



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

Casa abierta al tiempo

METROPOLITANA

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**“Aislamiento, identificación y caracterización de  
microorganismos probióticos provenientes de  
una cápsula Linex® Forte”**

REPORTE FINAL DE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS (DSB) EDIFICIO N-104

16 DE MAYO DE 2022 A 16 DE NOVIEMBRE DE 2022

PRESENTA: MAURICIO JIMÉNEZ CRUZ

2172031348

ASESORES:

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

DRA. MARTHA ADRIANA LEYTE LUGO

CIUDAD DE MÉXICO, 2022

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
LOS PROBIÓTICOS	5
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	5
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	7
EL USO DE PROBIÓTICOS EN FORMAS FARMACÉUTICAS	8
<b>V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>9</b>
<b>VI. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>10</b>
<b>VII. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>10</b>
<b>VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>10</b>
<b>IX. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
REACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS	11
AISLAMIENTO DE CEPAS	11
IDENTIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE BIFIDOBACTERIAS Y LACTOBACILOS	12
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS	12

FERMENTACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS Y ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	15
ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA	15
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA	16
<b><u>X. RESULTADOS</u></b>	<b><u>16</u></b>
AISLAMIENTO DE CEPAS	16
IDENTIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE BIFIDOBACTERIAS Y LACTOBACILOS	17
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS	17
FERMENTACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS Y ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	19
ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA	20
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA	21
<b><u>XI. DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>XII. CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b><u>27</u></b>

## Índice de tablas

- Tabla 1:** Componentes y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación de PCR\_ 14
- Tabla 2:** Datos de cinética de crecimiento utilizados para la elaboración de la curva de crecimiento de ambas cepas *L.acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* \_\_\_\_\_ 20
- Tabla 3:** Resultados de la actividad antagónica de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* contra enteropatógenos y patógenos bucales \_\_\_\_\_ 21
- Tabla 4:** Resultados del tipo de actividad antagónica de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* contra enteropatógenos y patógenos bucales\_\_\_\_\_ 22

## Índice de figuras

- Figura 1.** A: Bifidobacterias en medio TPYG y B: Lactobacilos en medio MRS \_\_\_\_\_ 16
- Figura 2.** Microfotografías de A: Estructuras bifurcadas Gram positivas y observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión y B: Estructuras bacilares Gram positivas observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión. \_\_ 17
- Figura 3.** Gel de agarosa de A: extracción de material genómico en donde se observan las muestras número 13 y 14 de lactobacilos y bifidobacterias respectivamente, B: Productos de PCR previas a la purificación, las muestras 13 y 14 representan lactobacilos y bifidobacterias respectivamente y C: Gel de agarosa al 2% de la purificación de productos de PCR en donde se observan bandas definidas. \_\_\_\_\_ 18
- Figura 4.** Árbol filogenético de secuencias analizadas por secuenciación de Sanger, las muestras encerradas son las muestras analizadas en este estudio \_\_\_\_\_ 18
- Figura 5.** Cinética de crecimiento de A: *L. acidophilus* y B: *B. animalis* subsp. *lactis*. En ambas cinéticas se observa el inicio y final de la fase estacionaria. \_\_\_\_\_ 19
- Figura 6.** Zonas de inhibición. A: sin inhibición (-), B: inhibición mínima (+), C: Inhibición media (++) y D: inhibición mayor (+++) \_\_\_\_\_ 20

## I. Resumen

Los probióticos actualmente han cobrado una relevancia importante debido a las diversas propiedades benéficas que aportan para la salud. En este estudio se aislaron, identificaron y tipificaron cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* provenientes del suplemento alimenticio: Linex® Forte, con la finalidad de conocer su morfología a través del aislamiento en medios de cultivo selectivos MRS y TPY, su posterior observación al microscopio y su adecuada tipificación por medio de secuenciación de la subunidad 16S. Además, se determinó su actividad antimicrobiana frente a patógenos bucales e intestinales. Los resultados del aislamiento arrojaron que, como lo marcaba la etiqueta del suplemento alimenticio, las cepas se encontraban en la presentación de cápsula a pesar de su caducidad vencida. El ensayo de actividad antagónica reveló interacciones bactericida y bacteriostática para el caso de *L. acidophilus* mientras que *B. animalis subsp. lactis* no mostró actividad antagónica. El suplemento alimenticio Linex® Forte cumple con lo especificado en su etiqueta, aunado a esto, la cepa de *L. acidophilus* posee potencial antimicrobiano contra enteropatógenos y patógenos bucales.

Palabras clave: Probióticos, fermentación bifidobacterias, lactobacilos, aislamiento

## II. Abstract

Probiotics have gained significant relevance due to their beneficial properties for health. In this study, strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* from a food supplement: Linex<sup>®</sup> Forte, to know its morphology through isolation in selective MRS and TPY culture media, its subsequent observation under a microscope, and its adequate typification by 16S subunit sequencing. In addition, its antimicrobial activity against oral and intestinal pathogens was determined. The isolation results showed that, as indicated on the label of the food supplement, the strains were in the capsule presentation despite their expiration date. The antagonistic activity assay revealed bactericidal and bacteriostatic interactions for the case of *L. acidophilus* while *B. animalis subsp. lactis* did not show antagonistic activity. The Linex<sup>®</sup> Forte food supplement complies with what is specified on its label; in addition, the *L. acidophilus* strains have antimicrobial potential against intestinal and oral pathogens.

Keywords: Probiotics, fermentation bifidobacteria, lactobacilli, isolation

### III. Introducción

Las técnicas biotecnológicas actuales permiten la utilización de microorganismos para distintas aplicaciones como lo es la implementación de tratamientos para la salud en la industria farmacéutica; la inclusión de microorganismos probióticos en alimentos y para resolver problemas de contaminación. Dentro de las aplicaciones más representativas, existen aquellas en donde la industria farmacéutica utiliza microorganismos como agentes terapéuticos en tratamientos especializados para prevenir y tratar enfermedades gastrointestinales, en especial a las bacterias ácido-lácticas, que en ocasiones se pueden encontrar de manera comercial conteniendo más de una cepa o más de un género en específico, como es el caso de Linex® Forte que contiene cepas de *Lactobacillus acidophilus* y de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Debido a que la inclusión de microorganismos a productos del tipo suplemento alimenticio ha ido en aumento, es imperativo que se pueda evaluar la viabilidad y concentración de los microorganismos embebidos dentro de este tipo de matrices, no solamente para asegurar su presencia la cual determinará su efecto beneficioso.

En la gran familia de las bacterias ácido lácticas, el género *Bifidobacterium* es uno de los más representativos, ya que contiene más de 50 especies totales, de las cuales solo 10 pueden encontrarse de manera predominante en el tracto intestinal humano y representan casi un 80% de la población enterobacteriana en infantes lactantes (Esaissen, et al., 2017). Su metabolismo de carácter anaerobio no le permite poblar segmentos superiores del tracto gastrointestinal. Coloniza principalmente el colon donde desempeñan sus funciones probióticas como la exclusión competitiva de patógenos y la modulación del sistema inmunitario a nivel de intestino delgado y colon, pero además también pueden ser encontrados en tejidos vaginales donde puede ser transmitido a los recién nacidos por parto normal, ocasionando que su tracto gastrointestinal (TGI) empiece a ser colonizado por bacterias de la madre. Debido a su condición de anaerobios facultativos, el aislamiento de bifidobacterias se da gracias al crecimiento en medios de cultivo selectivos como lo es el agar reforzado para *Clostridium* (RCA), Mann Rogosa y Sharpe (MRS) y agar selectivo para



bifidobacterias (BFM) en condiciones anaerobias para favorecer su crecimiento manteniendo una temperatura de 35 °C

El género *Lactobacillus spp*, comprende también un amplio grupo de microorganismos de los cuales destaca su capacidad de producción de ácido láctico como respuesta de su metabolismo anaerobio facultativo. Existen como estructuras bacilares y son células Gram positivas. Para su aislamiento y por sus requerimientos nutricionales se requiere el uso de medios de cultivo selectivos suplementados con hidrolizados de proteínas o también llamadas peptonas, como el medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe MRS. Este género crece en condiciones de temperatura de entre 35 y 37 °C y en cultivos sólidos, se puede observar la formación de colonias de coloración blanca con bordes lisos y regulares, generando tamaños de entre 1 y 5 mm de largo.

