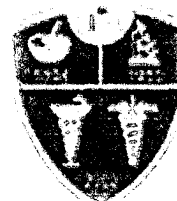




Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Departamento de Microbiología y Parasitología
Postgrado en Microbiología Clínica

QR82
L3Q8



**CAPACIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus* spp. PROVENIENTES DE
FLUIDO VAGINAL DE MUJERES EMBARAZADAS DURANTE EL TERCER
TRIMESTRE DE GESTACIÓN**

www.bdigital.ula.ve

Autora

Lcda. Eliana Quintero Wilchez

Tutora

MSc. Kiralba M. Sánchez R.

Cotutora

MSc. Elaysa j. Salas.

Mérida, Octubre 2014

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DEDICATORIA	Xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
Planteamiento del problema	4
Justificación	6
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
Antecedentes históricos	14
Campos de acción de los probióticos	15
Criterios de selección y evaluación del potencial probiótico	19
Trabajos previos	22
Hipótesis	26
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	27
Tipo de investigación	27
Población y criterios de inclusión	27
Recolección y transporte de las muestras	27
Procesamiento microbiológico de las muestras	28
Identificación fenotípica	28

Evaluación del potencial probiótico de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	30
1. Preparación del inóculo bacteriano	30
2. Resistencia a la acidez gástrica	30
3. Resistencia a las sales biliares	32
4. Actividad antagónica	35
5. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos	36
Análisis de resultados	38
 CAPÍTULO IV: RESULTADOS	 39
Evaluación del potencial probiótico de las cepas de <i>Lactobacillus</i>.	39
1. Resistencia a la acidez gástrica	39
2. Resistencia a sales biliares	42
3. Actividad antagónica	49
4. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos	49
 CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	 52
1. Resistencia a la acidez gástrica	52
2. Resistencia a las sales biliares	53
3. Actividad antagónica	55
4. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos	56
 CONCLUSIONES	 59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	71
ANEXO 1. Consentimiento informado para la recolección de datos	

del trabajo de investigación

- ANEXO 2. Fórmula de Retraso en el crecimiento**
- ANEXO 3. Identificación fenotípica de *L. plantarum* ATCC 8014**
- ANEXO 4. Identificación fenotípica de la cepa LB09: *L. paracasei* subsp *paracasei* 2**
- ANEXO 5. Prueba de resistencia a la acidez gástrica de LB05**
- ANEXO 6. Prueba de Resistencia a la acidez gástrica de LB09**
- ANEXO 7. Fórmula de porcentaje de supervivencia**
- ANEXO 8. Actividad antagónica de LB05**
- ANEXO 9. Cepa LB04 contra *P. aeruginosa***
Halo de inhibición por actividad antagónica

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacteriocinas y microorganismos productores	13
Tabla 2. Principales especies de bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos humanos	17
Tabla 3. Identificación fenotípica de colonias aisladas a partir de fluido vaginal de embarazadas en el último trimestre de gestación.	40
Tabla 4. Crecimiento de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. en jugo gástrico artificial a pH 2- 2,3 en función del tiempo.	41
Tabla 5. Porcentaje de supervivencia de las cepas LB02, LB05 y LB09 en jugo gástrico artificial a pH 2- 2,3.	42
Tabla 6. Actividad antagonica de las cepas de <i>Lactobacillus</i> en estudio frente a los patógenos de referencia.	50
Tabla 7. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las 10 cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. evaluadas	51

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de acidificación vaginal.	11
Figura 2. Procesamiento microbiológico de la muestra de fluido vaginal para el aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus</i> spp.	29
Figura 3. Preparación del inóculo bacteriano.	31
Figura 4. Prueba de resistencia a la acidez gástrica.	33
Figura 5. Prueba de resistencia a sales biliares.	34
Figura 6. Prueba de actividad antagónica.	37

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB03 en diferentes concentraciones de sales biliares.	43
Gráfico 2- Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB09 en diferentes concentraciones de sales biliares.	44
Gráfico 3. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB02 en diferentes concentraciones de sales biliares.	44
Gráfico 4. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB04 en diferentes concentraciones de sales biliares.	45
Gráfico 5. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB05 en diferentes concentraciones de sales biliares.	46
Gráfico 6. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB06 en diferentes concentraciones de sales biliares.	46
Gráfico 7. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB07 en diferentes concentraciones de sales biliares.	47
Gráfico 8. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB08 en diferentes concentraciones de sales biliares	47

Gráfico 9. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB10 en diferentes concentraciones de sales biliares. 48

Gráfico 10. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB01 en diferentes concentraciones de sales biliares. 48

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO
“CAPACIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus* spp. PROVENIENTES DE
FLUIDO VAGINAL DE MUJERES EMBARAZADAS DURANTE EL
TERCER TRIMESTRE DE GESTACIÓN”

Autora
Eliana Quintero

Tutor
Kiralba Sánchez

Lactobacillus spp. conforma el grupo bacteriano más utilizado como probióticos; aun cuando se consideran inocuas, la FAO y la OMS recomiendan que sean sometidas a pruebas que garanticen su efectividad y uso seguro. Con la finalidad de evaluar la capacidad probiótica de especies de *Lactobacillus* provenientes de fluido vaginal de mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación, se aislaron cepas de *Lactobacillus* spp. a partir de agar MRS; mientras que, la identificación se realizó utilizando galerías API 50 CH (bioMerieux). La evaluación del potencial probiótico consistió en pruebas de supervivencia como resistencia a pH ácido, utilizando jugo gástrico artificial (pH 2- 2,3 y pH 6- 6,5); así mismo, resistencia a sales biliares (concentraciones: 0,1%, 0,2% y 0,3%) siguiendo la metodología recomendada en la literatura. Por otro lado, se evidenció la actividad antagonica de cada cepa por medio de la técnica de difusión en pocillos. Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se determinaron por el método Kirby Bauer modificado. Se identificaron fenotípicamente 10 cepas de lactobacilos de las cuales; LB02, LB05 y LB09 sobrevivieron a pH ácido; LB02, LB03 y LB09 fueron resistentes a diferentes concentraciones de sales biliares; 6 cepas exhibieron actividad antagonica frente a microorganismos patógenos y todas fueron sensibles a betalactámicos y macrólidos. LB09 fue considerada como la cepa de mayor potencial probiótico del grupo estudiado, de acuerdo a su capacidad de resistir las barreras gastrointestinales, así como de producir efectos antagonicos.

PALABRAS CLAVES

Lactobacillus spp., potencial probiótico, fluido vaginal, embarazo.

AGRADECIMIENTOS

Al Ilustre Universidad de Los Andes.

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) por el financiamiento otorgado bajo el código FA-522-12-07-EE.

Al Postgrado de Microbiología, por el apoyo brindado.

A mi Tutora, Profesora Kiralba Sánchez, por su orientación, dedicación y estilo. Gracias por su apoyo para la consecución de esta meta.

A la directiva del Hospital “Sor Juana Inés de la Cruz” y al servicio de Ginecología y Obstetricia, en especial al Dr. Jaider Gómez por la colaboración prestada para la recolección de las muestras.

Al personal del área de Esterilización y Preparación de Medios de Cultivos del Departamento de Microbiología y Parasitología; en particular a la Lcda. María Eugenia Nieves y a la Lcda. Yacnely Infante, por su apoyo y colaboración durante la realización de esta investigación.

A las profesoras Elaysa Salas y Cándida Díaz, por sus valiosos aportes y colaboraciones, los cuales hicieron posibles la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por su amor incondicional, por mantenerme en pie en los momentos difíciles, gracias Señor. Alabado seas.

A mis padres, Jairo e Inez por su amor y apoyo incondicional en todo momento, los amo.

A mi compañero de vida, Antonio Gómez, por su apoyo y por alentarme a perseguir mis sueños, gracias.

A mi hija Miranda, has sido la luz que nunca se apaga. Te amo hija.

A todas las personas, familiares y amigos, que de una u otra forma me apoyaron y contribuyeron en la concreción de esta meta.

Eliana Quintero Wilchez.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Lactobacillus* se encuentran formando parte de los residentes habituales del tracto gastrointestinal y genitourinario en seres humanos. Desde los primeros estudios microbiológicos se conoce que la microbiota vaginal está representada en su mayor parte por lactobacilos, los cuales desarrollan funciones esenciales en el mantenimiento del microambiente genital. Entre los mecanismos que desarrollan estas bacterias para el control biológico se destaca la adherencia a través de adhesinas específicas, que interactúan con receptores a nivel de las células epiteliales y favorece la formación de biopelículas, evitando de esta manera la colonización por microorganismos no habituales (Martín, Soberón, Vázquez y Suarez, 2008; Murray, Rosenthal, Kobayashi y Pfaller, 2009).

Por otro lado, los lactobacilos producen un amplio espectro de compuestos antimicrobianos como: ácido láctico, ácido acético, etanol, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Hernández, 2009). El ácido láctico es uno de los productos responsables de la acidificación del entorno vaginal, (pH por debajo de 4); en consecuencia, este ambiente inhóspito limita el crecimiento tanto de los residentes habituales como de los transitorios, salvo para los propios lactobacilos; de igual modo, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas son sintetizados por los lactobacilos y tienen un efecto bactericida contra una gran variedad de microorganismos estrechamente relacionados; así como, contra cepas filogenéticamente distantes de la cepa productora (Fernández y Fernández, 2004; Dolz, 2008; Martin y cols., 2008).

Los lactobacilos son considerados probióticos, su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades está adquiriendo un importante auge en la

actualidad. Estos han sido utilizados con fines diversos, principalmente como alternativa al consumo de antibióticos. Se ha descrito su uso en la modulación de la inmunidad en casos de alergias producidas por antígenos alimentarios, en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica y para disminuir el colesterol; además, en la intolerancia a la lactosa, en procesos diarreicos, infecciones urinarias y en la disfunción vaginal (Peña, 2006; Vázquez, Lopretti, Rey y Zunino, 2007)

En este contexto, los probióticos se presentan como una opción para el mantenimiento y restablecimiento de la microbiota vaginal normal (Martin y cols., 2008), lo cual justifica la búsqueda de estos microorganismos a partir de este nicho ecológico, en función de que puedan formar parte de futuros productos probióticos dirigidos específicamente a la salud genital de la mujer.

La investigación de las propiedades probióticas es compleja; existe una gran diversidad de pruebas que permiten valorar la capacidad beneficiosa de los microorganismos; en este sentido, los científicos han tratado de establecer algunos criterios que deben cumplir los posibles candidatos a ser considerados probióticos; entre ellos, que sean microorganismos seguros, con capacidad de adhesión a células epiteliales, persistencia y multiplicación en el tracto gastrointestinal o vaginal; así mismo, que sean capaces de resistir al pH estomacal, sales biliares y produzcan ácidos, peróxidos y bacteriocinas (Vázquez y cols., 2007).

Con base a lo anterior, y considerando que el estudio de los probióticos en Venezuela no ha sido suficientemente desarrollado, el presente trabajo plantea como objetivo, determinar la capacidad probiótica de cepas de *Lactobacillus* spp., provenientes de fluido vaginal de mujeres embarazadas sanas durante el tercer trimestre de gestación. De igual modo, se pretende

fortalecer la línea de investigación en ciería, con el fin de lograr conformar la colección de cepas probióticas en esta institución y así fomentar la investigación en este campo.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Planteamiento del problema

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) representan un grupo heterogéneo de microorganismos ubicuos en la naturaleza. Particularmente, *Lactobacillus* spp. comprende el Género bacteriano más utilizado como probióticos; y un gran número de especies forman parte de la microbiota bucal, gastrointestinal y genital del hombre y animales (Prescott, Harley y Klein, 2004); por ello son considerados bacterias inocuas, sin embargo, se recomienda que sean sometidas a pruebas que garanticen su uso seguro y por otra parte, demostrar que poseen propiedades probióticas (FAO y OMS, 2001).

Al respecto, la literatura internacional refiere una serie de lineamientos o criterios que definen a un microorganismo como beneficioso. No obstante, la sistemática para la evaluación del potencial probiótico es compleja y de alto costo económico, lo cual ha dificultado el desarrollo de la investigación en este campo (FAO y OMS, 2001). En virtud de ello, existe una incesante búsqueda de métodos estándar para la caracterización del potencial probiótico de las bacterias ácido-lácticas.

De acuerdo a los lineamientos de la FAO/OMS (2001), la selección de cepas probióticas en principio, se basa en estudios de supervivencia y crecimiento; al respecto, dos pruebas ampliamente utilizadas son la prueba

de resistencia a la acidez gástrica y la resistencia a sales biliares (Vanegas, González, Arévalo y Villanueva, 2012).

La mayoría de los estudios en humanos, han señalado los efectos beneficios de las BAL sobre padecimientos gastrointestinales, particularmente en la diarrea, intolerancia a la lactosa y la infección por *Helicobacter pylori* (García, Henríquez, Retamal, Pineda, Delgado y González, 2009; Rerksupphaphol & Rerksupphaphol, 2010). Los ensayos, tanto “in vivo” como “in vitro” han demostrado que las cepas probióticas pueden contrarrestar la adherencia, la colonización, reproducción y acción virulenta de los enteropatógenos; así como, de patógenos genitourinarios, entre ellos *Gardnerella vaginalis* (Mastromarino, Brigidi, Macchia, Maggi, Pirovano, Trinchieri, Conte y Matteuzzi, 2002).

La microbiota vaginal desarrolla funciones esenciales en el mantenimiento del microambiente genital femenino durante el embarazo; de hecho, hacia el tercer trimestre de la gestación, la concentración de lactobacilos en vagina aumenta al menos 10 veces, lo cual está relacionado con un aumento de la vascularización y del fluido vaginal, provocado especialmente por el incremento de las hormonas (estrógenos y progesterona). Además, aumenta la disponibilidad de glucógeno, factor que favorece la presencia de lactobacilos en las secreciones vaginales. Por tal motivo, las mujeres embarazadas por su condición fisiológica, son candidatas óptimas para el aislamiento de *Lactobacillus* con potencial probiótico (Ferrerres, 2008; Alves, Cassamassimo, Guimarães y García, 2010).

A nivel mundial se han caracterizado numerosas cepas de lactobacilos con potencial probiótico, provenientes de diferentes fuentes. En Venezuela, los estudios relacionados con el aislamiento y caracterización de

Lactobacillus son escasos y de reciente data; por esta razón se propone el presente trabajo de investigación.

Justificación

En los últimos años, ha sido reconocido el papel de los lactobacilos en el mantenimiento de la homeostasis dentro de un ecosistema dinámico como la vagina. La pérdida del balance de la microbiota vaginal puede predisponer a la mujer a la adquisición de infecciones genitourinarias, tan frecuentes durante la etapa fértil. Por tal razón, el uso profiláctico de cepas de lactobacilos con capacidad probiótica tiene significancia en esta población.

El hecho de estudiar cepas de *Lactobacillus* spp. provenientes de fluido vaginal en gestantes durante la última etapa del embarazo, aumentaría la probabilidad de recuperar cepas con capacidad de adherencia a la mucosa vaginal y con potencial para coagregarse eficientemente con los patógenos habituales. En este contexto, la caracterización de cepas autóctonas de lactobacilos provenientes de fuentes humanas y la evaluación de su potencial probiótico, sería una contribución importante para la investigación en este campo en Venezuela.

Con este trabajo se pretende fortalecer la línea de investigación en probióticos y constituir el banco de cepas del grupo de probióticos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se espera que los hallazgos producto del presente estudio, sean la base para investigaciones posteriores en este ámbito, con la finalidad de profundizar los conocimientos e incursionar en la elaboración de productos probióticos en nuestra región.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad probiótica de especies de *Lactobacillus* provenientes de fluido vaginal de mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación.

Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente las cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de fluido vaginal de mujeres embarazadas.
2. Valorar la capacidad de resistir la acidez gástrica en las cepas de *Lactobacillus* identificadas.
3. Medir la capacidad de resistir a la exposición de sales biliares en las cepas de *Lactobacillus*.
4. Estudiar la actividad antagónica de los aislados de *Lactobacillus* frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Determinar el perfil de susceptibilidad de *Lactobacillus* spp. frente a diferentes antibióticos.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Taxonómicamente el género *Lactobacillus* se ubica en el Phylum *Firmicutes*, Clase III *Bacilli*, Orden II *Lactobacillales*; comprende aproximadamente 182 especies. Los miembros de este género son ubicuos en la naturaleza, se encuentran en las superficies de plantas, productos lácteos, carnes, aguas residuales, cervezas y frutas. Además, forman parte de la microbiota humana y animal a nivel del tracto gastrointestinal y vaginal, siendo *Lactobacillus crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. minutes*, *L. vaginalis* y *L. salivarius*, las especies encontradas con mayor frecuencia a nivel de la mucosa vaginal (Koneman, Washington, Stephen, William y Gary, 2008; Zhou, Brotman, Gajer, Abdo, Schüette, Ma, Ravel & Forney, 2010; Gustafsson y cols., 2011; Gueimonde, Sánchez, De los Reyes & Margolles, 2013).

Los lactobacilos se encuentran incluidos en el grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), éstos son bacilos ó cocobacilos grampositivos, agrupados por una gran cantidad de características metabólicas y fisiológicas. Se describen como bacterias nutricionalmente exigentes en virtud de su limitada capacidad biosintética; por lo tanto, requieren vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas (Prescott y cols., 2004; Sánchez, Mayta y Rivera, 2012).

El género *Lactobacillus* se caracteriza por ser catalasa negativo, no esporulados y en general inmóviles. Pueden ser mesófilos o termófilos con temperaturas óptimas entre 30 °C y 40 °C, crecen en condiciones de ligera acidez, a un pH entre 4,5 y 6,4. Generalmente se les clasifica como anaerobios facultativos, por lo que su crecimiento se ve favorecido en atmósfera microaerófila (5-10% de CO₂). La característica esencial del metabolismo fermentativo de los carbohidratos es el uso de 2 vías de fermentación como son, la vía de Embden-Meyer-Hoff ó fermentación homoláctica y la vía de las pentosas fosfato ó fermentación heteroláctica. En la primera vía, las BAL metabolizan principalmente las hexosas hasta ácido láctico, con un rendimiento neto de 2 moles de ATP por mol de hexosa fermentado; mientras que, en la fermentación heteroláctica a través de la acción de la enzima 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, se obtiene como productos finales: ácido láctico (70%), etanol, acetato y CO₂, con un rendimiento de mol de ATP por mol de hexosa fermentado (Collado, 2004; Prescott y cols., 2004; Koneman y cols., 2008; Hernández, 2009).

La estructura superficial de los lactobacilos presenta adhesinas con una composición química variada y que forman parte de la pared celular. Así se describen los ácidos lipoteicoicos, carbohidratos, glicoproteínas y proteínas extracelulares que interactúan con los receptores ubicados en las células epiteliales para mediar la adhesión. Se ha observado que un pH bajo favorece la unión de lactobacilos (aislados de vagina) a la fibronectina, encontrada a nivel de la matriz extracelular. Por otra parte, la unión a glicolípidos presentes en las membranas de las células vaginales se da como producto de la mediación de cationes divalentes (Martin y cols., 2008).

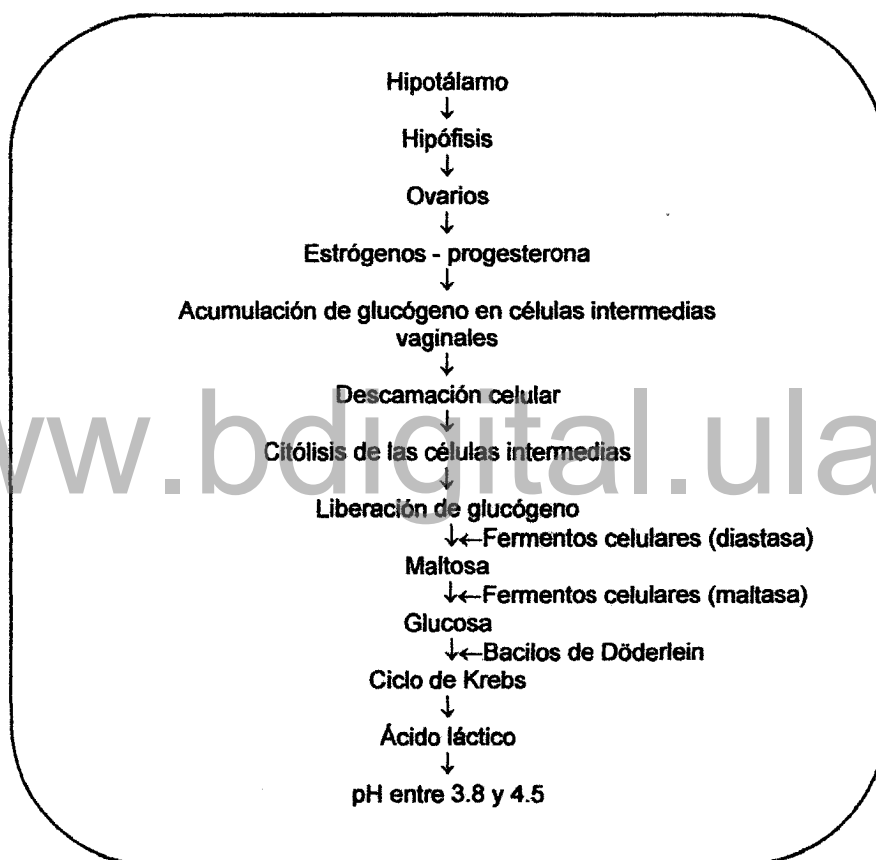
Entretanto, la interacción de los lactobacilos y el epitelio vaginal conlleva a la formación de una biopelícula que protege a dicho epitelio de la

colonización por microorganismos patógenos. Además, este efecto se ve potenciado por la capacidad de los lactobacilos de coagregar con patógenos potenciales, habilidad estudiada por Boris y cols. (1998, citado por Falagas, Betsi & Athanasiou, 2007) quienes demostraron que *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* provenientes de exudados vaginales de mujeres saludables, coagregaron con *G. vaginalis* "in vitro". Mientras que, Mastromarino y cols. (2002) observaron que la capacidad de los lactobacilos de coagregar varía según la especie de lactobacilo y el patógeno involucrado; los autores demostraron que cepas aisladas de fluido vaginal como *L. gasseri* MB 335, *L. salivarius* FV2 y *L. brevis* CD2 coagregaron con *G. vaginalis* y *Candida albicans*; de igual modo, las cepas de lactobacilos aisladas se adhirieron a las células vaginales desplazando a los patógenos; además, produjeron altos niveles de H_2O_2 lo cual inhibió el crecimiento de *G. vaginalis*.

Los lactobacilos ocupan los sitios de unión a los epitelios de patógenos e inhiben el crecimiento de los mismos y de esta manera incrementan el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico. La competencia por los nutrientes ejerce también un efecto antagónico directo (Castro y Rovetto, 2006; Tormo, 2006; Sánchez, Coyotécatl, Enríquez, Mendoza, Muñoz y Rivera, 2008).

Entre otros efectos antagonistas de los lactobacilos se ha descrito la producción de compuestos antimicrobianos, como los ácidos orgánicos; particularmente, el ácido láctico juega un papel importante en el mantenimiento del pH vaginal, el cual se forma como producto de la fermentación láctica del glucógeno, ocasionando que el pH fisiológico de la vagina se encuentre alrededor de 4 (Figura 1). Esta condición inhibe parcial o

totalmente el desarrollo de la mayor parte de las bacterias provenientes del tracto gastrointestinal y del ambiente, generando un efecto protector de la mucosa (Fernández y Fernández, 2004; Guevara, Santiago y Domínguez, 2011; Sánchez y cols., 2012).



Fuente: Fernández y Fernández, 2004

Figura 1. Mecanismo de acidificación vaginal.

Por otra parte, la producción de peróxido de hidrógeno es común entre algunas especies de lactobacilos. Las cepas productoras de H_2O_2 son más estables en el ambiente vaginal, producen un efecto bactericida o

bacteriostático mayor dependiendo de la especie. El efecto antagonista del H_2O_2 se da por su capacidad oxidante y por la generación de radicales $OH^\cdot$ que deterioran la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) celular, dificultando la reproducción de microorganismos carentes de la enzima catalasa (Martín y cols., 2008).

Para la generación de H_2O_2 a partir de O_2 , tres enzimas oxidasas fueron detectadas en los lactobacilos: NADH oxidasa en *L. casei* y *L. plantarum*; piruvato oxidasa en *L. bulgaricus* y *L. plantarum*; así mismo, flavoproteína α -glicerolfosfato oxidasa en *L. casei*. Estas enzimas se unen a una NADH peroxidasa que transforma el H_2O_2 evitando la auto-inhibición de la bacteria. El efecto inhibitorio del H_2O_2 se ve potenciado por la presencia de mieloperoxidasa y radicales haluros como Cl^- que se encuentran en grandes cantidades en las secreciones biológicas (Lepargneur & Rosseau, 2002; Martín y cols., 2008).

Otras sustancias con propiedades antibacterianas producidas por los *Lactobacillus* spp. son las bacteriocinas, definidas como polipéptidos sintetizados a nivel ribosomal, cuya actividad antimicrobiana está dirigida contra la membrana celular tanto de procariotas como eucariotas. De acuerdo a sus características químicas y actividad se clasifican en 4 grupos.

Clase I péptidos pequeños modificados postraduccionalmente, para formar lantionina y metil-lantionina, éstas actúan a nivel de la membrana citoplasmática, ya sea por despolarización de la membrana o por la inhibición de enzimas que interfieren con la biosíntesis de la pared celular. Clase II son péptidos no modificados postraduccionalmente, son termoestables y forman el grupo más grande, su actividad antimicrobiana se da por la formación de poros en la membrana citoplasmática. Clase III péptidos con un peso

superior a 30 KDa, termolábiles. Clase IV representada por un grupo heterogéneo de proteínas con adiciones de carbohidratos y lípidos (Sánchez, 2008; Zapata, Muñoz, Ruiz, Montoya y Gutiérrez, 2009).

En la actualidad, las únicas bacteriocinas utilizadas comercialmente en la industria alimentaria son la nisina (clase I), producida por *Lactococcus lactis*, y la pediocina (clase II), producida por *Pediococcus acidilactici* (Sánchez, 2008; Zapata y cols., 2009).

Zapata y cols. (2009), reportaron el aislamiento y caracterización de *Lactobacillus plantarum* LPBM10. Esta bacteria con propiedades probióticas y productora de bacteriocinas fue aislada a partir de leche fermentada. El extracto libre de células de LPBM10 presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. La bacteriocina LPBM10 fue descrita como altamente termoestable, con mayor actividad a pH ácido, la cual no fue afectada por la presencia de proteinasa K, agentes quelantes y detergentes.

Tabla 1. Bacteriocinas y microorganismos productores

Bacteriocinas	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>
Pediocina PA 1	II	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>
Zakacina P	II	<i>Lactobacillus sake</i> 706 LTH673
Plantaricinas EF y JK	II	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Divergicina A	II	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticinas J y V	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Lactacinas B	III	<i>L. acidophilus</i>

Fuente: Dolz, 2008.

Antecedentes históricos

La era de la probiótica se inicia a principios del siglo XX con los trabajos de Metchnikoff en 1908, quien observó que el consumo de leche fermentada ejercía un efecto sobre la microbiota residente del tracto gastrointestinal, con un impacto favorable en la salud humana (Castro y Rovetto, 2006).

Tissier (1906), en su trabajo demostró los beneficios clínicos derivados de la modulación de la flora intestinal, como consecuencia de la administración de bifidobacterias. Este investigador defendió la teoría acerca de los efectos favorables del uso de cultivos de bifidobacterias para tratar a niños con diarreas, ya que se creía que estas bacterias desplazaban a las patógenas. No obstante, la base científica en esa época no era sólida y científicos más escépticos alegaban que estas bacterias no serían capaces de soportar el tránsito gastrointestinal y así colonizar dicha región para ejercer sus efectos beneficiosos (Castro y Rovetto, 2006; Rodríguez, 2006).

Cheplin y Rettger (1922), Kulp y Rettger (1925), recomendaron el empleo de aislados intestinales de bacterias ácidolácticas pensando en la capacidad de estos para colonizar y crecer en el intestino, factores esenciales para su eficacia. Hacia el año 1930, Shirota se dedicó a la selección de cepas de origen intestinal con capacidad de sobrevivir el tránsito gastrointestinal. Años más tarde, Gordon y cols. (1957), sugirieron que era necesario establecer unos criterios de selección de lactobacilos con fines terapéuticos. En concreto, los investigadores recomendaron que: (a) fueran habitantes normales del intestino, (b) no fuesen patógenos, (c) capaces de establecerse en el intestino y (d) que alcanzaran grandes concentraciones en el mismo (Rodríguez, 2006).

En 1965, Lilly y Stillwell acuñaron el término probiótico para describir cualquier sustancia u organismo que contribuyera a mantener el equilibrio intestinal en los animales. Según estos autores, serían sustancias segregadas por algún microorganismo con capacidad de estimular el crecimiento de otro. Posteriormente, Fuller (1989), los consideró como un suplemento alimentario vivo que beneficia al hospedero animal con una mejoría del balance microbiano intestinal. Entretanto, Salminen definió los probióticos como “alimentos que contienen bacterias vivas las cuales son beneficiosas para la salud” (Tormo, 2006; Mennickent y Green, 2009).

El término probiótico deriva del latín *pro* que significa “a favor de” y del griego *bio* “vida”, que hace referencia a la capacidad de ciertos microorganismos de actuar “a favor de la vida”. Este término se aplica a ciertos microorganismos que administrados en cantidades apropiadas generan un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero. La FAO (por sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) definen el término probiótico como: “Microorganismos vivos que ingeridos en las cantidades adecuadas confiere un beneficio saludable al huésped” (FAO y OMS, 2001).

Campos de acción de los probióticos

Dentro del grupo de las bacterias potencialmente probióticas han sido descritos géneros como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Saccharomyces*. De ellos, *Lactobacillus* es el género que se refiere con mayor número de especies con efecto probiótico (Tabla 2) (FAO y OMS, 2001; Rodríguez, 2006; Rodríguez, 2008).

En el campo de aplicación de los probióticos ha sido demostrado su potencial para reducir la intensidad y duración de las diarreas. *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* fueron puestos a prueba en un estudio doble ciego en infantes y niños entre 2 meses y 7 años de edad que presentaron diarrea aguda, observándose una diferencia significativa en cuanto a la duración de la diarrea y número de deposiciones en los pacientes que recibieron probióticos con respecto al grupo que recibió placebo (Rerksuppaphol & Rerksuppaphol, 2010).

También existen evidencias que sugieren que los probióticos reducen la duración de las diarreas ocasionadas por rotavirus; al respecto Grandy, Medina, Soria y Araya (2010), realizaron un estudio doble ciego controlado, en niños menores de 2 años en Bolivia. Se evaluaron tres esquemas de tratamiento para la diarrea, al primer grupo de niños se les administró rehidratación oral y un producto con *Sacharomyces boulardii*, al segundo rehidratación oral y un producto compuesto por *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. longum* y *S. boulardii*; al tercer grupo se le aplicó rehidratación oral y placebo.

