



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÁCIDO LÁCTICO
PRESENTE EN EL KÉFIR SOBRE *Escherichia coli* Y SU RELACION CON EL
CONTROL DE EVENTOS GASTROINTESTINALES.**

**Tesis para optar al Título Profesional de Nutricionista y Grado Académico de
Licenciado en Nutrición y Dietética**

CLAUDIA AGUILERA ABARZUA

MARIOLY SALAZAR VIVAR

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alejandro Dinamarca

2015

Índice

Resumen	4
Abstract.....	5
Marco Teórico	6
1. Probióticos	6
2. La microbiota intestinal	6
3. <i>Escherichia coli</i>	11
3.1 <i>Escherichia coli</i> DH5 α	16
4. Probiótico casero: kéfir	18
5. Bacterias ácido lácticas	24
6. Conducta de consumo de kéfir en poblaciones afectadas con diarrea	25
Grafica N°1: Porcentaje de personas que refiere conocer los beneficios de los probióticos...	27
Grafica N°2: Proporción de consumidores de kéfir según género.....	28
Gráfica N° 3: Tipo de leche con la que fue preparado el kéfir	28
Gráfica N°4: Consumo de kéfir ante conocimiento de sus beneficios.....	29
Tabla n° 5: Consumo de kéfir ante eventos de diarrea según rango etario.	30
Hipótesis	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos	31
Metodología.....	32
1. EXPERIMENTACIÓN: Estudio del efecto de fermentado de kéfir casero sobre <i>Escherichia coli</i> en condiciones de laboratorio	32
1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	32
1.2.1 FERMENTADO DE KEFIR	32
1.2.2 CRECIMIENTO DE BACTERIA <i>Escherichia coli</i> DH5 α	33

1.2.3 PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE KÉFIR Y <i>Escherichia coli</i> DH5α	33
1.2.4 INOCULACIÓN DE MUESTRA EN AGAR MacConkey	35
1.2.5 MUESTRA EXPERIMENTAL CON ÁCIDO LÁCTICO	36
1.2.7 ESQUEMA DE METODOLOGÍA: <i>Escherichia coli</i> DH5α expuesta a kéfir.	38
.....	38
Resultados.....	40
1. EFECTO DEL KEFIR CASERO SOBRE <i>Escherichia coli</i> DH5α	40
Grafica N°1: Comportamiento del pH del kéfir según el tiempo de incubación.	40
Figura N°1: Conteo de UFC de <i>Escherichia coli</i> DH5α en Agar MacConkey.....	41
Grafica N°2: Recuento de UFC de <i>Escherichia coli</i> DH5α expuesta a ácido láctico	42
Grafica N°3: Recuento de UFC de <i>Escherichia coli</i> DH5α expuestas a kéfir.....	43
Discusión	46
Conclusión.....	50
Referencias.....	51

Resumen

Los probióticos se definen como microorganismos vivos no patógenos de tipo bacteriano y fúngico que al administrarse en cantidades suficientes proporcionan un beneficio para la salud del huésped, independiente de su valor nutritivo intrínseco; las bacterias más conocidas son del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*. Se estima que aproximadamente un total de 10^{14} bacterias están presentes en la microbiota intestinal de un individuo adulto, las cuales normalmente son beneficiosas o inofensivas para la salud.

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra comúnmente en el intestino grueso de los seres humanos. Las cepas bacterianas pueden ser comensales, patógenas o generar un estado simbiótico que proporciona resistencia contra otros microorganismos patógenos.

En este estudio se quiso evaluar el efecto del ácido láctico proveniente del kéfir sobre un modelo de microorganismo entérico, *Escherichia coli* DH5 α , el cual fue expuesto a distintos tiempos de fermentación de kéfir y, por otra parte, a distintas concentraciones de ácido láctico. Finalmente, se pudo comprobar que el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α , se vio afectado con la exposición del fermentado de kéfir, especialmente en la muestra de t72 (pH 4,7) y que en el caso de la muestra con ácido láctico a distintas concentraciones, el crecimiento de este microorganismo no se vio afectado. Mediante la aplicación de la prueba estadística Chi² se comprobó una independencia estadísticamente significativa entre el pH dado por el ácido láctico y el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α medido en UFC.

