



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

METROPOLITANA

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**“Aislamiento y caracterización de cepas
de *Lactobacillus reuteri* a partir de
comprimidos bucales Biogaia®”**

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS (DSB)

EDIFICIO N-104

16 DE MAYO DE 2022 A 16 DE NOVIEMBRE DE 2022

PRESENTA:

ARMANDO JAVIER ESTRADA LOPEZ

2172045039

ASESORES:

**DR. ALEJANDRO
ALBERTO AZAOLA
ESPINOSA
No. 5616**

**DRA. MARTHA
ADRIANA
LEYTE LUGO
No. 900035**

CIUDAD DE MÉXICO

Noviembre, 2022

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Introducción	3
4. Marco teórico	5
4.1. Probióticos	5
4.2. Principales mecanismo de acción de los probióticos	6
4.3. <i>Lactobacillus</i> spp.	7
4.4. Microbiota oral.....	8
4.5. <i>Lactobacillus reuteri</i>	9
4.6. Formas farmacéuticas de los probióticos	10
4.7. Calidad de los productos probióticos.....	11
4.8. Identificación de los probióticos.....	12
5. Planteamiento del problema	13
6. Justificación	13
7. Objetivos	14
7.1. Objetivo general.....	14
7.2. Objetivos particulares.....	14
8. Materiales y métodos	15
8.1. Adaptación y reactivación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	15
8.2. Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	16
8.3. Cuantificación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	17
8.4. Tipificación molecular de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	17
8.5. Ensayos de inhibición de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	18

9.	Resultados	20
9.1.	Adaptación y reactivación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	20
9.2.	Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	20
9.3.	Cuantificación de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	21
9.4.	Tipificación molecular de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	22
9.5.	Ensayos de inhibición de las cepas de <i>Lactobacillus reuteri</i>	23
10.	Discusión	27
11.	Conclusión	33
12.	Referencias.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en esta investigación.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. Activación de las cepas de L. reuteri A) Caldo sin inocular B) Caldo después de 24 h sin CO₂ y C) Caldo después de 24 h con CO₂</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Aislamiento y caracterización morfológica de cepas; A) Morfología colonial en agar MRS (medio V) después de 24 horas de crecimiento, B) Morfología colonial en agar MRS (medio VA) después de 24 horas de crecimiento, C) Microfotografía a 100x de aumento de L. reuteri (medio V) y D) Microfotografía a 100x de aumento de L. reuteri (medio VA)</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4. Diluciones y número de colonias de Biogaia® ProD™</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5. Gel de agarosa; A) Extracción de DNA, B) Productos de PCR columna y C) Purificación de productos de PCR. M: marcador de peso molecular; 7 y 8 cepas de L. reuteri.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Árbol filogenético • Cepas aisladas de L. reuteri ■Cepas de L. reuteri reportadas en el marbete del producto ○ Cepa control E. coli</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7. Cinética de crecimiento y valores de pH de L. reuteri</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Zonas de inhibición. A: sin inhibición (-), B: inhibición mínima (+), C: Inhibición media (++) y D: inhibición mayor (+++)</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9. Resultados de la determinación de la actividad bacteriostática (A: S. mutans) y bactericida (B: S. sobrinus y S. oralis) provenientes de muestras de inhibición.....</i>	<i>26</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Volúmenes de los componentes de la reacción de PCR.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 2. Número de colonias y UFC/ml de las diluciones Biogaia® ProD™</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3. Valores obtenidos en la Cinética de crecimiento L.reuteri</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 4. Resultados de la actividad antagónica L. reuteri contra microorganismos patógenos bucales y entéricos</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 5. Resultados de la determinación de actividad bacteriostática y bactericida</i>	<i>26</i>

1. Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos de gran interés en la industria farmacéutica por sus beneficios para la salud, como en la regulación de la población microbiana intestinal y la microbiota oral. La inclusión de estos microorganismos en presentaciones farmacéuticas es una de las aplicaciones que ha cobrado gran relevancia en los últimos años, siendo el género *Lactobacillus* uno de los más utilizados. El objetivo del presente estudio fue el aislamiento, caracterización y tipificación de cepas de *Lactobacillus reuteri* provenientes de un suplemento alimenticio en forma de comprimido bucal, así como la determinación de su capacidad inhibitoria frente a diversos patógenos. Los microorganismos aislados fueron identificados por su morfología bacilar correspondiente al género *Lactobacillus*. Las colonias aisladas fueron identificadas como Gram + y catalasa negativa. El número de células viables fue de 10^7 , valor coincidente con el marbete. La tipificación molecular confirmó un 100 % de identidad con el género *L. reuteri*. Los resultados de la actividad antagónica mostraron que si existe inhibición de patógenos. En conclusión, se confirmó que *L. reuteri* se encontraban en el suplemento alimenticio, además se demostró que posee propiedades bactericidas *in vitro* contra enteropatógenos y patógenos bucales.

2. Abstract

Probiotics are live microorganisms of great interest in the pharmaceutical industry for their health benefits, such as the regulating of the intestinal microbial population and the oral microbiota. Including these microorganisms in pharmaceutical presentations is one of the applications that has gained significant relevance in recent years, being the most used genus *Lactobacillus*. The present study's aim was the isolate, characterize and typifying *Lactobacillus reuteri* strains from a food supplement in the form of an oral tablet, as well as to determine their inhibitory capacity against several pathogens. The isolated microorganisms were identified by their bacillary morphology corresponding to the genus *Lactobacillus*. The isolated colonies were identified as Gram + and catalase negative. The number of viable cells was 10^7 , coinciding with the tag. Molecular typifying confirmed 100%

identity with the genus *L. reuteri*. The results of the antagonistic activity showed that there was inhibition against pathogens. In conclusion, *L. reuteri* was found in the food supplement, and the biological evaluation demonstrated that it possesses bactericidal properties *in vitro* against pathogens.

3. Introducción

Los probióticos al ser microorganismos vivos son de gran interés para la industria farmacéutica, ya que los beneficios para la salud son diversos, como la regulación de las poblaciones bacterianas en las microbiotas intestinales y bucales de individuos sanos. Los principales géneros son aquellos pertenecientes a la familia de las bacterias ácido-lácticas como son el género *Lactobacillus spp.*, los cuales se caracterizan por la producción de metabolitos como el ácido láctico, para la homeostasis bucal, además de encontrarse en distintas estructuras dentro del cuerpo humano. La inclusión de estos microorganismos en presentaciones farmacéuticas y suplementos alimenticios representa una de las aplicaciones más particulares de este tipo de microorganismos (Sin, C., *et al.*, 2017).

Lactobacillus reuteri es una especie de bacterias ácido-lácticas presentes en la cavidad bucal, predominantemente en la base de la lengua, saliva y dientes en donde desempeñan funciones de formación de biocapas, además de estar presentes en lesiones de caries activas. La dosis recomendada para ejercer un efecto positivo sobre la salud bucal es de 2×10^8 unidades formadoras de colonia. Su estructura principal comprende una envoltura celular y una pared que además de protegerlos contra los desafíos ambientales, le proporciona estructura a la célula y al tener una capa de peptidoglicano muy gruesa se caracterizan como bacterias Gram positivas con una morfología bacilar. Su metabolismo es anaerobio facultativo y bioquímicamente se identifican como catalasa negativa. Para su crecimiento y aislamiento es indispensable el uso de medios de cultivo del tipo selectivo como el de Mann Rogosa y Sharpe (MRS) y Rogosa Mitchell Wiseman. Una vez aisladas, la morfología colonial puede apreciarse de forma circular con una coloración blanca y en ocasiones con bordes lisos y regulares. Su tamaño puede variar de entre 1 y 5 mm, requiriendo para su crecimiento una temperatura que oscile entre los 35 y 37 °C (Sin, C., *et al.*, 2017).

Debido al creciente interés por las aplicaciones de microorganismos probióticos, es importante el análisis para la verificación de la presencia de probióticos en

productos del tipo suplemento alimenticio, como lo son los comprimidos Biogaia®, en los cuales es importante el control de condiciones como la temperatura, el almacenamiento y consideraciones de otros componentes en la producción.

En este estudio se pretende realizar una revisión introductoria de las principales características morfológicas, bioquímicas y moleculares de cepas provenientes de un comprimido bucal Biogaia® para posteriormente a través de un diseño experimental basado en técnicas microbiológicas, demostrar la viabilidad y la concentración de las cepas de *Lactobacillus reuteri* presentes en el comprimido, además de comprobar su actividad inhibitoria contra enteropatógenos y patógenos bucales. Como parte introductoria y de contextualización, se presentarán las características de cepas de *Lactobacillus reuteri* a estudiar, con el fin de sentar una base teórica, posteriormente se describirán los distintos métodos a utilizar para el aislamiento y caracterización de cepas provenientes del comprimido bucal Biogaia®. Finalmente, los resultados esperados comprenden el cálculo de las unidades formadoras de colonia (UFC) para la obtención de la viabilidad y concentración de microorganismos indicada en el marbete del producto, la identificación de las cepas de *Lactobacillus reuteri* como resultado de las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares aplicadas a las muestras, además de determinar la actividad antagónica de los aislados.

