

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evaluación de la Capacidad de Colonización Intestinal de un
Lactobacillus sp Proveniente de un Fermento Comercial**

María Alejandra Cabezas Alarcón

Tesis de grado presentada como requisito para la
Obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Quito

Diciembre 2009

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Evaluación de la Capacidad de Colonización Intestinal de un
***Lactobacillus* sp Proveniente de un Fermento Comercial**

María Alejandra Cabezas Alarcón

Gabriel Trueba, **Ph.D.**
Director y Miembro Comité de Tesis

Sonia Zapata, **Ph.D.**
Miembro Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, **Ph.D.**
Miembro Comité de Tesis

Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales
Stella de la Torre, **Ph.D.**

Quito
Diciembre 2009

©Derechos de autor

María Alejandra Cabezas Alarcón
2009

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía a lo largo de mi vida

A mis padres y hermano por todo su apoyo y esfuerzo durante mi carrera

AGRADECIMIENTO

A los Doctores Gabriel Trueba y Sonia Zapata por todos sus consejos y ayuda en la elaboración del proyecto

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. En especial a Juan Carlos Escobar y Sara Cifuentes por todos sus consejos y enseñanzas

A mis padres y hermano por siempre haber tenido una palabra de aliento para mí y nunca haber dejado de confiar en mi capacidad y conocimientos

RESUMEN

En el siguiente estudio se estableció la capacidad de colonización *in vivo* de dos cepas de *Lactobacillus* sp. obtenidas de dos fuentes distintas, la una de estómago de ratón Balb – C y la otra de fermento comercial marca DANISCO. El propósito de este estudio fue determinar si las cepas industriales pueden colonizar el intestino de un ratón en igual magnitud que las cepas intestinales.

Tanto la cepa obtenida de fermento comercial DANISCO como la aislada de estómago de ratón Balb – C se inocularon en ratones Balb – C. Se utilizaron 15 ratones Balb – C para este estudio, en 5 de ellos se inoculó la cepa aislada de fermento comercial marca DANISCO, en otros 5 se inoculó la cepa obtenida de estómago de ratón Balb – C y los 5 restantes fueron utilizados como animales de control.

Posterior a la inoculación de las cepas en ratones Balb – C, estos fueron sacrificados para sembrar parte de su contenido intestinal y poder corroborar si tanto los microorganismos de la cepa aislada de fermento DANISCO como aquellos de la cepa aislada de estómago de ratón Balb – C habían colonizado o no el intestino de sus hospedadores.

Al finalizar el estudio se evidenció que los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial DANISCO poseen menor capacidad de colonizar el intestino de ratones Balb – C que aquellos que se aislaron del estómago de ratón Balb – C que se inocularon en los mismos ratones.

ABSTRACT

The following research established the capability of colonization of two different strains of *Lactobacillus* sp., one of them was obtained from the stomach of a Balb – C mouse and the other one was isolated from a commercial ferment DANISCO. The propose of this research was to determine if a commercial strain has the same capability to colonize the gut of a Balb – C mouse than the intestinal strains.

The commercial strain and the one isolated from the stomach of a Balb – C mouse were inoculated in Balb – C mice. Fifteen Balb – C mice were used in all the research, the commercial strain was inoculated in 5 of them, the strain isolated from the stomach of the Balb – C mouse was inoculated in 5 ice and the last five mice were used as animals of control.

After the inoculation of both strains in Balb – C mice the animals were sacrificed to sow part of the content of their gut so that it can be possible to see if the microorganisms of the commercial strain and those of the strain isolated from the stomach of a Balb – C mouse have or not colonize the gut of their host.

The study showed that the *Lactobacillus* sp. isolated from a commercial ferment have reduced ability to colonize the intestine than those which were isolated from the stomach of a Balb – C mouse and were inoculated in Balb – C mice.

TABLA DE CONTENIDOS

Universidad San Francisco de Quito	ii
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
TABLA DE CONTENIDOS	viii
1. Introducción	1
1.1. Los Probióticos	2
1.2. Beneficios de los Probióticos	4
1.4. Los Probióticos en el Intestino	6
1.4.1. Origen Natural de los Probióticos	6
1.5. El Género <i>Lactobacillus</i>	7
2. Objetivo General	8
3. Objetivos específicos	8
4. Justificación	9
5. Área de Estudio	10
6. Materiales, Reactivos y Equipos	10
6.1. Material	10
6.1.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. del Estómago de Ratón	11
6.1.2. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. de Fermento Comercial DANISCO	11
6.2. Identificación Cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.	11
6.2.1. Kit para Tinción Gram	11

6.3. Aislamiento de Cepas de Bacilos Gram Positivos	12
6.4. Antibiogramas	12
6.5. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)	12
6.6. Conteo de <i>Lactobacillus</i> sp.	13
6.6.1. Elaboración de Diluciones	13
6.6.2. Montaje de Diluciones en Cámara Petroff Hauser	13
6.6.3. Conteo de <i>Lactobacillus</i> sp.	13
6.7. Inoculación de <i>Lactobacillus</i> sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina Aislados de Fermento Comercial y de estómago de Ratón en Ratonés Balb – C.	14
6.8. Sacrificio y Siembra del Contenido Intestinal de Ratonés	14
7. Metodología	14
7.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. del Estómago de Ratón y de Fermento Comercial DANISCO	14
7.1.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. del Estómago de Ratón	14
7.1.2. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. de Fermento Comercial marca DANISCO	15
7.1.3. Aislamiento de Cepas de Bacilos Gram Positivos	16
7.3. Antibiogramas	17
7.4. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)	17
7.4.1. Elaboración de la Solución con Rifampicina	17
7.4.2. Obtención de Cepas Mutantes Resistentes a la Rifampicina Aisladas del Estómago de Ratón y de Fermento Comercial Marca DANISCO	18
7.5. Conteo de <i>Lactobacillus</i> sp.	18
7.5.1. Administración de <i>Lactobacillus</i> sp. a Ratonés	18
7.6. Colonización de Intestinos de Ratón	19
7.7. Sacrificio y Siembra del Contenido Intestinal de Ratonés	20
8. Resultados	20
8.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp.	20