Palabras claves: Probióticos, *Escherichia coli*, Kéfir.

Abstract

Probiotics are defined as living non pathological microorganisms of bacterial and fungal type that administered at sufficient quantity provide a health benefit for the host, independently of its intrinsic nutritive value; the most known bacteria are the ones of the *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* genre. It is estimated that approximately 10^{14} bacteria are present in the intestinal microbiota in an adult, which are commonly beneficial or inoffensive for health.

Escherichia coli is a Gram negative bacterium of the *Enterobacteriaceae* family, that is commonly found in the large intestine of humans. The bacterial strains can be commensal, pathogenic or create a symbiotic state that provides resistance against other pathogenic microorganisms.

In this study we wanted to evaluate the effect of the lactic acid from kefir on a model of a enteric microorganism, *Escherichia coli* DH5 α , which was exposed to different times of kefir fermentation and, on the other hand, at different concentrations of lactic acid. Finally, it could be checked that the *Escherichia coli* DH5 α growth was affected by the exposition of the kefir fermentation, especially in the t72 sample (pH 4,7) and in the case of the sample with lactic acid at different concentrations, the growth of this microorganism was not affected. Through the application of the Chi² statistic test it was proved statistically significant independence between medium pH given by lactic acid and growth of *Escherichia coli* DH5 α measured in CFU.

Keywords: Probiotics, *Escherichia coli*, Kéfir.

Marco Teórico

1. Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos no patógenos de tipo bacteriano y fúngico que al administrarse en cantidades suficientes proporcionan un beneficio a la salud del huésped independiente de su valor nutritivo intrínseco (1); obteniéndose así, una mejoría del balance microbiano intestinal, gracias a la presencia de bacterias lácticas del tipo *lactobacilos* o *bifidobacterias*, siendo las más conocidas junto al hongo *Saccharomyces* (2).

La palabra probiótico significa "para la vida", y hoy en día, se utiliza en referencia a las bacterias asociadas con efectos útiles en los seres humanos y animales. Esta creencia se basa en el conocimiento de que la flora intestinal puede proteger a los humanos contra infecciones y que la perturbación de esta flora puede aumentar la susceptibilidad a la infección. Las bacterias en el yogur y productos lácteos fermentados constituyen la fuente más importante de probióticos para los seres humanos (3). Los probióticos deben estar vivos en el alimento o suplemento y deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (TGI) para ejercer de esta manera sus efectos beneficiosos (4).

2. La microbiota intestinal

La microbiota intestinal se define como el conjunto de microorganismos residentes en el tracto gastrointestinal (TGI) que proporcionan una barrera biológica contra la invasión de

patógenos y contribuyen a la modulación del sistema inmune (5). La microflora tiene tres funciones principales: protectora, estructural y metabólica. La función metabólica incluye la síntesis de vitaminas esenciales tales como biotina y folato, y la fermentación de residuos alimenticios no digeribles (6). Proporciona protección contra patógenos al competir por los nutrientes y receptores en el TGI. Algunas cepas, como bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas y ácido láctico que inhibe el crecimiento de otras especies bacterianas. A pesar que el TGI tiene varias funciones de protección para evitar la adherencia de las cepas patógenas, algunas de éstas también podrían fomentar el crecimiento de bacterias, como la capa de moco que contiene mucinas que producen sacáridos los cuales se utilizan como fuente de energía tanto por cepas patógenas y comensales (6).

En el feto, el TGI es estéril, y durante el parto se produce la primera colonización de bacterias a través del canal de parto. Directamente después de un parto vaginal, el TGI superior estéril del recién nacido comienza a ser colonizado por la microbiota vaginal y fecal de la madre. A diferencia de lo que ocurre en niños nacidos por cesárea, en donde la exposición microbiana primaria probablemente se origina a través del entorno circundante (7).

