

Recuento de *Lactobacillus* spp. en materia fecal de ratones sanos alimentados con leche probiótica

Baroni, M.R.¹; Zurbriggen M.L.¹; Alvarez, C.¹; Salamone, F.¹; Méndez, E.¹; Minella, K.²; Fuentes, M.²

1- Cátedra de Bacteriología

2- Cátedra de Morfología Normal- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas -Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo S/N.(3000). Santa Fe.

RESUMEN: Existe creciente interés, sobre el papel que los probióticos desempeñan en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades.

Los principales microorganismos considerados probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sus efectos fueron estudiados administrándolos por vía oral a humanos y animales de experimentación.

En este trabajo se estudió la variación de la flora lactobacilar fecal de ratones sanos alimentados con leche conteniendo bacterias probióticas aisladas de humanos.

Se estudiaron un lote control y uno tratado con leche probiótica. Se investigó el recuento total de *Lactobacillus* spp. en materia fecal utilizando cuatro diseños, variando: número de ratones por lote, duración de la experiencia, momento e intervalo de la toma de muestra. En el último diseño, se efectuó además, el recuento de *Lactobacillus acidophilus*.

Cuando se analizaron los recuentos, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. El consumo de leche probiótica, no modificó cuantitativamente el contenido lactobacilar fecal.

Palabras claves: probióticos - *Lactobacillus* spp - heces - ratones .

SUMMARY: COUNT OF *Lactobacillus* spp. IN FAECES OF HEALTHY MICE FED ON MILK CONTAINING PROBIOTICS. Baroni, M.R., Zurbriggen M.L.; Alvarez, C.; Salamone, F.; Méndez, E., Minella, K.; Fuentes, M.. There is an increasing interest in the role of probiotics in preventing and treating different diseases.

The main human probiotic bacteria belong to Genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Their effects have been studied by administering them orally to human beings and laboratory animals.

In this work, the variation of fecal lactobacillus flora in healthy mice fed on milk containing probiotics isolated from human beings was analysed.

Two lots of mice were studied. One was taken as control and the other one was treated with probiotic milk. The total count of *Lactobacillus* spp. in faeces was assessed using four designs, varying number of mice in each lot, test duration, and sampling time and interval. Counts of *Lactobacillus acidophilus* were also carried out in the latter design.

When counts of *Lactobacillus* spp. were analysed, no statistically significant differences between both groups could be found. Therefore, probiotic milk feeding did not quantitatively modify fecal lactobacillus content.

Key words: probiotics - *Lactobacillus* spp. - faeces - mice

* Correspondencia:

E-mail: emendez@fbc.unl.edu.ar.

Datos preliminares de este trabajo fueron presentados mediante un poster en la "Reunión Científica: Microbiología Clínica 2003"- 14 y 15 de noviembre de 2003. SADEBAC, División AAM. Buenos Aires.

Introducción

Existe un creciente interés, tanto de la comunidad científica, como de la población general, sobre el papel que los probióticos desempeñan en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades.

Los principales microorganismos considerados probióticos para humanos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sus efectos han sido estudiados administrándolos por vía oral a humanos y animales de experimentación. Mediante el uso de determinadas cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* se ha logrado un efecto significativo en la prevención (1) y tratamiento de diarreas infantiles, diarreas asociadas a antibióticos y en la profilaxis de la «diarrea del viajero» (2).

Algunas especies de *Lactobacillus* producen antibióticos y otras sustancias como ácidos orgánicos (acético y láctico) que inhiben el crecimiento de gérmenes patógenos, actúan desconjugando sales biliares y constituyen fuente de enzimas que facilitan la absorción de alimentos (3).

Determinadas cepas bacterianas activan células del sistema inmune, mostrando un incremento en la respuesta específica y no específica del huésped (4).