Este estudio comprende dos fases, la primera consta de una revisión preliminar de información contenida en artículos de divulgación científica, acerca de las características principales del género *Bifidobacterium* y el género *Lactobacillus* para la contextualización y la creación de una base teórica de referencia además de la descripción de técnicas actuales para la obtención de cepas aisladas de ambos géneros anteriormente mencionados. En la siguiente fase, se aislaron cepas provenientes de la cápsula de Linex<sup>®</sup> Forte, para su posterior identificación morfológica a través de una observación microscópica y la aplicación de pruebas de naturaleza bioquímica, finalmente se realizó una tipificación molecular para obtener datos de secuencias que puedan ser comparadas con las encontradas en la base de datos BLASTN de NCBI

#### IV. Marco Teórico

##### Los probióticos

En el organismo, existen tejidos y zonas en donde se encuentran, además de células con funciones específicas, las bacterias. Las hay de géneros variados, pero las que representan un interés importante son aquellas que se alojan en el tracto gastrointestinal, que, a pesar de ser un sistema complejo con diferentes estratos, niveles, condiciones y características, posee una población representativa de bacterias que cumplen funciones dentro de la homeostasis natural del organismo. Los probióticos son considerados organismos vivos que cuando se introducen en el organismo acarrearán efectos beneficiosos para la salud del huésped que las consume, esto debido a que se relacionan con la microbiota entérica ya existente, la cual desempeña funciones importantes como lo es la protección de las células epiteliales, la regulación del almacenamiento de energía en el huésped y el desarrollo de una inmunidad de las mucosas alojadas en sitios específicos del tracto gastrointestinal (Stene, C., et al., 2022).

##### Principales características del género *Bifidobacterium*

De entre los grupos de microorganismos que se consideran con propiedades probióticas, existe el género *Bifidobacterium*, del filo Actino bacteria, descubiertas a finales del siglo XVIII en heces de infantes lactantes (Uusitupa, H., et al., 2020). Se denominan bacterias Gram positivas, sin capacidad de formar esporas, anaerobias y pleomórficas. El género comprende una familia grande que alberga a los *B. animalis*, cepas encontradas predominantemente en muestras de mucosa, heces y tejidos epiteliales de infantes en periodo de lactancia, mientras que las cepas de *B. longum* y *B. pseudocatelantum* se encuentran presentes predominantemente en muestras de heces y mucosa tanto en adultos como en infantes, entre otros (Hidalgo Cantabrana, et al., 2017).

Recientemente, las cepas de bifidobacterias que más han cobrado relevancia son aquellas cepas pertenecientes a la subespecie *lactis* ya que se ha demostrado la capacidad de estas para participar en la regulación homeostática, en la modulación del sistema inmunitario y también jugar un papel importante en el metabolismo. Debido a características anteriormente mencionadas, su inclusión en plataformas terapéuticas o en suplementos alimenticios para reducir el riesgo de contraer enfermedades del tracto respiratorio y distintas enfermedades asociadas a infecciones y desórdenes del tracto gastrointestinal ha ido en aumento, en especial el uso de cepas como B420 y BB12, las cuales pueden ser obtenidas a través de cultivos de colección, además de que pueden ser manipuladas durante las etapas de incremento de biomasa para producir algún metabolito de interés o llevar a cabo rutas metabólicas específicas. (Alessandri et al., 2021)

Estudios recientes sugieren que aquellos microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium* pueden coadyuvar en el mantenimiento de las funciones normales del tracto gastrointestinal, ya que pueden interactuar de dos formas principales: participando en el correcto desarrollo del sistema inmune desde temprana edad, ya que su proliferación comienza desde la lactancia materna, mejorado la homeostasis y funcionamiento del tracto gastrointestinal en donde también se promueve y mejora la integridad de la barrera intestinal, haciendo difícil la adhesión de microorganismos patógenos y disminuyendo su proliferación. Además, se ha demostrado que las bifidobacterias son capaces de producir metabolitos como las vitaminas, polifenoles y ácidos linoleicos conjugados, proporcionando un impacto beneficioso en los estratos epiteliales del huésped. (Talaie y Sina Ravari, 2022)

Otro aspecto importante en donde participan las bifidobacterias es en el metabolismo de polisacáridos, lo cual no solo proporciona nutrientes para el huésped, sino que también radica en la correcta colonización de las bifidobacterias en el tracto gastrointestinal. Diversos estudios actuales reportan también el uso de bifidobacterias para el tratamiento del síndrome de intestino irritable, este padecimiento al carecer de un tratamiento viable y ser de naturaleza crónica representa un problema para reducir los síntomas, además de que se asocia con ansiedad en pacientes. Las propiedades

moduladoras que desempeñan las bifidobacterias han demostrado el poder de mitigar los síntomas causados por el síndrome de intestino irritable cuando se administran probióticos conteniendo bifidobacterias en suplementos o de manera natural en alimentos fermentados. (Nifkar, et al., 2008)

Actualmente también se ha encontrado el potencial uso de probióticos pertenecientes al género *Bifidobacterium* en el tratamiento del síndrome metabólico, padecimiento que ha incrementado su prevalencia en pacientes de mediana edad. El cambio en la microflora intestinal ha demostrado la reducción de peso y la resistencia a la insulina por medio de la modulación de las funciones del sistema inmune, esto aunado al consumo de productos ricos en probióticos representa una alternativa de prevención para el síndrome metabólico. Se ha encontrado que el consumo de *B. lactis* HN019 promueve la reducción de obesidad, hiperlipidemia e inflamación generalizada, características indicadores del síndrome metabólico. (Kassi, et al., 2011)

#### Principales Características del género *Lactobacillus*

Otro género presente en la microbiota humana es aquel denominado como *Lactobacillus*, que comprende más de 200 especies de microorganismos anaerobios no esporulados y Gram positivos, con presencia del más del 6% en población total en estructuras como el duodeno y aproximadamente 0.3% en el colon (Heeney, D., et al., 2018). Solo un pequeño número ha sido considerado con potencial uso, entre los que se encuentran aquellos aislados a lo largo de todo el tracto gastrointestinal como: *L. casei*, *L. delbrukeii*, *L. murinus*, *L. rhamnosus*, estos últimos considerados como autóctonos ya que no se han aislado de ambientes fuera de la microbiota intestinal. Otras especies son *L. reuteri* y *L. acidophilus*, las cuales han tenido mayor relevancia en la actualidad debido a su uso en estudios que profundizan en las características metabólicas que les confieren aplicaciones para tratar enfermedades infecciosas, para prevenir el síndrome de colon irritable, enfermedades inflamatorias del tracto intestinal y también hacia el tratamiento de condiciones propias del síndrome metabólico como lo es la diabetes mellitus tipo I y II, e incluso en el uso para el tratamiento de cáncer colorrectal.