4. Marco teórico

4.1. Probióticos

Los probióticos son bacterias benéficas que al ser consumidos en concentraciones adecuadas le confieren un beneficio a la salud del huésped. Los probióticos pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (BAL) que se pueden obtener de productos fermentados de forma natural. Estos son capaces de regular la microbiota intestinal y bucal, siendo los productos lácteos los vehículos más comunes para la entrega de estos (Arshad et al., 2018). Según la comunidad científica, el valor para poder conferir un beneficio a la salud del huésped, estos productos deben ser consumidos o administrados en una cantidad mínima de 10^6 UFC/ ml. En los últimos años han cobrado una gran importancia esto debido a sus grandes beneficios en la salud, así como su amplió uso durante su historia (Chen et al., 2018). Se ha comprobado el beneficio a la salud que tienen las BAL en especial las cepas que son reconocidas como seguras (GRAS) (Arshad et al., 2018). Entre los probióticos más comunes se encuentran *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* y *Saccharomyces boulardi.*, las cuales se pueden encontrar en el intestino humano y en la cavidad oral (Roobab et al., 2020). Para el uso adecuado de los probióticos, estos deben contar con ciertas características, como; resistir el paso por el tracto gastrointestinal, el pH ácido y las sales biliares. Además, la seguridad en el uso de probióticos es importante, por eso se recomienda el uso de cepas de origen humano. Por otro lado, la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y bucal es una propiedad muy deseada, ya que da lugar a la colonización en el área del intestino así como de la cavidad oral, lo que puede intensificar los efectos favorables de los probióticos (Sarao and Arora, 2017).

Los probióticos poseen una serie de efectos benéficos para la salud de los seres humanos y animales. Tienen la capacidad de coadyuvar en el tratamiento de ciertas enfermedades como la gastroenteritis, el cáncer, la diarrea, el síndrome del intestino irritable, las alergias, la colesterolemia y también enfermedades periodontales. Además de todos estos efectos, los probióticos también estimulan

el sistema inmunitario mediante diversos mecanismos, contribuyendo así a la salud general de los consumidores (Goel and Kumar, 2021).

4.2. Principales mecanismo de acción de los probióticos

El primer mecanismo de acción de los probióticos es la competencia con los patógenos por los nutrientes. Aquí, los probióticos mantienen el equilibrio huésped-microorganismo, reduciendo la colonización del patógeno a través de la inhibición de la adhesión de los patógenos. Se ha demostrado en distintos estudios que algunos probióticos tienen la capacidad de poder inhibir a una gran variedad de bacterias patógenas realizando una actividad antagónica contra estos (Abatenh et al., 2018).

Debido al aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos, el segundo mecanismo de acción cobra una gran relevancia que está relacionado con la producción de algunas sustancias antimicrobianas, ácidos grasos de cadena corta, bacteriocinas, disminución del pH intestinal y especies reactivas de oxígeno que suprimen el crecimiento de los patógenos (Goel and Kumar, 2021). La capacidad de los probióticos para producir sustancias antimicrobianas ha causado un gran impacto en los investigadores y en la comunidad científica, de ahí que los usos profilácticos y terapéuticos de los probióticos se han reconsiderado como alternativa al uso de antibióticos (Coman et al., 2014).

El tercer mecanismo es la estimulación/modulación de la respuesta inmune mediante la activación de las células T, la producción de citocinas, la potenciación de las respuestas de los linfocitos Th1 y atenuación de la respuesta de los linfocitos Th2, estos mecanismos son importantes para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Abatenh et al., 2018).

En la actualidad, se ocupan una gran cantidad de grupos de microorganismos como probióticos los cuales poseen efectos beneficiosos para la salud del

huésped. La mayoría de estos grupos son las pertenecientes a las BAL entre las que destacan el género de *Lactobacillus* spp.

4.3. *Lactobacillus* spp.

El género de *Lactobacillus* comprende un grupo de bacterias heterofermentativas que son capaces de producir ácidos orgánicos (entre los que se encuentran el ácido láctico como principal producto, el ácido acético, ácido propiónico y el ácido feniláctico), con la finalidad de disminuir el pH en el entorno en el que se desarrollan. Es bien conocido que los *Lactobacilos* pueden interaccionar con las células del huésped provocando una afectación en los mecanismos del sistema inmune innato a través de vías de señalización, en los que intervienen los receptores de tipo toll (TLR). El género *Lactobacillus* posee una morfología en forma de bastones o cocobacilos, se identifican como bacterias Gram positivas no formadoras de esporas. Estas pueden ser estrictamente fermentativas, aerotolerantes o anaerobias, así como acidófilas, además de tener requisitos nutricionales muy complejos (Widyarman et al., 2018). Al ser aerotolerantes estas pueden desarrollarse en ambientes con 5-10 % de CO₂ y su temperatura óptima es de 35 – 37 °C, requieren de 24 a 48 horas para su reproducción en medios tanto líquidos como en sólidos, la coloración de sus colonias blanca con una forma circular, bordes lisos y regulares, su tamaño oscila entre 1 y 5 mm, el pH ideal para su crecimiento es de 5.4 - 5.5, y todas estas características se pueden observar en medios agarizados (Sin et al ., 2017).

Los probióticos han sido siempre asociados tradicionalmente con la salud intestinal, sin embargo en los últimos años se ha encontrado que también tienen aplicaciones potenciales en la salud bucal (Hasslöf and Stecksén-Blicks., 2020). Basado en el hecho que los probióticos se pueden encontrar en la cavidad oral, estos tienen también la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y prevenir la adhesión de especies patógenas. Por estas razones es importante el conocimiento de la microbiota oral, ya que tiene efectos en el desarrollo y mantenimiento del

equilibrio entre los patógenos y las bacterias saludables para lograr una homeostasis bucal (Signorino et al., 2021).

4.4. Microbiota oral

La microbiota juega un papel muy importante en la salud del huésped, sus alteraciones pueden provocar algunos problemas de salud. La boca, es la principal entrada para muchos microorganismos que van a llegar y colonizar diferentes partes del cuerpo, es por lo que cada parte del cuerpo tiene su propia y particular microbiota. La microbiota oral está conformada por alrededor de 1000 especies de microorganismos, esto depende de la edad, la higiene bucal y la genética, ya que todos estos aspectos pueden influir en la diversidad de la microbiota oral (Sivamaruthi et al., 2020). Así mismo, la biopelícula oral juega un papel crucial en la adhesión microbiana. La biopelícula en la cavidad bucal es causante de una mala salud bucal, ya que esta se adhiere a la cavidad mediante agregación y coagregación. La colonización y la supervivencia de las bacterias probióticas en la biopelícula son eventos de suma importancia, ya que con esto se puede establecer los efectos beneficios dado que los probióticos interactúan con esta biopelícula eliminando a los patógenos responsables (Hasslöf and Stecksén-Blicks., 2020).

Las enfermedades orales, en especial las infecciones periodontales y las caries dentales, son muy comunes y pueden presentar algunas complicaciones que requieran el uso de antibióticos, lo que puede traer algunos efectos secundarios. El tratamiento de enfermedades orales es uno de los más costosos a nivel mundial se estima que alrededor de \$ 544 mil millones se utilizaron para dichos tratamientos, por lo tanto es de suma importancia un tratamiento profiláctico y coadyuvante, con la finalidad de poder abordar estos problemas, es por esto que se están investigando nuevos enfoques de tratamiento, como el uso de probióticos (Mishra et al., 2020).

Investigaciones actuales sobre algunas cepas particulares podrían aumentar el papel o la eficacia de los probióticos en la salud oral, en vista de que los probióticos proporcionan efectos terapéuticos a corto y largo plazo, ya que pueden ser consumidos como parte de la dieta logrando así mejorar la salud oral (Ranjha et al., 2021).

El uso de probióticos ha cobrado una gran relevancia y popularidad, se han convertido en promotores para la prevención y tratamiento en contra de algunas enfermedades relacionadas con la salud bucal e intestinal, dentro de este grupo de bacterias beneficiosas se encuentra los *Lactobacillus reuteri* el cual puede eliminar el crecimiento de algunas bacterias patógenas como por ejemplo *Streptococcus mutans* (Widyarman et al., 2018).

4.5. Lactobacillus reuteri

L. reuteri fue aislado en el siglo XX en la década de los 60's por Gerhard Reuter un microbiólogo alemán, que las encontró y aisló del yeyuno/íleon y de las heces de humanos, contienen 175 especies y 27 subespecies, además de que se pueden encontrar en distintas partes del tracto gastrointestinal, así como en la cavidad oral, demostrando que *L. reuteri* es un miembro estable del microbioma humano. Algunas cepas tienen la capacidad de transformar el glicerol en 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), para después excretarlo en forma de reuterina, un sistema potente antimicrobiano. La investigación de los efectos beneficiosos que tiene *L. reuteri* sobre la salud se ha incrementado, encontrando que puede ser utilizada para diferentes enfermedades y eventos inflamatorios (El-Ziney, 2018).