Se ha demostrado que la administración oral de lactobacilos induce la liberación de enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa por parte de macrófagos peritoneales en ratones, siendo mayor la actividad de los mismos cuando se administran lactobacilos viables. (3)

Un factor a considerar es que el efecto de los probióticos es óptimo cuando se utilizan bacterias lácticas aisladas del mismo huésped al que se van a administrar. No obstante existen numerosos experimentos en ratas (5), ratones (6) o cerdos, con el fin de demostrar la capacidad de ciertos cultivos, de procedencia humana, para inhibir la proliferación de patógenos. (2)

El objetivo del presente trabajo fue observar si existe un aumento en el recuento de *Lactobacillus* spp en materia fecal de ratones sanos alimentados con leche probiótica sometidos a distintas condiciones experimentales.

Materiales y Métodos

Animales y tratamiento probiótico

Se trabajó con ratones Balb/c sanos, divididos en dos grupos: control e incógnita, en el momento del destete (20 días después del nacimiento).

Al grupo control se le administró comida y agua "ad libitum", y al grupo incógnita se le reemplazó el agua por leche probiótica comercial con una carga bacteriana de 10^5 - 10^6 UFC/ml, conteniendo *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, de acuerdo con especificaciones del comerciante.

La leche probiótica fue diluida al 20% v/v con agua, según protocolo del grupo de trabajo.

Los animales de ambos grupos se mantuvieron a temperatura controlada (22°C) con un ciclo luz-oscuridad.

Se realizó el recuento total de *Lactobacillus* spp. en materia fecal de ratones sanos aplicando cuatro diseños diferentes. Dicha diferencia consistió en modificar las condiciones del experimento referidas a: (1) número de ratones por lote; (2) duración de la experiencia en días; (3) momento de la toma de muestra (inmediatamente antes de ofrecerle leche probiótica fresca y dos horas después de ofrecerla) y (4) intervalo en días de la toma de muestra. En el último diseño se efectuó además el recuento de *Lactobacillus acidophilus*.

En el primer diseño el experimento duró 7 días, estudiando los dos lotes de ratones Balb/c: control (6 ratones) con comida y agua "ad libitum" e incógnita (5 ratones) a los cuales se les reemplazó el agua por leche probiótica comercial diluida al 20% v/v (LPCD).

En el segundo diseño se estudiaron otros dos lotes durante 14 semanas. Durante este período al lote control (11 ratones) siempre se le suministró agua y al lote incógnita (10 ratones), agua y LPCD alternadamente: 3 semanas leche, 4 semanas agua y las últimas 7 semanas leche.

En el tercer y cuarto diseño se evaluaron durante un período de 7 días el lote control (8 ratones) y el lote incógnita (7 ratones), radicando la diferencia entre ambos diseños en el intervalo, en días, de la toma de muestra.

Ensayo microbiológico

En el primer diseño se efectuaron tomas de muestra de materia fecal:

a) el día del destete, b) el 3º, 5º y 7º día después del destete, 24 horas después de ofrecerle LPCD fresca. Teniendo en cuenta que la leche se cambió diariamente.

Todas las muestras se procesaron el mismo día de la recolección.

Fueron colocadas en recipientes estériles previamente tarados, obteniendo por diferencia el peso de cada materia fecal.

Se realizaron diluciones de las mismas con agua peptonada y se sembraron por duplicado, en superficie, sobre agar MRS (7,8,9). Se incubó a 37°C durante 48 horas en atmósfera de CO₂; después de este tiempo las colonias fueron contadas y los resultados expresados como Unidades Formadoras de Colonias por gramo de Materia Fecal (UFC/g MF).

Para la identificación presuntiva de las colonias de lactobacilos se realizó coloración de Gram a fin de determinar características morfológicas y tintoriales. Se determinó la actividad de la enzima catalasa y se verificó el crecimiento a 37 y 45 °C.

En el *segundo diseño* las tomas de muestra se efectuaron semanalmente. Se emplearon en este caso medios más selectivos con el objetivo de eliminar la flora fecal acompañante, para ello se adicionó al agar MRS (empleado anteriormente), acetato de sodio a una concentración final del 2% (9) y bilis de buey al 5% (10). Las muestras se procesaron de la misma manera que en el ensayo anterior.