Hallazgos recientes sugieren el papel que desempeñan cepas del género *Lactobacillus* en la modulación de las funciones del tracto gastrointestinal y la microflora bucal. La capacidad de prevenir y curar enfermedades bucales como la gingivitis y halitosis se debe a la presencia de cepas del género *Lactobacillus* en la microbiota bucal, las cuales han demostrado la acción antimicrobiana debido al mejoramiento y fortalecimiento del sistema inmune por la interacción de estas bacterias con células inmunocompetentes, las cuales en ocasiones son responsables de la producción de citocinas. El uso de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* se debe directamente a la disminución de la presencia de la interleucina-8 (IL-8) en los fluidos gingivales. Otro aspecto biológico en donde están implicadas cepas de este género es en la modificación de la homeostasis bucal, hecho que puede coadyuvar en el tratamiento de la gingivitis, principalmente en la modulación de las vías de señalización inflamatoria características de esta enfermedad bucal (Ranjha et al., 2021).

#### El uso de probióticos en formas farmacéuticas

La introducción del consumo de probióticos, se dio gracias a la existencia de productos resultantes de la fermentación de alimentos en conservación, los cuales, al estar expuestos a la acción metabólica de ciertas bacterias, adquieren propiedades probióticas y se convierten en productos para consumo humano. En la actualidad, gracias a estudios exhaustivos acerca de la acción predominantemente beneficiosa de los probióticos, diferentes investigaciones se apegan a la posibilidad de administrar microorganismos vivos para el tratamiento de enfermedades específicas asociadas a la disbiosis, la cual ocurre cuando existe un desbalance en las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal y puede degenerar en condiciones como lo son: los síndromes inflamatorios intestinales, obesidad, diabetes mellitus tipo II o infecciones por la presencia de microorganismos bacterianos como *Clostridium difficile*.

Desde el reconocimiento por la OMS y su particular definición en 2001, los probióticos han cobrado una relevancia mayor debido a su creciente uso, es por eso por lo que, a lo largo de la última década, distintos países en donde su consumo ha ido en exponencial aumento han implementado diversas formas para el aseguramiento

de la calidad de los probióticos en presentaciones farmacéuticas o suplementos alimenticios.

Para denominar a un microorganismo como probiótico se deben tener en cuenta consideraciones como; identificación morfológica, molecular y taxonómica, evaluación *in vitro* e *in vivo* la cual incluye pruebas de seguridad como lo es la actividad hemolítica, la resistencia a antibióticos y respectivos estudios de toxicidad. Por último, las cepas que se consideran que pueden tener un efecto beneficioso para la salud, deben también ser sometidas a pruebas de tolerancia al estrés gastrointestinal, esto debido a que su efecto en la salud depende directamente de la sobrevivencia a través de las condiciones del tracto gastrointestinal para asegurar su llegada a sitios específicos en donde podrán desempeñar la acción para la que fueron administradas. Cabe destacar que las evaluaciones *in vitro* deberán ser precedidas por sus complementos *in vivo* para su uso en el consumo humano como productos biofuncionales (Ganguly et al., 2011).

## **V. Planteamiento del problema**

El uso de microorganismos probióticos existentes en presentaciones de suplementos alimenticios es muy frecuente en la actualidad. La implementación de productos de esta naturaleza en el mercado surge de la necesidad de los consumidores de obtener un beneficio de las propiedades de las bacterias ácido-lácticas, las cuales pretenden armonizar la microbiota del hospedador en donde se encuentran. Debido a su uso normalizado, es importante conocer el estado viable de los microorganismos presentes, además de asegurar su proporción para que puedan ejercer el efecto armonizador esperado. El uso de la biotecnología y técnicas microbiológicas como la identificación morfológica y la correcta caracterización de microorganismos viables permite evaluar el uso de estos suplementos alimenticios.

## **VI. Justificación**

Una propiedad que le confiere el beneficio de armonizar la microbiota intestinal del huésped a microorganismos probióticos es la viabilidad que poseen cuando se encuentran en presentaciones para administración oral. Para que las bacterias ácido-lácticas puedan ejercer su efecto beneficioso no solamente deben poseer viabilidad, sino que también deben encontrarse en un número determinado. El aseguramiento de la viabilidad y el número de microorganismos se logra aplicando técnicas de microbiología experimental, en donde se podrá obtener información de aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares de bacterias ácido-lácticas presentes en suplementos alimenticios. A través de una revisión en la literatura acerca de temas relacionados y estudios previamente realizados sobre la caracterización y aislamiento de bacterias ácido lácticas, en este trabajo se pretenden hacer uso de técnicas de caracterización morfológica, bioquímica así como la tipificación molecular de microorganismos probióticos presentes en un suplemento alimenticio en forma de cápsula para administración oral Linex® Forte, con el objetivo conocer la viabilidad y el número de microorganismos probióticos.

## **VII. Objetivo general**

Aislar, identificar y caracterizar microorganismos probióticos provenientes de una cápsula Linex® Forte para el aseguramiento de la presencia de microorganismos viables dentro de la forma farmacéutica.

## **VIII. Objetivos específicos**

- Reactivar los microorganismos liofilizados presentes en la cápsula Linex® Forte
- Aislar los microorganismos probióticos a partir de una cápsula de Linex® Forte
- Caracterizar morfológicamente los microorganismos probióticos aislados a través de una Tinción de Gram

- Caracterizar bioquímicamente los microorganismos probióticos a través de la prueba de catalasa
- Tipificar molecularmente los microorganismos probióticos aislados

## **IX. Material y métodos**

Este estudio fue de corte cuantitativo y experimental, con un alcance descriptivo de las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* encontradas en una cápsula Linex® Forte teniendo como variables dependientes la viabilidad y la concentración de los microorganismos presentes en la cápsula.

### Reactivación de microorganismos

La reactivación de los microorganismos provenientes de Linex® Forte se llevó a cabo por medio de la suspensión de 1g de contenido de polvo proveniente del interior de la cápsula en agua peptonada al 1%, la cual fue preparada utilizando 9 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9 % y 0.1 g de peptona de carne. El agua peptonada fue previamente esterilizada en autoclave por 15 min a 121 °C. La suspensión de reactivación se agitó hasta su homogenización.

### Aislamiento de cepas

Para el aislamiento de las bifidobacterias se utilizó un volumen total de 200 ml de medio de cultivo TPYG sólido que contiene (g/ml); peptona de caseína (2), peptona de soja (1), extracto de levadura (0.5), glucosa (1), L-Cisteína (0.1), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.4), MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.1), ZnSO<sub>4</sub> (0.05), CaCl<sub>2</sub> (0.03), FeCl<sub>3</sub> (0.006), clorhidrato de litio (0.4), propionato de sodio (0.6), agar bacteriológico (1.8) y Tween 80 (1%) . Para el aislamiento de lactobacilos, se utilizó medio de cultivo selectivo MRS (Difco), el cual se preparó utilizando el peso como se muestra en su etiqueta y se disolvió en 200 ml de agua destilada. El crecimiento de ambos probióticos se inició inoculando 5 µl de muestra de agua peptonada de reactivación en cajas de Petri de 60 x 15 mm con TPYG sólido y MRS para bifidobacterias y lactobacilos, respectivamente. Las



muestras se incubaron a 37 °C en condiciones anaerobias durante 24 horas para el caso de los lactobacilos y 48 horas en el caso de las bifidobacterias.

#### Identificación de las características morfológicas de bifidobacterias y lactobacilos

La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante la prueba de tinción de Gram preparando un frotis con muestra de colonias aisladas de agar TPYG y MRS en un portaobjetos de vidrio, la fijación se realizó por calor. Posteriormente se agregó en el siguiente orden; una solución de colorante cristal violeta (1 min), una solución de yodo como mordiente (1 min), solución de acetona-agua (5 s) como decolorante y safranina como colorante de contraste (40 s). Posterior a cada solución agregada se realizaron lavados con agua. Los frotis coloreados se observaron en el microscopio óptico utilizando aceite de inmersión para el objetivo de 100x.