L. reuteri se considera como una bacteria probiótica la cual coloniza el intestino y la cavidad oral, esta puede ser consumida en diferentes presentaciones como lo son en yogurt o en tabletas con la finalidad de reducir la colonización de diferentes bacterias patógenas (Widyarman et al., 2018). El aumento en el interés de los consumidores por los probióticos como una alternativa para mejorar la calidad de vida ha incentivado el desarrollo del mercado de los probióticos. Por estos motivos

la industria láctea como la industria farmacéutica seleccionan nuevas cepas de bacterias probióticas con la finalidad de proponer nuevas formas farmacéuticas en beneficio del consumidor (Di Pierro et al., 2019).

4.6. Formas farmacéuticas de los probióticos

El uso de cepas probióticas ya no solo es en las aplicaciones alimenticias, en los últimos años también se han utilizado para formulaciones bioterapéuticas y farmacéuticas. Los probióticos se encuentran regulados en diferentes países en tres categorías principales; alimentos, suplementos alimenticios y productos farmacéuticos (Sanders et al., 2018). Es por esto, que los suplementos alimenticios representan un segmento importante en el mercado de probióticos y cada año crece más el interés por estos productos (Marinova et al., 2019). El gran interés de los consumidores por una vida saludable ha promovido la creciente demanda por estos productos biofuncionales. Estos suplementos alimenticios pueden contener cultivos monos o mixtos de microorganismos o esporas bacterianas, y se pueden encontrar en distintas presentaciones como cápsulas, polvo, tabletas o suspensiones (Vecchione et al., 2018). Los suplementos alimenticios probióticos representan el segundo segmento más grande en el mercado de probióticos y este crece año con año, dado que estas formulaciones están especificadas a pacientes con perfiles clínicos diferentes, en este sentido es fundamental asegurar la caracterización e identificación correcta (Marinova et al., 2019). Dado que los probióticos son microorganismos vivos, deben llegar a su destino en cantidades suficientes y permanecer viables para ser efectivos. La viabilidad depende del proceso de producción, el sistema de entrega y la carga. Los productos probióticos desarrollados a partir de la misma cepa en diferentes entornos e instalaciones de fabricación pueden tener diferentes funciones (Batoool et al., 2020). No obstante se ha informado de la baja calidad de los productos probióticos, esto relacionado con el incumplimiento en las células viables, hasta la identificación incorrecta de las especies (Di Pierro et al., 2019).

4.7. Calidad de los productos probióticos

La calidad de los productos, donde se incluye la fiabilidad y la exactitud del etiquetado del producto puede variar en diferentes zonas geográficas, es por ello que debe existir una armonización de los marcos normativos que dictaminan los requisitos de fabricación de los productos probióticos (Sanders et al., 2018). Los aspectos de calidad son de suma importancia, es por ello que se debe monitorear el uso de cepas probióticas con el fin de asegurar la bondad y la confiabilidad de los efectos beneficiosos (Ghafouri-Fard et al., 2018). Uno de los problemas de calidad de los probióticos es el mantenimiento de la viabilidad en el proceso de envasado, almacenamiento y distribución (Di Pierro et al., 2019). Es por esto, que las propiedades tecnológicas son de suma importancia para que las bacterias probióticas se puedan utilizar en un producto comercial, por eso deben ser adecuadas para poder ser cultivadas a gran escala, deben permanecer viables y estables durante todo el proceso de fabricación y de almacenamiento, además de que no deben conferir ningún sabor desagradable al producto final y lo más importante es que deben tener el efecto benéfico para el huésped (Sarao and Arora, 2017). Los ingredientes o aditivos pueden tener un impacto en la supervivencia de los probióticos, además de que los niveles altos de ciertos ingredientes pueden provocar la inhibición del crecimiento de las células bacterianas durante el almacenamiento. Las condiciones ambientales durante el periodo de almacenamiento y de transporte son otro factor importante para la viabilidad de los microorganismos, siendo la temperatura óptima de almacenamiento de 4-5 °C, ya que se ha comprobado que a una temperatura más elevada, por ejemplo a 20 °C, hay una reducción significativa de las células viables. La permeabilidad de la luz y las técnicas de envasado son otro factor importante para garantizar la supervivencia de las bacterias probióticas (Mizielińska et al., 2017).

Es necesario establecer regulaciones pertinentes con la finalidad de salvaguardar la salud de los consumidores y evitar cualquier posible efecto adverso derivado del uso de probióticos, garantizando las normas de los productos comerciales y su

eficacia (Sharma et al., 2016). La adecuada identificación de las bacterias probióticas es fundamental para evaluar las condiciones de crecimiento y las características metabólicas y la información genómica (Ghafouri-Fard et al., 2018).

4.8. Identificación de los probióticos

La extensa gama de aplicaciones que presentan las BAL hace necesario la caracterización de estas para determinar las características importantes y de esta manera poder explotar sus aplicaciones. A lo largo del tiempo se han recopilado distintas herramientas de caracterización con base en análisis morfológico, la tinción de Gram es uno de los análisis más utilizados para la identificación morfológica, siendo los *Lactobacillus* Gram positivos, además se utilizan medios de cultivo selectivos para el aislamiento y el recuento de las células viables, como son el agar De Man, Rogosa Sharpe (MRS) y el Rogosa Mitchell Wiseman los cuales contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento de los *Lactobacillus* (Sin et al ., 2017). Otra forma de identificación son las pruebas bioquímicas. En el caso de las BAL, se determina su naturaleza a través de la prueba de catalasa, los *Lactobacillus* no producen la enzima catalasa y por esta razón son consideradas catalasas negativa, y por último para la identificación molecular existen diferentes técnicas las cuales se han ocupado ampliamente para la identificación de las especies de *Lactobacillus*. Cada una de estas técnicas presentan sus ventajas y desventajas. Las herramientas se pueden clasificar de manera general como herramientas que se basan en la amplificación, el ADN, y en la secuenciación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual nos permite la identificación con precisión de las cepas aisladas (Sharma et al., 2020).

5. Planteamiento del problema

Los probióticos comprenden un grupo amplio de microorganismos, los más utilizados son pertenecientes al género de *Lactobacillus*, los cuales tienen como objetivo el balance de la microflora bucal e intestinal confiriendo un efecto beneficioso al hospedador. En la actualidad existe gran cantidad de productos que se denominan suplementos alimenticios, el amplio uso de estos productos conlleva al estudio y la evaluación de la viabilidad y el número de microorganismos presentes para que puedan ejercer el efecto deseado dentro del organismo del hospedador. La viabilidad de los probióticos depende de factores como las características fisiológicas, condiciones de producción y de almacenamiento, además de factores ambientales como la temperatura y el oxígeno. Por esta razón, es importante la implementación de técnicas de microbiología para el estudio, la identificación y caracterización para el aseguramiento de la viabilidad de los suplementos alimenticios anteriormente mencionados.

6. Justificación

Para que los probióticos ejerzan su efecto beneficioso dentro de la microflora intestinal y bucal, deberán permanecer viables y en una concentración adecuada. Es importante verificar la concentración adecuada de microorganismos en el suplemento y esto se logra a través de técnicas que evalúan el número y las características morfológicas propias de las bacterias ácido-lácticas. Dentro de estas técnicas, se encuentran el aislamiento en medios de cultivo selectivo; lo cual describirá las características morfológicas de las bacterias ácido-lácticas, recuento en placas; que proporcionará el número de microorganismos viables, pruebas enzimáticas; que brindarán información acerca del metaboloma de las bacterias y la tipificación molecular, utilizada para el aseguramiento de la presencia de microorganismos probióticos. En este estudio, a través de una revisión bibliográfica y su complemento experimental, se plantea realizar el aislamiento, la caracterización morfológica y bioquímica, tipificación molecular y actividad antagonista de microorganismos probióticos provenientes de un suplemento

alimenticio en forma de comprimidos bucales Biogaia® con el objetivo de verificar el número y la viabilidad de cepas de *Lactobacillus reuteri*.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar cepas de *Lactobacillus reuteri* a partir de comprimidos bucales Biogaia®

7.2. Objetivos particulares

- Reactivar las cepas de *Lactobacillus reuteri* provenientes del comprimido bucal Biogaia®
- Aislar y cuantificar las cepas de *Lactobacillus reuteri* activas
- Caracterizar morfológicamente, bioquímicamente y molecularmente las cepas de *Lactobacillus reuteri*

8. Materiales y métodos

En esta investigación se analizó el suplemento alimenticio en presentación de comprimido bucal Biogaia® ProD™ que contenía 2 cepas de *Lactobacillus reuteri*, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis. Esto fue a través de un diseño experimental de corte cuantitativo, donde se pretende abordar un alcance descriptivo de las propiedades morfológicas, bioquímicas y moleculares de cepas de *Lactobacillus reuteri*, teniendo como variable dependiente la supervivencia y el número de microorganismos presentes en el comprimido bucal. En la figura 1 se muestra el resumen de la metodología utilizada en esta investigación.