En el *tercer diseño* se efectuaron las tomas de muestra el día del destete, al 3º, 5º y 7º día, a las dos horas posteriores del cambio de leche (momento de la toma de muestra), para que consuman el producto fresco (LPCD inmediatamente después de preparada la dilución), asegurando que los lactobacilos se encontraban viables, y poder así tener más recuperación en las muestras de materia fecal.

Para el análisis de las muestras se realizó el procedimiento descrito anteriormente.

En el *cuarto diseño* se tomaron muestra de materia fecal: el día del destete, al 2º, 3º y 7º día, dos horas después de ofrecerle LPCD recién preparada. Las muestras se analizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

En este último diseño se realizó además el recuento diferencial de *Lactobacillus acidophilus* para detectar si había diferencias entre los ratones alimentados con probiótico y los que tomaban agua.

Para la identificación de las colonias de *Lactobacillus acidophilus*, se empleó además de las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente, el sistema de identificación API 50CHL (BioMerieux).

Recuento de lactobacilos en el alimento probiótico

Se realizó, para todos los diseños, el recuento lactobacilar del producto probiótico para asegurar la viabilidad de los lactobacilos en la leche suministrada a los animales de experimentación. Para este fin se realizaron diluciones del producto con agua peptonada, se sembraron las distintas diluciones en agar MRS y se incubaron a 37°C durante 48 horas en atmósfera de CO₂. Los recuentos se realizaron en la leche pura, LPCD recién ofrecida y LPCD que permaneció 24 hs. a temperatura ambiente en los bebederos. Los recuentos se expresaron como UFC/ml del producto probiótico.

Análisis estadístico

Para analizar el efecto del alimento probiótico se compararon las medias de cada grupo de ratones utilizando un diseño estadístico que tuviera en cuenta el seguimiento de los grupos en el tiempo; dicho diseño es el de análisis de la variancia para datos longitudinales. La variable respuesta del modelo lineal propuesto es el logaritmo de los recuentos de UFC/g de materia fecal. Los gráficos de perfiles fueron obtenidos para mostrar los efectos principales o la posible diferencia entre los grupos, identificados como Control e Incógnita. En todos los casos se informa el valor P exacto, resultado de las comparaciones. El nivel de significancia elegido fue de 0,05. Los datos fueron procesados con el Software SPSS versión 10.0. (11, 12)

Resultados y Discusión

Los recuentos de *Lactobacillus* spp. en la leche probiótica se mantuvieron en el orden de 10⁵ – 10⁶ UFC/ml durante todas las experiencias.

La figura 1 muestra los recuentos de *Lactobacillus* spp. del grupo control (C) e incógnita (I) realizados al momento del destete, al 3º, 5º y 7º días posteriores al mismo. En I se obtuvo al quinto día un valor de 10⁸ UFC/g de materia fecal mientras que en C se recuperó al 7º día, 10⁹ UFC/g.

En la figura 2 se observan los recuentos totales obtenidos durante el segundo diseño en función del tiempo (semanas). Los resultados de ambos lotes coinciden en las 4^o, 13^o y 15^o semanas. Esta figura muestra que los recuentos aumentan en función del tiempo, pero esto ocurre para ambos grupos de estudio y no existe entre ellos diferencia estadísticamente significativa. Se piensa que, este efecto se observa únicamente en este diseño porque se estudiaron los lotes durante un período más prolongado y podría deberse a la colonización intestinal propia del desarrollo de los animales de experimentación.

La figura 3 indica el recuento total de *Lactobacillus* spp. en función del tiempo (días) para el diseño 3. En el grupo C se alcanzó 10^9 - 10^{10} UFC/g al 5^o día del destete, recuperándose idéntico número de bacterias al 7^o día en los dos grupos.