Además de la tinción de Gram, las muestras de bifidobacterias y lactobacilos fueron sometidas a una prueba de catalasa en donde un frotis de colonias aisladas de los microorganismos se cubrió con una gota de una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. La presencia de la enzima catalasa se determinó por la aparición de burbujeo en la muestra. Se utilizó una muestra de *Escherichia coli* como control positivo y una muestra de *Streptococcus mutans* como control negativo.

#### Tipificación molecular de cepas aisladas

Para la extracción de material genómico, cultivos de 24 horas fueron utilizados para la obtención de biomasa. La extracción del material genómico se llevó a cabo utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Protocol (Promega, EUA) con algunas modificaciones.

La biomasa recolectada se colocó en un tubo eppendorf de 1500µl conteniendo 480 µl de EDTA 50 mM, se agregaron 10 µl de lisozima y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después del tiempo de incubación se centrifugó por 3 min a 12000 rpm y se desechó el sobrenadante. Al paquete celular obtenido, se le agregó 500 µl de buffer de lisis y 5 µl de RNAasa, y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo y utilizando un baño María a 70 °C, se incubó por otros 15

minutos, habiendo transcurrido el tiempo se agregó 200  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M y se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf nuevo y se le agregó el mismo volumen de sobrenadante retirado de solución buffer vinculante NTI, la mezcla del sobrenadante y del NTI se transfirieron a una columna de centrifugado de purificación de ácidos nucleicos de sílice y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm. Se desechó el NTI del tubo colector y se agregó 500  $\mu$ l de buffer vinculante NT3 a la columna de sílice, se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm, se descartó el NT3 del tubo colector y se centrifugó por 2 minutos a 10000 rpm para su secado. Una vez seca la columna, se traspasó a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 15  $\mu$ l de agua estéril para la hidratación del DNA, y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm. Por último, se agregó nuevamente 15  $\mu$ l de agua estéril y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm, el DNA resultante se almacenó para su posterior uso.

Posterior a la extracción del material genómico, se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1%, la cual se preparó utilizando 25 ml de solución tamponada de electroforesis TAE 1X y 0.25 g de agarosa, la solución de agarosa se disolvió en calentamiento hasta que esta se fundiera por completo, y se dejó enfriar hasta alcanzar 50 °C aproximadamente. Se selló con cinta el soporte y se colocó el peine para formar los pocillos de gel, se vertió la solución en el soporte y se dejó polimerizar.

Se tomaron 3  $\mu$ l de muestra y 2  $\mu$ l de un buffer de carga. Para la electroforesis se retiró la cinta del soporte del gel y el gel conteniendo los pozos se colocó en la cubeta de electroforesis, se añadió TAE 1X, hasta cubrir el gel de agarosa y se depositaron las muestras en los pocillos. Se conectaron los electrodos positivo y negativo, se programó la fuente de alimentación a 400 mA, 75 voltios por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, se visualizaron los fragmentos de DNA mediante el uso de una lámpara de luz UV.

Para la identificación de las cepas se amplificó la secuencia de la subunidad 16 S del DNA genómico, con los iniciadores universales 9F y 1512R. Los volúmenes utilizados en la reacción se detallan en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron; un primer ciclo de 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos que consistieron en

94 °C por 45 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 1.5 min, y un ciclo más de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular y visualizados utilizando una lámpara de luz UV.

**Tabla 1:** Componentes y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación de PCR

Componente	Volumen (μl)	Total de muestra (μl) <sup>†</sup>
Mix	25	225
1512(Reverse)	1	9
9(Forward)	1	9
DNA	2	18
Agua destilada	21	189

<sup>†</sup>El volumen total de la muestra fueron 450 μl

Los productos de PCR fueron purificados cortando las bandas del gel de agarosa y colocándolas en tubos eppendorf, el fragmento de gel de agarosa se disolvió con ayuda de un baño maría. Posteriormente, se utilizó el kit de purificación QIAquick® PCR Purification kit (50) (QUIAGEN, EUA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los productos de purificación se eluyeron en un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular y visualizados utilizando una lámpara de luz UV con la finalidad de observar solo una banda.

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo enviando muestras del material genómico al laboratorio Humanizing Genomics macrogen. El recorte de las secuencias y su análisis (*triming*) se realizó utilizando el software 4Peaks en donde se consideraron solo las regiones del electroferograma mejor resueltas dentro del intervalo de 30 a 500 pares de bases. La alineación de cada secuencia se realizó utilizando MEGA X y las comparaciones se llevaron a cabo con la consulta de las bases de datos de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## Fermentación de cepas probióticas y elaboración de la curva de crecimiento

Previo a la elaboración de la curva de crecimiento se llevó a cabo la adaptación de las cepas probióticas utilizando medio de cultivo TPYG líquido y caldo MRS para bifidobacterias y lactobacilos, respectivamente. Los medios de cultivo se depositaron en viales cerrados con tapa de caucho y sellos de aluminio y conteniendo una atmosfera de CO<sub>2</sub>. Se inocularon muestras de bifidobacterias y lactobacilos previamente aislados y fueron depositados en los viales previamente descritos. A este primer paso se le denominó primer inóculo y fue incubado durante 8 horas en una cámara de crecimiento rotatoria a 37 °C y 150 rpm. De este primer inóculo se tomó una alícuota de 1 ml y se dejó crecer en otro vial durante toda la noche a las mismas condiciones del primer inóculo. A este segundo inóculo se le denominó semilla el cual se incubó *overnight* (durante toda la noche).

Habiendo transcurrido el tiempo del cultivo de toda la noche, del vial semilla se tomó una alícuota con la cantidad necesaria para inocular viales de fermentación que al inicio de la fermentación tuvieran una densidad óptica de 0.2. La fermentación se llevó a cabo durante 48 horas a 37 °C en una incubadora rotatoria a 150 rpm. Cada 2 horas se tomaron alícuotas de 2 ml, comenzando en el tiempo 0, a las cuales se les midió el pH utilizando un potenciómetro y la absorbancia de la muestra se midió utilizando un espectrofotómetro. Los datos obtenidos de las lecturas fueron extrapolados utilizando curvas estándar de peso seco vs. absorbancia de microorganismos del mismo género proporcionadas por el Dr. Alejandro Azaola.

## Ensayo de actividad antagónica

La actividad antagónica de las cepas de lactobacilos y bifidobacterias se llevó a cabo por medio del método de doble agar. Una vez determinado el intervalo de la fase estacionaria, se sembró en medios agar MRS y TPYG sólido para lactobacilos y bifidobacterias, respectivamente y se dejaron crecer durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis a 37 ° C. Una vez observado el crecimiento de colonias se cubrió el

medio MRS y TPYG con medio de cultivo agar Mueller Hinton inoculado a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland con enteropatógenos y patógenos bucales. Ambas capas de agar se dejaron interactuar durante 24 horas a 37 °C.