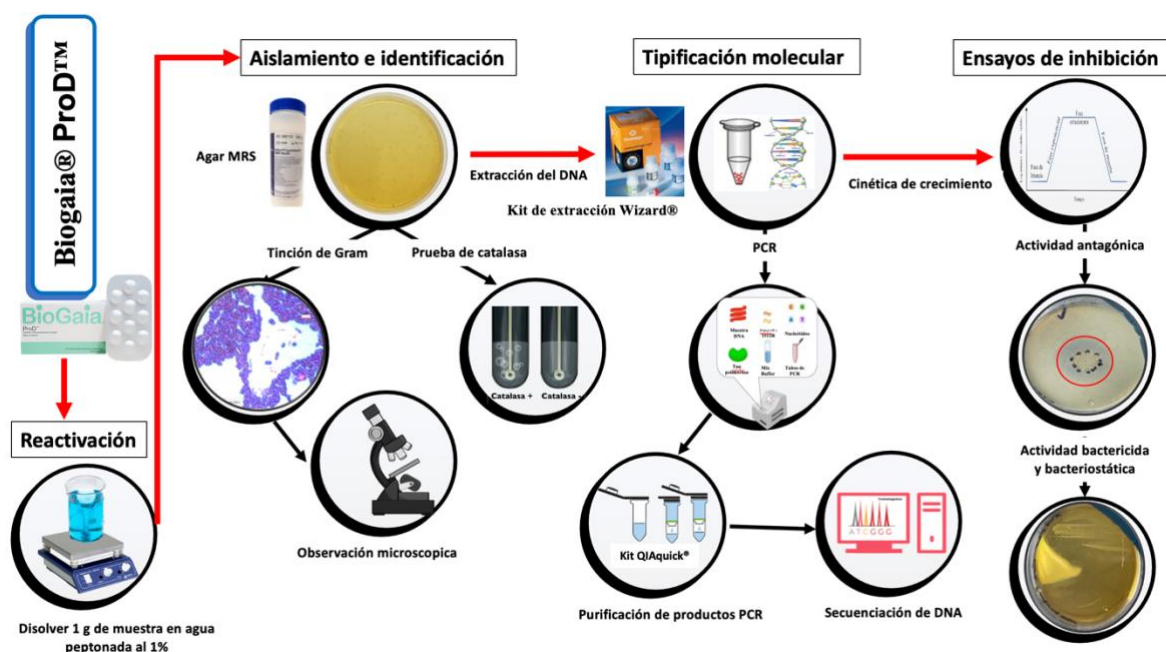


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en esta investigación

8.1. Adaptación y reactivación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

La reactivación de las cepas provenientes del comprimido bucal se llevó a cabo preparando una solución de agua peptonada al 1%, pesando 0.1 g de peptona de carne y disolviéndose en 10 mL de solución de cloruro de sodio 0.9% para

favorecer la adaptación y la activación de las cepas de *L. reuteri*. La solución de agua peptonada fue esterilizada en autoclave por 15 minutos a 121 °C. La reactivación de las cepas se realizó pesando 1 g del comprimido bucal Biogaia® ProD™ y disolviéndose en 9 mL de la solución de agua peptonada previamente preparada, la mezcla se mantuvo a agitación constante durante 30 minutos hasta su homogenización. La activación de las cepas de *L. reuteri* se efectuó en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, USA), con una atmosfera de CO₂ y otra sin CO₂, el caldo se inoculó con una alícuota de 1000 µL de la solución de agua peptonada con muestra y se incubó a 37 °C a 150 rpm en una incubadora rotatoria por 24 h.

8.2. Aislamiento e identificación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

El aislamiento de las cepas de *L. reuteri* DSM 17938 se realizó utilizando placas de agar Man Rogosa Sharpe (MRS) adicionado con vancomicina (50 mg/L) y ampicilina (2 mg/L) (medio VA), y placas de agar Man Rogosa Sharpe (MRS) adicionado con vancomicina (50 mg/L) para *L. reuteri* ATCC PTA 5289 (medio V). la adición de la vancomicina y ampicilina se realizó con la finalidad de tener medios selectivos para cada cepa (Romani et al., 2013). Se tomó una alícuota de 5 µL del caldo de activación y se extendió por el método de estriado en las placas de agar y se incubaron a 37 °C por 24 h en campana anaeróbica que contenía 85% de nitrógeno, 10 % de CO₂ y 5% de hidrógeno. Las colonias individuales observadas después de las 24 h fueron aisladas en función de su morfología colonial, como el tamaño, la forma y el color. La identificación de las cepas se realizó por la técnica de tinción de Gram de acuerdo al procedimiento estándar, posteriormente la observación microscópica se realizó con un microscopio óptico con un objetivo de 100x. Su identificación bioquímica se realizó por la prueba de catalasa, donde se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % a una colonia aislada. La presencia de la enzima catalasa se evaluó por la formación de burbujas o la ausencia de estas. Como control positivo de la prueba de catalasa se utilizó un cultivo de *Escherichia coli* y como control negativo *S. mutans*.

8.3. Cuantificación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

Para la cuantificación de las células viables del comprimido bucal Biogaia® ProD™, primero se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-1} – 1×10^{-8} , posteriormente en placas de agar MRS se inocularon 5 μ L de cada dilución, se llevaron a incubar a 37 °C por 24 h en una campana anaeróbica. El ensayo se realizó por triplicado. Después de las 24 h se realizó el conteo de las colonias con ayuda de un contador de colonias.

8.4. Tipificación molecular de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

El primer paso de la tipificación molecular fue la extracción del DNA, para poder llevar a cabo la extracción de material genómico. Se sembraron colonias de *L. reuteri* en placas de agar MRS (medio VA y medio V) y se incubaron por 24 h en cámara anaeróbica a 37 °C con la finalidad de producir biomasa. La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Protocol (Promega, EUA) con algunas modificaciones, ya que también se utilizaron columnas de centrifugado de purificación de ácidos nucleicos de sílice. El DNA resultante de la extracción se corrió en un gel de agarosa al 1% a 400 mA, 75 v por 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, los fragmentos del DNA se visualizaron en una lámpara de luz UV.

El segundo paso de la tipificación molecular fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se amplificó la secuencia de la subunidad 16 S del DNA genómico, con los iniciadores universales 9F y 1512R y un buffer mix, los volúmenes utilizados en la reacción se detallan en la tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron; un primer ciclo de 94 °C 3 min, seguido de 30 ciclos que consistieron en 94 °C 45 s, 50 °C 45 s y 72 °C 1 min 30 segundos 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.

El tercer paso de la tipificación molecular fue la purificación de los productos de PCR, este se efectuó utilizando el kit de purificación QIAquick® PCR Purification kit (QUIAGEN, EUA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los productos de purificación fueron corridos en un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular y visualizados con una lámpara UV.

El último paso de la tipificación molecular fue la secuenciación de los productos de PCR, el DNA amplificado se envió al laboratorio Humanizing Genomics macrogen para su identificación final mediante la secuenciación genética. El *trimming* 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 comparación y alineación de cada secuencia se realizó con el software Mega 11 a través del uso de la base de datos BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La construcción del árbol filogenético se realizó con el software Mega 11.

Tabla 1. Volúmenes de los componentes de la reacción de PCR

Componente	Cantidad (50 µL)
Buffer mix*	25 µL
Primer 1512R	1 µL
Primer 9F	1 µL
DNA genómico	2 µL
Agua estéril	21 µL

*contiene MgCl₂, dNtp y taq polimerasa

8.5. Ensayos de inhibición de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

Para los ensayos de inhibición de las cepas de *L. reuteri* se utilizaron bacterias patógenas bucales y entéricas (Tabla 4). Primero se realizó una cinética de crecimiento con la finalidad de conocer cuando el cultivo inicia la fase estacionaria, que es dónde el microorganismo empieza a secretar productos que pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias (Caycedo et al., 2021). Para la construcción de la cinética de crecimiento se inocularon caldos MRS con *L. reuteri* previamente

aislados y fueron incubados por 8 h a 37 °C en una incubadora rotatoria a 150 rpm. De este primer inóculo se tomó una alícuota de 1 ml y se inóculo en caldo MRS, este cultivo se incubó overnight (toda la noche) a 37 °C en una incubadora rotatoria a 150 rpm. Para la fermentación se inóculo caldo MRS a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm, el tiempo de fermentación fue de 28 h. Se tomaron alícuotas de 2 ml cada 2 horas comenzando en el tiempo 0, a las cuales se les midió el pH con un potenciómetro y fueron leídas en un espectrofotómetro a 600 nm, el peso seco fue calculado con base a una curva estándar de *Lactobacillus* de peso seco vs abs proporcionada por el Dr. Alejandro Azaola. Posteriormente para la determinación de la actividad antagónica se realizó por el método de doble agar, teniendo en cuenta el intervalo de la fase estacionaria. Las cepas de *L. reuteri* se sembraron en medios de cultivo agar MRS y se dejaron crecer 24 horas previas a la inoculación de la segunda capa de agar. Una vez observado el crecimiento de las colonias de *L. reuteri* se cubrió el medio MRS utilizando medio de cultivo agar Mueller Hinton con una concentración de 0.5 en la escala de McFarland de los patógenos bucales y entéricos. Las placas de doble agar se incubaron a 37 °C por 24 h. Por último, para la determinación de la actividad bacteriostática y bactericida, de los halos de inhibición resultantes de la actividad antagónica, se tomaron muestras con hisopo estéril y se resembró en medio de cultivo agar Mueller Hinton se dejaron crecer por 24 h a 37 °C.