En la figura 4 los recuentos del C e I se mantienen entre valores 10^9 y 10^{10} UFC/g al destete, 2^o y 3^o día y descienden al 7^o día a valores entre 10^8 - 10^9 UFC/g de materia fecal.

En la figura 5 se comparan los recuentos de *L. acidophilus*, observándose que al 7^o día los valores oscilan entre 10^8 - 10^9 UFC/g para el grupo C e I.

La ausencia de variación en los recuentos de lactobacilos en el grupo experimental que recibió leche probiótica como bebida, podría deberse a varios factores: 1) que la materia fecal no sea una muestra apta para evaluar colonización por bacterias lácticas, pudiendo pensarse en otras muestras con mayor sensibilidad para la detección de la variación de los recuentos como puede ser la biopsia colónica, a fin de evaluar la adherencia a la mucosa intestinal; 2) que se usaron cepas probióticas de origen humano presentes en la leche utilizada como bebida en ratones, atribuyendo a esta diferencia de especies, la falta de variación en los recuentos.

Alander y col. (13) trabajando con individuos sanos que recibieron oralmente cepas probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* GG, demostraron que la

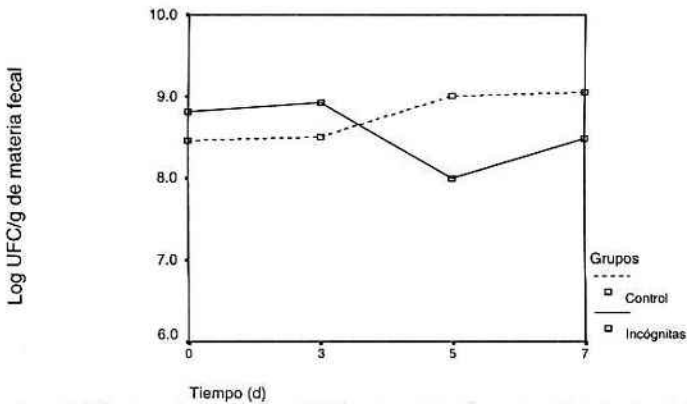
materia fecal no es suficiente para evaluar la colonización por estas cepas, ya que observaron su persistencia en biopsias de mucosa colónica aún después de su desaparición de la materia fecal. Por ello, el estudio de esta única muestra puede subestimar la colonización. Este resultado podría avalar nuestra hipótesis de que la materia fecal sería una muestra poco representativa para el estudio del contenido de la mucosa intestinal.

Locascio y col. (8) demostraron que administrando oralmente a niños con diarrea crónica leche adicionada de *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* (ambas cepas aisladas de heces de infantes sanos) aumentaban los recuentos de lactobacilos en materia fecal, sugiriendo que la flora probiótica restaura los niveles de lactobacilos. Si bien estos autores observaron un incremento en los recuentos, hay que tener en cuenta que trabajaron con un grupo experimental cuya flora intestinal lactobacilar se encontraba probablemente disminuida por la patología de base. La falta de variación en nuestros resultados tal vez se deba a que trabajamos con ratones sanos.

Pavan, Mercenier y col. (14) trabajaron con condiciones similares a las nuestras; administraron especies humanas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus salivarius* a ratones sanos. Evaluaron la persistencia de estas cepas en el tracto digestivo de los ratones, observando que los recuentos aumentaban y los períodos de tiempo, en los que se recuperaban los microorganismos en materia fecal, eran diferentes, dependiendo de la vía de administración (oral, intragástrica e intrarrectal) y cepa probiótica. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en los recuentos en los dos grupos de estudio.