#### Determinación de actividad bacteriostática y bactericida

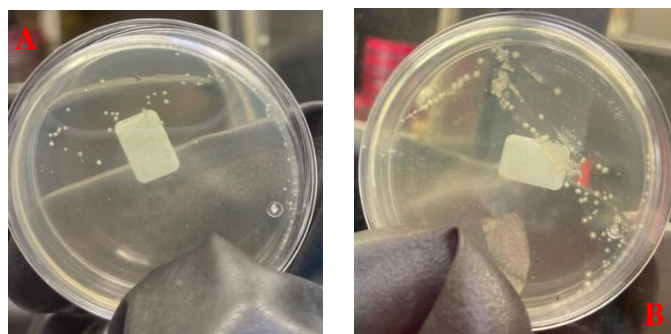
De los halos de inhibición resultantes de la interacción antagonista y con el objetivo de conocer la naturaleza de la interacción antagonista, se tomaron muestras utilizando hisopos estériles, se sembraron por estriado en medios de cultivo agar Mueller Hinton y se dejaron crecer durante 24 horas a 37 °C.

### X. Resultados

#### Aislamiento de cepas

En el medio de cultivo TPYG sólido adicionado con clorhidrato de litio y propionato de sodio, se obtuvieron colonias circulares irregulares de color blanquecino opaco, con un diámetro de menos de 1 mm de longitud, de naturaleza cremosa y semihúmeda. Las colonias se pueden observar en la figura 1-A, cabe destacar que el tiempo de crecimiento de los microorganismos varió de entre 48 y 72 horas.

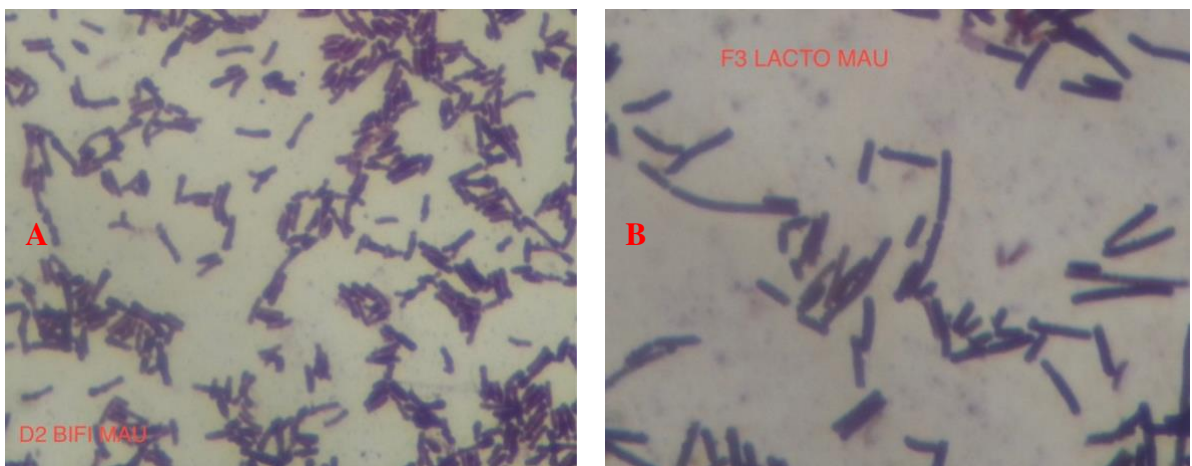
En el medio de cultivo selectivo MRS se obtuvieron colonias circulares regulares de color blanco brillante con un diámetro, después de 48 horas de crecimiento, igual a 1 mm. Las colonias presentaron consistencia rígida y se pudo observar también al momento de resiembra que las colonias tomadas con el asa estéril se retiraban con facilidad del medio, pero resultaba difícil la inoculación en nuevo medio debido a su consistencia seca y adherente. Se pueden observar las colonias obtenidas en la figura 1-B



**Figura 1.** A: Bifidobacterias en medio TPYG y B: Lactobacilos en medio MRS

## Identificación de las características morfológicas de bifidobacterias y lactobacilos

Las colonias obtenidas en medio TPYG sólido adicionado con propionato de sodio y clorhidrato de litio fueron sometidas a tinción de Gram y observadas en el microscopio óptico utilizando el aumento de 100x. El análisis permitió determinar que fueron bacterias Gram positivas de forma bifurcada como típicamente se encuentran las bifidobacterias (figura 2-A). Por otro lado, del medio de cultivo agar MRS se pudieron observar estructuras bacilares Gram positivos bajo el microscopio óptico, estas estructuras se asemejaron a aquellas pertenecientes al género *Lactobacillus* (figura 2-B).



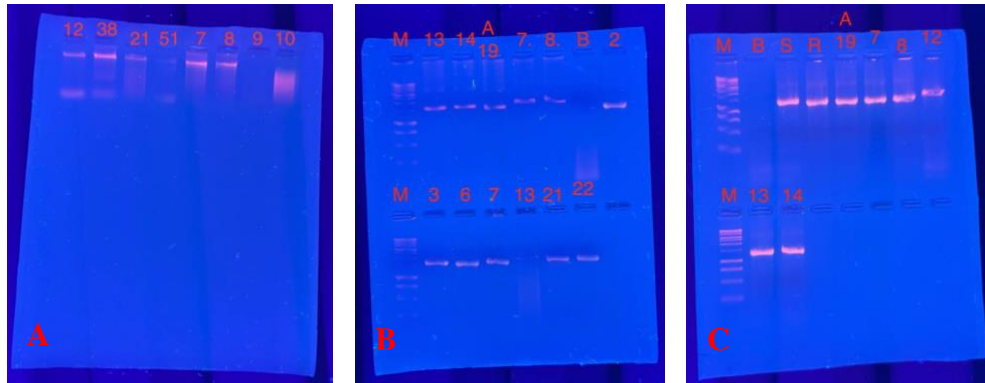
**Figura 2.** Microfotografías de A: Estructuras bifurcadas Gram positivas y observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión y B: Estructuras bacilares Gram positivas observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.

Para la prueba de catalasa se utilizaron como controles a *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* las cuales son catalasa positiva y negativa, respectivamente. La prueba de catalasa se utilizó para identificar la presencia de la enzima catalasa en los microorganismos tomados de una colonia aislada. Las cepas aisladas del medio TPYG sólido, además de ser Gram positivas, fueron catalasa negativa debido a la ausencia de burbujeo durante la prueba. Asimismo, las cepas aisladas del medio agar MRS resultaron también ser catalasa negativa cuando fueron sometidas a esta prueba.

## Tipificación molecular de cepas aisladas

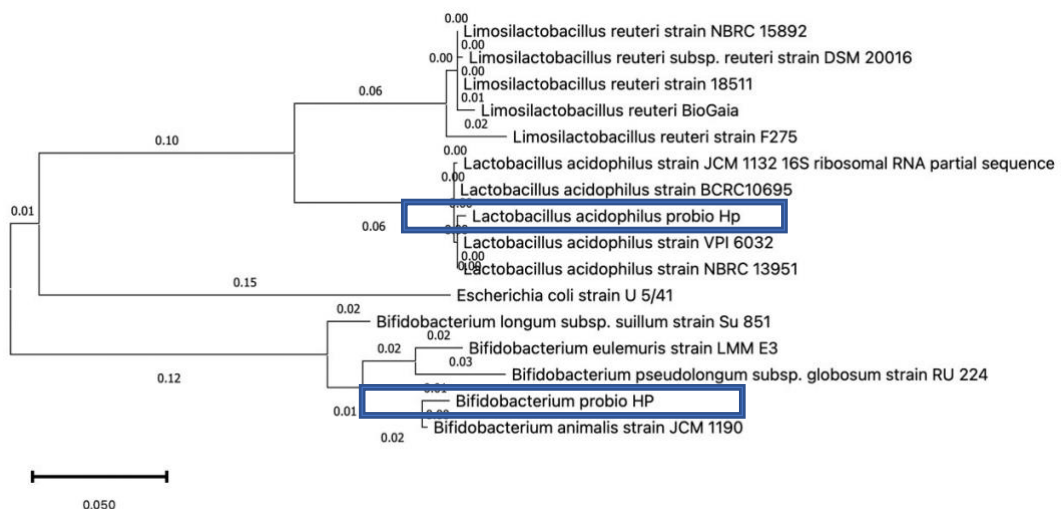
En la figura 3-A se pueden observar los productos de extracción de las cepas

aisladas. Se observa una degradación del material genético debido a que las bandas no se encuentran definidas, por lo que se procedió a una purificación para poder obtener una mejor definición de las bandas, las cuales se pueden observar en la figura 3-B. Finalmente en la figura 3-C se observa el gel de agarosa con los productos de PCR.