8.2. Identificación de <i>Lactobacillus</i> sp.	21
8.3. Antibiogramas	21
8.4. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)	22
8.5. Conteo de <i>Lactobacillus</i> sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina	22
8.6. Siembra del Contenido Intestinal de Ratonés	22
9. Discusión	23
10. Conclusiones	25
11. Recomendaciones	26
12. Limitaciones	27
12. Bibliografía	28
13. Figuras	30
Figura 1. Ratón ingiriendo <i>Lactobacillus</i> sp.	30
Figura 2. Tinción Gram de <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de fermento DANISCO vistos al microscopio	31
Figura 3. Tinción Gram de <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de estómago de ratón vistos al microscopio	32
Figura 4. <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de estómago de ratón sensibles a la rifampicina	33
Figura 5. <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de fermento DANISCO sensibles a la rifampicina	34
Figura 6. <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de estómago de ratón resistentes a la rifampicina	35
Figura 7. <i>Lactobacillus</i> sp. aislados de estómago de fermento DANISCO resistentes a la rifampicina	36
Figura 8. <i>Lactobacillus</i> sp. recuperados del intestino de ratón alimentado con <i>Lactobacillus</i> sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón	37
Figura 9. Tinción Gram de <i>Lactobacillus</i> sp. recuperados de intestino de ratón alimentado con <i>Lactobacillus</i> sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón vistos al microscopio	38
14. Tablas	39
Tabla 1. Medida de los halos de sensibilidad a la rifampicina	39

Tabla 2. Concentración microbiana por mL de cultivo de <i>Lactobacillus</i> sp. mutantes resistentes a la rifampicina	40
Tabla 3. Resultados de la siembra del contenido intestinal de los ratones alimentados con <i>Lactobacillus</i> sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón	41
16. Anexos	42
16.1. ANEXO 1 Instrucciones para elaborar la solución nutricia.	42

1. Introducción

Las infecciones intestinales son un grave problema de salud pública en países en desarrollo como Ecuador. El síndrome diarreico sistémico, es el responsable de 10 millones de muertes anuales en África, Asia y Latinoamérica. Las bacterias patógenas causantes de diarrea más comunes son *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Vibrio colerae*, a las que se debe sumar virus y parásitos. (Ordoñez 1985).

Se sabe que las bacterias de la flora intestinal constituyen una barrera protectora contra infecciones y se ha sugerido que el aumento de estas bacterias en el intestino podría fortalecer la misma. Los alimentos funcionales tienen el propósito de incrementar la flora intestinal para reforzar la barrera protectora contra bacterias patógenas, algunos de estos alimentos están enriquecidos con probióticos (bacterias lácticas similares a las que existen en el intestino delgado) (Eckburg 2005).

Se ha sugerido que los alimentos funcionales podrían constituir una alternativa para la prevención de infecciones intestinales ya que el costo de los mismos es relativamente accesible para toda la población (Ordoñez 1985).

Para que un probiótico sea efectivo, es necesario que se adhiera a la mucosa intestinal. Hasta la actualidad no se ha comprobado la adhesión de muchos

probióticos al intestino ni su colonización por largos períodos de tiempo (Berg 1998).

1.1. Los Probióticos

Según Fuller, citado por Collins 1999, un probiótico es un alimento que contiene microorganismos vivos que benefician al hospedador ayudando a mantener un balance microbiano en su intestino. Este tipo de alimentos incluyen leches fermentadas como yogurt, así como cualquier otro tipo de alimentos que se hayan elaborado con microorganismos. Generalmente los microorganismos que se utilizan para elaborar estos alimentos son todos aquellos que producen ácido láctico, entre los cuales cabe mencionar a los *Lactobacillus* y las bifidobacterias (Collins 1999).

Un probiótico es considerado también como un microorganismo no patógeno que cuando se ingiere continuamente logra colonizar el intestino del hospedador rápidamente pudiéndose observar cambios beneficiosos en la salud del mismo (Novak 2006).

Los probióticos han sido sujetos de un sinnúmero de estudios con el fin de evaluar la posibilidad de utilizarlos con fines terapéuticos. Se los ha descrito como un agente bioterapéutico, el cual se podría utilizar para inhibir la colonización de un microorganismo patógeno en el tracto intestinal (D' Souza 2002). Este tipo de

microorganismos en ciertos alimentos protegerían de un sinnúmero de problemas de salud, no sólo de tipo infeccioso sino también problemas autoinmunes e inflamatorios (Batista de Morais 2006).

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir con las siguientes características:

- Ser de origen humano
- No ser patógeno
- Ser resistente a los ácidos del intestino y la bilis
- Tener las características para sobrevivir en el tracto intestinal
- Tener la capacidad de influir en las actividades metabólicas (Batista de Morais 2006)
- Provocar un efecto beneficioso en el hospedador
- Contener un alto número de células viables
- Permanecer viable durante su almacenamiento y uso, una vez que se haya elaborado el producto final (Collins 1999)

Actualmente los probióticos son considerados como una terapia complementaria para combatir a aquellas bacterias patógenas, inclusive son utilizados contra aquellos microorganismos que han desarrollado resistencia a los antibióticos (Berg 1998).

1.2. Beneficios de los Probióticos

A los probióticos se les atribuye las siguientes propiedades, entre las más importantes constan:

- Aliviar los síntomas de la intolerancia a la lactosa
- Incrementar las defensas del organismo contra infecciones intestinales
- Disminuir los niveles del colesterol sérico
- Ayudar en el proceso de la digestión
- Estimular la inmunidad gastrointestinal
- Prevenir la colonización del intestino por patógenos
- Reforzar la barrera epitelial
- Disminuir el riesgo de infecciones intestinales causadas por rotavirus (Collins 1999)
- Estimular la producción de linfocitos y anticuerpos
- Incrementar el sistema inmune por medio de efectos adyuvantes (McCracken 1999)

1.3. Probióticos de los Alimentos Funcionales

Los probióticos más utilizados en la elaboración de leches fermentadas para el consumo humano son aquellos que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, estos géneros son utilizados bien en conjunto o cada uno por

separado. Hay estudios en los que se menciona que otros géneros no patógenos como *Escherichia*, *Enterococcus* y *Bacillus* y otro tipo de organismos vivos como levaduras del género *Sacharomyces* han sido utilizados para la elaboración de alimentos funcionales (Swajewska 2006). Sin embargo se ha comprobado que aquellos probióticos que tienen un mayor y mejor efecto en la salud intestinal humana son aquellos de origen humano (Parracho 2007).