Tabla 2. Principales especies de bacterias ácido lácticas utilizada como probióticos humanos.

<i>Lactobacillus spp.</i>	Otras bacterias lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>L. delbrueckii</i>	
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. gasseri</i>	
<i>L. johnsonii</i>	
<i>L. paracasei</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius</i>	

Fuente: Rodríguez, 2006.

Los autores observaron que los dos primeros esquemas disminuyeron la duración de la diarrea; el tratamiento con un único probiótico disminuyó la fiebre y el tratamiento con la mezcla de probióticos suprimió la expulsión violenta y espasmódica del contenido estomacal, en comparación con el grupo que recibió rehidratación oral y placebo.

En el campo de la ginecología, el uso de lactobacilos para tratar infecciones del tracto genitourinario se remonta a 1915, cuando Newman, inyectó directamente estos microorganismos en la vejiga urinaria para tratar la cistitis. También se ha introducido como opción terapéutica para prevenir

infecciones que pueden desencadenar complicaciones gineco-obstétricas, como parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, morbilidad y mortalidad neonatal (Martin y cols., 2008).

Reid, Beuerman, Heinemann y Bruce (2001), demostraron que al administrar probióticos vía oral en una dosis de 10^8 organismos viables, se puede ayudar al mantenimiento de la microbiota vaginal, evitando la aparición de cuadros de vaginosis bacteriana (VB) o mejorando el ecosistema vaginal en mujeres que presentaron esta disfunción vaginal.

En un estudio piloto llevado a cabo por Ueharaa, Mondena, Nomotob, Reiko y Hiromi (2006), las pacientes con infecciones urinarias recurrentes fueron tratadas con supositorios intravaginales de *Lactobacillus crispatus*, observándose una disminución notable de las infecciones recurrentes, pudiéndose evidenciar la efectividad y seguridad de implementar este tipo de probiótico en estos casos.

Gueimonde y cols. (2006), realizaron un estudio para observar el efecto del consumo materno de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sobre transferencia y establecimiento de microbiota bifidobacterial en neonatos. Este estudio es el primero en demostrar que el consumo materno del probiótico LGG afecta la transferencia y la composición de *Bifidobacterium* a nivel intestinal durante la primera infancia. El tratamiento con probióticos parece reforzar el desarrollo de una microbiota *Bifidobacterium* más compleja y más diversa.

La influencia de los probióticos sobre la respuesta inmunitaria se investigó a principios de la década pasada, observándose que ciertas cepas bacterianas presentaban propiedades inmunomoduladoras en los

seres humanos. Algunos probióticos estimulan la inmunidad innata y adquirida, regulan reacciones de hipersensibilidad, inducen la inmunidad secretora promoviendo la producción de Ig A secretora, lo cual genera una gran variedad de aplicaciones desde el punto de vista terapéutico (Castro y Rovetto, 2006; Tormo, 2006).

Kabeerdoss y cols. (2011), evaluaron el efecto inmunomodulador de *Bifidobacterium lactis* Bb12® presente en un yogurt comercial, para inducir la secreción de inmunoglobulina A y β -defensina 2 en las heces de adultos sanos. Los hallazgos obtenidos demostraron un incremento de Ig A en las heces durante el período de consumo del yogurt con probiótico; esto podría explicar la habilidad de los probióticos para prevenir infecciones gastrointestinales y de las vías respiratorias inferiores en los individuos.

La eficacia del uso de probióticos ha sido demostrada en una amplia variedad de condiciones clínicas, desde diarreas en infantes, enterocolitis necrotizante, diarreas asociadas a antibióticos, colitis, infección por *Helicobacter pylori*; así mismo, infecciones urogenitales en mujeres y enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras; sin embargo, en algunos casos no han sido totalmente definidos los mecanismos a través de los cuales estos microorganismos ejercen su efecto. En virtud de esto, se continúan llevando a cabo estudios controlados, para dilucidar la capacidad de los probióticos de generar una respuesta favorable ante el consumo de los mismos (Mennickent y Green, 2009).

Criterios de selección y evaluación del potencial probiótico

La selección de una cepa bacteriana como probiótico requiere que sus efectos beneficiosos sean demostrados científicamente, por lo cual, estos

microorganismos deben cumplir con una serie de criterios que permitan clasificarlos como microorganismos seguros para el hombre (FAO y OMS, 2001; Tormo, 2006; Martin y cols., 2008). Entre ellos se citan los siguientes:

- Procedencia humana, ya que la interacción con el hospedador es específica.
- Ejercer algún efecto beneficioso demostrado para la salud.
- No ser patogénicos. Deben ser generalmente reconocidas como seguras, razón por la cual se clasifican como microorganismos GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Regarded As Safe); aún en estado de inmunosupresión del hospedero no deben causar enfermedad.
- Soportar la aplicación de procedimientos tecnológicos. Permanecer viable en los procesos de elaboración de alimentos y durante el almacenamiento.
- Ser resistentes a la destrucción por las secreciones gástricas y bilis, para sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo a una concentración adecuada.
- Capacidad para adherirse al epitelio intestinal, prerequisite para colonizar el tracto intestinal y ejercer los efectos beneficiosos.
- Ejercer un efecto antagonista contra patógenos; producir sustancias antimicrobianas que presenten efectos probados contra patógenos del tracto intestinal.
- Modular la respuesta inmunitaria en forma positiva sin alterar la homeostasis.
- Ser identificados hasta especie: Se recomienda que se realicen primero ensayos fenotípicos, seguidos de la identificación genética mediante métodos tales como la hibridación de ADN, la determinación de secuencias del ARN 16S u otros métodos reconocidos internacionalmente.

Entre las pruebas “in vitro” más comúnmente empleadas para evaluar la capacidad probiótica de microorganismos potenciales se encuentran: la tolerancia al pH ácido y sales biliares, el efecto antagonista sobre el microorganismo patógeno, la producción de sustancias antimicrobianas, la determinación del perfil de resistencia a los principales antimicrobianos de uso clínico y la capacidad de adherencia a los epitelios (FAO y OMS, 2001).

La resistencia a valores de pH bajos y la exposición a sales biliares es de gran importancia para la selección de cepas probióticas. Estas deben resistir pH de 2 sin afectar su viabilidad. El pH gástrico del estómago es de 1-1,5; sin embargo, este se modifica en presencia de alimentos, alcanzando pH 2-2,5.

Una de las condiciones más importante para considerar a los microorganismos como probióticos, es resistir a la acción de las sales biliares, sustancia bactericida natural, que actúa contra los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias. La concentración de sales biliares en el intestino humano es variable y difícil de predecir ya que está sujeta al tipo de alimento ingerido. Ciertas bacterias tienen la capacidad de hidrolizar las sales biliares a través de una enzima hidrolítica conocida como sal biliar hidrolasa. Esta característica ha sido observada en varios géneros bacterianos incluyendo *Lactobacillus* y difiere ampliamente entre las especies de este género; lo cual podría deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular microbiana (González y González, 2006; Pozza, Silva, García, García y Pozza, 2011).

Otra característica propia de un microorganismo probiótico es el efecto antagonista sobre algunos agentes patógenos, a través de sustancias antimicrobianas, como ácido láctico y acético; estos acidifican el medio e inhiben la proliferación de algunos agentes patógenos; así mismo, la producción de metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Cueto, Acuña y Valenzuela, 2010).

Los antibióticos son agentes antimicrobianos altamente eficaces en el tratamiento y erradicación de las infecciones bacterianas; sin embargo, su efectividad es reducida debido a que las bacterias son microorganismos adaptables y capaces de desarrollar mecanismos de resistencia. En recientes investigaciones, se ha afirmado que las bacterias comensales incluyendo BAL pueden poseer genes de resistencia a los antibióticos, condición adversa para que un microorganismo sea considerado seguro; ya que estas bacterias podrían transferir genes de resistencia a bacterias patógenas por medio de elementos móviles como plásmidos o transposones; por este motivo es importante evaluar los perfiles de resistencia ante diferentes antibióticos (Cueto y cols., 2010).

Trabajos previos

En España, Martín y cols. (2008), analizaron las características probióticas relevantes de 45 cepas de *Lactobacillus* aislados de muestras vaginales de mujeres sanas. En este estudio 21 cepas fueron clasificadas como *L. crispatus*, 17 correspondieron a *L. jensenii*, 6 a *L. gasseri* y una cepa se identificó como *L. plantarum*. La capacidad acidificante varió entre las especies estudiadas, así como su habilidad para formar biopelículas. La formación de H₂O₂ fue un común denominador entre las cepas; no se detectaron bacteriocinas, y todas las cepas presentaron resistencia a

metronidazol, ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina, trimetoprim sulfametoxazole, así mismo, a betalactámicos, eritromicina y tetraciclina. Basados en los resultados obtenidos todas las especies estudiadas fueron propuestas como candidatas a nuevos probióticos.

En Uruguay, Vázquez y cols. (2007) aislaron y caracterizaron una cepa de *Lactobacillus acidophilus* recuperada de materia fecal de un lactante. Se identificó fenotípicamente por tinción de Gram, prueba catalasa, pruebas de fermentación por API 50CH y crecimiento en anaerobiosis y aerobiosis. Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de resistencia al pH, tolerancia a sales biliares y se realizó un modelo gástrico "in vitro". Este microorganismo presentó la habilidad de sobrevivir al pasaje a través del tubo digestivo ya que resistió la exposición a un pH similar al estomacal, pudo crecer en un medio con sales biliares y sobrevivió a la acción conjunta de la pepsina y una simulación de jugo gástrico; características que permitieron clasificarla como posible cepa probiótica.

En Argentina, Pascual, Daniele, Ruíz, Giordano, Pájaro & Barberis (2008) aislaron una cepa con potencial probiótico, identificada como *Lactobacillus rhamnosus* L60 proveniente de fluido vaginal. Esta cepa mostró características esperadas como, coagregación, producción de peróxido de hidrógeno y actividad antimicrobiana ante patógenos urogenitales.

En diferentes Hospitales de la ciudad de Bogotá en Colombia, Vanegas y cols. (2010), recolectaron 17 muestras de leche materna y 19 muestras entre meconio y heces de neonatos. Se aislaron 26 cepas de *Bifidobacterium* spp. identificadas mediante PCR 16-23S; a todas se les determinó la capacidad antagónica, encontrándose los siguientes resultados: 17 (65,4%)

inhibieron al menos uno de los patógenos evaluados y 9 (34,6%) a ninguno de ellos. Trece cepas inhibieron a *Escherichia coli* ATCC 25922 y 10 aislamientos a *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; así mismo, 8 cepas afectaron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En Pakistán, Nawaz, Wang, Zhou, Ma, Wu, & Xu (2011), caracterizaron 61 cepas de lactobacilos aislados de lactantes saludables. Estos microorganismos fueron sometidos a pruebas de resistencia a la acidez gástrica, tolerancia a bilis y actividad antimicrobiana. Fueron seleccionadas 5 cepas (NWS09, NWS11, NWS14, NWS19 y NWS29), que se identificaron mediante secuenciación del gen 16S ARNr y la región 16S-23S del ARNr. Por otra parte, se realizó la caracterización de genes de resistencia transferibles, adhesión a células Caco-2 y resistencia al paso por el tracto gastrointestinal de BALB/c gnotobiotic.

La cepa NWS09 presentó resistencia transferible a eritromicina conferida por el gen *erm* (B); mientras que, NWS14 fue resistente a tetraciclina. Así mismo, NWS29 identificado como *L. fermentum* mostró una alta tolerancia a pH ácido, sales biliares y actividad antagónica contra 5 patógenos de alimentos, a través de la producción de bacteriocinas y acidificación del medio. También presentó alta adhesividad “in vitro” a las células Caco-2 y fue aislado en un alto número del tracto digestivo después de 24, 48 y 72 horas de inoculación en BALB/c gnotobiotic. *L. fermentum* NWS29 fue identificada como una cepa probiótica que puede ser incorporada en los alimentos para humanos.

En Cuba, Sánchez, Vichi, Llanes, Castro, Soler, Espinosa, Kociubinski y Ferreira (2011) aislaron y caracterizaron cepas vaginales de *Lactobacillus* spp. a las cuales se les determinó su estabilidad a pH ácido y a diferentes

temperaturas. Se seleccionaron 9 cepas con las mejores características como candidatos a probióticos por su capacidad de hemaglutinación, autoagregación, coagregación e inhibición de patógenos.

En Mérida- Venezuela, Mejía, Chacón, Guerrero, Rojas y López (2007) caracterizaron 22 cepas de *Lactobacillus* a partir de muestras fecales de niños y fluido vaginal de mujeres sanas, a las cuales se les evaluó el potencial probiótico “in vitro”. Los autores encontraron cepas con capacidad de resistir condiciones hostiles a pH 3, y a una concentración de sales biliares de 0,3%; así mismo, la propiedad de ejercer efecto antagonista ante microorganismos como: *Bacillus subtilis* ATCC 60519, *Candida albicans* ATCC 14053, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Moreno, Salas, Pérez y Jiménez (2011), en Mérida – Venezuela, evaluaron el potencial probiótico de 4 cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei* y una cepa de *L. rhamnosus*, provenientes de muestras de heces de lactantes y leche materna. Las pruebas “in vitro” consistieron en resistencia a la acidez gástrica en caldo MRS suplementado con pepsina ajustado a pH 2, 3 y 4, así mismo, resistencia a diferentes concentraciones de sales biliares (0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,3%). Las cepas ensayadas mostraron diferentes grados de resistencia y capacidad de multiplicarse en tales condiciones. Los lactobacilos estudiados presentaron comportamientos favorables para ser considerados como potencialmente probióticos, una cepa de *L. paracasei* ssp. *paracasei* (cepa 71) y una cepa de *L. rhamnosus* (cepa 75) presentaron el mayor potencial.

Hipótesis de la investigación

Las cepas de *Lactobacillus* spp. aislados a partir de fluido vaginal de mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación, poseen propiedades probióticas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

Estudio de tipo descriptivo.

Población y criterios de inclusión

Las cepas objeto de esta investigación fueron recuperadas a partir de fluido vaginal proveniente de mujeres embarazadas sanas en el último trimestre de gestación.

La recolección de las muestras de secreción vaginal se realizó en la consulta de Ginecología y Obstetricia del Hospital “Sor Juana Inés de la Cruz” de la ciudad de Mérida, Estado Mérida, durante el periodo Junio-Septiembre de 2012, con el consentimiento informado de la paciente. Los procedimientos fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki para investigación en seres humanos reseñado en el Código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología (Briceño, Pérez, Villalón, Aguilera, Michelangeli, Feliciangeli, Godoy, Camilloni, Otaiza y Ceballo, 2008; World Medical Association, 2013) (Anexo 1).

Recolección y transporte de las muestras

Las muestras de fluido vaginal fueron recolectadas por el médico especialista, mediante el uso de un hisopo estéril; éste se depositó en un tubo con 5 mL de caldo Mann Rogosa and Sharpe (MRS, BBL).

Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “*Prof. Celina Araujo de Pérez*”, para su respectivo procesamiento microbiológico.