**Figura 3.** Gel de agarosa de A: extracción de material genómico en donde se observan las muestras número 13 y 14 de lactobacilos y bifidobacterias respectivamente, B: Productos de PCR previas a la purificación, las muestras 13 y 14 representan lactobacilos y bifidobacterias respectivamente y C: Gel de agarosa al 2% de la purificación de productos de PCR en donde se observan bandas definidas.

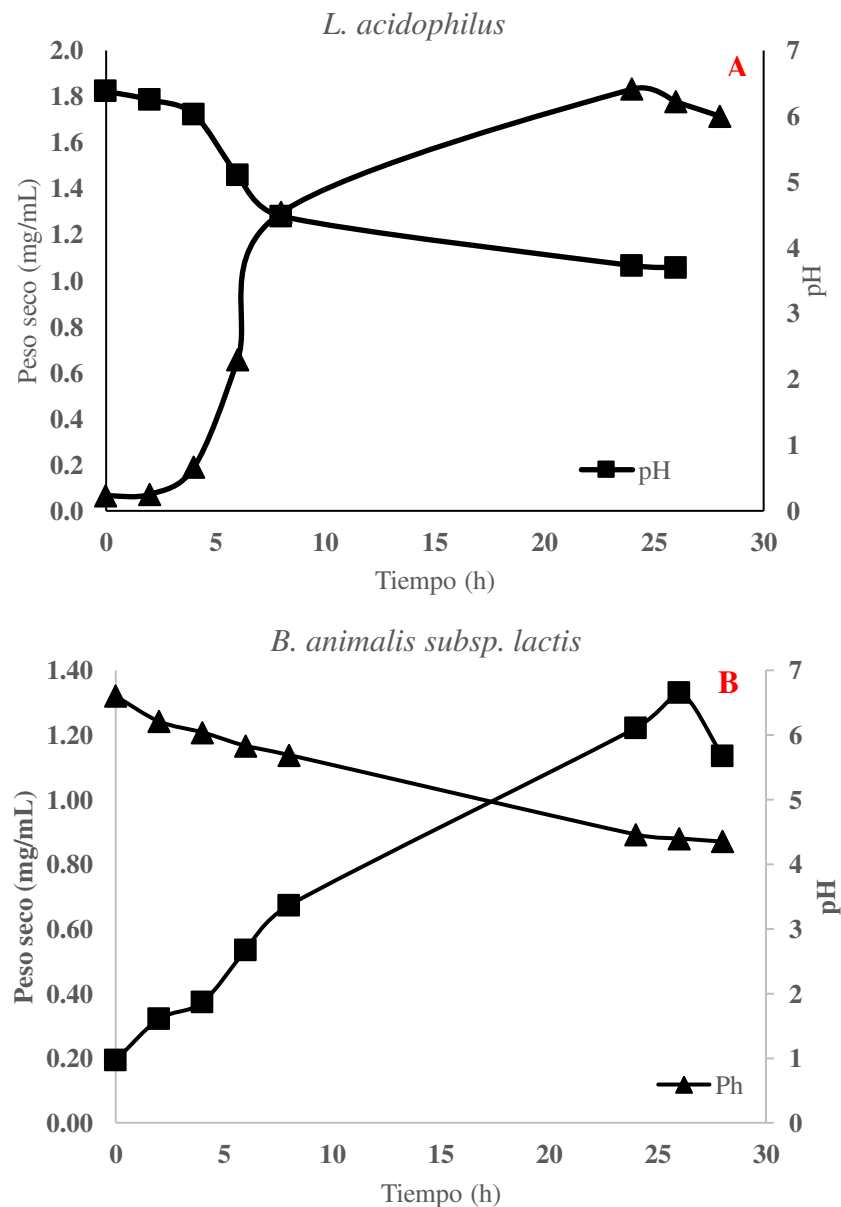
La secuenciación de Sanger permitió la confirmación de la identidad de las cepas aisladas, siendo de un 100% de identidad de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* para las cepas obtenidas a partir del crecimiento en medio de cultivo TPYG sólido y un 100% de identidad de *Lactobacillus acidophilus* para las cepas obtenidas del crecimiento en agar selectivo para lactobacilos MRS. El procesamiento y análisis de los datos de secuenciación, así como el trimming y la alineación de las secuencias mejor resueltas permitieron la construcción de un árbol filogenético que se observa en la figura 4.



**Figura 4.** Árbol filogenético de secuencias analizadas por secuenciación de Sanger, las muestras encerradas son las muestras analizadas en este estudio

## Fermentación de cepas probióticas y elaboración de la curva de crecimiento

La fermentación de las cepas de *B. animalis subsp. lactis* y *L. acidophilus* se realizó con la finalidad de encontrar el tiempo en el que los microorganismos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, ya que en este punto es en donde comienza la liberación de metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos enteropatógenos y bucales (Caycedo et al., 2021). La figura 5 muestran las diferentes fases de crecimiento para cada microorganismo, siendo el inicio de la fase estacionaria la marca de las 9 horas hasta las 28 horas para ambas cepas. La tabla 2 muestra los distintos valores de peso seco y absorbancia obtenidos después de 28 horas de fermentación para ambas cepas.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de A: *L. acidophilus* y B: *B. animalis subsp. lactis*. En ambas cinéticas se observa el inicio y final de la fase estacionaria.

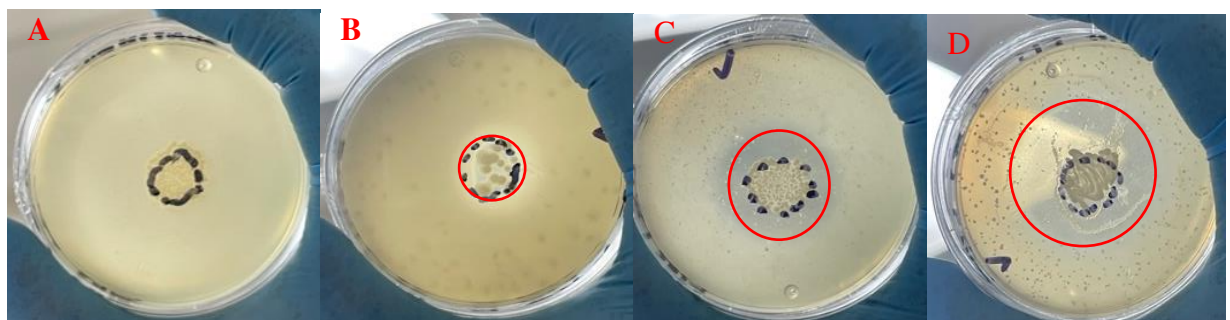


**Tabla 2.** Datos de absorbancia y peso seco para la elaboración de la curva de crecimiento de ambas cepas *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis*

Tiempo (h)	<i>Bifidobacterium subsp. lactis</i>			<i>L. acidophilus</i>		
	Absorbancia	Peso seco(mg/ml)	pH	Absorbancia	Peso seco(mg/ml)	pH
0	0.2345	0.194	6.60	0.1852	0.065	6.38
2	0.3609	0.321	6.21	0.2117	0.072	6.25
4	0.4125	0.373	6.04	0.679	0.189	6.03
6	0.5730	0.534	5.83	1.2381	0.657	5.11
8	0.7105	0.673	5.69	1.2209	1.296	4.48
24	1.2561	1.222	4.46	1.1463	1.832	3.73
26	1.3692	1.331	4.44	1.1091	1.776	3.7
28	1.1705	1.136	4.35	1.0678	1.714	3.69

#### Ensayo de actividad antagonista

La inhibición de las cepas de *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis* se observa en la Tabla 2 y figura 6, los datos se obtuvieron por el método de doble agar. Con el fin de obtener un cultivo en fase estacionaria de crecimiento, las cepas puras de ambos microorganismos se dejaron crecer 24 horas para el caso de *L. acidophilus* y 48 horas para *B. animalis subsp. lactis*, previas a la inoculación de la segunda capa de agar que se realizó utilizando medio de cultivo Mueller Hinton a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland con carga de patógenos bucales y entéricos.