Hay dos microorganismos de los que no se tiene certeza si deberían o no ser considerados como probióticos, estas bacterias son los *Lactobacillus bulgaricus* y los *Streptococcus thermophilus*, los cuales son y han sido utilizados a través de los años para la elaboración de yogurt. Se desconoce si son o no beneficiosos en el intestino del hospedador debido a que no poseen las características necesarias para poder resistir a las condiciones del estómago humano, pues por lo general no logran llegar hasta el intestino (Swajewska 2006).

Hay que tener en cuenta que para que estos alimentos sean efectivos, se requiere de un mínimo de unidades formadoras de colonias (UFCs) de probióticos. Sin embargo hasta el momento no se ha encontrado una dosis exacta en ningún estudio realizado. Algunos fabricantes de productos naturales recomiendan una dosis diaria de cinco mil millones de probióticos durante 5 días, esto es para aquellos probióticos que han sido recetados. Para obtener resultados a nivel terapéutico ingiriendo este tipo de microorganismo se recomienda una dosis diaria de entre 10^6 a 10^9 UFCs por día. A pesar de que estas dosis mínimas son las

sugeridas, se requiere de una investigación completa que determine la dosis exacta para la administración de este tipo de microorganismos (Swajewska 2006). Algunos autores sugieren que si se quiere observar un efecto positivo en infantes para prevenir diarreas o alergias es necesario que se les empiece a suministrar estos microorganismos lo más temprano posible, a medida que su microflora empieza a incrementarse, con el fin de que los mismos se puedan establecer en su intestino y lleguen a ser parte del mismo (Batista de Morais 2006).

1.4. Los Probióticos en el Intestino

1.4.1. Origen Natural de los Probióticos

El intestino fetal es estéril, este empieza a colonizarse a partir del parto vaginal en donde el feto tiene contacto con las bacterias vaginales y las de la flora intestinal de la madre. Aquellos niños nacidos por cesárea inician la colonización de su tracto intestinal al momento en que se alimentan con leche materna por primera vez. Aquellos bebés que son alimentados con leche materna tienen en su microflora al menos un 90% de *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium*, mientras que aquellos que son alimentados con fórmulas tienen únicamente entre un 40% a 60% de dichos microorganismos en su intestino (Batista de Morais 2006).

Adicionalmente es necesario mencionar que en el tracto intestinal existe una gran variedad de bacterias (más de 1000 especies distintas) que ayudan a prevenir que microorganismos patógenos lo colonicen. Además en el intestino se cuenta con barreras como la acidez, movimientos peristálticos y la eliminación de

microorganismos extraños por medio de la mucosa intestinal. Este tipo de mecanismos de defensa ayudan en muchas ocasiones a combatir la colonización de microorganismos patógenos (McCracken 1999).

1.5. El Género *Lactobacillus*

Las bacterias del género *Lactobacillus* son microorganismos que por lo general se los puede encontrar en el intestino delgado y la vagina de los seres humanos. Algunas bacterias de este género son consideradas benéficas debido a que producen vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y bacteriocina, las cuales ayudan a combatir y prevenir infecciones en sus hospedadores (Ried 2004).

Las bacterias del género *Lactobacillus* son los microorganismos más utilizados como probióticos de consumo humano, debido a que se los considera seguros por el hecho de que han sido utilizados durante varios años (Berg 1998). Se ha reportado que *Lactobacillus casei* GG (aislado de heces humanas) ayuda a una recuperación más rápida de ciertos tipos de diarrea, incluyendo aquellas diarreas inducidas por un mal uso de antibióticos o por *Rotavirus* (McCracken 1999).

Debido a la gran incertidumbre que existe en el mundo sobre la eficacia de los probióticos para colonizar el intestino se decidió realizar este estudio con el fin de poder corroborar si los probióticos utilizados, sobre todo, en fermentos comerciales para la elaboración de yogurts u otros alimentos funcionales son ó no

capaces de realizar colonizaciones *in vivo* sobreponiéndose al ambiente hostil del tracto intestinal de un ser vivo.

2. Objetivo General

- Comparar la capacidad de colonización intestinal de dos cepas de *Lactobacillus* sp. aislados de fermentos lácticos y de estómago de ratón.

3. Objetivos específicos

- Aislar dos cepas distintas de *Lactobacillus* sp., una de fermento comercial, YO - MIX marca DANISCO, y otra del estómago de ratón con el fin de comparar su capacidad de colonización *in vivo*.
- Obtener colonias mutantes de las dos cepas de *Lactobacillus* sp. resistentes a la rifampicina para poder recuperarlas e identificarlas con mayor facilidad luego de su inoculación en ratones.
- Determinar el número de *Lactobacillus* sp. resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón y de fermento comercial marca DANISCO que crecen en el intestino delgado.

4. Justificación

Existen varios estudios que han postulado los beneficios y los múltiples usos que pueden tener las bacterias ácido lácticas como probióticos en la salud humana. Existen ya varios productos que contienen bacterias ácido lácticas que han sido estudiados demostrando su efectividad para beneficiar la salud humana. Los productos que contienen este tipo de microorganismos se comercializan en presentación líquida (yogurt) o en polvo (leches), también a manera de granulados o tabletas (Lin 2006). En la actualidad es necesario estudiar el mecanismo de acción mediante el cual los probióticos benefician a la salud humana debido al incremento de enfermedades de carácter infeccioso, autoinmunes y alergias. Como se mencionó anteriormente existe la expectativa de que estos microorganismos sean a futuro una alternativa inclusive contra aquellas bacterias que desarrollan resistencia a los antibióticos.

El interés por encontrar un tratamiento contra procesos infecciosos ha llevado a explorar la posibilidad de incrementar la microflora con microorganismos exógenos, como probióticos, con el fin de prevenir o controlar procesos infecciosos intestinales. Se ha sugerido también la posibilidad de modificar la microflora con el propósito de aumentar la proporción de microorganismos que se conoce tienen efectos benéficos. (Batista de Morais 2006).

Sin embargo hasta el momento no ha sido posible tener un conocimiento del mecanismo de acción de los probióticos *in vivo*, por lo que no es posible realizar

una acertada selección de las mejores cepas y especies que puedan beneficiar a la salud humana (Berg 1998).