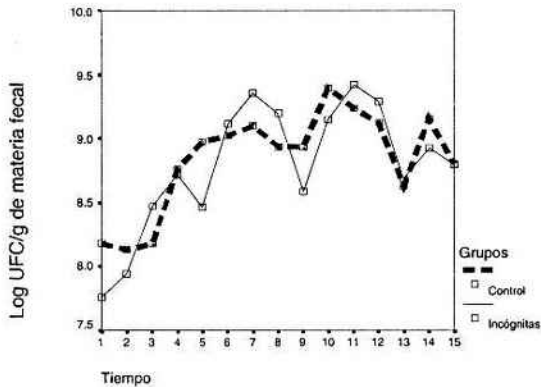
Se desea destacar que existen en la bibliografía pocos reportes realizados en humanos y/o ratones sanos que determinen la variación de los recuentos de lactobacilos en muestras fecales, por lo que consideramos importante comunicar los hallazgos de este trabajo.

Figura 1: Comparación entre el grupo control e incógnita, del log de UFC/g de materia fecal de *Lactobacillus* spp. en función del tiempo (días); en el día del destete, 3^o, 5^o y 7^o día.



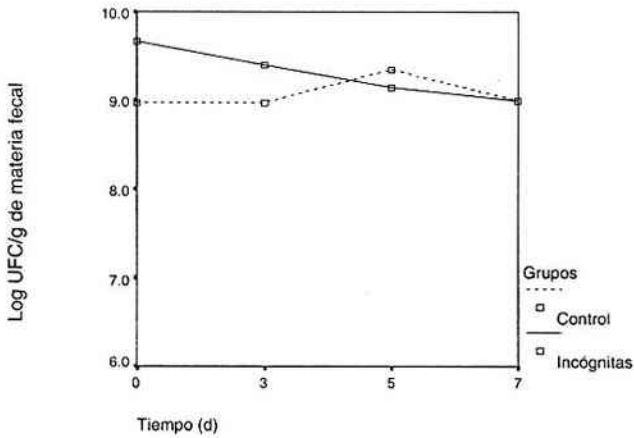
Valor p de tendencia = 0.750; valor p de interacción = 0.036; valor p de la diferencia media de los log de los recuentos = 0.434 (No significativa).

Figura 2: Comparación entre el grupo control e incógnita, del log de UFC/g de materia fecal de *Lactobacillus* spp. para cada semana de estudio.



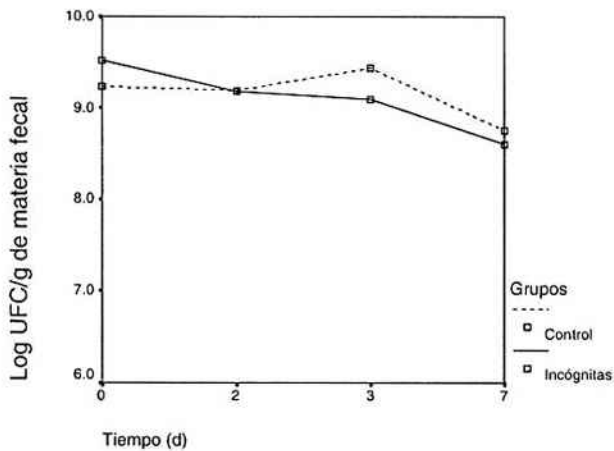
Valor p de tendencia <math>< 10^{-3}</math>; valor p de interacción = 0.065; valor p de la diferencia media de los log de los recuentos = 0.533 (No significativa).

Figura 3: Recuento fecal total de *Lactobacillus* spp para el diseño 3. Datos expresados en UFC/g de materia fecal en función del tiempo (días); en el día del destete, 3^o, 5^o y 7^o día.



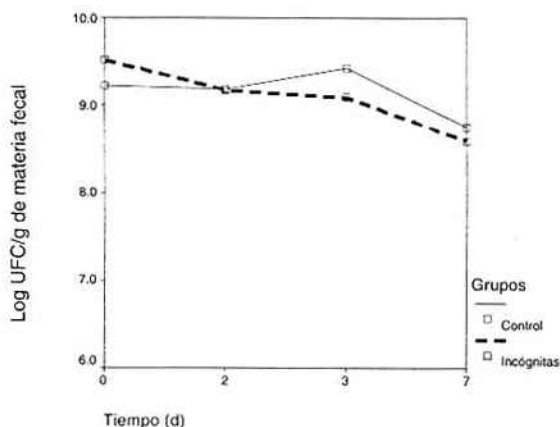
Valor p de tendencia = 0,284; valor p de interacción = 0,123; valor p de la diferencia media de los log de los recuentos = 0,253 (No significativa).