Se estima que aproximadamente un total de 10^{14} bacterias (10^{11} células por gramo de heces) están presentes en la microbiota intestinal de un individuo adulto (8). La colonización microbiana varía a lo largo de la longitud del tracto gastrointestinal, en el estómago y duodeno, la concentración alcanza aproximadamente entre 10 a 10^3 bacterias por ml, 10^4 - 10^7 bacterias por ml en yeyuno e íleon y 10^{11} - 10^{12} bacterias por ml en el colon (9).

Normalmente, la mayoría de las bacterias en el tracto gastrointestinal son beneficiosas o inofensivas para la salud del huésped, y solo una minoría está representada por bacterias potencialmente dañinas (10).

En el adulto, las bacterias anaerobias como *Lactobacilos* y *Streptococos* dominan una pequeña parte de la microbiota, la cual se va haciendo más compleja principalmente en la región que une el intestino delgado y grueso. En el intestino grueso predominan las bacterias anaerobias tales como *Bifidobacterias*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus*. Los anaerobios facultativos como *Escherichia. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* representan menos del 1% de la microbiota total (11).

En personas de edad avanzada los cambios del patrón motor del intestino delgado, junto con un grado de disminución de la movilidad pueden influir en la motilidad del intestino y tener un efecto negativo sobre la digestión, causando estreñimiento, y por lo tanto, puede ser asociado con cambios en la microbiota intestinal (12).

Una de las zonas del tubo digestivo, que invariablemente alberga microorganismos, es el colon, aunque también pueden encontrarse microorganismos en otras regiones del tubo digestivo como por ejemplo en el íleon distal en personas sanas.

Tabla N° 1: Bacterias presentes en el tubo digestivo bajo.

MICROORGANISMO	UBICACIÓN	MANIFESTACIÓN CLÍNICA	ADAPTACIONES
<i>Achromobacter spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Infecciones post-operatorias, post-traumáticas	Gram negativo, no fermentador, aerobio.
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Intestino grueso	No determinada	Gram negativo, estrictamente anaerobio
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Intestino grueso, íleon	Infecciones post-operatorias	Gram negativo, aerobio.
<i>Aeromonas spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Diarrea (rara), septicemia (rara), osteomielitis	Gram negativo móvil, ubicuo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Gastroenteritis (rara), bacteremia	Gram negativo,
<i>Bacillus spp.</i>	Intestino grueso	Intoxicación alimentaria, infección herida	Gram positivo.
<i>Bacteroides spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Peritonitis, absceso, colecistitis, enteritis	Gram negativo, anaerobio, bilis resistentes.
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Intestino grueso	Diverticulitis, peritonitis	Gram positivo, anaerobio obligado
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	Intestino grueso	No determinada	Gram negativo
<i>Campylobacter spp.</i>	Intestino grueso	Diarrea	Gram negativo, móvil.
<i>Clostridium spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Intoxicación alimentaria, coledocistis, colecistitis, enterocolitis pseudomembranosa	Gram positivo, anaerobio.

<i>Corynebacterium spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	No conocida	Gram positivo, inmóviles, anaerobio facultativo
<i>Enterobacteriaceae</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Absceso, peritonitis, bacteremia, diarrea, fiebres entéricas, fiebre tifoidea complicaciones post-operatorias y post-traumáticas, meningitis, endocarditis, intoxicación alimentaria	Gram negativo, anaerobio facultativo
<i>Enterococcus</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Peritonitis, colecistitis, complicaciones , post-operatorias	Gram positivo, anaerobio facultativo
<i>Flavobacterium spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Meningitis, peritonitis	Gram negativo, inmóviles, aerobio.
<i>Lactobacillus spp,</i>	Intestino grueso, íleon bajo	No conocida	Gram positivo, anaerobio.
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Colecistitis, absceso, peritonitis, mionecrosis	Gram positivo, anaerobio.
<i>Propionibacterium spp.</i>	Intestino grueso	Endocarditis	Gram positivo, anaerobio estricto.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Gastroenteritis, meningitis, bacteremia, complicaciones postoperatorias	Gram negativo, aerobio.
<i>Ruminococcus bromii</i>	Intestino grueso	No determinada	Gram positivo, anaerobio.
<i>Sarcina spp.</i>	Intestino grueso	No determinada	Gram positivo, anaerobio estricto.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intestino grueso, íleon bajo	Absceso pancreático, enteritis, intoxicación alimentaria, complicaciones de enterocolitis, pseudomembranosa	Gram positivo, anaerobio facultativo.
<i>Veillonella spp.</i>	Intestino grueso	No determinada	Gram negativo, anaerobia.
<i>Vibrio spp.</i>	Intestino grueso, íleon bajo	No por bacterias habituales	Gram negativo