En la actualidad existe mucha expectativa sobre la eficacia de los probióticos *in vivo*. Sin embargo hasta el momento no ha sido posible comprobar la adhesión de estos microorganismos al intestino humano ni su capacidad para colonizarlo. Con la finalidad de conocer si estos microorganismos tienen o no la capacidad para colonizar el intestino al igual que las cepas intestinales se hizo la presente investigación.

5. Área de Estudio

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Cumbayá – Ecuador desde abril del 2008 hasta enero del 2009. Las cepas de *Lactobacillus sp.* estudiadas se aislaron del estómago de un ratón y de un fermento comercial marca DANISCO.

6. Materiales, Reactivos y Equipos

6.1. Material

Se utilizaron dos diferentes cepas de *Lactobacillus sp.* para este estudio. Una se aisló del estómago de un ratón y la segunda se obtuvo de un fermento comercial DANISCO.

6.1.1. Obtención de *Lactobacillus* sp. del Estómago de Ratón

- Ratón Balb – C
- Kit de disección
- Alcohol al 90%
- Solución Nutricia (Ver ANEXO 1)
- Agar MRS marca DIFCO
- Incubadora marca LAB LYNE IMPERIAL II INCUBATOR

6.1.2. Obtención de *Lactobacillus* sp. de Fermento Comercial DANISCO

- Fermento Comercial marca DANISCO
- Leche estéril
- Agar MRS marca DIFCO
- Baño María marca BLUE M

6.2. Identificación Cepas de *Lactobacillus* sp.

6.2.1. Kit para Tinción Gram

- Cristal Violeta
- Lugol
- Solución Decolorante de Alcohol – Cetona en proporción 1:1

- Safranina
- Aceite de Inmersión
- Microscopio marca LEICA SMF

6.3. Aislamiento de Cepas de Bacilos Gram Positivos

- Cepas que contengan bacilos Gram positivos
- Agar MRS marca DIFCO

6.4. Antibiogramas

- Discos de Rifampicina
- Discos de Gentamicina
- Discos de Ciproflaxina
- Discos de Eritromicina
- Discos de Clindamicina
- Discos de Trimetoprim Sulfametoxazol
- Discos de Cefoxitina

6.5. Obtención de *Lactobacillus* sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)

- Rifampicina

- Etanol
- Agar MRS marca DIFCO
- Caldo MRS marca DIFCO

6.6. Conteo de *Lactobacillus* sp.

6.6.1. Elaboración de Diluciones

- Solución Salina al 0,9%
- Tubos de Ensayo Estériles

6.6.2. Montaje de Diluciones en Cámara Petroff Hauser

- Micropipetas
- Dilución 10^{-3} de *Lactobacillus* mutantes resistentes a la Rifampicina
- Cámara Petroff Hauser

6.6.3. Conteo de *Lactobacillus* sp.

- Microscopio de campo obscuro marca OLYMPUS
- Cámara Petroff Hauser

6.7. Inoculación de *Lactobacillus* sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina Aislados de Fermento Comercial y de estómago de Ratón en Ratones Balb – C.

- 15 Ratones Balb – C
- Micropipetas
- Dilución 10^{-3} de *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la Rifampicina aislados de Fermento Comercial DANISCO
- Dilución 10^{-3} de *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la Rifampicina aislados de intestino de ratón
- Dilución 10^{-3} de caldo MRS marca DFCO con $75\mu\text{g/ml}$ de Rifampicina

6.8. Sacrificio y Siembra del Contenido Intestinal de Ratones

- Cloroformo
- Alcohol al 90%
- Agar MRS marca DIFCO con Rifampicina

7. Metodología

7.1. Obtención de *Lactobacillus* sp. del Estómago de Ratón y de Fermento Comercial DANISCO

7.1.1. Obtención de *Lactobacillus* sp. del Estómago de Ratón

Los *Lactobacillus* sp. fueron aislados del estómago de un ratón. Para esto se sacrificó un ratón utilizando cloroformo. Posteriormente se limpio el abdomen del animal con alcohol y se procedió a abrirlo con la ayuda de una tijera y pinzas. Una vez abierto el abdomen del ratón se identificó el intestino del mismo, del cual se cortó un pedazo de 3 cm aproximadamente y se lo colocó en un tubo de ensayo con solución nutritiva. La muestra de intestino fue incubada durante 24 horas a 37°C. Luego de la incubación se realizó un hisopado del caldo de la solución nutritiva en 4 placas con agar MRS las cuales fueron incubadas durante 24 horas más a 37°C.

7.1.2. Obtención de *Lactobacillus* sp. de Fermento Comercial marca DANISCO

Los microorganismos presentes en el fermento comercial de DANISCO están liofilizados, por lo tanto antes de realizar su aislamiento se los debe restituir utilizando leche previamente esterilizada. Por cada 500 mL de leche se colocaron 0,023 g de fermento DANISCO. Esta mezcla se incubó en baño maría (37°C) con agitación constante durante 12 horas. Posterior a la incubación se procedió a sembrar la mezcla anterior en 4 placas petri con agar MRS, para esto se empapo un hisopo estéril con la mezcla y se sembró la mezcla, estas placas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia de oxígeno dentro de una jarra gas pack a 37°C.

7.1.3. Aislamiento de Cepas de Bacilos Gram Positivos

Luego de las 24 horas de incubación, tanto del intestino de ratón como de la mezcla del fermento DANISCO se procedió a realizar tinciones Gram de las colonias puntiformes con el fin de aislar todas aquellas en las que se podían observar bacilos Gram positivos.

Para realizar la tinción Gram primero se fijo parte de la muestra en un portaobjetos, para esto se colocó una gota de agua destilada en el medio de la placa, posteriormente se tomó un poco de muestra de una de las colonias de interés, una vez mezclada la muestra con el agua destilada se fijó la misma al calor, teniendo la debida precaución para evitar que la muestra se sobrecaliente.

Posteriormente se colocó cristal violeta por un minuto sobre la muestra, luego del minuto se enjuagó la placa con agua evitando que el chorro caiga directamente sobre la muestra. Se secó la placa con cuidado y sin topar la muestra, se procedió a colocar lugol sobre la misma y se esperó un minuto, luego se lavó la placa nuevamente, se la secó y se procedió a colocar alcohol cetona sobre la misma. Una vez colocado el alcohol cetona se enjuagó la placa y se colocó safranina sobre la muestra durante 30 segundos, posteriormente se enjuagó la placa y se dejó secar completamente.