Figura 4: Comparación, entre el grupo control e incógnita, del log de UFC/g de materia fecal de *Lactobacillus* spp. en función del tiempo (días); en el día del destete, 2^o, 3^o y 7^o día.



Valor p de tendencia = 0,011; valor p de interacción = 0,496; valor p de la diferencia media de los log de los recuentos = 0,722 (No significativa).

Figura 5: Comparación, entre el grupo control e incógnita, del log de UFC/g de materia fecal de *Lactobacillus acidophilus* para el diseño 4 en función del tiempo (días); en el día del destete, 2º, 3º y 7º día.



Valor p de tendencia = 0,006; valor p de interacción = 0,126; valor p de la diferencia media de los log de los recuentos = 0,254 (No significativa).

Conclusión

Se concluye que los recuentos de *Lactobacillus* spp. en materia fecal de ratones sanos alimentados con leche conteniendo cepas probióticas humanas no mostraron diferencia estadísticamente significativa con los del grupo control, quedando como interrogante si el estudio de la materia fecal no subestima la colonización intestinal con cepas probióticas.

Agradecimientos

A Msc. Elena Carrera y Lic. Stella Vaira, del Departamento de Matemática, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por el apoyo prestado con el estudio estadístico.

Bibliografía

- 1- González S., Albarracín G., Locascio de Ruiz Pesce M., Male M., Apella M.C., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. 1990. Prevention of infantile diarrhea by fermented milk. *Microbiologie Aliments Nutrition*, **8**, 4 349-354.
- 2- Salminen S; Deighton M., and Gorbach S; 1993. Lactic acid bacteria in health and disease, 199-225, Marcel Decker, Inc. New York.
- 3- Perdígón G., Alvarez S., Medici M., Nader de Mecias M.E., Margni R.A., Oliver G., Pesce de Ruiz Holgado A.A. 1986. Actividad inmunopotenciadora de bacterias lácticas administradas por vía oral. *Medicina* **46**, 751-754.
- 4- Perdígón G., Alvarez S., 1992. Probiotic and the immune state, 146-176; In R. Fuller (ed) PROBIOTIC: the scientific basis. Chapman and Hall, London.
- 5- Hitchins A.D., Wells P. and McDonough E.F. 1985. Amelioration of the adverse effects of gastrointestinal challenge with *Salmonella enteritidis* on weaning rats by a yogurt diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**: 92- 100.
- 6- Nacer Macías M.E., Apella M.C., Romero N.C., Gonzalez S.N. and Oliver G. 1992. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 407-411.
- 7- Hartemink, R., Rombouts M. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J. of Microbiological Methods* **36**, 3:181-192.
- 8- Locascio M., González S., Apella M.C., Bru de Labanda E.,

Oliver G. 2002. Probiotic bacteriotherapy in chronic infantile diarrhea. *Interciencia* **27**, 7: 365-368.

9- Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin E., Von der Weid T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and Immunity* **71**, 1: 428-436.

10- Vinderola C.G., Reinheimer J.A. 1999. Culture media for enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal* **9**: 497-505.

11- Matthews J., Altman D., Campbell M., Royston P. 1990. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* **300**:230-235.

12- Finney D. 1990. Repeated measurements: What is measured and what repeats *Statistics in medicine*, **9**: 639-644.

13- Alander M., Satokari R., Korpela R. and col. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1: 351-354.

14- Pavan S., Desreumaux P. and Mercenier A., 2003. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**, 4: 696-701.