**Figura 6.** Zonas de inhibición. A: sin inhibición (-), B: inhibición mínima (+), C: Inhibición media (++) y D: inhibición mayor (+++)

**Tabla 3.** Resultados de la actividad antagónica de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* contra enteropatógenos y patógenos bucales

Patógeno	<i>L.acidophilus</i>	<i>B. animalis subsp. lactis</i>
<i>Escherichia coli</i>	+++	-
<i>Sarcina lutea</i>	++	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
<i>Serratia marcesens</i>	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Lactobacillus lactis</i> <sup>†</sup>	+	-
<i>Streptococcus mutans</i> <sup>†</sup>	+	-
<i>Streptococcus sobrinus</i> <sup>†</sup>	+	-
<i>Streptococcus. tigurinus</i> <sup>†</sup>	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>†</sup>	+	-
<i>Streptococcus oralis</i> <sup>†</sup>	++	-

- : +++: inhibición mayor; ++: inhibición media, +: inhibición mínima, -: sin inhibición.

<sup>†</sup>Patógenos bucales donados por la Dra. Aida Hamdan (Laboratorio G002, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco).

#### Determinación de actividad bacteriostática y bactericida

De aquellos cultivos en agar MRS que presentaron actividad antagónica después de 24 horas de crecimiento, se tomó una muestra y se sembró en medio de cultivo Mueller Hinton, con la finalidad de observar la naturaleza bacteriostática o bactericida de la interacción entre los lactobacilos y los patógenos entéricos y bucales. Se observa en la tabla 4 que para todos los casos excepto para *S. mutans*, la actividad antagónica resultó ser bactericida. Por otro lado, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* no mostró este tipo de actividad ya que la interacción antagónica fue nula.

**Tabla 4:** Resultados del tipo de actividad antagónica de *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis* contra enteropatógenos y patógenos bucales

Patógeno	<i>L.acidophilus</i>	<i>B. animalis subsp. lactis</i>
<i>E. coli</i>	Bactericida	-
<i>S. lutea</i>	Bactericida	-
<i>S. aureus</i>	Bactericida	-
<i>S. typhimurium</i>	-*	-
<i>S. marcesens</i>	Bactericida	-
<i>P. aureginosa</i>	Bactericida	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-
<i>L. lactis</i> <sup>†</sup>	Bactericida	-
<i>S. mutans</i> <sup>†</sup>	Bacteriostática	-
<i>S. sobrinus</i> <sup>†</sup>	Bactericida	-
<i>S. tigurinus</i> <sup>†</sup>	Bactericida	-
<i>E. faecalis</i> <sup>†</sup>	Bactericida	-
<i>S. oralis</i> <sup>†</sup>	Bactericida	-

\* no se realizó determinación. †Patógenos bucales.

## XI. Discusión

El suplemento alimenticio Linex® Forte indica en sus especificaciones la presencia de cepas de microorganismos probióticos de géneros distintos, las cepas de *Lactobacillus acidophilus* pudieron ser aisladas utilizando medio de cultivo agar MRS y en condiciones como mencionan Zawistowska-Rojek y colaboradores (2022), en donde se describen las características más utilizadas para el aislamiento de este tipo de microorganismos, asimismo, las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* fueron exitosamente aisladas siguiendo las condiciones descritas por los autores anteriormente mencionados.

Si bien se recomienda el uso de agar MRS suplementado con neomicina y paromomicina para el crecimiento y aislamiento de bifidobacterias (Roy, 2001), en este estudio se utilizó el medio de cultivo TPY, este medio optimizado y propuesto en una investigación de Azaola y colaboradores (1999) resultó ser efectivo para el crecimiento de las cepas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, cuando se encontraba suplementado con propionato de sodio y clorhidrato de litio, lo cual permitió el aislamiento de solo cepas de bifidobacterias que se encontraban en combinación dentro de la presentación Linex® Forte, además de permitir una mayor obtención de biomasa. La reactivación con agua peptonada empleada previa al aislamiento se cree que coadyuvó a la adaptación de la cepas, ayudándolas a salir del estado liofilizado en el que se encontraban. Sin embargo, para la fermentación resultó efectivo el uso de medio de cultivo MRS, tal como lo mencionan Zawistowska-Rojek y colaboradores (2022). Además de los componentes propios del medio de cultivo para el crecimiento de *L. reuteri* y *B. animalis subsp. lactis*, las condiciones de crecimiento como lo es la temperatura y anaerobiosis determinan también la obtención de colonias pertenecientes a las características usuales de estos microorganismos.

De acuerdo con las directrices impuestas por la FAO a partir del año del 2001, los productos que contengan microorganismos vivos entendidos como probióticos y de uso seguro deben garantizar la presencia de cepas específicas para no comprometer la seguridad del producto, que para el caso de este estudio es el suplemento

alimenticio Linex® Forte. La correcta identificación de los microorganismos cobra una gran relevancia y es por eso que en este estudio se pudieron identificar ambas cepas probióticas: *L. acidophilus* y *B. animalis subsp lactis* utilizando la amplificación de material genómico PCR, tal como se realizó en un estudio llevado a cabo por Taludker y colaboradores (2021) en donde también se llevó a cabo una secuenciación de la subunidad 16S y su posterior comparación con bases de datos NCBI y BLASTN. La extracción del material genético, la obtención de productos de reacción de PCR y su posterior purificación hicieron posible la correcta identificación de las cepas analizadas en este estudio.

Estudios recientes sugieren que el uso de microorganismos denominados como probióticos pueden conferir un beneficio a la salud del huésped, la principal forma en que los probióticos actúan es gracias a su presencia y adaptación en diferentes microbiotas como lo puede ser en la microbiota intestinal o bucal. Cabe destacar que los mecanismos por los cuales se da un efecto benéfico son variados, ejemplo de ello es la producción de metabolitos antimicrobianos como el ácido láctico, entre otros. (Georgieva et al., 2014).

En este estudio se llevó a cabo un ensayo que permitió visualizar la capacidad antimicrobiana de los microorganismos presentes en el suplemento alimenticio Linex® Forte. El ensayo de la actividad antagónica comenzó desde la elaboración de la cinética de crecimiento, la cual se realizó para poder identificar el intervalo de tiempo que marca el inicio y el final de la fase estacionaria de crecimiento para *L. acidophilus* la cual tuvo una fase estacionaria que inició a partir de las 9 horas y terminó hasta aproximadamente las 24 horas. Para el caso de *B. animalis subsp. lactis*, la fase estacionaria se situó entre las 9 horas y hasta las 26 horas. También fue posible determinar el pH a lo largo del crecimiento de ambos microorganismos, las lecturas revelan un decremento en el valor del pH siendo *L. acidophilus* la cepa que alcanzó un valor de pH menor (3.96) al obtenido por *B. animalis subsp. lactis* (4.35), ambos a las 28 h.