Una vez realizada la tinción Gram se observaron las muestras en el microscopio, para esto se colocó una gota de aceite de inmersión en cada una de las placas, las cuales se observaron con un aumento de 100X. Todas aquellas colonias que contenían bacilos Gram positivos fueron sembradas, por duplicado, en placas

petri con agar MRS e incubadas en anaerobiosis repetidas veces (de 3 a 4) hasta que se logró obtener un cultivo denso de *Lactobacillus*.

7.3. Antibiogramas

Los antibiogramas fueron realizados en agar MRS debido a que en ningún otro medio había crecimiento de *Lactobacillus* sp. En las pruebas se utilizaron 7 distintos antibióticos (gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina, clindamicina, trimetoprim sulfametoxazol, cefoxitina y rifampicina) con la finalidad de ver la resistencia y sensibilidad de las cepas a los mismos.

7.4. Obtención de *Lactobacillus* sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)

7.4.1. Elaboración de la Solución con Rifampicina

Se diluyeron 0,34 gramos de rifampicina en 10 mL de etanol, con el fin de obtener una solución stock (34mg/mL) una vez homogenizada la muestra se colocaron 662 μ L de la misma en 300 mL de agar MRS para obtener una concentración de 75 μ g/mL de rifampicina en el medio de cultivo.

7.4.2. Obtención de Cepas Mutantes Resistentes a la Rifampicina Aisladas del Estómago de Ratón y de Fermento Comercial Marca DANISCO

Se realizó un lavado con 200 μ L de caldo MRS de aquellas placas petri con mayor densidad de colonias bacterianas puntiformes de bacilos Gram positivos. Posteriormente se tomaron 150 μ L del lavado y se los sembró, por duplicado, en placas petri que contenían agar MRS + 75 μ g/mL de rifampicina con la finalidad de obtener mutantes espontáneos resistentes a dicho antibiótico. Estas cajas fueron incubadas durante 48 horas en ausencia de oxígeno a 37°C.

Luego de las 24 horas de cultivo se realizó una tinción Gram con el fin de corroborar que las bacterias que habían crecido en el medio con antibiótico eran las mismas que fueron inoculadas anteriormente. Estas colonias fueron cultivadas en MRS + 75 μ g/ml de rifampicina para obtener una mayor población de las mismas.

7.5. Conteo de *Lactobacillus* sp.

7.5.1. Administración de *Lactobacillus* sp. a Ratones

Para realizar el conteo de microorganismos viables/mL de muestra se realizaron lavados de las placas petri con 1000 μ L de caldo MRS de los cuales se tomaron 10 μ L para sembrarlos en 9 mL de caldo MRS con 75 μ g/mL de rifampicina, los cuales fueron incubados durante 24 horas a 37°C.

Posteriormente se procedió a realizar diluciones de dichos cultivos con el fin de facilitar el conteo de los microorganismos. Las diluciones se realizaron

colocando 1 mL de cultivo en 9 mL de solución salina al 0,9%, la primera dilución tenía una concentración de 10^{-1} , al colocar 1 mL de la primera dilución en 9 mL de solución se obtuvo una dilución 10^{-2} , esto se realizó una vez más para obtener una dilución 10^{-3} . De esta última dilución se colocaron 10 μ L en una cámara de conteo Petroff Hauser y se colocó un cubreobjetos sobre la misma; posteriormente se realizó el conteo en un microscopio de campo oscuro, cada una de las muestras se contó por triplicado con el fin de obtener un promedio de los microorganismos viables de las mismas.

7.6. Colonización de Intestinos de Ratón

Cinco ratones fueron alimentados con *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina obtenidos del estómago de ratón, cinco más se alimentaron con *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de fermento DANISCO y cinco más, que fueron utilizados como control, fueron alimentados con caldo MRS + 75 μ g/mL de rifampicina. Cada uno de los ratones fue alimentado con una dilución 10^{-3} de cada una de las muestras.

La administración de bacterias a los ratones se la realizó luego de dejar a los mismos durante 1 hora sin agua con el fin de que ingieran todo el líquido que se les dio. Se administró 1 mL de muestra en una dilución de 10^{-3} en la cual había una concentración de $1,4 \times 10^{10}$ microorganismos/mL de solución para el caso de los *Lactobacillus* sp. aislados del estómago de ratón y una de $1,86 \times 10^{11}$

microorganismos/mL de solución para el caso de los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial DANISCO, los cuales les fueron administrados en alícuotas de 100 µL cada media hora como se observa en la Figura 1.

7.7. Sacrificio y Siembra del Contenido Intestinal de Ratones

Se sacrificaron los quince ratones alimentados con el fin de poder sembrar parte de su contenido intestinal. Se abrió el abdomen de los ratones para identificar el intestino de los mismos, el intestino se cortó en el medio con la finalidad de poder obtener parte del contenido del mismo y sembrarlo, por duplicado, en pacas petri con agar MRS + 75 µg/mL de rifampicina, la muestra del contenido intestinal fue extendida utilizando hisopos estériles. Dichas placas petri fueron selladas con parafilm y se incubaron en gas packs durante 48 horas a 37°C.

8. Resultados

8.1. Obtención de *Lactobacillus* sp.

Se realizaron cultivos en varios medios, sin embargo el crecimiento de *Lactobacillus* sp. aislados del estómago de ratón se observó únicamente en la solución nutritiva (ver ANEXO 1) y posteriormente parte de la población bacteriana que se desarrollo en dicho medio presentó crecimiento en agar MRS.

En el caso de los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial DANISCO, se pudo observar crecimiento en varios medios de cultivo, presentándose una mayor población en agar MRS.

8.2. Identificación de *Lactobacillus* sp.

Para poder verificar si las colonias que presentaban crecimiento en MRS pertenecían o no al género *Lactobacillus* se realizaron tinciones Gram, además dicho medio es específico para los mencionados microorganismos. Luego de realizar las tinciones fue posible observar al microscopio bacilos Gram positivos tal como lo muestra las Figuras 2 y 3.

8.3. Antibiogramas

Los *Lactobacillus* sp. aislados del estómago de ratón presentaron sensibilidad a la rifampicina, con un halo de 3,8 cm. Mientras que los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial DANISCO presentaron sensibilidad a la rifampicina con un halo de 3,5 cm como se indica en la Tabla 1 y en las Figuras 4 y 5.