Procesamiento microbiológico de las muestras

Las muestras de fluido vaginal fueron procesadas aplicando el siguiente protocolo (Figura 2):

1. La muestra depositada en el caldo MRS fue incubada a 37 °C en microaerofilia (5- 10% de CO₂) durante 24 horas.
2. A partir del caldo MRS se realizó un subcultivo en agar MRS, se incubó a 37 °C en condiciones de microaerofilia por 72 horas.
3. Se seleccionaron colonias con características macroscópicas y microscópicas compatibles con *Lactobacillus* spp.; es decir, colonias convexas, pequeñas, lisas y opacas, así mismo, la observación de bacilos grampositivos rectos en la tinción de Gram (Ocaña, Bru, de Riux-Holgado y Nader-Macías, 1999)

Identificación fenotípica

La identificación se realizó por medio de las siguientes pruebas: (Koneman y cols., 2008)

1. Tinción de Gram.
2. Prueba de catalasa.
3. Producción de gas a partir de glucosa.
4. Producción de indol.

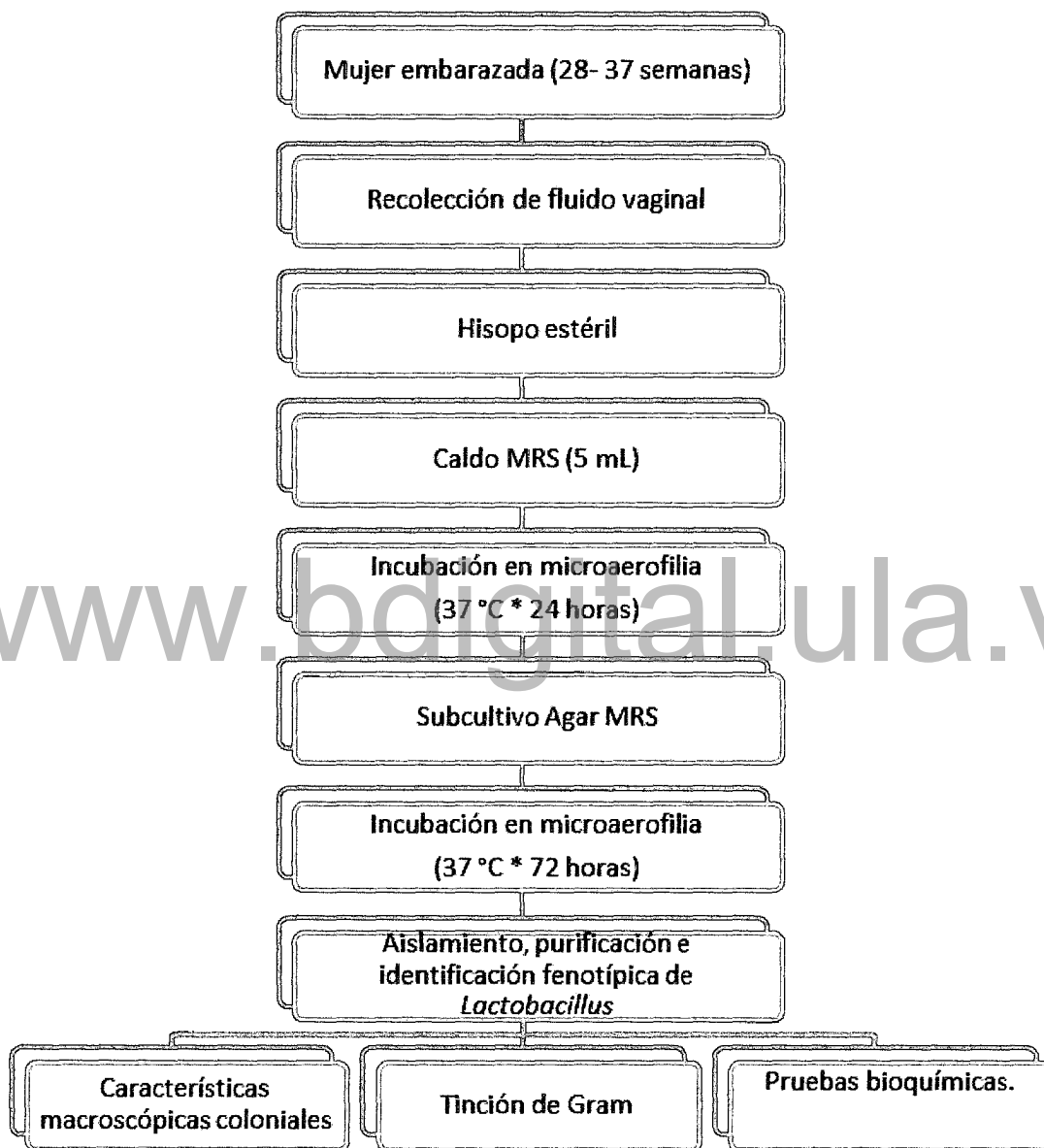


Figura 2. Procesamiento microbiológico de la muestra de fluido vaginal para el aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp.

5. Crecimiento a 15 °C y 45 °C
6. Fermentación de carbohidratos a través del sistema API 50 CH – API CHL (BioMerieux) y lectura con el programa API LAB plus v 3.2. Como control bioquímico fue utilizada la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

Evaluación del potencial probiótico de las cepas de *Lactobacillus*

1. Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas identificadas como lactobacilos fueron inoculadas en caldo MRS e incubadas a 37°C por 18- 20 horas. El cultivo fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con solución fisiológica estéril al 0,9% para eliminar el medio de cultivo. Con las células obtenidas se prepararon suspensiones celulares con una turbidez comparables al tubo N° 1 de la escala de Mac Farland (BioMeriux Marcy l'Etoile France) equivalente a 3×10^8 bacterias/mL, a una absorbancia de 0,31 a 560 nm (Moreno y cols., 2011).

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-8}) en agua peptonada, las cuales fueron sembradas en placas de MRS (100µl) e incubadas a 37°C bajo condiciones de microaerofilia por 24 horas; luego de la incubación se realizó el conteo de colonias (Figura 3).

2. Resistencia a la acidez gástrica

La metodología utilizada se fundamentó en la propuesta de Font y Taranto (2001) modificada; para ello, se preparó jugo gástrico artificial compuesto por 1000 U/mL de pepsina y 2 g de NaCl por litro, ajustando el pH entre 2- 2,3 con HCl concentrado, como control se utilizó jugo gástrico a pH 6- 6,5 ajustado con NaOH 1N. Estas soluciones fueron esterilizadas con

filtro de membrana de 0,22 μm , y repartidas a razón de 10 mL en tubos estériles, los cuales se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

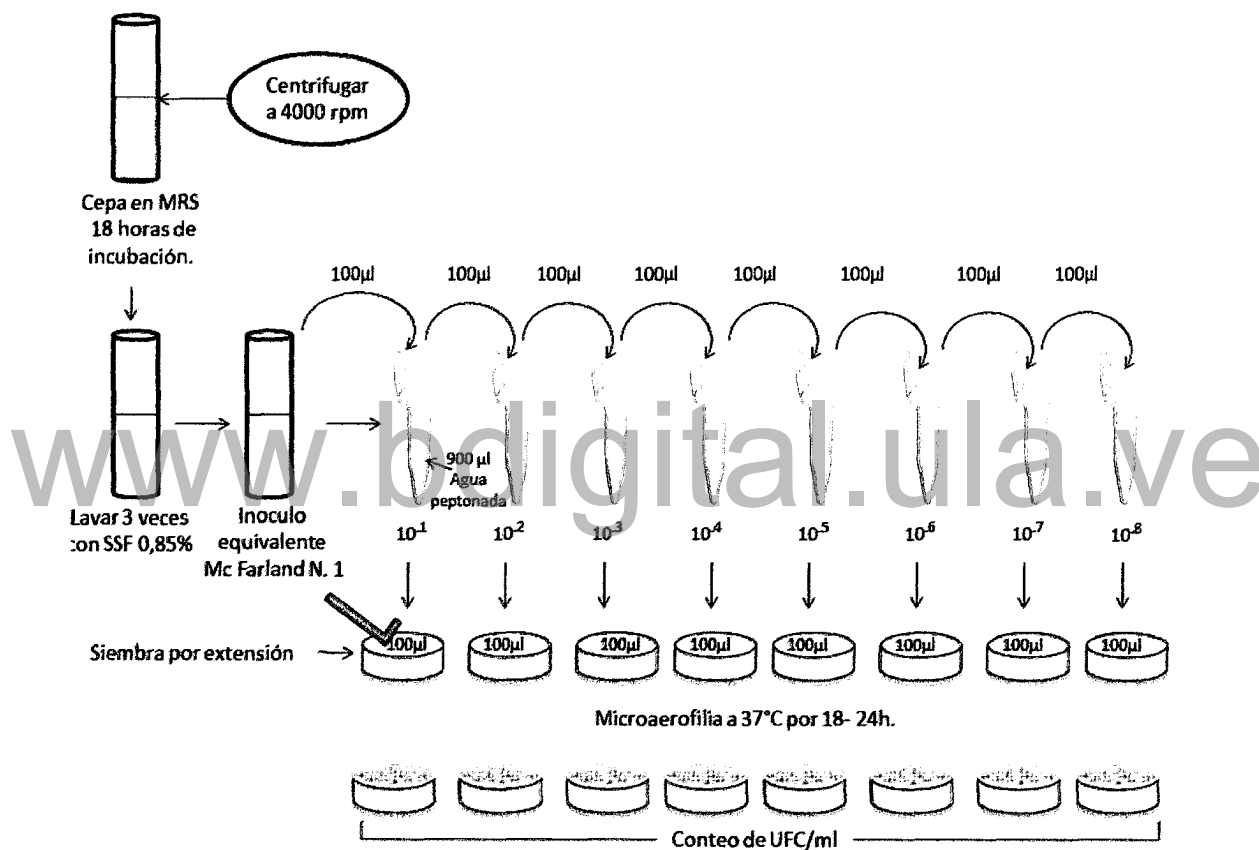


Figura 3. Preparación del inóculo bacteriano.

A partir de cada suspensión celular preparada en el procedimiento N° 1, se inocularon 20µL en 10 mL de jugo gástrico artificial a pH 2- 2,3 y pH 6-6,5; se incubaron a 35 °C en baño de María por espacio de 3 horas. Al cabo de este período se determinó la concentración bacteriana en cada tubo en los tiempos 0, 1, 2 y 3 horas de incubación. Para ello se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-5}) en agua peptonada y se cultivaron 100 µL sobre placas de MRS, incubándose a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia por 24 horas; luego de la incubación se realizó el conteo de colonias. Las cepas que no mostraron reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) fueron consideradas como bacterias resistentes a la acidez gástrica (Figura 4).

3. Resistencia a las sales biliares

La determinación de la capacidad para soportar diferentes concentraciones de sales biliares se realizó aplicando la metodología descrita por Font y Taranto (2001); Alvarado y Díaz (2009b) y Moreno y cols. (2011):

De las suspensiones celulares preparadas en el procedimiento N°1, se tomó 50 µL de cada cepa y se dispensó en 5mL de caldo MRS suplementado con diferentes concentraciones de sales biliares (Ox bile, Himedia) comprendidas entre 0,1%, 0,2% y 0,3%; luego se incubó a 37°C, por espacio de 6 horas con lecturas de densidad óptica ($\lambda=560\text{nm}$) a cada hora de incubación. Finalmente, se dejaron los tubos hasta las 24 horas para realizar una última lectura. Como control se preparó para cada cepa experimental un tubo con 50 µL de suspensión de células en 5 mL de caldo MRS sin sales biliares (Figura 5).

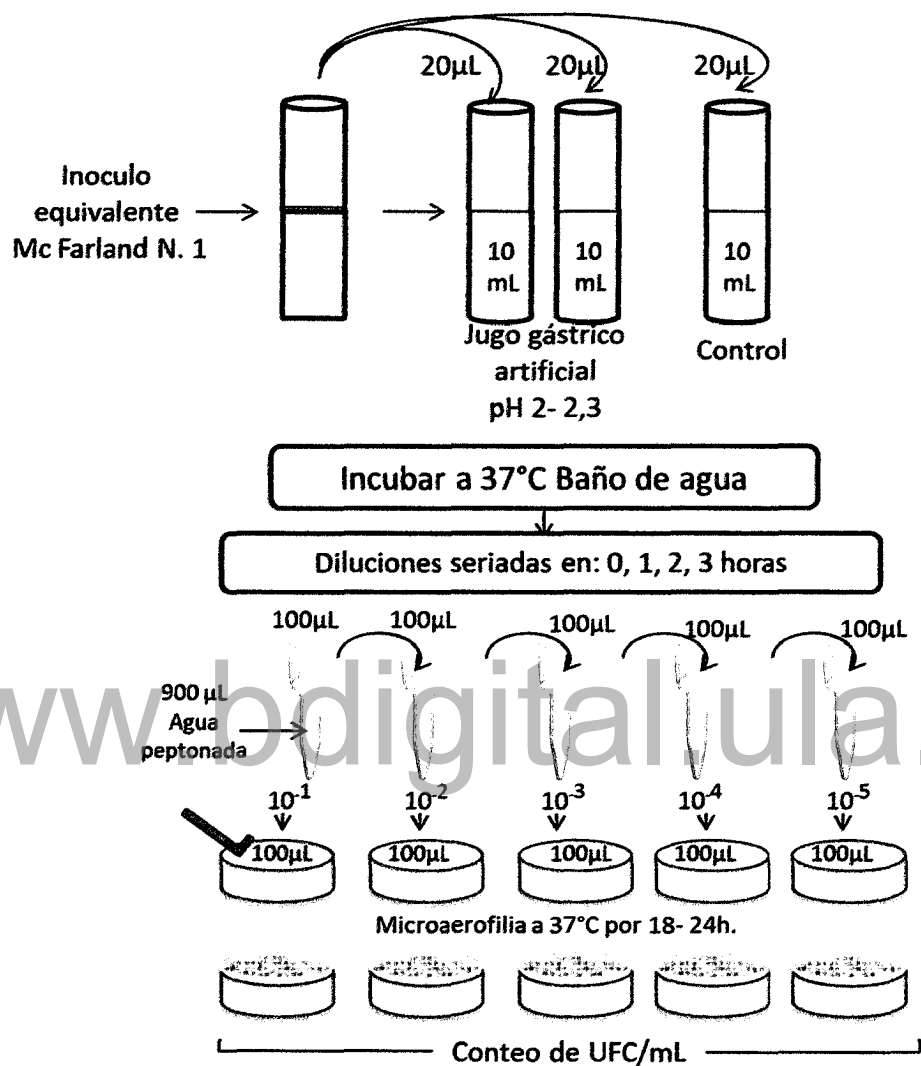


Figura 4. Prueba de resistencia a la acidez gástrica.

