

ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE LACTOBACILOS AISLADOS DE FUENTES NATURALES

Karín L. Zamudio* y Amparo I. Zavaleta*

*Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

El uso de los lactobacilos como probióticos se ha incrementado debido a sus propiedades benéficas para la salud animal y humana. Con el objetivo de identificar y obtener cepas nativas de lactobacilos para ser utilizadas como probióticos, se seleccionaron 9 lactobacilos aislados de diferentes fuentes naturales. Las especies de *Lactobacillus* fueron identificadas por el perfil de fermentación de carbohidratos y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando cebadores específicos diseñados a partir de los espaciadores intergénicos de los genes ribosómicos 16S-23S. Los lactobacilos seleccionados pertenecen a las especies: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* y *Lb. fermentum* correspondiendo en número de cepas por especie 3, 3, 2 y 1 respectivamente. El potencial probiótico de estos microorganismos se determinó por su estabilidad frente a pH ácido, su tolerancia a la bilis y a su actividad antimicrobiana contra los patógenos entéricos *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Se encontró que *Lb. acidophilus* 4P-1 presenta las mejores características probióticas por resistir más de 24 horas a pH 3.5 e inhibir a los patógenos ensayados.

Palabras clave: *Lactobacillus*, *Lb. acidophilus*, probiótico, PCR, espaciadores intergénicos 16S- 23S, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The use of the lactobacilos as probiotics has been increased due to its beneficial properties for the human and animal health. With the objective to identify and to obtain native strains of lactobacilos to be used as probiotics, 9 isolated lactobacilos from different natural sources were selected. The *Lactobacillus* species were identified by carbohydrate fermentation patterns and by the Polymerase Chain Reaction using specific primers designed from 16S-23S rDNA intergenic spacer regions. The selected lactobacilos belong to the following species: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* and *Lb. fermentum* corresponding in number of strains by species 3, 3, 2 and 1 respectively. The probiotic potential of these microorganisms was determined by low pH stability, tolerance to bile and their antimicrobial activity against the enteric pathogens *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Lb. acidophilus* 4P-1 showed the best probiotic characteristics to resist more than 24 hours at pH 3,5 and to inhibit pathogens mentioned above.

Key words: *Lactobacillus*, *Lb. acidophilus*, probiotic, PCR, 16S- 23S intergenic spacers, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

El interés por el uso de los lactobacilos como probiótico en el tratamiento y prevención de enfermedades se ha incrementado de forma considerable en los últimos años; y se fundamenta en utilizar microorganismos productores de metabolitos benéficos y de agentes antimicrobianos para el control de patógenos. Los probióticos han sido utilizados en el tratamiento de artritis reumatoide, carcinogénesis, intolerancia a la lactosa, enferme-

dad de Crohn, diarrea, candidiasis, infecciones del tracto urinario, así también como agentes inmunomoduladores y reguladores de los niveles de colesterol (1,2,3,4). Numerosos estudios demuestran que la administración de lactobacilos por vía oral disminuyen significativamente la presencia de enteropatógenos en el intestino de pollos, cerdos y humanos y reestablece el balance apropiado de la flora intestinal. Los lactobacilos son considerados excelentes probióticos por ser de carácter no patogénico, inocuos, estables y viables, por resistir

al cambio de pH y tener la capacidad de transformar numerosos carbohidratos. Las cepas utilizadas como probiótico deben reunir las siguientes características: I) no ser patógenas, especialmente para personas inmunodeficientes, ni estar asociadas con enfermedades, II) resistir a enzimas proteolíticas, III) ser capaces de sobrevivir en el tránsito gástrico, IV) ser estables frente a los ácidos, bilis y no conjugarse con las sales biliares, V) tener capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales, VI) sobrevivir en el ecosistema intestinal, VII) producir agentes antimicrobianos, VIII) presentar estabilidad durante su empleo, IX) crecer rápido en condiciones del ciego y X) tener capacidad de inmunestimulación sin efectos antiinflamatorios (4,5).

Las especies de *Lactobacillus* cuyos efectos probióticos han sido probados con éxito *in vitro* e *in vivo* son: *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* (2,5). En el presente estudio, se utilizaron cepas de lactobacilos aislados de diferentes fuentes y que fueron seleccionadas por sus propiedades probióticas ensayadas en la inhibición de patógenos entéricos. Los aislados fueron previamente identificados por pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos diseñados a partir de los espaciadores intergénicos entre los genes ribosómicos 16S-23S (7,8,9).