8.4. Obtención de *Lactobacillus* sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina (Ra)

El crecimiento de los *Lactobacillus* sp. se observó a las 48 horas de sembrarlos en MRS con 75 µg/mL de rifampicina. Posterior al crecimiento se corroboraron dichos resultados al sembrar los mutantes resistentes a la rifampicina en MRS, colocando únicamente un disco de rifampicina en el medio de la placa petri, el crecimiento de estos fue abundante y no se observó halo lo cual se puede corroborar en las Figuras 6 y 7.

8.5. Conteo de *Lactobacillus* sp. Mutantes Resistentes a la Rifampicina

Una vez realizado el conteo se encontró que la concentración de microorganismos/mL de cultivo era de $1,4 \times 10^{10}$ microorganismos/mL de cultivo para los *Lactobacillus* sp. aislados de estómago de ratón, mientras que la concentración de los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial DANISCO era de $1,86 \times 10^{11}$ microorganismos/mL de cultivo, tal como se puede ver en la tabla 2.

8.6. Siembra del Contenido Intestinal de Ratones

Luego de sembrar el contenido intestinal en MRS con rifampicina de los quince ratones utilizados para la investigación se observó, únicamente, crecimiento

de levaduras en los cinco que fueron alimentados con *Lactobacillus* sp. provenientes del fermento comercial DANISCO. Iguales resultados se obtuvieron de los cinco animales que se alimentaron con caldo MRS + 75µg/mL de rifampicina. En tres de los cinco que se alimentaron con *Lactobacillus* sp. mutantes aislados de estómago de ratón se observó crecimiento de *Latobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina como lo muestran las Figuras 8 y 9, en los dos restantes, únicamente, hubo crecimiento de levaduras como se puede observar en la Tabla 3.

Se realizó una prueba estadística no binomial con el fin de conocer si los resultados obtenidos se debieron o no al azar, de la cual se arrojó una probabilidad de 0,30.

9. Discusión

La comparación en el grado de colonización de los *Lactobacillus* provenientes de intestino y aquellos de un fermento comercial sugiere que las bacterias adaptadas al crecimiento en medios artificiales han perdido la capacidad de colonizar o sobrevivir en condiciones intestinales. Estos resultados están en concordancia con la noción de que los organismos sometidos a ambientes distintos a los que originalmente colonizan, sufren procesos adaptativos que los hace más exitosos en las nuevas condiciones pero pierden la capacidad de multiplicarse en el medio original. El proceso en el cual un organismo se adapta a un nuevo ambiente y pierde competitividad en el medio original ocurre por mutaciones aleatorias en genes (Remold 2001).

De acuerdo con McCracken (2001) existen alrededor de 300 distintas especies de microorganismos en el tracto intestinal, lo cual genera un ambiente hostil dentro del intestino, pues la flora microbiana existente compite por nutrientes y espacio. Para que un organismo pueda ingresar a este ambiente requiere poseer una serie de atributos que le permita colonizar el mismo. El presente estudio sugiere que son probablemente algunos de estos atributos los que disminuyen durante el proceso de adaptación a medios artificiales.

Los resultados de este estudio sugieren que la administración de probióticos provenientes de cultivos artificiales no tiene mayor impacto en la composición de la microbiota intestinal. Según Corthésy (2007) hay cepas de probióticos que no colonizan el intestino ni permanecen en él por largos períodos por lo que el consumo de estos debe ser permanente. Adicionalmente Dunne (2001) argumenta que hay pocas posibilidades de que una sola cepa de probióticos tenga la capacidad de influenciar beneficiosamente la salud intestinal del hospedador afectando positivamente su microflora.

Los ratones fueron sacrificados luego de 5 días de haber sido alimentados, lo que pudo causar que los *Lactobacillus* sp. obtenidos del fermento de DANISCO hayan muerto en el intestino de los mismos. Con lo cual quedaría descartada la posibilidad de que los microorganismos presentes en el fermento sean considerados como un probiótico, pues no se reprodujeron y no tuvieron la capacidad de permanecer viables en el intestino, ya que según Collins (1999), el desarrollo,

proliferación y colonización en el intestino, son características fundamentales de un probiótico.

10. Conclusiones

- El protocolo utilizado en esta tesis ha demostrado ser un esquema válido para evaluar la capacidad de colonización de probióticos *in vivo*.
- Los *Lactobacillus* sp. aislados de fermento comercial e inoculados en ratones Balb – C que fueron utilizados en este estudio poseen una menor capacidad para colonizar el intestino de un ser vivo que aquellos que fueron aislados del estómago de ratón e inoculados en ratones Balb – C.
- La prueba de estadística realizada arrojó un valor que indica que los resultados del presente estudio se pueden haber debido únicamente al azar, pues 0,30 es una probabilidad no significativa.

11. Recomendaciones

- La efectividad de los probióticos debe ser evaluada a mayor profundidad, realizando más experimentos en los cuales se utilicen distintas concentraciones de probióticos para alimentar a los animales en estudio, se los alimente mayor número de veces y por distintos tiempos con el fin de observar cual de las técnicas es la que da mejores resultados *in vivo*.
- Con la finalidad de obtener mayor variabilidad de resultados, se recomienda también, realizar investigaciones con mayor número de animales siguiendo los mismos pasos que se han descrito en el presente proyecto.
- Se recomienda para estudios futuros comparar distintas cepas de distintos fermentos con la cepa que se obtuvo del estómago de ratón.

12. Limitaciones

Una de las posibles limitaciones del estudio realizado es que las condiciones intestinales (tejidos y microflora) de los ratones sean muy distintas a las que se encuentran en el intestino de los seres humanos.

Otra limitación fue el número de animales utilizados, sin embargo si siguen las recomendaciones del presente trabajo y el protocolo establecido a lo largo del mismo, se podrán obtener resultados más certeros sobre la capacidad de colonización de *Lactobacillus* sp. de fermentos comerciales.