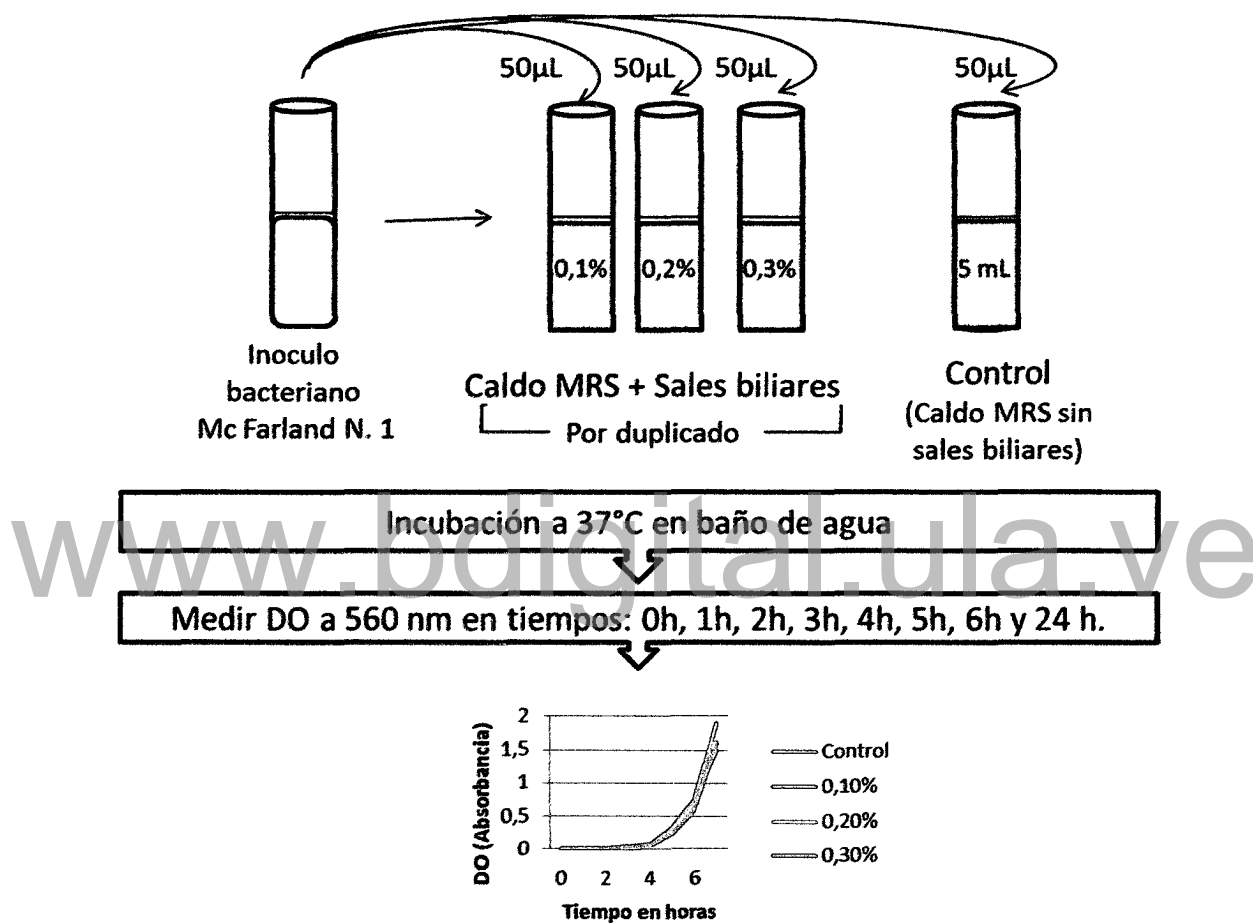


Figura 5. Prueba de resistencia a sales biliares.

pocillos formados se depositaron: a) 80 µL del sobrenadante obtenido por centrifugación de cada cepa de lactobacilos en estudio y b) 80 µL del cultivo directo (inoculo bacteriano equivalente a la escala Mac Farland N°1) en pocillos diferentes; las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas en microaerofilia. Se utilizó *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 como cepa de referencia con actividad antagónica positiva.

El efecto antagónico se determinó midiendo los diámetros de los halos de inhibición alrededor del pocillo, expresados en mm. Cualquier halo mayor o igual a 9mm de diámetro fue considerado como actividad antagónica positiva (Tagg y McGiven, 1971; modificado por Alvarado y Díaz, 2009b) (Figura 6).

5. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos

Se utilizó la técnica de difusión del disco substituyendo el agar Mueller Hinton por agar MRS (Ocaña, Silva y Nader, 2006; Alvarado y Díaz, 2009b). Los antibacterianos probados fueron: ampicilina 10 µg (BBL); eritromicina 15 µg (BBL); ciprofloxacina 5 µg (BBL); amikacina 30 µg (BBL), gentamicina 10 µg (HiMedia) y vancomicina 30 µg (BBL).

La interpretación de la susceptibilidad de los lactobacilos a la ampicilina, eritromicina, ciprofloxacina y vancomicina se realizó usando los puntos de corte estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) para *Enterococcus* spp., por su relación filogenética con los lactobacilos (Alvarado y Díaz, 2009b).

Para interpretar el resultado de sensibilidad a la amikacina y gentamicina se utilizó el diámetro de inhibición sugerido por la casa comercial.

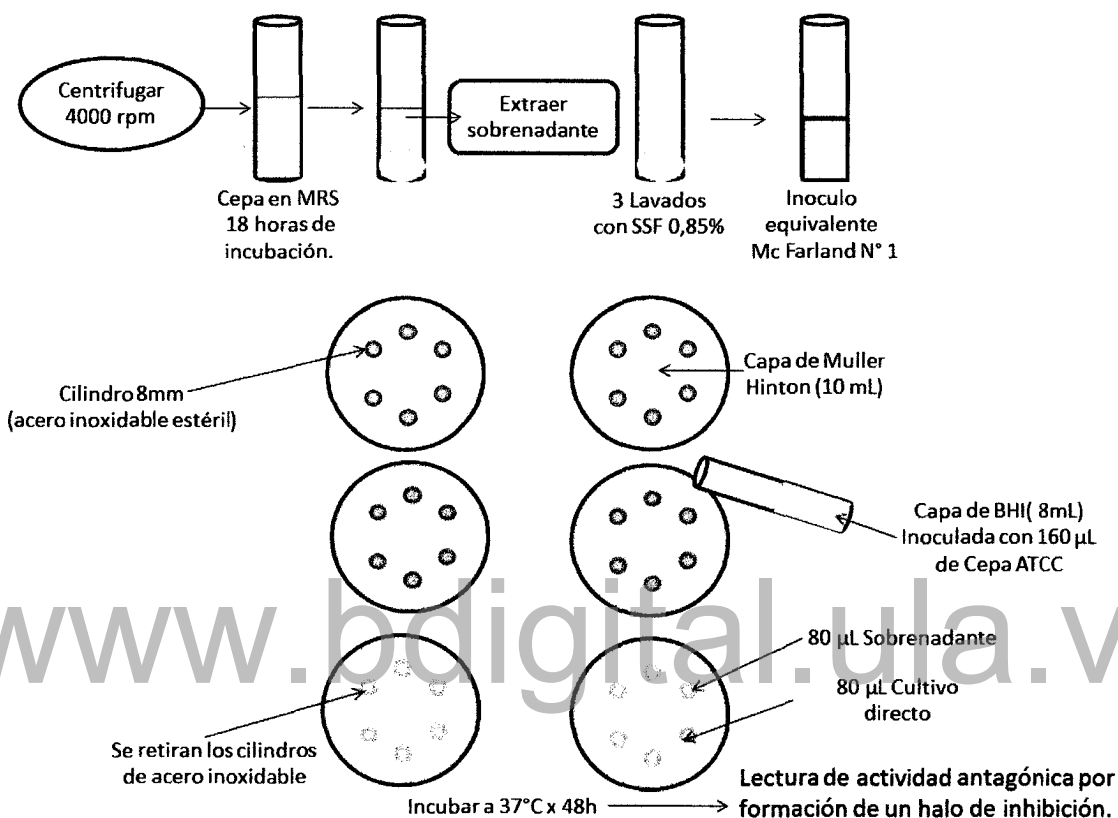


Figura 6. Prueba de actividad antagónica.

Análisis de resultados

Los datos obtenidos en el procesamiento microbiológico y pruebas “in vitro” fueron sometidos a un análisis descriptivo a través de tablas de resultados y gráficos; así como el cálculo de fórmulas para el análisis cuantitativo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Del estudio analítico de las muestras de fluido vaginal, se recuperaron 23 colonias con características propias de lactobacilos; es decir; bacilos grampositivos, catalasa negativos con producción de ácido positivo a partir de glucosa. Posteriormente, se seleccionaron al azar 10 colonias para la identificación bioquímica hasta género y especie, mediante el uso de galerías API 50 CH (Anexos 3 y 4). En la Tabla 3 se presentan los resultados de la identificación fenotípica de las 10 cepas en estudio, las cuales fueron sometidas a pruebas para la evaluación de su potencial probiótico. Como se puede observar la identificación bioquímica de las cepas en estudio, estuvo en un perfil de identificación: bueno (84%) hasta muy bueno (99%).

Evaluación del potencial probiótico de las cepas de *Lactobacillus* spp.

1. Resistencia a la acidez gástrica.

En la Tabla 4 se registran los resultados que determinan la capacidad que tienen los lactobacilos en estudio de resistir la acidez gástrica (pH 2-2,3), la misma se expresó en logaritmo de las UFC/mL (log UFC/mL).

Las cepas LB05 y LB09 mostraron crecimiento a la primera hora de incubación en el jugo gástrico artificial con un porcentaje de supervivencia de 51% y 74% respectivamente (Anexo 5 y 6); mientras que, la cepa LB02 desarrolló hasta la segunda hora de incubación con una supervivencia del

Tabla 3: Identificación fenotípica de colonias aisladas a partir de fluido vaginal de embarazadas en el último trimestre de gestación.

Cepa	Identificación bioquímica (Sistema API)	Porcentaje de confiabilidad de identificación
Control ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9 %
LB01	<i>Lactobacillus acidophilus 1</i>	85.0%
LB02	<i>Lactobacillus acidophilus 1</i>	86.3%
LB03	<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	99,6%
LB04	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 2</i>	99.5%
LB05	<i>Lactobacillus acidophilus 2</i>	84.0%
LB06	<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	92.9%
LB07	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 2</i>	95.0%
LB08	<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	97.9%
LB09	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 2</i>	99.7%
LB10	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 2</i>	99.4%

Tabla 4: Crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* spp. en jugo gástrico artificial a pH 2- 2,3 en función del tiempo.

Cepa	Tiempo (Horas)	Log UFC/mL pH 2- 2,3	Log UFC/mL pH 6- 6,5 (control)
LB01	0	3,9	4,9
	1	0	5,1
	2	0	4,8
	3	0	5
LB02	0	4,3	4,1
	1	2,5	4,4
	2	2,9	4,6
	3	0	4,5
LB03	0	3,7	4,3
	1	0	4,4
	2	0	4,5
	3	0	4,5
LB04	0	4,6	4,6
	1	0	4,4
	2	0	4,8
	3	0	4,9
LB05	0	4,7	4,9
	1	2,5	4,9
	2	0	5
	3	0	5
LB06	0	4	4
	1	0	3,9
	2	0	3,8
	3	0	4,2
LB09	0	4,8	4,4
	1	3,7	5
	2	0	5
	3	0	5,1
LB10	0	3,4	5,1
	1	0	4,8
	2	0	4,2
	3	0	4,4

UFC: Unidades formadoras de colonias

63% (Tabla 5). El cálculo del porcentaje de supervivencia se realizó según la fórmula propuesta por Cueto y cols. (2010) (Anexo 7).

Tabla 5: Porcentaje de supervivencia de las cepas LB02, LB05 y LB09 en jugo gástrico artificial a pH 2- 2,3.

Cepa	Porcentaje de supervivencia
LB02	63 %
LB05	51 %
LB09	74 %

Por su parte, las cepas LB01, LB03, LB04, LB06 y LB10 no desarrollaron a pH 2-2,3; siendo consideradas como totalmente sensibles a la acidez gástrica.

2. Resistencia a sales biliares:

En los gráficos del 1 al 10 se registran las curvas de crecimiento para las 10 cepas de lactobacilos ensayadas; el desarrollo bacteriano se expresó en lecturas de densidad óptica (D.O.) en función del tiempo en horas. En éstos se compara el crecimiento de las cepas en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares (0,1%, 0,2% y 0,3%).

En los Gráficos 1 y 2, se presentan las curvas de crecimiento de las cepas LB03 y LB09, se observa un comportamiento similar en presencia de sales biliares a diferentes concentraciones con respecto al control; esto indica que las cepas resistieron la presencia de esta sal; cabe destacar que estos aislamientos presentaron una fase de adaptación más corta en comparación con el resto de las cepas; por consiguiente, la fase exponencial de crecimiento inició aproximadamente a las dos horas de incubación.

La cepa LB02 (Gráfico 3), mostró una fase de adaptación prolongada (superior a 6 horas); no obstante, a las 24 horas se observó crecimiento en los cultivos con sales biliares, superando las medidas de D.O. mostradas por el control.

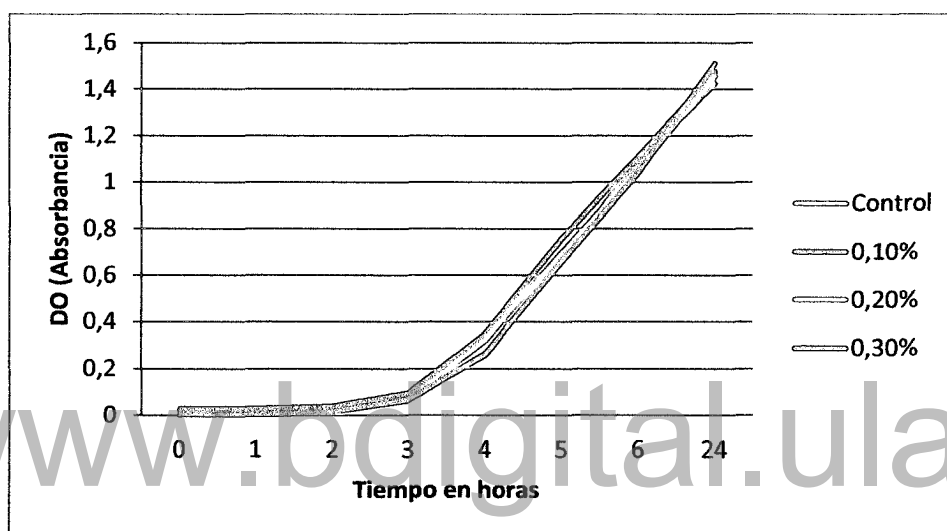


Gráfico 1. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB03 en diferentes concentraciones de sales biliares.

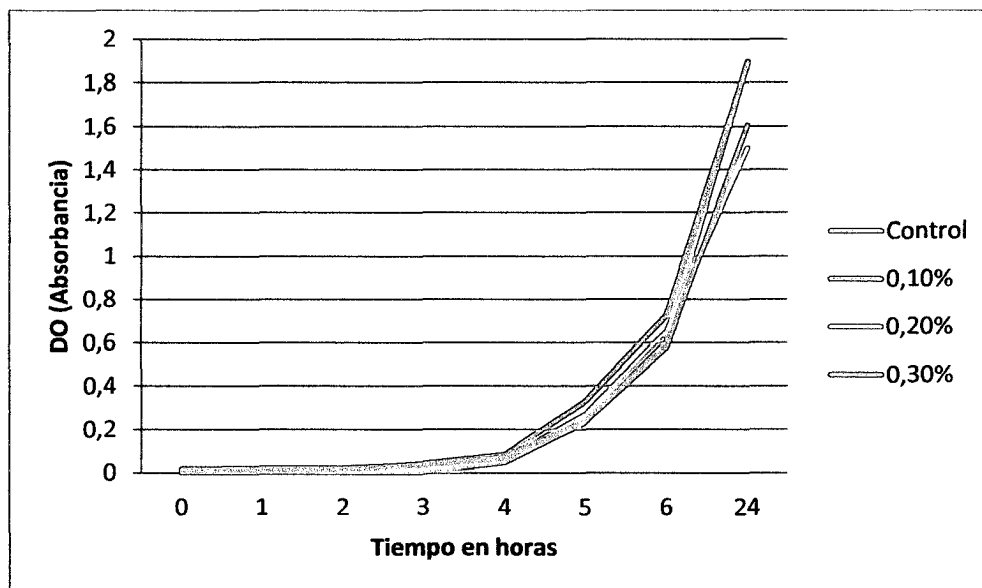


Gráfico 2. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB09 en diferentes concentraciones de sales biliares.