9. Resultados

9.1. Adaptación y reactivación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

La adaptación y reactivación de las cepas se consiguió en los dos caldos con CO₂ y sin CO₂ esto se puede observar en la figura 2A y 2B, ya que existió una turbidez en los caldos después de las 24 h de incubación, lo que significa que existió una producción de biomasa.

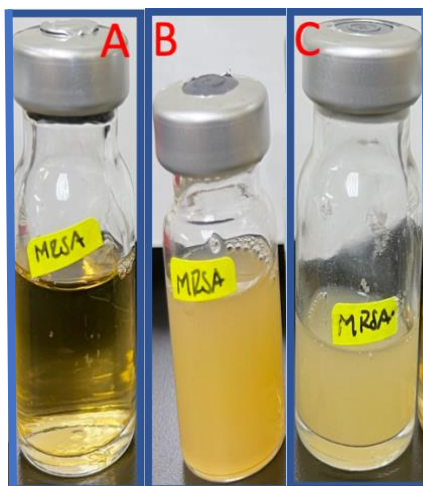


Figura 2. Activación de las cepas de *L. reuteri* A) Caldo sin inocular B) Caldo después de 24 h sin CO₂ y C) Caldo después de 24 h con CO₂

9.2. Aislamiento e identificación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas de *L. reuteri* en agar MRS modificado (medio VA y medio V) resultando en colonias aisladas circulares, color blanco, acuosas y con dimensiones de 1 mm para ambas cepas. Las colonias obtenidas después de 3 resiembras fueron sometidas a la tinción de Gram, esto permitió determinar que las bacterias aisladas fueran Gram positivas. La observación al microscopio óptico mostró una morfología bacilar asemejándose al género *Lactobacillus* (figura 3). En las pruebas bioquímicas, ambas cepas fueron catalasa negativa, esto debido a la ausencia de burbujas durante la prueba.

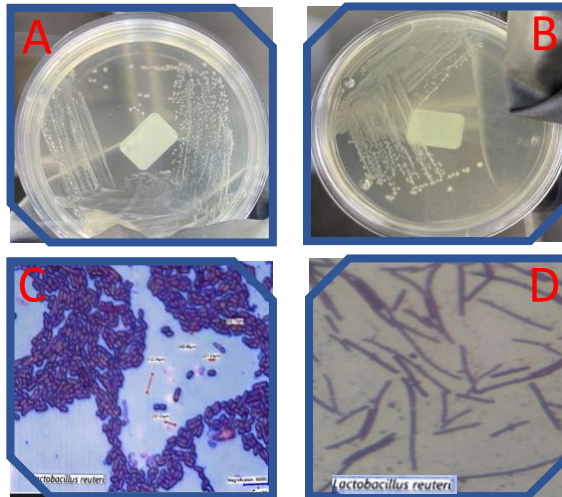


Figura 3. Aislamiento y caracterización morfológica de cepas; A) Morfología colonial en agar MRS (medio V) después de 24 horas de crecimiento, B) Morfología colonial en agar MRS (medio VA) después de 24 horas de crecimiento, C) Microfotografía a 100x de aumento de *L. reuteri* (medio V) y D) Microfotografía a 100x de aumento de *L. reuteri* (medio VA)

9.3. Cuantificación de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

Se determinó la cuenta de células viables del suplemento alimenticio Biogaia® ProD™, tomando en cuenta la morfología y el número de colonias. Para ello se seleccionaron las diluciones donde las colonias se encontraban separadas y se podían contar con facilidad. Una vez seleccionado las diluciones, se procedió a calcular el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), promediando el resultado de las 3 gotas por dilución, para conocer el valor en las muestras se realizó con la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = \frac{(\text{No. de colonias por dilución})(\text{factor de dilución (inverso de la dilución)})}{\text{mL de la muestra inoculada}}$$

En la figura 4 y tabla 2 se muestra el número de colonias y el conteo de UFC/ml de las diluciones, además del número de colonias que indica el marbete del producto Biogaia® ProD™. Se demostró que el número de UFC/ml es el mismo indicado en el marbete del producto.

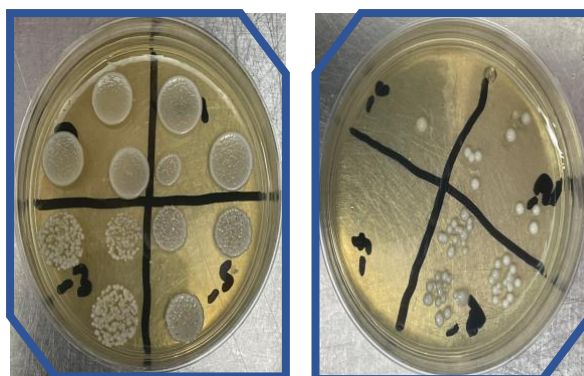


Figura 4. Diluciones y número de colonias de Biogaia® ProD™

Tabla 2. Número de colonias y UFC/ml de las diluciones Biogaia® ProD™

Factor de dilución	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	Biogaia® ProD™
No. colonias	82 ± 2 [†]	15 ± 1 [†]	3.3 ± 0.57 [†]	-----
UFC/ml	1.64x10 ⁷	3x10 ⁷	6.66x10 ⁷	2x10 ⁷ *

[†]Promedio de las 3 gotas ± desviación estándar,* por 0.1 g de comprimido

9.4. Tipificación molecular de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

En la figura 5A se pueden observar los productos de la extracción del DNA de las cepas aisladas, la amplificación del DNA se observa en la figura 5B con los productos de PCR y la purificación de los productos de PCR se observa en la figura 5C, donde se perciben bandas bien definidas. La comparación de los resultados de la secuenciación se llevó a cabo utilizando la base de datos MEGABLAST® teniendo como resultado al *Lactobacillus reuteri* con un porcentaje de identidad de 100% para ambas cepas, además de que el análisis de los datos de secuenciación permitió la construcción del árbol filogenético que se muestra en la figura 6.

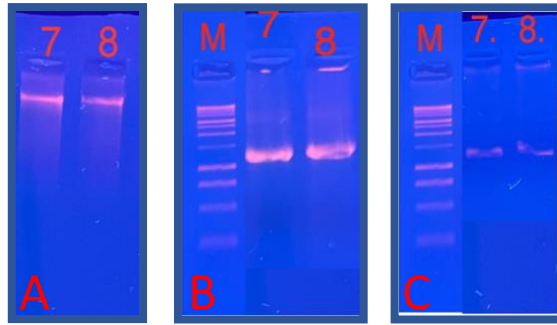


Figura 5. Gel de agarosa; A) Extracción de DNA, B) Productos de PCR columna y C) Purificación de productos de PCR. M: marcador de peso molecular; 7 y 8 cepas de *L. reuteri*

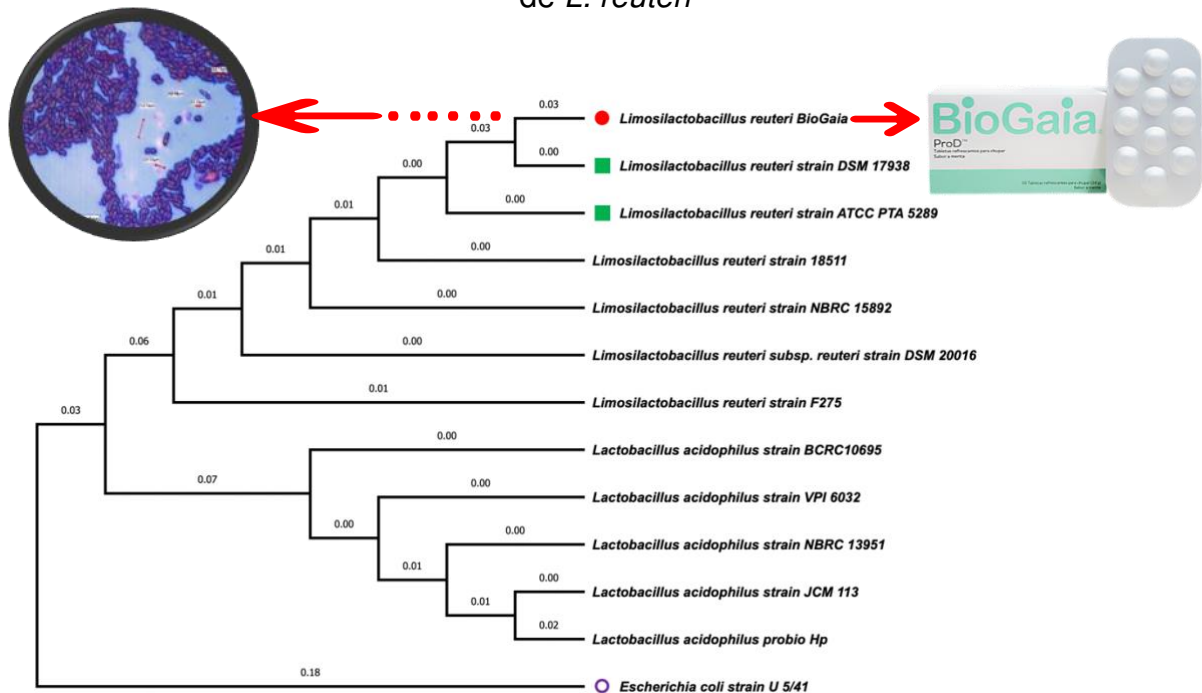


Figura 6. Árbol filogenético • Cepas aisladas de *L. reuteri* ■ Cepas de *L. reuteri* reportadas en el marbete del producto ○ Cepa control *E. coli*