12. Bibliografía

1. Batista de Morais Mauro, Miuki Abe Jacob Cristina. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. Jornal de Pediatria 82 (2006): S189 – 97.
2. Berg, Rodney. Probiotics, prebiotic or ‘conbiotics’? Trends in Microbiology volume 6 No. 3 (1998). 781S – 90s.
3. Castillo, Jorge. Lactobacilos. 1997. Visitado el 30 de mayo del 2008. Disponible en línea en: <http://www.monografias.com/trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml>
4. Collins David, Gibson Glenn. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. American Journal of Clinica Nutrition 69 (1999): 1052S – 7S.
5. Corthésy Blaise, Gaskins Rex, Mercenier Annick. Cross – Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. The Journal of nutrition 0022-3166/07 (2007)
6. D’ Souza Aloysius, Rajkumar Chakravarthi, Cooke Jonathan, Bulpitt Christopher. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta - analysis. British Medical Journal volume 324 (2002).
7. Dunne Colum, O’ Mahony Liam, Murphy Lisa, Thornton Gerardine, Morrissey Darrin, O’ Halloran Sile, Feeney Maria, Flynn Sarah, Fitzgerald Gerald, Daly Charles, Kiely Barry, C O’ Sullivan Geral, Shanahan Fergus, Collins Kevin. In vitro selection for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. American Journal of Clinica Nutrition 73 (2001): 368S – 92S.
8. Eckburg Paul, Bik Elisabeth, Bernstein Chares, Purdom Elizabeth, Dthlefsen Les, Sargent Michael, Gill Steven, Nelso Karen, Relman David. Diversity of the Human Intestinal Microflora. Scienceexpress 1110591 (2005).

9. Lin Wen – Hsin, Hwang Chin – Fa, Chen Li – Wei, Tsen Hau – Yang. Viable counts, characteristic evaluation for comercial lactic acid bacteria products. Food Microbiology 23 (2006): 74 – 81.
10. McCracken Vance J., Lorenz Robin G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Cellular Microbiology (2001) 3 (1), 1 – 11.
11. McCracken Vance J., Gaskins H Rex. Probiotics and the immune system. Probiotics: A Critical Review ISBN 1-898486-15-8 (1999): 85 – 111.
12. Novak Joshua, Katz Jeffrey. Probiotics and Prebiotics for Gastrointestinal Infections. Current Infections disease 8 (2006): 103 – 109.
13. Ordoñez Gabriel, Guderian Ronald, Andrade Germania, Barba de Chan Sonia, Bossano Rodrigo, Vaca Martha, Swinscoe Janeth, Guevara Angel, Araujo Edmundo. Etiología del Síndrome Diarreico Sitémico en Niños de Dos Años en la Ciudad de Quito. Revista Ecuatoriana de Medicina volumen XXI (1985): 65 – 84.
14. Parracho Helena, McCartney Anne, Gibson Glenn. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. Proceedings of the Nutrition Society 66 (2007): 405 – 411.
15. Remold Susanna K., Lenski Richard E. Contribution of individual random mutations to genotype-by-environment interactions in *Escherichia coli* *PNAS*. Volume 98 No. 20 September 25 (2001): 11388-11393
16. Ried, Karin. Gastrointestinal Health *The role of pro – and pre – biotics in standard foods*. Clinical Practice volume 33 No. 4 (2004): 253 – 255.
17. Szajewska Hania, Setty Mala, Mrukowicz Jacek, Guandalini Stefano. Probiotics in Gastrointestinal Diseases in Children: hard and Not – So – Hard evidence of Efficacy. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 42:454Y475 (2006): 454 – 475.

13. Figuras



Figura 1. Ratón ingiriendo *Lactobacillus* sp.



Figura 2. Tinción Gram de *Lactobacillus* sp. aislados de fermento DANISCO vistos al microscopio

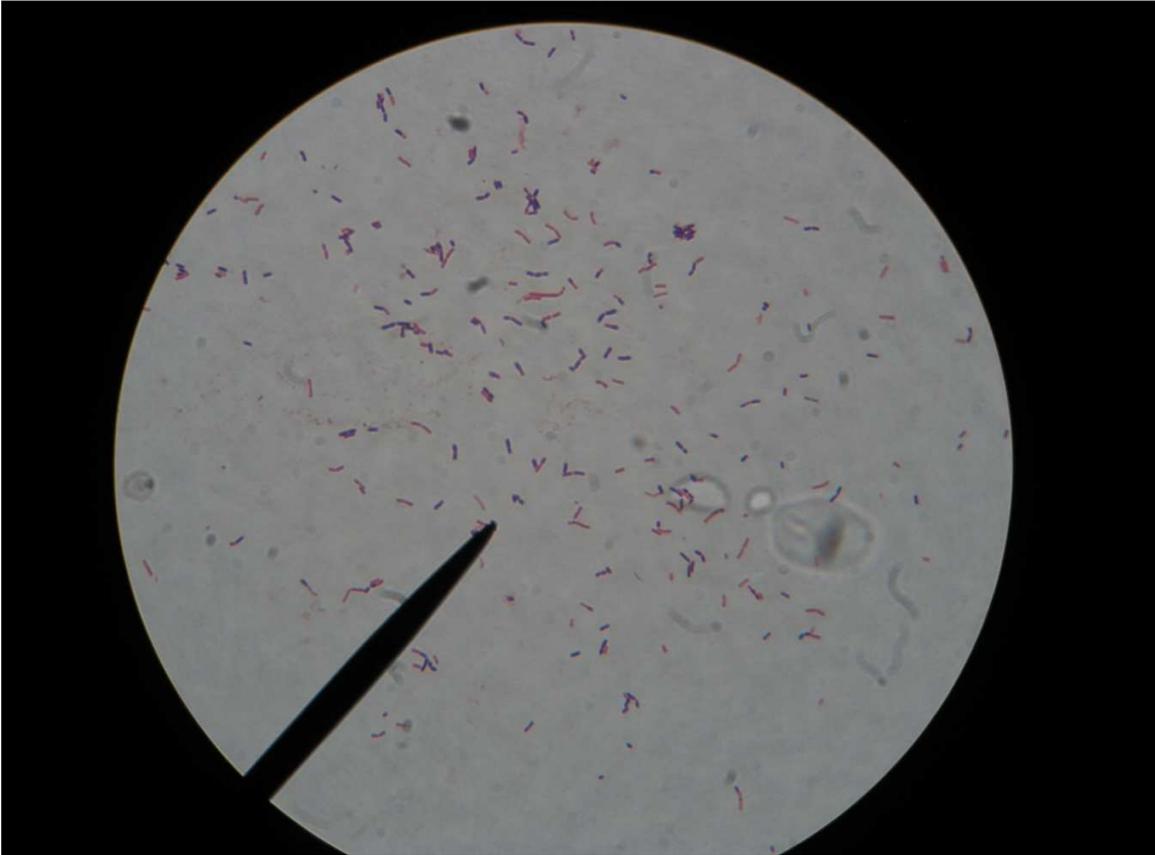


Figura 3. Tinción Gram de *Lactobacillus* sp. aislados de estomago de ratón vistos al microscopio