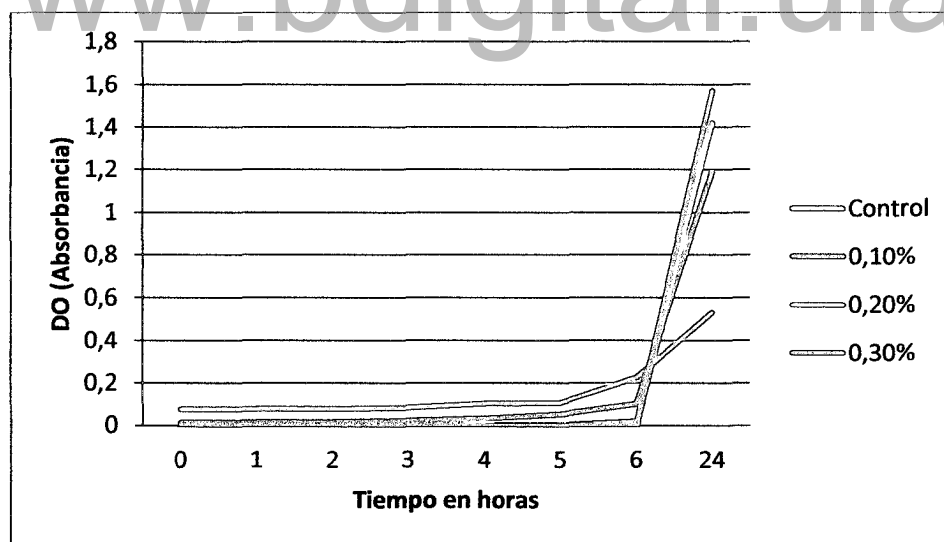


Gráfico 3. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB02 en diferentes concentraciones de sales biliares.

Las cepas LB04, LB05, LB07 y LB10 (Gráficos 4, 5, 7, 9) presentaron un crecimiento similar al control; sin embargo, fue un crecimiento lento a pesar de su evidente resistencia a las diferentes concentraciones de sales biliares. Entretanto, la cepa LB01 (Gráfico 10) fue sensible ante la acción de las sales biliares; LB06 (Gráfico 6) fue sensible a las concentraciones 0,2% y 0,3%, así mismo LB08 (Gráfico 8) fue sensible a la concentración 0,3%.

El retraso en el crecimiento (D) para las cepas LB03 y LB09, fue igual a cero (0), considerando estas cepas como resistentes a la acción de las sales biliares. Mientras que, para el resto de las cepas ensayadas no fue posible el cálculo de D, ya que su fase logarítmica se presentó después de 6 horas.

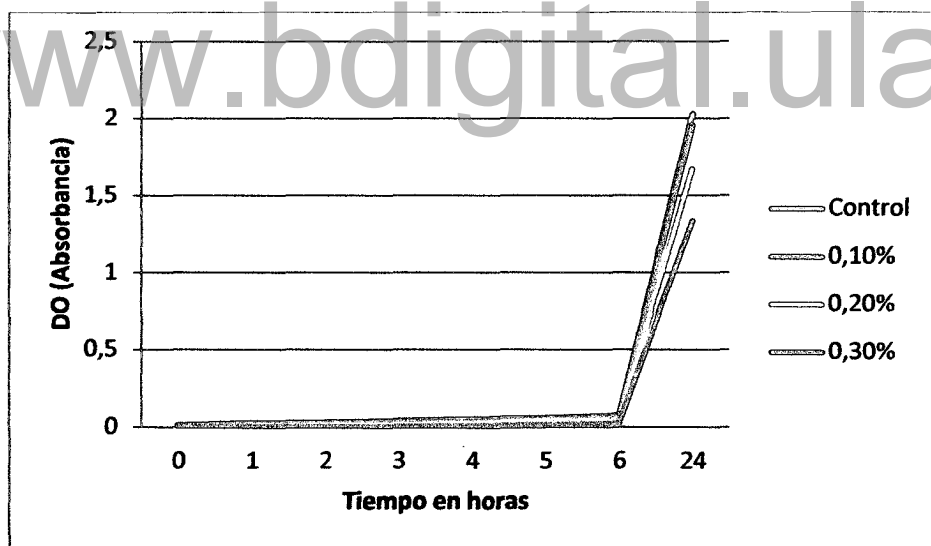


Gráfico 4. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB04 en diferentes concentraciones de sales biliares.

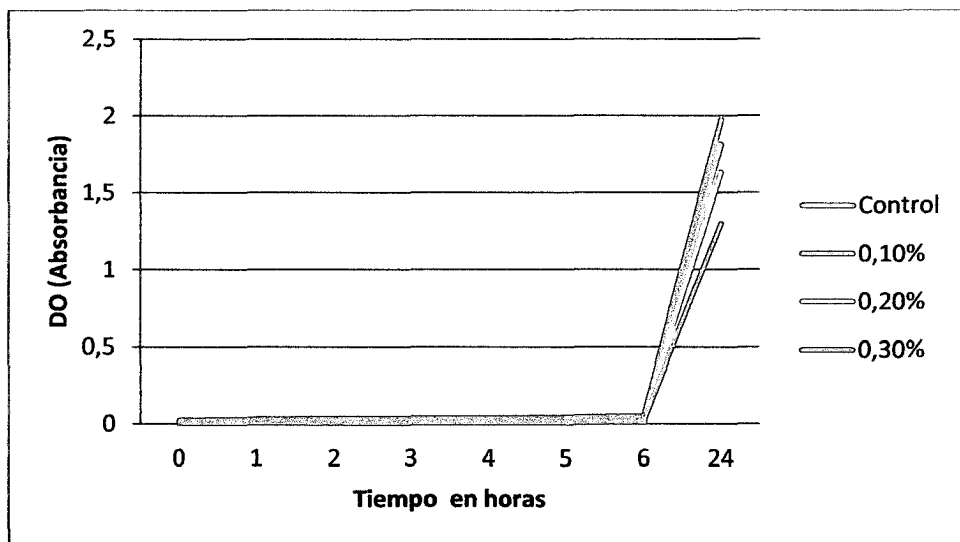


Gráfico 5. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB05 en diferentes concentraciones de sales biliares.

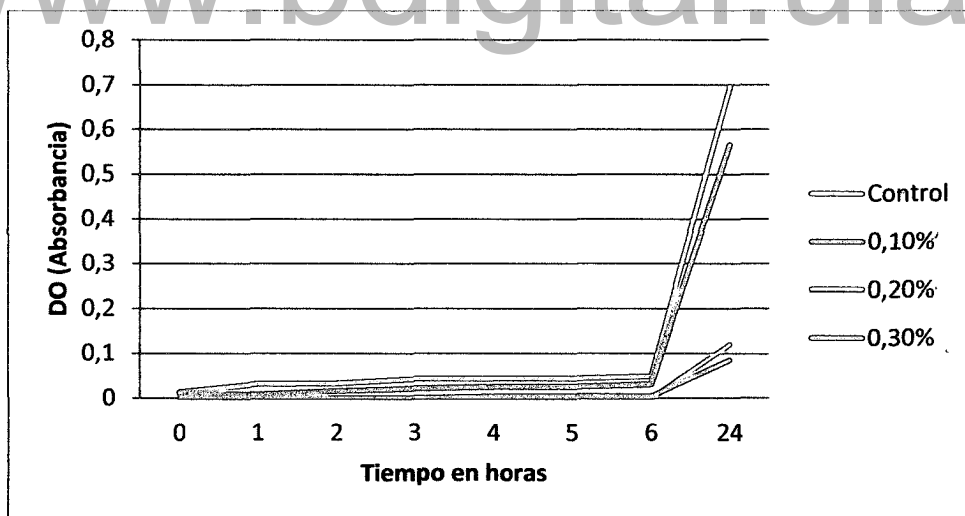


Gráfico 6. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB06 en diferentes concentraciones de sales biliares.

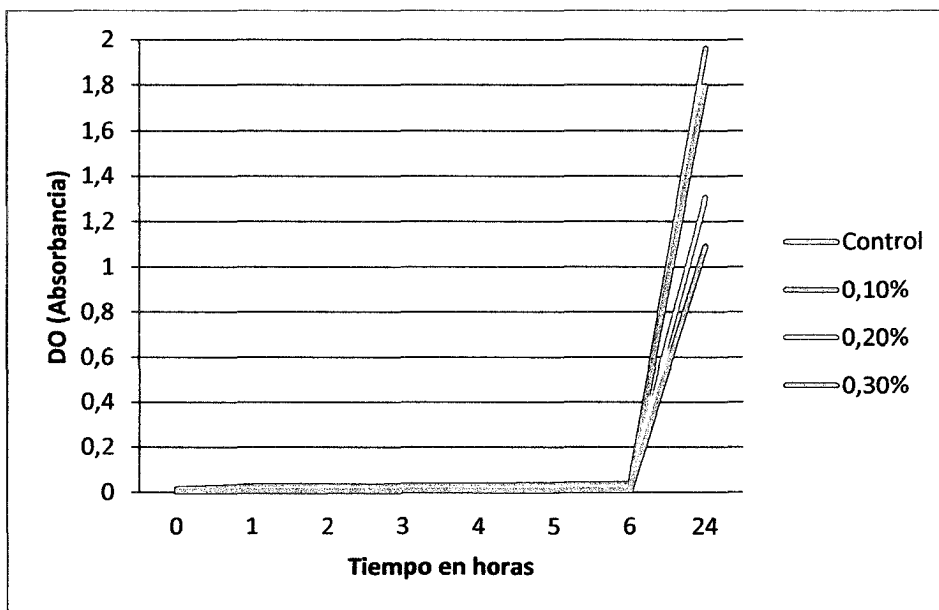


Gráfico 7. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB07 en diferentes concentraciones de sales biliares.

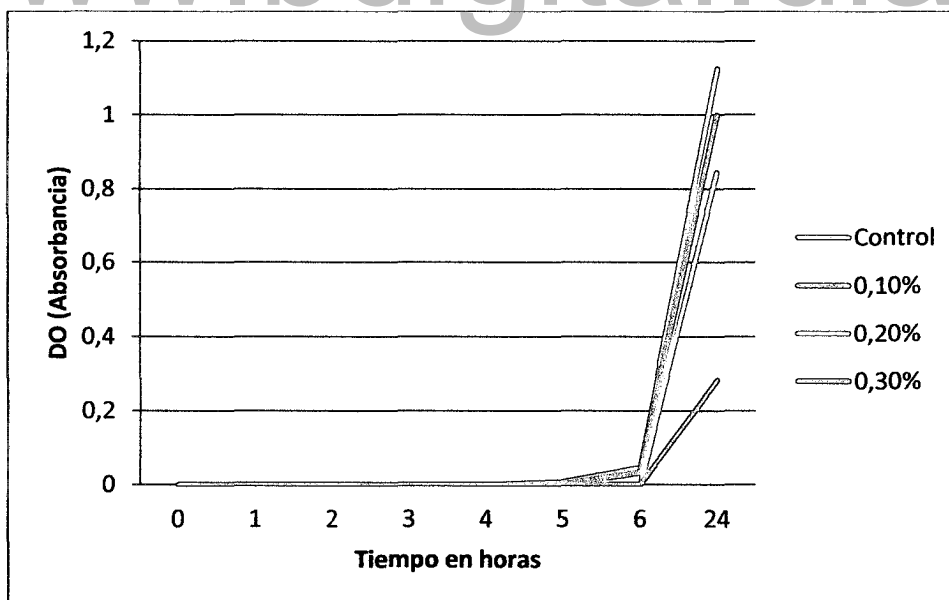


Gráfico 8. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB08 en diferentes concentraciones de sales biliares.

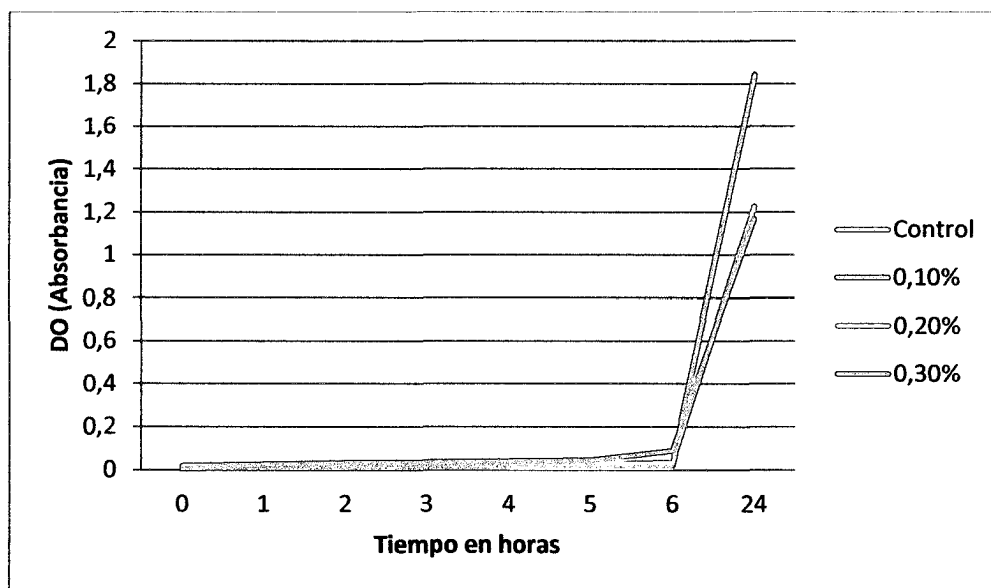


Gráfico 9. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB10 en diferentes concentraciones de sales biliares.

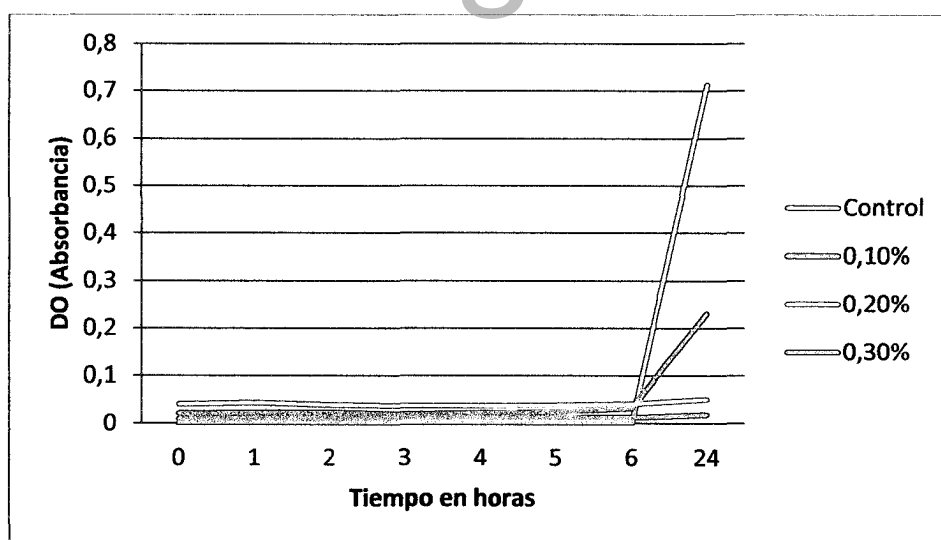


Gráfico 10. Valores de densidad óptica (DO) en función del tiempo de incubación de la cepa LB01 en diferentes concentraciones de sales biliares.

3. Actividad antagónica

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la actividad antagónica de las bacterias en estudio. Así tenemos que LB02, LB04, LB06, LB09 y LB10, mostraron efecto inhibitorio contra al menos uno de los microorganismos patógenos ensayados. La cepa LB05 presentó actividad antagónica positiva frente a todos los patógenos (Anexo 8). Las cepas LB02 y LB05 fueron capaces de inhibir tanto a bacterias grampositivas como gramnegativas. Los aislamientos LB01, LB03, LB07 y LB08 no manifestaron actividad antagónica.

El mayor efecto antagónico se observó a partir del sobrenadante de la cepa LB05.

4. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos

Todas las cepas de lactobacilos estudiadas fueron sensibles a los antibióticos betalactámicos ensayados y al representante de los macrólidos.