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo e identificación bioquímica

Lactobacilos de diferentes orígenes (10), así como las cepas de colección: *Lb. plantarum* CECT 748, *Lb. casei* CECT 475, *Lb. acidophilus* CECT 362 y *Lb. fermentum* CECT 4007, se sembraron en medio sólido específico Man Rogosa Sharpe (MRS) a 30 °C por 48 h en microanareobiosis. Para la prueba de fermentación de carbohidratos, se inoculó 100 µl del cultivo fresco en caldo MRS modificado (11) adicionando rojo de clorofenol al 0.004 %, y el carbohidrato (fructosa, manitol, xilosa, maltosa, sorbitol, sucrosa, manosa) al 0.05 %, se incubó a 30 °C por 48 horas y se procedió a la lectura de los resultados.

Identificación molecular

Se utilizó la PCR con cebadores específicos diseñados a partir de los espaciadores intergénicos

de los genes ribosómicos 16S-23S y del 16S, cuyas características se presentan en la tabla 1. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 50 µl que contenía aproximadamente 50 ng del ADN genómico, dNTP 200 µM, de cada cebador 25 pmol, MgCl₂ 1.5 mM y Taq DNA polimerasa 1 U. Las condiciones de reacción fueron un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos con las siguientes etapas: Desnaturalización 94 °C por 3 segundos, alineamiento según cebador (tabla 1) por 30 segundos, polimerización a 72 °C por 45 segundos y un ciclo final de polimerización a 72 °C por 2 minutos. El producto de PCR se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % con buffer TBE 1X a 80V.

Ensayo de la actividad antimicrobiana

Se utilizó un cultivo en caldo MRS de 48 horas y se concentraron las células por centrifugación a 3500 rpm por 30 minutos. 100 µl del sobrenadante, que contenía las sustancias liberadas, se colocó en los pocillos que se formaron por torres de acero inoxidable en el agar Mueller Hinton; previamente se inoculó a placas distintas aproximadamente 3 x 10⁸ Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *Listeria monocitogenes* ATCC 19118 o *E. coli* ATCC 43887. Se incubó a 30 °C por 24 horas y se midió el diámetro de cada halo de inhibición.

Determinación de la capacidad de crecimiento a diferente pH

Esta prueba se realizó en matraces de 250 mL de capacidad que contenían 30 ml de caldo MRS; el pH inicial de cada caldo se ajustó a 6.2, 4.0, 3.5, 3.0 y 2.5, se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Se inoculó 10⁷ UFC/mL de cada cepa con 24 horas de crecimiento. Los cultivos se incubaron en microanareobiosis a 37 °C durante 24 horas y se tomaron muestras a las 0, 12 y 24 horas para el recuento de células viables por siembra en agar MRS.

Determinación de la capacidad de crecimiento a 0.15 % de bilis

Al medio MRS se le ajustó el pH inicial a 5.5 y se inoculó con 10⁷ UFC/mL e incubó a 37 °C en microanareobiosis; en seguida se tomaron muestras a las 0, 12 y 24 horas para el recuento de células viables por siembra en agar MRS.

RESULTADOS

A los 9 lactobacilos aislados de diferentes fuentes naturales, primero se les identificó a qué especie pertenecen, mediante las pruebas de fermentación de carbohidratos. En la lectura e interpretación de los perfiles bioquímicos correspondientes a las especies de *Lactobacillus*, se utilizaron las tablas descritas en el manual Bergey, así como los mostrados por las cepas de colección: *Lb. plantarum* CECT 1234, *Lb. casei* CECT 4678, *Lb. acidophilus* CECT 3895, *Lb. fermentum* CECT 3678.

La capacidad de degradación de los azúcares por los diferentes aislados se presenta en la tabla 1. En esta se observa que cada lactobacilo muestra un perfil metabólico característico que no permite una identificación precisa al compararlo con los descritos en el Manual Bergey; ejemplo de estos casos se presenta con los aislados Y-7, Q17-2, Q2-3 y 5P-2.