9.5. Ensayos de inhibición de las cepas de *Lactobacillus reuteri*

La fermentación de las cepas de *L. reuteri* se realizó con la finalidad de encontrar el tiempo en el que el microorganismo alcanza 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 tabla 3 muestra los valores obtenidos de absorbancia y de peso

seco. La figura 7 muestra las diferentes fases de crecimiento para *L. reuteri* siendo el inicio de la fase estacionaria la marca de las 9 horas hasta las 26 horas.

Tabla 3. Valores obtenidos en la Cinética de crecimiento *L.reuteri*

Tiempo	Absorbancia	Peso seco (mg/ml)*	pH
0	0.2681	0.086	6.25
2	0.4884	0.141	5.92
4	1.7423	0.454	5.21
6	1.3143	1.389	4.7
8	1.4093	1.484	4.2
24	1.6084	1.683	4.12
26	1.7323	1.807	4.12
28	1.0437	1.119	4.14

*Valores extrapolados en una curva estándar de *Lactobacillus* proporcionada por el Dr. Alejandro Azaola

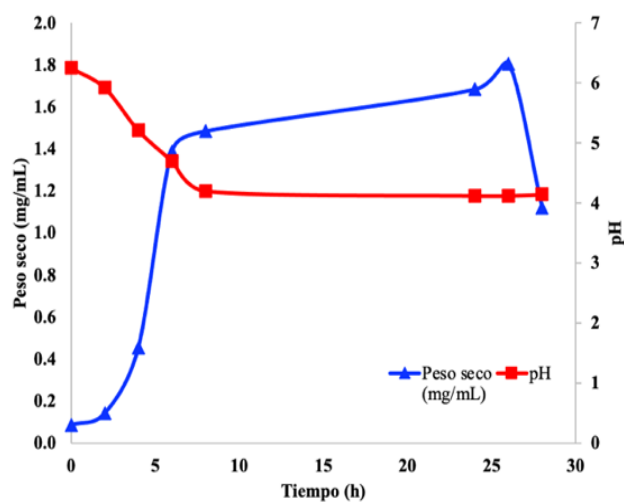


Figura 7. Cinética de crecimiento y valores de pH de *L. reuteri*

La inhibición de *L. reuteri* se observa en la Tabla 4 y Figura 8. Las cepas de *L. reuteri* se dejaron crecer 24 horas previas a la inoculación del enteropatógeno, tiempo necesario para tener un cultivo en fase estacionaria de crecimiento. Se

puede observar que *L. reuteri* mostró la mayor inhibición contra *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, no existió inhibición contra *S. typhimurium*, *S. lutea* y *S. tigurinus*.

Tabla 4. Resultados de la actividad antagonica *L. reuteri* contra microorganismos patógenos bucales y entéricos

Patógeno	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Escherichia coli</i>	+++
<i>Sarcina lutea</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Serratia marcesens</i>	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
<i>Lactococcus lactis</i> ^t	+
<i>Streptococcus mutans</i> ^t	++
<i>Streptococcus sobrinus</i> ^t	++
<i>Streptococcus tigurinus</i> ^t	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ^t	++
<i>Streptococcus oralis</i> ^t	++

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

^tPatógenos bucales donados por la Dra. Aida Hamdan

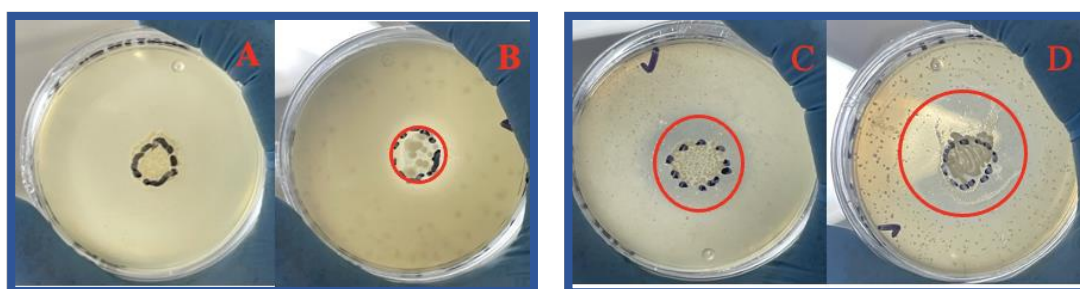


Figura 8. Zonas de inhibición. A: sin inhibición (-), B: inhibición mínima (+), C: Inhibición media (++) y D: inhibición mayor (+++)

Para confirmar la naturaleza de la actividad bactericida o bacteriostático de *L. reuteri*, se realizó el ensayo tomando muestras con hisopos de la zona clara de la inhibición y se sembró en agar Mueller Hinton, los resultados se observan en la Tabla 5 y Figura 9 siendo de forma bactericida en la mayoría de las inhibiciones realizadas, debido a, la ausencia de crecimiento del patógeno y solamente bacteriostática para la cepa *S. mutans*, dado que, existió crecimiento del patógeno.

Tabla 5. Resultados de la determinación de actividad bacteriostática y bactericida

Patógeno	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>E. coli</i>	Bactericida
<i>S. lutea</i>	-
<i>S. aureus</i>	Bactericida
<i>S. typhimurium</i>	-
<i>S. marcesens</i>	Bactericida
<i>P. aeruginosa</i>	Bactericida
<i>K. penumoniae</i>	Bactericida
<i>L. lactis</i> [†]	Bactericida
<i>S. mutans</i> [†]	Bacteriostática
<i>S. sobrinus</i> [†]	Bactericida
<i>S. tigurinus</i> [†]	-
<i>E. faecalis</i> [†]	Bactericida
<i>S. oralis</i> [†]	Bactericida

-: no se realizó determinación. [†]Patógenos bucales.

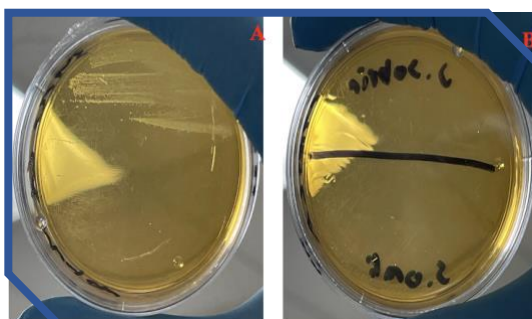


Figura 9. Resultados de la determinación de la actividad bacteriostática (A: *S. mutans*) y bactericida (B: *S. sobrinus* y *S. oralis*) provenientes de muestras de inhibición.

10. Discusión

Los productos probióticos son cada vez más populares en el mundo, existiendo una gran cantidad de presentaciones en el mercado. Los consumidores buscan los efectos beneficiosos de las bacterias probióticas esperando que estos productos contengan las bacterias indicadas en la etiqueta (Yeung et al., 2016). Las investigaciones sobre el tema de la calidad de la composición de los suplementos alimenticios comerciales indican que en muchas ocasiones el contenido no corresponde con la información del etiquetado, ya sea en términos de identidad, viabilidad y en el número de microorganismos presentes en la muestra (Vecchione et al., 2018).

Esta investigación se realizó con la finalidad de verificar que los *Lactobacillus* en el suplemento alimenticio Biogaia® ProD se encontraran en la cantidad declarada por el marbete del producto. Además de comprobar si tenían una actividad antagónica frente a diversas bacterias patógenas. Ya que en los últimos años el papel de los probióticos ha tenido un enorme progreso dentro del área de la salud, mejorando, previniendo y ayudando a reducir algunas enfermedades. Los probióticos requieren de suplementos específicos en su medio para su correcto desarrollo y reproducción. Los resultados obtenidos nos confirmaron la presencia de las cepas de *L. reuteri*, ya que la adaptación y reactivación en caldo MRS se cumplió, debido a la presencia de turbidez después de las 24 h de incubación, lo cual nos indica que a pesar del estrés sufrido en el proceso de fabricación las cepas se encontraban presentes en el suplemento.