En el caso de las quinolonas, 4 cepas fueron resistentes; mientras que, para los aminoglucósidos 9 cepas fueron resistentes. Por otra parte, LB03, LB09, LB10 fueron sensibles a vancomicina (Tabla 7).

Tabla 6: Actividad antagónica de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a los patógenos de referencia.

Cepas		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
LB01	S	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
LB02	S	++	-	+	-
	C	-	-	-	-
LB03	S	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
LB04	S	-	-	+	+
	C	-	-	+	+
LB05	S	++	++	+	+
	C	-	-	-	-
LB06	S	++	-	-	-
	C	-	-	-	-
LB07	S	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
LB08	S	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
LB09	S	-	-	+	-
	C	-	-	+	-
LB10	S	-	-	+	-
	C	-	-	++	-

S: sobrenadante de cultivo en caldo MRS. C: Cultivo directo en caldo MRS.
 (-): halo de inhibición <8mm; (+): halo de inhibición entre 9-11mm; (++):
 halo de inhibición entre 12-14 mm.

Tabla 7: Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las 10 cepas de *Lactobacillus* spp. evaluadas

CEPA	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana						
	AM	SAM	GEN	AK	E	CIP	VA
LB01	23 S	22 S	0 R	0 R	37 S	23 S	0 R
LB02	24 S	23 S	10 R	9 R	40 S	24 S	0 R
LB03	22 S	26 S	0 R	0 R	42 S	0 R	20S
LB04	25 S	23 S	14 I	12 R	40 S	30 S	0 R
LB05	22 S	22 S	12 R	10 R	39 S	25 S	0 R
LB06	20 S	22 S	9 R	9 R	39 S	26 S	0 R
LB07	25 S	26 S	14 I	14 R	45 S	30 S	0 R
LB08	20 S	21 S	0 R	0 R	38 S	0R	0 R
LB09	32 S	30 S	14 I	15 I	19 I	0 R	24 S
LB10	19 S	25 S	11 R	10 R	20 I	0 R	23 S

S: Sensible, I: Sensibilidad intermedia, R: Resistente, AM: Ampicilina, SAM: Ampicilina sulbactam, GEN: Gentamicina, AK: Amikacina, E: Eritromicina, CIP: Ciprofloxacina, VA: Vancomicina.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

1. Resistencia a la acidez gástrica.

La acidez gástrica es uno de los aspectos que más afecta la viabilidad de los lactobacilos en su paso por el tubo digestivo; sin embargo, muchas especies de lactobacilos pueden superar esta barrera ya que son acidúricos, lo que les permite crecer incluso a pH inferior a 5, como es el caso del pH estomacal, propiedad que varía entre las diferentes especies de este género bacteriano (Prescott y cols., 2004).

En el presente estudio, las cepas LB02, LB05 y LB09 exhibieron crecimiento después de 1 a 2 horas de realizado el cultivo en jugo gástrico artificial (pH 2- 2,3); no obstante el crecimiento fue menor que el control.

Es de considerar que se trata de un modelo “in vitro”; en condiciones fisiológicas las secreciones gástricas poseen componentes que pueden favorecer la permanencia de los lactobacilos en ambientes ácidos; además, los alimentos ingeridos sirven como una matriz protectora, ejerciendo un efecto buffer evitando así la acción directa de los jugos gástricos sobre el microorganismo (Gardiner, Stanton, Lynch, Collins, Fitzgerald & Ross, 1999; Moreno y cols., 2011).

De lo anterior, se puede esperar que la supervivencia de LB02, LB05 y LB09 a pH gástrico aumente dependiendo de la matriz de alimento utilizada para contener cualquiera de estas cepas y así promover su tránsito por el tubo digestivo y ejercer su efecto probiótico.

En contraste, Sánchez y cols. (2011), caracterizaron cepas de lactobacilos de origen vaginal capaces de crecer a pH 2,5; así mismo, Nawaz y cols. (2011), reportaron crecimiento de 17 cepas provenientes de leche materna a pH 2,5. Por su parte, Cueto y cols. (2010), obtuvieron crecimiento de lactobacilos provenientes de suero costeño, en jugo gástrico artificial a pH 2, observándose un descenso de 3 ciclos logarítmicos en el crecimiento de las cepas.

Por otro lado, Pan y cols. (2009), Moreno y cols. (2011), reportaron la incapacidad de los lactobacilos recuperados de crecer a pH 2, siendo capaces de crecer en pH 3 y 4. Los autores consideraron a las cepas producto de esa investigación como lactobacilos con capacidad probiótica.

Ahora bien, las cepas en estudio provienen de un hábitat con un pH que oscila entre 3,8-4,5, pudiéndose inferir que estos lactobacilos son capaces de crecer bajo estas condiciones; por consiguiente, desde el punto de vista de la vía de administración, las cepas ensayadas pueden ser utilizadas en la manufactura de fórmulas vaginales.

2. Resistencia a sales biliares.

En su paso por el tubo digestivo los lactobacilos deben exponerse a la acción de sales biliares, éste ejerce un efecto lítico sobre la membrana celular de las diferentes especies bacterianas, debido a su capacidad de alterar la permeabilidad de la misma. En la presente investigación las cepas LB03 y LB09 presentaron un retardo en el crecimiento igual a cero (0); es decir, que el efecto inhibitorio de las sales sobre dichas cepas fue poco o casi nulo; por consiguiente son consideradas resistentes a las sales biliares.

Para las demás cepas evaluadas, LB02, LB04, LB05, LB06, LB07, LB08 y LB10 no fue posible realizar el cálculo del retraso del crecimiento, dado que, la fase logarítmica en todas ellas, se presentó después de 6 horas. No obstante, las curvas de crecimiento a las 24 h demostraron la capacidad de estas cepas para resistir el efecto inhibitorio de las sales biliares.

Por otro lado, LB02 y LB03 mostraron un comportamiento interesante, puesto que, la viabilidad incrementó a medida que aumentaba la concentración de este detergente biológico, observándose la mayor D.O. en la concentración con sales biliares más alta (0,30%). En este caso se podría especular que a medida que aumenta la concentración de sales, la cepa va adaptándose y al mismo tiempo nutriéndose de este sustrato, efecto que favorecería su viabilidad a nivel intestinal. Resultados similares fueron encontrados por Moreno y cols. (2011).

En los microorganismos resistentes a la acción de las sales biliares, la literatura plantea la presencia de actividad hidrolasa en diferentes cepas de *Lactobacillus*; aunque la función de esta enzima no es bien conocida, existen varias hipótesis acerca de los beneficios que puede aportar a la bacteria, entre ellos: proveerla de una membrana celular reforzada que indudablemente facilitaría su tránsito por el intestino, o aumentar la capacidad para inhibir a otros microorganismos, confiriéndole una ventaja selectiva en este entorno altamente competitivo (Begley, Hill & Gahan, 2006).

Otro aspecto que llama a la atención, es el hecho de que las cepas LB03 y LB09, presentaron una fase de adaptación más corta en comparación con el resto de las cepas; por consiguiente, la fase exponencial de crecimiento inició aproximadamente a las dos horas de incubación. Esta característica confiere una ventaja importante a los microorganismos

probióticos dado que, un rápido crecimiento del microorganismo puede favorecer la colonización a nivel de las células epiteliales, prerequisite esencial para ejercer un efecto protector (Reid & Bruce, 2006).

3. Actividad antagónica.

Diversas especies del género *Lactobacillus* tienen la capacidad de producir biocinas extracelulares que afectan la permeabilidad de la membrana citoplasmática de otras bacterias; además producen metabolitos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, peróxido de hidrógeno y enzimas inhibitorias; en conjunto actúan ejerciendo un efecto antagónico frente a la microbiota competitiva (Vallejo y cols., 2008; Alvarado y Díaz, 2009; Shiva y Jara, 2013).

En el presente trabajo, las cepas LB02, LB04, LB06, LB09 y LB10 exhibieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que, la cepa LB05 presentó actividad contra todos los patógenos ensayados. La mayor actividad inhibitoria se presentó en el sobrenadante, lo que significa que este efecto antagónico se debe posiblemente a la producción de bacteriocinas, compuestos antimicrobianos o alguno de los productos del metabolismo de los lactobacilos.

En este sentido, algunos autores señalan que los efectos antagonistas de los probióticos contra microorganismos patógenos o alterantes se ha atribuido principalmente a la producción de ácidos orgánicos (Alvarado y Díaz, 2009; Sánchez y cols., 2011).

Por su parte, Moreno y cols. (2011) y Pan y cols. (2009), reportaron mayor actividad antagónica en el cultivo directo de las cepas de lactobacilos sobre las bacterias patógenas ensayadas más que del sobrenadante.

4. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Uno de los criterios más importantes para la selección de cepas probióticas es su inocuidad, razón por la cual el conocer el patrón de resistencia a los antibióticos es de interés. Con algunas excepciones la resistencia a los antibióticos en estos microorganismos no se considera una característica deseable (Córdoba, Chaves y Arias, 2009; Gueimonde, Sánchez, de los Reyes & Margolles, 2013).

Dada la complejidad taxonómica de este género, no han sido establecidos puntos de corte para las diferentes familias de antimicrobianos.

En el presente estudio se encontró que la mayoría de las cepas fueron resistentes a la vancomicina exceptuando a LB03, LB09 y LB10. En la literatura se describe este fenotipo de resistencia como intrínseca y es uno de los más estudiados en los lactobacilos. Su mecanismo de acción se basa en la sustitución del sitio de unión de la vancomicina al terminal D-alanil/ D-alanina del pentapéptido, evitando la polimerización del peptidoglicano. Se ha demostrado que en varias especies de *Lactobacillus* el terminal D-alanina es sustituido por un terminal D-lactato o D-serina, evadiendo la unión de la vancomicina (Gueimonde y cols., 2013). Sin embargo, Rojo y cols. (2006, citado por Córdoba y cols., 2009) indican que algunas especies de *Lactobacillus* no poseen resistencia intrínseca a este antibiótico; así mismo, Karapetkov y cols. (2011), reportaron 5 cepas sensibles a este glicopéptido.

Los lactobacilos son usualmente sensibles a los betaláctamicos, característica observada en la totalidad de las cepas en estudio. Resultados similares fueron obtenidos por Córdoba y cols. (2009), Alvarado y Díaz (2009), Martin y cols. (2008) y Mejías y cols. (2007).

Así mismo, se observó una alta sensibilidad a eritromicina en las cepas evaluadas; esto se corresponde con lo referido en la literatura (Gueimonde y cols., 2013).

En cuanto a los aminoglucósidos, nueve (9) cepas presentaron resistencia a la amikacina; mientras que siete, (7) fueron resistentes a gentamicina y las restantes mostraron sensibilidad intermedia frente a la acción de los antibióticos, de acuerdo a los criterios establecidos para este estudio. Reportes similares fueron documentados por Gueimonde y cols. (2013), quienes refieren una elevada resistencia de los lactobacilos a estos antibióticos. En la literatura se describen genes de resistencia a aminoglucósidos, los cuales codifican enzimas transferasas aac (6')- aph (2''), ant (6) y aph (3')- IIIa; que son responsables de catalizar la modificación de los aminoglucósidos, impidiendo su unión a los ribosomas y por ende su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas (Gueimonde y cols., 2013)

Por lo que se refiere a las quinolonas la literatura describe que la actividad de este grupo de antibióticos esta disminuida frente a lactobacilos (Gueimonde y cols., 2013). En el presente estudio las cepas LB01, LB02, LB04, LB05, LB06 y LB07 presentaron sensibilidad a la ciprofloxacina. Resultados similares reportaron Córdoba y cols. (2009), quienes describieron un bajo grado de resistencia a ciprofloxacina. En contraste, Karapetkov y cols. (2011) reportan un alto grado de resistencia frente a los inhibidores de la síntesis ADN, los autores mencionan que aún no se conoce el mecanismo que media la resistencia a fluoroquinolonas en *Lactobacillus*.

Resulta de interés la determinación y comparación de patrones de susceptibilidad a los antibióticos en bacterias de diferentes grupos y en particular en *Lactobacillus* spp; ya que los probióticos ingeridos con los alimentos funcionales entran en contacto con la microbiota intestinal, pudiendo este nicho ecológico constituirse como un reservorio de genes de resistencia transmisibles (FAO y OMS, 2001).

Considerando los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, existe una alta variabilidad en el comportamiento de las diferentes cepas evaluadas, en cuanto a la caracterización preliminar de la capacidad probiótica; los patrones reportados en la literatura de resistencia a pH y sales biliares son muy variables, a tal punto que los resultados de estas pruebas “in vitro” son específicas de cada cepa y por consiguiente, no son extrapolables.

Partiendo de la premisa que las cepas de una misma especie no son iguales y por ende no aportan los mismos beneficios, se ha propuesto la formulación de productos probióticos compuestos de mezclas de microorganismos con diferentes propiedades biorreguladoras, ya que la funcionalidad de un inóculo multicepa puede ser más efectiva y consistente, debido a la posibilidad de complementar sus efectos expresando sus propiedades probióticas en forma sinérgica (Ávila, Ávila, Tovar, Brizuela, Perazzo y Hernández, 2010; Martín y cols., 2008; Moreno y cols., 2011; Sánchez y cols., 2011)

En la presente investigación, fueron caracterizadas cepas que cumplen con uno o varios de los requerimientos establecidos para ser consideradas como probióticos, según lo establecido por la FAO y OMS (2001); además, cabe la posibilidad de mejorar su eficacia si son implementados en preparados multicepas para alcanzar mejores beneficios al hombre.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados de esta investigación se puede concluir lo siguiente:

1. De acuerdo a las características morfológicas, culturales, fisiológica y bioquímicas, las diez (10) cepas evaluadas fueron identificadas como *Lactobacillus* spp.
2. LB02, LB05 y LB09 fueron capaces de sobrevivir a pH ácido (2-2,3); mientras que, LB01, LB03, LB04, LB06 y LB10 fueron sensibles a la acidez gástrica.
3. LB02, LB03 y LB09 resistieron las diferentes concentraciones de sales biliares.
4. LB02, LB04, LB06, LB09 y LB10, mostraron efecto antagónico contra al menos uno de los microorganismos patógenos ensayados.
5. El sobrenadante proveniente de LB05 presentó el mayor efecto antagónico contra todos los patógenos evaluados.
6. Todas las cepas en estudio fueron sensibles a los betalactámicos y macrólidos.
7. La cepa LB09 fue considerada como la cepa de mayor potencial probiótico del grupo estudiado, debido a su capacidad de resistir las barreras gastrointestinales, así como de producir efectos antagónicos.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la identificación molecular de la cepa LB09.
2. Identificar el metabolito o biocina presente en el sobrenadante de la cepa LB05.
3. Efectuar ensayos para evaluar la actividad antagónica de las cepas en estudio frente a otros microorganismos de importancia clínica a nivel urogenital, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. y *Candida* spp.
4. Realizar pruebas complementarias que permitan evaluar otras propiedades probióticas de las cepas, como adherencia a células epiteliales vaginales, interferencia en la adhesión de patógenos y capacidad inmunomoduladora.
5. Continuar con los estudios preliminares para la búsqueda de cepas con capacidad probiótica a partir de diferentes nichos ecológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, C. y Díaz, C. (2009a). Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *RESPYN: Revista Salud Pública y Nutrición*, 10(1).

Alvarado, C. y Díaz, C. (2009b). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 51: 8-14.

Alves, D., Cassamassimo, M.; Guimarães, M. y García, C. (2010). Alteración de la flora vaginal en gestantes de bajo riesgo atendidas en servicio público de salud: prevalencia y asociación a la sintomatología y hallazgos del examen ginecológico. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 18 (5): 1-9.

Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, Y. y Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto gastrointestinal de animales de granja. *Revista Científica FCV-LUZ*, 20 (2): 161- 170.

Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3): 1729- 1738.

Briceño E, Pérez, E., Villalón, M., Aguilera, M., Michelangeli, C., Feliciangeli, E., Godoy, J., Camilloni, C., Otaiza, E. y Ceballo, H. (2008). Código de Bioética y Bioseguridad. Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología (FONACIT). (3ª ed). Venezuela.

Castro, L. y Rovetto, C. (2006). Probióticos: Utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37 (4): 308- 314.

Collado, M. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico*. Trabajo de grado de doctorado no publicado, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Córdoba, M.; Chaves, C. y Arias, M. (2009). Identificación y cuantificación de sensibilidad a antibióticos de bacterias prebióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59 (2).

Cueto, M., Acuña, Y. y Valenzuela, J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeno. *Actualidades biológicas*, 32 (93).

Dolz M. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 28(3):20-37.

Falagas, M., Betsi, G. & Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 657–664.

FAO/OMS (2001). Guía para la Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la leche en polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Córdoba, Argentina.

Fernández, A. y Fernández, M. (2004). El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 5(2):75-80.

Ferreres, I. (2008). El pH vaginal en el embarazo. *Matronas profesión*, 9 (4), 18-20.

Font de Valdez, G. & Taranto M. (2002). Probiotic Properties of Lactobacilli. In Spencer, J y Ragout de Spencer, A. (Eds). Food Microbiology Protocols (pp 173- 181). New Jersey: Humana Press. 

Sánchez, J., Coyotécatl, L., Enríquez, M., Mendoza, E., Muñoz, Z. y Rivera, T. (2008). Incidencia del bacilo de Döderlein y su influencia en la presencia de otros microorganismos en el canal vaginal. *Redalyc*, 49 (2): 172-179.

García, A., Henríquez, P., Retamal, C., Pineda, S., Delgado, C. y González, C. (2009). Propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp. aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Médica de Chile*, 137: 369-376.

Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P., Collins, J., Fitzgerald, G. & Ross, R. (1999). Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. *Journal of Dairy Science*, 82:1379-1387.

González, F. y González, B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias de los efectos sobre mecanismos hipocolesterolémicos. *RESPYN*, 7(1).

Grandy, G. Medina, M., Soria, R. & Araya, M. (2010). Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infectious Diseases*, 10: 253-259.

Gueimonde, M., Sakata, S., Kalliomäki, M., Isolauri, E., Benno, Y. y Salminen, S. (2006). Efecto del consumo materno de lactobacilos GG sobre transferencia y establecimiento de microbiota bífidobacterial en neonatos. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42 (2): 116-170.

Gueimonde, M., Sánchez, B., De los Reyes, C. & Margolles, A. (2013). Antibioticresistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(202): 1-6.

Guevara, A., Santiago, V. y Domínguez, A. (2011). Vaginosis citolítica una entidad clínica poco conocida. *Revista de Obstetricia y Ginecología Venezolana*, 71(1): 45- 48.

Gustafsson, R., Ahné, S., Jeppson, B., Benoni, C., Olsson, C., Stjernquist, M. & Ohlsson, B. (2011). The Lactobacillus flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Womens Health*, 11(17).

Gutiérrez, A. y Acosta, E. (2008). Determinación del potencial bactericida In Vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente a *E. coli*. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2): 68-73.

Hernández, A. (2009). *Evaluación del potencial probiótico de cepas de Lactobacillus para su uso en un alimento funcional*. Tesis de grado de maestría no publicado. Instituto Politécnico Nacional, Telaxcala. México.

Kabeerdoss, J. Devi, S., Regina, M., Prabhavathi, D., Vidya, R., Mechenro, J., Mahendri, N., Pugazhendhi, S. & Ramakrishna, B. (2011). Effect of yoghurt containing *Bifidobacteriumlactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal*, 10:138.

Koneman E., Washington, W., Stephen, A., William, J. y Gary, P. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Texto y Atlas a color. 6ª Edición. PANAMERICANA.

Lepargneur, J. & Rosseau, V. (2002). Role protecteur de la flore de Dodërlein. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction*, 31: 485- 494.

Martín, R., Soberón, N., Vaneechoutte, M., Florez, A., Vázquez, F. & Suárez, J. (2008). Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *International Microbiology*, 11: 261- 266.

Martín, R., Soberón, N., Vazquez, F. y Suarez, J. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clinica*, 26(3):160-167.

Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U. & Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5): 884-893.

Mejía, J., Chacón, Z., Guerrero, B., Rojas, J. y López, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *Revista Científica FCV-LUZ*, XVII, (2): 178-185.

Mennickent, S. y Green, K. (2009). Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora*, (24): 32-38.

Moreno, R. (2011). Evaluación de la capacidad probiótica e inmunomoduladora de *Lactobacillus* spp. aislados de muestras de heces de lactantes y leche materna. Tesis de maestría no publicada. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Moreno, R., Salas, E., Pérez, C. y Jiménez, J. (2011). Evaluación del potencial probiótico de lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. *MedULA, Revista de Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, 20: 135-139.

Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X. & Xu, J. (2011). Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*, 5(12):1428-1436.

Murray, P., Rosenthal, G., Kobayashi, G. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: El Servier Science.

Ocaña, V., Bru, E., de Ruiz A & Nader-Macías, M. (1999). Surface characteristics of lactobacilli isolates from human vagina. *Journal of General Applied Microbiology*, 45, 203-212.

Pascual, L., Daniele, M., Ruíz, F., Giordano, W., Pájaro, C. & Barberis, L. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *Journal of General Applied Microbiology*, 54: 141-148.

Peña, L. (2006). Probióticos: situación actual y líneas de investigación. *Anales de Pediatría*, 4(1):42-53.

Pozza, M., Silva, L., Garcia, J., Garcia, S. & Pozza, P. (2011). Human gastrointestinal tract resistance of *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces. *Ciencias Agrarias*, 32(3).

Prescott, L.; Harley, J y Klein. D. (2004). *Microbiología*. (5ªed). Madrid, España: McGraw- Hill.

Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C. & Bruce, A. (2001). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 32: 37–41.

Reid G., Bruce AW. (2006). Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World Journal Urology*, 24: 28-32.

Rerksupphol S. & Rerksupphol, L. (2010). *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* stored at ambient temperature are effective in the treatment of acute diarrhoea. *Annals of Tropical Paediatrics*, 30(4):299-304.

Rodríguez, J. (2006). *Microorganismos y salud bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas*. Complutense. Madrid, España.

Rodríguez, M. (2008). "Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora". Tesis doctoral no publicada, Universidad autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Sánchez, J., Coyotécatl, L., Enríquez, M., Mendoza, E., Muñoz, Z. y Rivera, T. (2008). Incidencia del bacilo de Döderlein y su influencia en la presencia de otros microorganismos en el canal vaginal. *Redalyc*, 49 (2): 172-179:

Sánchez, J., Mayta, M. y Rivera, J. (2012). Alteraciones del pH vaginal asociado a los lactobacilos o bacilo de Döderlein. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 59 (1): 56- 60.

Sánchez, K. (2008). Bacterias acido- lácticas con potencial probiótico. Trabajo de ascenso no publicado. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Sánchez, L., Vichi, J., Llanes M., Castro, E., Soler, D.; Espinosa, I.; Kociubinski, G. y Ferreira, C. (2011). Aislamiento y caracterización in

vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticas. *Revista Salud animal*, 33(3): 154- 160.

Shiva, C. y Jara, L. (2013). Identificación y caracterización molecular de cepas nativas de *Lactobacillus* aisladas de material de cama de pollos de engorde. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(3): 307-315.

Tagg, J. & Mc Given, R. (1971). Assay System for bacteriocins. *Applied Environmental Microbiology*, 21 (5): 943.

Tormo, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría, Monografías*, 4(1): 30- 41.

Ueharaa, S., Mondena, K., Nomotob, K. Reiko, Y. & Hiromi, K. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28: 30-34.

Vanegas, M., González, L. y Arévalo, S. (2010). Capacidad bactericida de *Bifidobacterium* sp. aislada de leche materna y de heces de neonatos, frente a los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Infection*, 14(4): 241-247.

Vanegas, M., González, L. y Arévalo, S. y Villanueva, C. (2012). Evaluación del potencial probiotico de cepas *Lactobacillus* Colombianas aisladas de leche materna. *Revista Alimentos Hoy*, 21(26): 7- 17.

Vallejo, M., Marguet, E. y Etchechoury, V. (2008). Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 9 (4).

Vázquez, S., Lopretti, M., Rey, F., Zunino, P. (2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. *INNOTEC Revista anual del laboratorio Tecnológico del Uruguay*, 2: 12-14.

World Medical Association (2013) Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 64va edición. Fortaleza, Brasil.

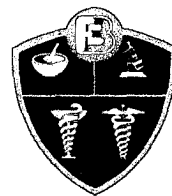
Zapata, S., Muñoz J., Ruiz, O., Montoya, O y Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16.

Zhou, X., Brotman, R., Gajer, P., Abdo, Z., Schüette, U., Ma, S., Ravel, J. & Forney, L. (2010). Recent Advances in Understanding the Microbiology of the Female Reproductive Tract and the Causes of Premature Birth. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Published online 2010 December.

ANEXOS
www.bdigital.ula.ve



ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

“Capacidad probiótica de *Lactobacillus* spp. provenientes de fluido vaginal de mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación”.

Mérida, de del 201

Investigador Principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Nombre del paciente: _____

Yo, _____ portadora de la C.I.Nº _____ he sido informada sobre el trabajo de investigación, alcances y objetivos; de igual modo, entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este trabajo de investigación.

Firma del Participante

C.I.Nº _____

Firma del Investigador

C.I.Nº _____

ANEXO 2

Fórmula de Retraso en el crecimiento

$$D = t^2 - t^1$$

Fuente: Font y Taranto, 2001

www.bdigital.ula.ve

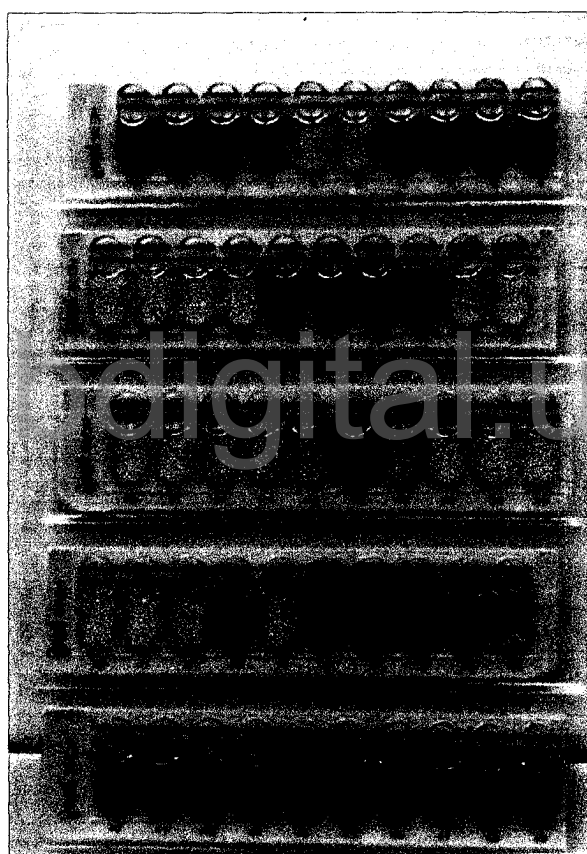
D: Retraso en el crecimiento

t^1 : tiempo en minutos de curva de crecimiento control

t^2 : tiempo en minutos de curva de crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares

Anexo 3

**Identificación fenotípica de *L. plantarum* ATCC 8014 (Cepa control) con
99,9 % de confiabilidad. Galería API 50 CH**



Anexo 4

Identificación fenotípica de Cepa LB09: *L. paracasei* subsp *paracasei* 2

99,7 % de confiabilidad. Galería API 50 CH



Anexo 5

Prueba de resistencia a la acidez gástrica de LB05



(a) Prueba de resistencia a la acidez gástrica:
Cepa LB05 (pH 6- 6,5) 1 hora de incubación



(b) Prueba de resistencia a la acidez gástrica:
Cepa LB05 (pH 2- 2,3) 1 hora de incubación.

Anexo 6
Prueba de Resistencia a la acidez gástrica de LB09



(a) Prueba de resistencia a la acidez gástrica:
Cepa LB09 (pH 6- 6,5)/1 hora de incubación



(b) Prueba de resistencia a la acidez gástrica:
Cepa LB09 (pH 6- 6,5)/1 hora de incubación

ANEXO 7

Fórmula de porcentaje de supervivencia

$$\% = \frac{\log \text{UFC/mL (pH 2-2,3)}}{\log \text{UFC/mL (pH 6-6,5)}} \times 100$$

Fuente: Cueto y cols., 2010

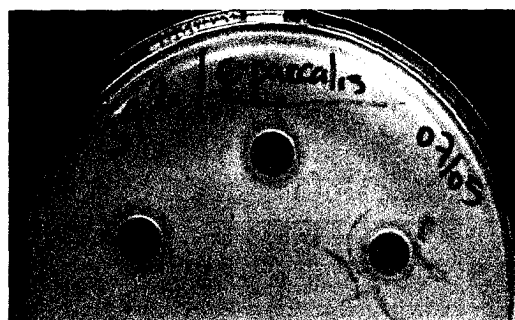
www.bdigital.ula.ve

Anexo 8

Actividad antagónica de LB05



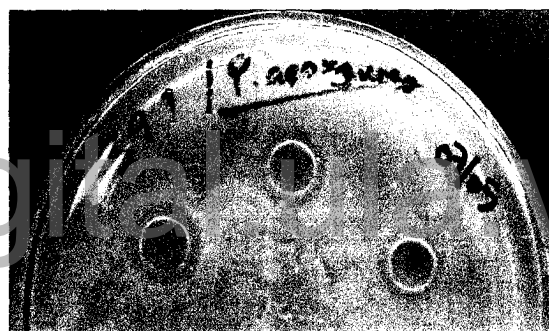
(a)



(b)



(c)



(d)

(a) Actividad antagónica positiva de LB05 contra *E. coli*

(b) Actividad antagónica positiva de LB05 contra *E. faecalis*

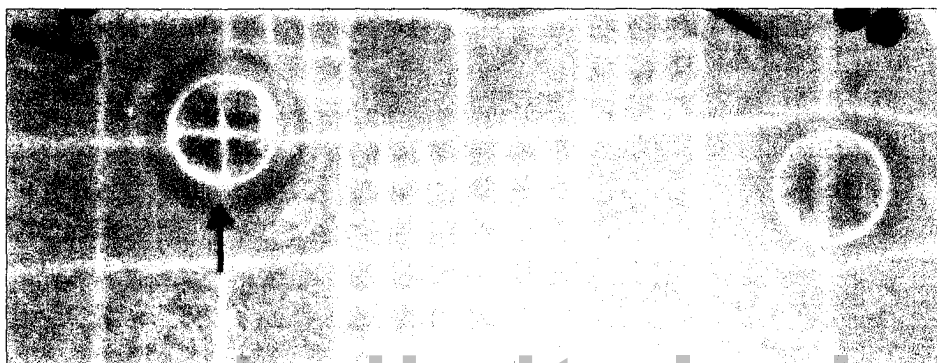
(c) Actividad antagónica positiva de LB05 contra *S. aureus*

(d) Actividad antagónica positiva de LB05 contra *P. aeruginosa*

Anexo 9

Cepa LB04 contra *P. aeruginosa*

Halo de inhibición por actividad antagónica



www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)