El papel de los probióticos para conferir beneficios antimicrobianos se basa en la capacidad de producción de ácido láctico que algunos microorganismos poseen. La

razón por la cual algunas de las bacterias ácido-lácticas poseen actividades antimicrobianas se debe directamente a la acción que cumplen los ácidos no disociados al reducir el pH del medio intracelular de las bacterias patógenas inhibiendo así sus funciones vitales principales (Georgieva et al., 2014). El ensayo de la actividad antagonica contra cepas enteropatógenas y bucales, demostró el potencial uso de BAL como lo es *L. acidophilus* contra cepas patógenas bucales, esto debido a la inhibición mostrada en el ensayo, la cual fue de naturaleza bactericida para todas las cepas probadas excepto para *S. mutans*, contra la cual mostró una actividad bacteriostática. Sin embargo, para el caso de *B. animalis subsp. lactis* este no fue el caso, ya que no mostró actividad inhibitoria para ninguna de las cepas probadas en este estudio. Esto último quizá se deba a que el pH de la fermentación no alcanzó un valor óptimo como para conferirle una actividad antimicrobiana, asimismo también puede deberse a que se encontraban solo células de bifidobacterias y no una combinación con lactobacilos, tal como se menciona en un estudio realizado por Zakharova y Gorbunchikova en 2021, en donde se probaron lactobacilos y bifidobacterias en combinaciones de distintas proporciones para comprobar su potencial antimicrobiano. Esto último sugiere que quizá la relación simbiótica entre lactobacilos y bifidobacterias es una de las razones para que las bifidobacterias puedan poseer actividad antimicrobiana. Aunado a esto, también se entiende que las bifidobacterias pueden adaptarse mejor a las condiciones del tracto gastrointestinal mientras que los lactobacilos pueden encontrarse tanto en las microbiotas bucales como intestinales, pudiendo entonces inhibir el crecimiento de patógenos bucales tal como se observó en este estudio.

Otro aspecto importante observado en el ensayo de la actividad antagonica fue la naturaleza de la interacción, que para el caso de *L. acidophilus* fue predominantemente bactericida, puesto que se observó durante la fermentación que puede alcanzar valores de pH menores y esto le confiere un poder antimicrobiano mayor. Cabe destacar que para el caso de *S. mutans*, la interacción se observó de naturaleza bacteriostática y esto quizá se deba a la capacidad de *S. mutans* para formar biocapas en la cavidad bucal, además de ser el principal patógeno responsable de la aparición de caries dental. También se puede interpretar la acción antimicrobiana

como una forma de competencia, ya que estudios como el de Mei y colaboradores (2013) sugieren que *L. acidophilus* es también capaz de formar biocapas y ser responsable de la cariogenicidad en la cavidad bucal, comprometiendo la microbiota y la salud bucal del huésped.

## **XII. Conclusiones**

Los métodos utilizados a lo largo de esta investigación permitieron el correcto aislamiento, identificación y tipificación de las cepas de *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis* encontradas en el suplemento alimenticio Linex® Forte. La secuenciación permitió la identificación de las cepas presentes en el suplemento alimenticio, hecho importante para garantizar la seguridad del producto en cuestión. Además, se pudo determinar el potencial antimicrobiano de *L. acidophilus* frente a patógenos intestinales y bucales a través del ensayo de actividad antagónica realizado en este estudio, pudiendo afirmar entonces que efectivamente, como muchas investigaciones sugieren, algunas cepas de BAL poseen actividad antimicrobiana. Sin embargo, se recomienda el uso de técnicas específicas y ensayos *in vivo* confirmatorios para ahondar en su aplicación para la salud humana.

### **XIII. Referencias bibliográficas**

- Alessandri, G., van Sinderen, D., Ventura, M. (2021). The genus *Bifidobacterium*: from genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1472-1487. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.006>
- Azaola, A., Bustamante, P., Huerta, S., Saucedo, G., González, R., Ramos, C., Saval, S. (1999). Use of surface response methodology to describe biomass production of *bifidobacterium infantis* in complex media. *Biotechnology Techniques*, 13, 93-95.
- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Esaiassen, E., Hjerde, E., Pauline Cavanagh, J., Skov Simonsen, G., Klingenberg, C. y Norwegian Study Group on Invasive Bifidobacterial Infections. (2017). *Bifidobacterium* Bacteremia: Clinical Characteristics and a Genomic Approach To Assess Pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00150-17>.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N. y Karaivanova, E. (2014). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 84-91. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.987450>
- Indian Council of Medical Research Task Force; Co-ordinating Unit ICMR; Co-ordinating Unit DBT. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian J Med Res*. 2011 Jul;134(1):22-5. PMID: 21808130; PMCID: PMC3171912.



- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G. y Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-48>
- Kivanç, M., Yilmaz, M. y Çakir, E. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal of Biology*. <https://doi.org/10.3906/biy-0906-67>
- Mei, M., Chu, C., Low, K., Che, C. y Lo, E. (2013). Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, e824-e831. <https://doi.org/10.4317/medoral.18831>
- Nikfar, S., Rahimi, R., Rahimi, F., Derakhshani, S. y Abdollahi, M. (2008). Efficacy of Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Diseases of the Colon & Rectum*, 51(12), 1775-1780. <https://doi.org/10.1007/s10350-008-9335-z>
- Ranjha, M. M. A. N., Shafique, B., Batool, M., Kowalczewski, P. U., Shehzad, Q., Usman, M., Manzoor, M. F., Zahra, S. M., Yaqub, S. y Aadil, R. M. (2021). Nutritional and Health Potential of Probiotics: A Review. *Applied Sciences*, 11(23), 11204. <https://doi.org/10.3390/app112311204>
- Stene, C., Röme, A., Palmquist, I., Linninge, C., Molin, G., Ahrné, S., Johnson, L. B., y Jeppsson, B. (2022). Administration of probiotics to healthy volunteers: effects on reactivity of intestinal mucosa and systemic leukocytes. *BMC Gastroenterology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02185-1>
- Talaei, B. y Sina Ravari, S. (2022). Beneficial Effects of Probiotics in Some of the Important Human Disorders: A narrative review. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 29(2). <https://doi.org/10.22062/JKMU.2022.91900>

- Talukder, A., Haque, M., Mahmud, M. y Ekram, M. (2021). Molecular identification of Bifidobacterium sp. from local yoghurt and evaluation of growth inhibition activity against pathogenic bacteria. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 56(3), 147-154. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v56i3.55962>
- Uusitupa, H. M., Rasinkangas, P., Lehtinen, M. J., Mäkelä, S. M., Airaksinen, K., Anglenius, H., Ouwehand, A. C., y Maukonen, J. (2020). Bifidobacterium animalis subsp. lactis 420 for Metabolic Health: Review of the Research. *Nutrients*, 12(4), 892. <https://doi.org/10.3390/nu12040892>
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., y Marco, M. L. (2018). Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004>
- Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. (2017). Bifidobacteria and their health- promoting effects. *Microbiol Spectrum* 5(3):BAD-0010-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016>
- Zakharova, L. y Gorbunchikova, M. (2021). A New Synbiotic Fermented Dairy Product: Technological Production Features. *Food Processing: Techniques and Technology*, 51(1), 17-28. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-17-28>
- Zawistowska-Rojek, A., Zaręba, T. y Tyski, S. (2022). Microbiological Testing of Probiotic Preparations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 5701. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095701>