Figura 4. *Lactobacillus* sp. aislados de estómago de ratón sensibles a la rifampicina



Figura 5. *Lactobacillus* sp. aislados de fermento DANISCO sensibles a la rifampicina



Figura 6. *Lactobacillus* sp. aislados de estómago de ratón resistentes a la rifampicina



Figura 7. *Lactobacillus* sp. aislados de estomago de fermento DANISCO resistentes a la rifampicina



Figura 8. *Lactobacillus* sp. recuperados del intestino de ratón alimentado con *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón

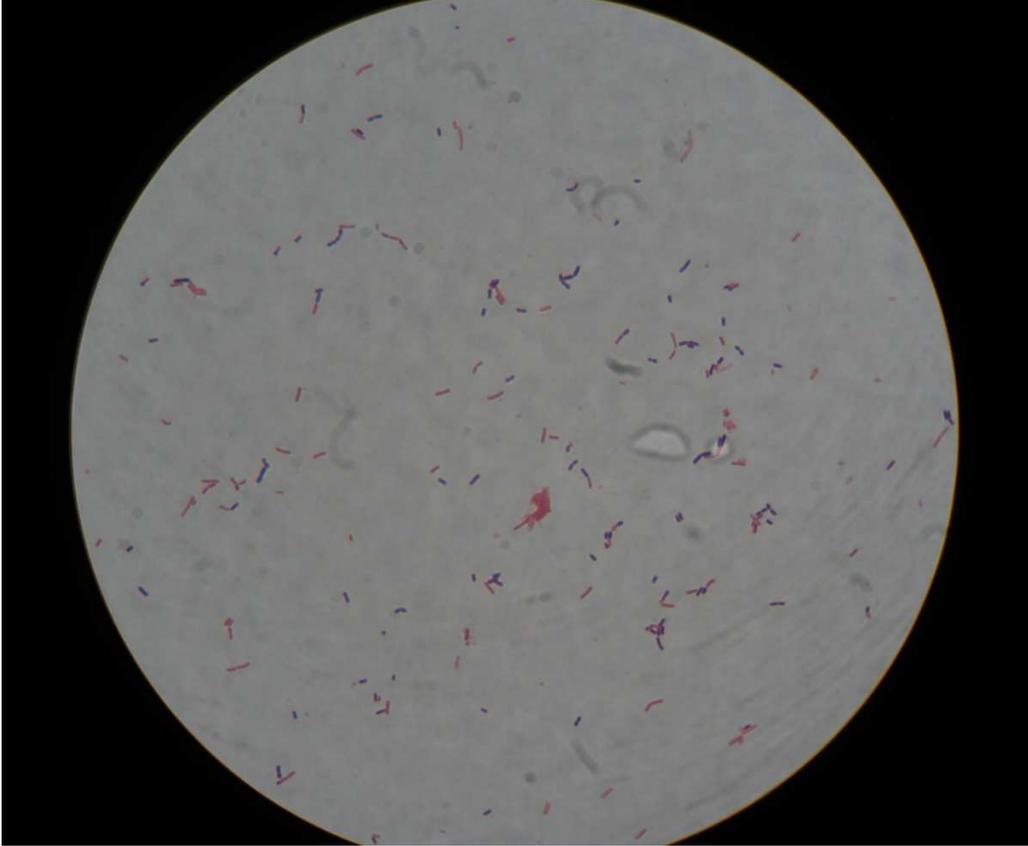


Figura 9. Tinción Gram de *Lactobacillus* sp. recuperados de intestino de ratón alimentado con *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón vistos al microscopio

14. Tablas

	Medida Halos (cm)
<i>Lactobacillus</i> sp. Fermento DANISCO	3,5
<i>Lactobacillus</i> sp. Estómago Ratón	3,8

Tabla 1. Medida de los halos de sensibilidad a la rifampicina

	UFC/mL
<i>Lactobacillus sp. Fermento</i> DANISCO	1,86 x 10 ¹¹
<i>Lactobacillus sp. Estómago Ratón</i>	1,4 x 10 ¹⁰

Tabla 2. Concentración microbiana por mL de cultivo de *Lacobacillus sp.* mutantes resistentes a la rifampicina

	Número de Colonias por Cultivo		
	Original	Duplicado	Promedio
Ratón 1	134	198	166
Ratón 2	113	78	95
Ratón 3	0	0	0
Ratón 4	0	0	0
Ratón 5	555	162	358

Tabla 3. Resultados de la siembra del contenido intestinal de los ratones alimentados con *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a la rifampicina aislados de estómago de ratón

16. Anexos

16.1. ANEXO 1 Instrucciones para elaborar la solución nutritiva.

Preparación de la solución nutritiva especial:

Disolver 11.5 gr de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.8 gr de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.68 gr de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada; tomar 6 mL de la solución y agregar a una mezcla de 6.0 gr de extracto de levadura, 2.4 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{H-citrato}$, 72 gr de KH_2PO_4 , 24 gr de d-glucosa y 1,2 gr de Tween, previamente disueltos en 100 mL de agua destilada. Calentar toda la mezcla para que haya una disolución completa de todos los ingredientes. Agregar 60 mL de una solución puffer acetato sódico 4 m + ácido acético con pH 5,4 a 100 mL de la solución nutritiva, completar con agua destilada hasta 200 mL; el pH será entonces de 5.0. Esta mezcla, en virtud de su elevada concentración de acetato y de su ácida reacción, resulta autoestéril, conservándose en nevera durante meses sin alteración (Castillo 1997).

Calentar 185 mL de la colusión anterior a 50 °C y luego agregar a 700 mL de la leche magra sometida a digestión trípica, que en unión de 19 gr de agar se trata en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Completar, hasta 1000 mL con leche trípica caliente. Distribuir en tubos de ensayo 10 mL de la mezcla y guardar los tubos en el refrigerador (Castillo 1997).