La prueba de PCR utilizando cebadores específicos a partir de las zonas conservadas de las regiones intergénicas de los genes ribosómicos 16S-23S, permitió identificar los 9 lactobacilos obtenidos de diferentes muestras naturales. En la tabla 2 se presenta el número de cepas por especie identi-

cada, las características de los cebadores utilizados y los tamaños de los productos amplificados. Los cebadores dan origen a productos de PCR de diferentes tamaños, siendo estos de 520, 500, 450 y 420 pb para las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum* respectivamente.

La actividad antibacteriana se determinó midiendo el halo de inhibición de cada cepa frente a los enteropatógenos *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*; siendo uno Gram positivo, y el otro, Gram negativo. Estos microorganismos se eligieron por estar disponibles en el laboratorio, ser diferentes y tener un alto riesgo para la salud. Los halos de inhibición variaron entre 2 a > 8 mm siendo las cepas Q17-2, 4P-1 y Y-7 las que mostraron un mayor halo de inhibición (tabla 3). Asimismo, se evaluó la resistencia a pH ácido tolerancia a bilis por considerarse estos parámetros fundamentales para ser seleccionado como probiótico. La cepa 4p-1, aislada del tracto gastrointestinal de pollo mostró las mejores características probióticas por resistir a pH 3.5 presentando un buen crecimiento, siendo este de 10^9 UFC/mL adecuadas para este tipo de preparados (fig.1) y mantenerse viable al 0.15% de bilis, así como presentar un mayor halo de inhibición frente a los patógenos ensayados (tabla 3).

Tabla 1. Fermentación de carbohidratos de los lactobacilos aislados de diferentes fuentes naturales

Pruebas Aislados	CreCIM		Arabinosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Manitol	Melobiosa	Ranncosa	Sorbitol	Sucrosa	Trehalosa	Xilosa
	a 15 °C	a 45 °C											
Q2-3	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Q7-3	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
LAB-6	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Q17-2	+	-	+	+	-	d	+	+	-	+	+	-	-
2P-1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
4P-1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
5P-2	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Y-5	-	+	-	+	-	+	d	+	-	-	+	-	-
Y-7	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-

(-), no fermenta; (+), fermenta; (d), no determinado

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos para identificar las especies de *Lactobacillus* por PCR

Características del oligonucleótido Especie	Nombre	Secuencia (5'→3')*	Tm (°C)	Producto de PCR (pb)
<i>Lactobacillus casei</i>	PrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG	55	500
	CasII	GCGATGCGAATTTCTTTTC		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	450
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTAC	62	520
	16SH	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lprf	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	420
	FermII	CTGATCGTAGATCAGTCAAG		

* información obtenida de Walter y col. (2000)

Tabla 3. Especies de *Lactobacillus* según origen de procedencia y actividad antibacteriana

Especie	Cepa	Origen de procedencia	Actividad antibacteriana	
			<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. plantarum</i>	Lab-6	Bebida fermentada	+	+
<i>Lb. casei</i>	Q2-3	Queso artesanal	+	+
<i>Lb. casei</i>	Q7-3	Queso artesanal	++	+
<i>Lb. plantarum</i>	Q17-2	Queso artesanal	++	+
<i>Lb. plantarum</i>	2p-2	Tracto GI de pollo	+	+
<i>Lb. acidophilus</i>	4p-1	Tracto GI de pollo	++	++
<i>Lb. acidophilus</i>	5p-2	Tracto GI de pollo	+	+
<i>Lb. acidophilus</i>	y-5	Yogurt natural	+	-
<i>Lb. fermentum</i>	y-7	Yogurt natural	++	+

Halo de inhibición: (+), entre 2 y 5 mm; (++) , >5 mm; (-) <1mm.

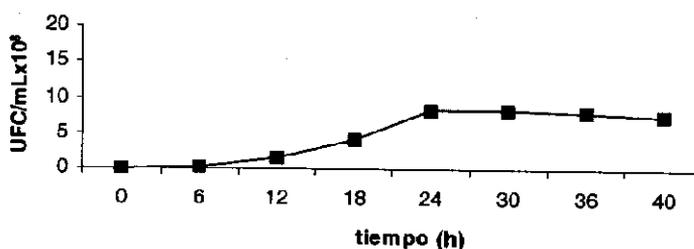


Figura 1. Curva de crecimiento del aislado 4P1(-) y *Lb. acidophilus* CECT 362 (■) a pH 3.5.

DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Lactobacillus* denominadas como seguros o GRAS (Generally Recognized as Safe) son microorganismos Gram positivos, catalasa negativo, no esporulados, inmóviles y fermentadores; estas características permitieron seleccionar 9 lactobacilos de diferentes orígenes descritos en trabajos previos (4, 10, 12).

Los lactobacilos seleccionados comparten muchas características metabólicas, que no permiten identificar con certeza a la especie que pertenecen. Así, los aislados Q2-3 y Q7-3 tienen diferentes perfiles de fermentación para arabinosa, manitol, ramnosa y xilosa (tabla 1), que si comparamos su lectura con los del manual Bergey indicaría que son especies distintas si solo se consideran estas pruebas metabólicas. Sin embargo, cuando se utilizaron las pruebas biomoleculares, los dos aislados pertenecen a una misma especie; estas diferencias indican que las características fenotípicas generalmente no se relacionan con las genotípicas.

La zona intergénica entre los genes ribosómicos 16S y 23S es altamente conservada para cada especie del género *Lactobacillus*, a su vez muy polimórfica en secuencia y tamaño entre las especies del mismo género. Estas características han permitido diseñar cebadores universales para identificar y caracterizar diferentes especies y cepas bacterianas (7,8,9). El uso de cebadores específicos para los espaciadores intergénicos 16S-23S y genes ribosómicos 16S (tabla 2) en la técnica de la PCR permitieron determinar la especie de los lactobacilos aislados de diferentes orígenes.

La mayor dificultad que presentan los lactobacilos utilizados hoy en día para la elaboración de un gran número de productos alimenticios convencionales radica en su baja capacidad de supervivencia durante su paso por el estómago y el duodeno, ya que para lograr un efecto positivo de estos microorganismos sobre la flora intestinal es esencial que sean capaces de adaptarse en el intestino y competir con la flora nativa existente (7). La mayoría de lactobacilos estudiados presentan gran estabilidad a los ácidos y bilis, y producen sustancias antimicrobianas que inhiben la flora patógena por efecto competitivo (1,3,6). La supervivencia a altas concentraciones de ácido es fundamental para el buen funcionamiento del microorganismo como probiótico, ya que el mismo puede estar sometido en su paso a través del estómago y el intestino a

pHs que pueden alcanzar valores de 3.0, o menores (6). En este sentido *Lb. acidophilus* 4P1 presentó las mejores características de estabilidad frente a ácidos y bilis; este microorganismo podría ser utilizado como productor de antimicrobianos en la industria láctica para disminuir el número de casos de intoxicación alimentaria por *L. monocytogenes*, un patógeno emergente y de alto riesgo.

Las características de tolerancia a pH, bilis y actividad antimicrobiana presentadas por las cepas estudiadas requieren ser complementadas con la prueba de adherencia en la línea celular Caco-2 antes de explorar sus bondades probióticas en la industria alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Colección Española de Cultivos Tipo por proporcionarnos las cepas utilizadas en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 35:1-27
2. De Ross N.M. and Katan B.M. 2000. Effects of bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:405-411.
3. Pal Kaur I., Chopra K. and Sain A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15:1-9.
4. Reid G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3763-3766.
5. Heller K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:374-379.
6. Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E. and Salminen S.J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* 167:185-189
7. Walter J., Tannock W., Tilsala-Tamisjarvi A., Rodtong S., Loacih S.M., Munro K. and Alotossva T. 2000. Detection and identification

- of gastrointestinal *Lactobacillus* species by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303.
8. Yeung P.S., Sanders M.E., Kitts C. L., Cano R. and Tong P.S. 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains. *J.Dairy Sci.* 85:1039-1051.
 9. Zhong W., Millsap K., Bialkowska-Hobrzansk H., and Reid G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2418-2423
 10. Zamudio K.L., Negron L. and Zavaleta A.I. 2003. Identificación molecular de especies del género *Lactobacillus* productores de exopolisacáridos de interés biotecnológico. Libro de Resúmenes del V Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Trujillo.
 11. Kimmel S.A., Roberts R.F. and Ziegler G.R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 659-664.
 12. Snerth P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.E. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilking, Baltimore.
 13. Olsen A., Halmand M., Jacobsen M. 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interacciones during fermentation. *J.Appl. Bacteriol.*74:506-512
 14. Klanenhammer T.R. and Kullen M.J. 1999. Selection and design of probiotic. *Int. J. Food Microbiol.* 50:45-47