El crecimiento de las bacterias está influenciado no solamente por la composición del medio de cultivo, sino que también las condiciones ambientales desempeñan un papel importante en el desarrollo óptimo de las bacterias. Usualmente, el crecimiento de bacterias ácido-lácticas se logra a través de una temperatura de 37°C (Sin et al., 2017). En los resultados del aislamiento en medios de cultivo MRS modificados, se observó el crecimiento de colonias con características de coloración blanca y de constitución mucosa, demostrando la importancia de la

temperatura y las condiciones anaeróbicas de incubación. El resultado de la tinción de Gram confirmó que las bacterias son Gram positivas, y la morfología observada microscópicamente confirmó la presencia de bacilos representativos del género *Lactobacillus*, aunque el tamaño fue distinto para ambas cepas esto podría deberse a los antibióticos presentes en el medio de cultivo, haciendo que las dos cepas se diferenciaron (Fevria and Hartanto, 2020). Para la identificación bioquímica se realizó la prueba de catalasa, la cual consiste en la reacción del peróxido de hidrógeno en presencia de esta enzima, produciendo agua y oxígeno el cual se evidencia mediante la formación de burbujas. El resultado de la prueba fue negativo, tal como se describe en el estudio realizado por Rodríguez y colaboradores (2021), en donde se aislaron e identificaron diferentes cepas de género *Lactobacillus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos el medio MRS es el mejor para el aislamiento del género de *Lactobacillus spp.*, lo cual se comprobó al sembrar en medio TPYG (datos no mostrados) y no lograr un aislamiento correcto, ya que el crecimiento era muy lento, con una coloración blanco transparente y produjo colonias muy pequeñas. Reflejando así la importancia de las diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y de cada uno de los componentes del medio donde se llevó a cabo el aislamiento. Estos resultados son similares a los encontrados por y colaboradores (2017), donde describe que el medio MRS es el apropiado para aislar cepas del género de *Lactobacillus spp.*

El número de células viables que contiene una fórmula probiótica es uno de los requisitos más importantes, dado que, la ingesta diaria debe ser al menos de 10^6 UFC/ml (Chen et al., 2018). Sin embargo existen diferentes factores, como el proceso de fabricación, transporte y condiciones de almacenamiento que pueden afectar el número de células viables de los suplementos alimenticios (Yeung et al., 2016). Los resultados obtenidos para la cuantificación de células viables indican que el suplemento alimenticio Biogaia® ProD cumplió con lo declarado en la etiqueta del producto, demostrando la viabilidad de los probióticos, lo que se

traduce en que pueden producir efectos beneficiosos para el consumidor. Estos resultados son similares a los presentados por Marinova y colaboradores (2019), donde 10 de los suplementos alimenticios analizados en ese estudio, presentaban un número de células viables que coincidían con lo indicado en las etiquetas, que oscilaban entre $10^8 - 10^{10}$ UFC/g.

Un microorganismo debe cumplir con ciertos requisitos para poder ser considerado como probiótico. Entre estos requisitos se incluye la identificación a nivel de especie y la tolerancia a las barreras fisicoquímicas del huésped (Battol et al., 2020). La extracción del DNA de esta investigación fue visualizada en gel de agarosa, las bandas observadas confirmaron la presencia del DNA, ya que en las dos muestras se observaron bandas bien definidas. Para los productos de PCR las dos bandas se observaron en la zona de 500 bp, sin embargo las muestras presentaban un barrido indicando la presencia de otros componentes que fueron eliminados con el proceso de purificación donde se observaron bandas bien definidas.

Basándose en el análisis de secuenciación de genes, se logró identificar los probióticos que contenían el suplemento alimenticio Biogaia® ProD coincidiendo con los genes y la especie indicada en la etiqueta. La identificación de la subunidad 16S del DNA confirmó que *L. reuteri* tenía un 100% de identidad con los genomas analizados en la base de datos del NCBI. El resultado del análisis del árbol filogenético construido por el método basado en distancias de *L. reuteri* aislado del suplemento alimenticio Biogaia® ProD fue alineado con otras secuencias de *L. reuteri*, *L. acidophilus* y teniendo como control a *E. coli*, donde se puede observar que si existió una relación filogenética con las otras cepas de *L. reuteri*, y confirmando así que el producto contenía tanto la especie y el número de células viables que indicaba el etiquetado. Destacando la importancia de que las cepas probióticas deben estar claramente etiquetadas en los marbetes de los productos, siendo esto de suma importancia, ya que puede existir una contaminación o contener especies diferentes a las reportadas. Estos resultados

son similares a un estudio realizado por Ansari y colaboradores (2019), donde examinaron 21 suplementos y se descubrió que un 82 % de las identificaciones de especies coincidían con la etiqueta del producto mediante la secuenciación de la subunidad 16S del DNA.

Los probióticos son importantes, ya que cumplen dos funciones principales, una siendo agentes para la fermentación de alimentos y la segunda, confiriendo beneficios a la salud a quien los consume. Durante mucho tiempo se ha pensado que los probióticos brindan protección contra los patógenos a través del antagonismo directo o la eliminación competitiva, ya que las bacterias probióticas son capaces de producir bacteriocinas para eliminar a sus competidores (Coman et al., 2014). La búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas ha causado el interés por el uso de algunos probióticos, esto con la finalidad de prevenir algunas enfermedades gastrointestinales, así como orales.

Con base en estas observaciones, la primera parte de los ensayos de inhibición fue la cinética de crecimiento de *L. reuteri*, la cual se realizó con la finalidad de determinar cada una de las fases de crecimiento, siendo un parámetro importante para el análisis del efecto inhibitorio de *L. reuteri*. Con respecto al resultado de la cinética de crecimiento se observó que la fase de latencia empezó de las 0 – 4 h con un pH entre 6.25 – 5.21, la fase exponencial empezó de las 4 - 8 h con un pH entre 4.7 – 4.2 y la fase estacionaria comenzó de las 9 – 26 h con un pH entre 4.2 – 4.1, siendo esta última fase la más importante en esta investigación dado que es donde los microorganismos pueden ser más activos metabólicamente. El pH también es un factor importante para los probióticos debido a que durante la cinética pueden producir ácidos orgánicos, los cuales pueden tener un efecto inhibitorio frente a ciertos patógenos. Los ácidos láctico y acético que son producidos por *L. reuteri* son ácidos orgánicos débiles a pH bajo y, por lo tanto, pueden atravesar las membranas plasmáticas hidrofóbicas. El proceso de difusión ocurre espontáneamente y está influenciado simultáneamente por el pH y los gradientes osmóticos entre las membranas celulares internas y externas. Los

aniones cargados no pueden pasar a través de la membrana celular y, por lo tanto, pueden dañar la célula por el aumento en la actividad necesaria para mantener el pH correcto en la célula y alterando la membrana celular (Greifová et al., 2017). Se puede observar que la fase estacionaria y el descenso del pH son muy semejantes a los presentados en un estudio por Mis y colaboradores (2019), donde la cinética de crecimiento de *L. reuteri* de igual forma comienza a las 9 h y el pH es de 4.1 a las 24 h.

Los lactobacilos son conocidos por producir algunos compuestos antimicrobianos, esto se ha demostrado en experimentos in vitro contra patógenos entéricos y orales. La eficacia de la actividad antagónica de los probióticos depende de factores, como las condiciones ambientales de crecimiento, y la producción de metabolitos como los ácidos orgánicos (Coman et al., 2014). La actividad antagónica en esta investigación se realizó con cepas de bacterias patógenas (entéricas y bucales), las cuales fueron seleccionadas de acuerdo con el propósito del suplemento alimenticio estudiado que era la salud bucal, además de comprobar su acción en problemas intestinales.

La actividad antagónica en esta investigación se realizó con *L. reuteri* en una fase estacionaria, demostrando que los probióticos aislados tenían diversos grados de inhibición contra las diferentes bacterias patógenas. La inhibición se evaluó por el método de doble agar: método que utiliza al microorganismo con un crecimiento de 24 h. Los probióticos pueden combatir a los patógenos bacterianos, ya sea por interacción indirecta, exclusión competitiva, o por la secreción de metabolitos (Bustamante et al., 2020). Basándose en los resultados de la actividad antagónica de *L. reuteri* se confirmó que tuvo una inhibición por exclusión competitiva contra la mayoría de los patógenos probados, esto debido a que al coexistir los dos microorganismos en el mismo medio de cultivo compitiendo por recursos limitados (nutrientes y espacio), *L. reuteri* logro formar un halo de inhibición frente a los patógenos. Sin embargo, no se confirmó si la inhibición fue causada por algún metabolito excretado. Por lo tanto, se podría esperar una mayor inhibición con el

uso de algún metabolito que se pudiera aislar de *L. reuteri*. Para confirmar la naturaleza de la actividad antagónica, se evaluó la actividad bacteriostática y bactericida. Los resultados de esta confirmaron que *L. reuteri* presentó una actividad bactericida, esto debido a que no hubo crecimiento del patógeno al tomar una muestra del halo de inhibición y resembrarlo. Para el caso de *S. mutans* que si presentó crecimiento, se puede concluir que *L. reuteri* puede disminuir la cantidad del microorganismo patógeno pero no inhibirla totalmente. Baca-Castañón y colaboradores (2014), informó en su estudio que *L. reuteri* posee una actividad inhibitoria contra patógenos bucales, de igual manera destacan la necesidad de profundizar en la investigación antibacteriana de los probióticos. Además, un estudio realizado por Guantario y colaboradores (2018), demostró que, con el método de doble agar, algunos microorganismos del género *Lactobacillus* presentan actividad antagónica frente a patógenos entéricos, con resultados similares a los obtenidos en el presente estudio.

11. Conclusión

Esta investigación confirma la presencia de los microorganismos en el suplemento alimenticio Biogaia® ProD, lo anterior a través de las técnicas aplicadas para su caracterización morfológica y bioquímica. El número de células viables se verificó a través de las UFC/ml cumpliendo con lo indicado en la etiqueta. La técnica de tipificación molecular y la secuenciación del material genómico permitió la identificación de las cepas de *L. reuteri* presentes en el suplemento alimenticio, confirmando que el producto tiene una calidad satisfactoria.

Los beneficios que ofrecen los productos probióticos para prevenir y coadyuvar con algunas enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal y oral se demostraron en esta investigación, evidenciando que las cepas aisladas poseen propiedades bactericidas *in vitro* contra patógenos entéricos y bucales, ya que se logró la inhibición de la mayoría de ellos. Estos resultados dan certeza de que los probióticos confieren un beneficio a la salud de quien los consume. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios para identificar los metabolitos responsables de la actividad inhibitoria. Además, se necesitan ensayos *in vivo* para determinar su actividad probiótica y así reafirmar sus beneficios a la salud.

12. Referencias

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegay, Z., Tefera G., & Aynalem, E. (2018) Health benefits of probiotics. *J Bacteriol Infec Dis.*;2(1):8-27.

Ansari, J. M., Colasacco, C., Emmanouil, E., Kohlhepp, S., & Harriott, O. (2019). Strain-level diversity of commercial probiotic isolates of *Bacillus*, *Lactobacillus*, and *Saccharomyces* species illustrated by molecular identification and phenotypic profiling. *PLOS ONE*, 14(3), e0213841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213841>

Arshad, F.-A., Mehmood, R., Hussain, S., Annus Khan, M., & Khan, M. S. (2018). Lactobacilli as Probiotics and their Isolation from Different Sources. *British Journal of Research*, 05(03), 1–11. <https://doi.org/10.21767/2394-3718.100043>

Baca-Castañón, M. L., de la Garza-Ramos, M. A., Alcázar-Pizaña, A. G., Grondin, Y., Coronado-Mendoza, A., Sánchez-Najera, R. I., Cárdenas-Estrada, E., Medina-De la Garza, C. E., & Escamilla-García, E. (2015). Antimicrobial Effect of *Lactobacillus reuteri* on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9178-y>

Batool, S. A., Ahsan, F., Nawaz, M., Anjum, A. A., Khan, A. U., Ullah, N., Ali, M. A., & Murtaza, N. (2020). Study of in-vitro probiotic properties and antibiotic resistance in lactobacilli isolated from commercial probiotic products in pakistan. In *Pakistan Journal of Science* (Vol. 72, Issue 1).

Bustamante, M., Oomah, B. D., Mosi-Roa, Y., Rubilar, M., & Burgos-Díaz, C. (2020). Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 325–334. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9521-4>

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>

Chen, S., Chen, L., Chen, L., Ren, X., Ge, H., Li, B., Ma, G., Ke, X., Zhu, J., Li, L., Feng, Y., & Li, Y. (2018). Potential probiotic characterization of *Lactobacillus reuteri* from traditional Chinese highland barley wine and application for room-temperature-storage drinkable yogurt. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5780–5788. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14139>

Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., & Cresci, A. (2014). *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501[®], *Lactobacillus paracasei* IMC 502[®] and SYNBIO[®] against

pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.12544>

Di Pierro, F., Polzonetti, V., Patrone, V., & Morelli, L. (2019). Microbiological Assessment of the Quality of Some Commercial Products Marketed as *Lactobacillus crispatus*-Containing Probiotic Dietary Supplements. *Microorganisms*, 7(11), 524. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110524>

El-Ziney, M. G. (2018). Molecular and Probiotic Characterizations of *Lactobacillus reuteri* DSM 12246 and Impact of pH on Biomass and Metabolic Profile in Batch-Culture. *Advances in Microbiology*, 08(01), 18–30. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.81002>

Fevria, R., & Hartanto, I. (2020). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) From Sauerkraut. *Proceedings of the International Conference on Biology, Sciences and Education (ICoBioSE 2019)*. <https://doi.org/10.2991/absr.k.200807.018>

Ghafouri-Fard, S., Hejazi, M.A., Afshar, D., Barzegari, A., Eslami, S. (2018). 16S-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis Assay for Discriminating Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species Isolated from Traditional Dairy Products. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 25 (2), 175-186.

Greifová, G., Májeková, H., Greif, G., Body, P., Greifová, M., & Dubničková, M. (2017). Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia Microbiologica*, 62(6), 515–524. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0524-9>

Goel, G., & Kumar, A. (2021). *Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine* (G. Goel & A. Kumar, Eds.; Vol. 21). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6795-7>

Haslöf, P., & Stecksén-Blicks, C. (2020). Probiotic bacteria and dental caries. *The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health*, 28, 99-107. <https://doi.org/10.1159/000455377>

Marinova, V. Y., Rasheva, I. K., Kizheva, Y. K., Dermenzhieva, Y. D., & Hristova, P. K. (2019). Microbiological quality of probiotic dietary supplements. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 834–841. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1621208>

Mishra, S., Rath, S., & Mohanty, N. (2020). Probiotics—A complete oral healthcare package. *Journal of Integrative Medicine*, 18(6), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.08.005>

Mizielińska, M., Sobecka, K., Jarosz, M., Urbański, D., Stobińska, M., Łukawska, B., Olchawa, E., & Bartkowiak, A. (2017). The influence of immobilization and

packaging on the viability of probiotics stored at 25 °C. *World Scientific News*, 77(2), 120–139.

Ranjha, M. M. A. N., Shafique, B., Batool, M., Kowalczewski, P. Ł., Shehzad, Q., Usman, M., Manzoor, M. F., Zahra, S. M., Yaqub, S., & Aadil, R. M. (2021). Nutritional and Health Potential of Probiotics: A Review. *Applied Sciences*, 11(23), 11204. <https://doi.org/10.3390/app112311204>

Rodríguez-López, C. M., Guzmán-Beltrán, A. M., Lara-Morales, M. C., Castillo, E., & Brandão, P. F. B. (2020). Aislamiento e identificación de lactobacillus spp. (lactobacillaceae) resistentes a cd(ii) y as(iii) recuperados de fermento de cacao. *Acta Biológica Colombiana*, 26(1), 19–29. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677>

Romani Vestman, N., Hasslöf, P., Keller, M. K., Granström, E., Roos, S., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2013). Lactobacillus reuteri Influences Regrowth of Mutans Streptococci after Full-Mouth Disinfection: A Double-Blind, Randomised Controlled Trial. *Caries Research*, 47(4), 338–345. <https://doi.org/10.1159/000347233>

Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>

Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., & Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3), 212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>

Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>

Sharma, A., Lee, S., & Park, Y.-S. (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, 29(10), 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>

Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic Resistance of Lactobacillus sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38–51. <https://doi.org/10.1111/jfs.12211>

Signorino F, Zouri NN, Allocca G, Maiorana C, Poli PP.(2021). Effectiveness of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri* in patients with peri-implant mucositis: a prospective clinical study. *Journal of Osseointegration*, 13(3),144-149. <https://doi.org/10.23805/JO.2021.13.03.7>

Sin, C., Britos, M., Ortega, S., & Vasek, O. (2017). Reactivación de *Lactobacillus* spp. aislados de saliva y alimentos. *Revista de La Facultad de Odontología*, 10(1), 7–12. <https://doi.org/10.30972/rfo.1012928>

Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2020). A Review of the Role of Probiotic Supplementation in Dental Caries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1300–1309. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09652-9>

Vecchione, A., Celandroni, F., Mazzantini, D., Senesi, S., Lupetti, A., & Ghelardi, E. (2018). Compositional Quality and Potential Gastrointestinal Behavior of Probiotic Products Commercialized in Italy. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00059>

Widyarman, A., Pranoto, S., Theodorea, C., Bachtiar, E., & Bachtiar, B. (2018). Isolation and identification of Indonesian *Lactobacillus reuteri* strain from the saliva of young adults. *Scientific Dental Journal*, 2(2), 67–77. <https://doi.org/10.26912/sdj.v2i2.2840>

Wilcox, H., Carr, C., Seney, S., Reid, G., & Burton, J. P. (2020). Expired probiotics: what is really in your cabinet? *FEMS Microbes*, 1(1). <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtaa007>

Yeung, T. W., Üçok, E. F., Tiani, K. A., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2016). Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00494>