Aunque el estómago y el esófago se contaminan con bacterias cada vez que se ingiere un alimento, la población bacteriana no sobrevive bien en estas dos áreas, lo mismo ocurre con el intestino delgado (excepto el íleon distal). Por otra parte, el hígado, la vesícula y también el peritoneo, están libres de bacterias o sólo las albergan transitoriamente. La presencia de microorganismos en estos sitios se debe a enfermedades subyacentes, como carcinoma o bien alcanzan estos sitios después de una ruptura del intestino grueso. (13)

La influencia de los probióticos en la microbiota intestinal

El consumo de probióticos (dosis 10^9 - 10^{10} UFC/día) afecta la composición y actividad de la microbiota intestinal (11). Se ha demostrado que varias cepas probióticas; entre ellas, *L. rhamnosus GG*, *B. lactis Bb-12*, *L. reuteri*, son capaces de acortar la duración de la diarrea por rotavirus (10). Por otro lado, se ha demostrado que *Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* puede acortar la diarrea por *C. difficile* (19). Para la diarrea del viajero, los efectos de los probióticos son menos claras. La razón de esto puede ser las diferentes etiologías de este tipo de diarrea y la alta tasa de abandono (*Sazawal et al. 2006*) (11).

3. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae*, no esporulada, anaerobia facultativa, es decir que puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, aceptores de electrones o fermentar (14). El metabolismo central de *E. coli*

consiste en la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, la vía pentosa fosfato, la vía de Entner-Doudoroff, el ciclo de Krebs, y diversas vías de fermentación (14).

En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, a la fermentación de manitol y gas a partir de glucosa, con respecto a la lactosa, es positivo en el 90% de las cepas con citrato negativo (15).

Se encuentra comúnmente en el intestino grueso de seres humanos y otros animales de sangre caliente. Estas cepas pueden ser comensales, patógenas y causar enfermedades en sitios intestinales y extra intestinales o generar un estado simbiótico que proporciona resistencia contra organismos patógenos (6). Está presente en cantidades relativamente más bajas que otras importantes bacterias comensales; sin embargo, es la causa más común de enfermedad intestinal y extra intestinal (6) y es la primera bacteria en colonizar el intestino de los bebés (16). La bacteria persiste en el ambiente hasta que el huésped consume agua o alimentos contaminados o adulterados con bacterias viables. Después de la ingesta, enfrenta un factor estresante: la acidez estomacal, y logra sobrevivir gracias a una fase estacionaria en la cual induce un sistema de protección de ácido-resistencia (17). Cuando llega al colon debe encontrar los nutrientes necesarios que permitan el cambio desde la fase de latencia a la fase logarítmica (18). Básicamente, el éxito en la colonización del intestino radica en competir por los nutrientes (18), en penetrar la capa de mucus (19), evadir los mecanismos de defensa del huésped (20) y crecer rápidamente (21). Luego, reside en la capa mucosa hasta que es desprendida hacia el lumen intestinal desde donde algunas células son eliminadas a través de las heces y el ciclo comienza nuevamente.

Escherichia coli patógenas

Las cepas de *Escherichia coli* patógenas están categorizadas en patotipos, seis de ellos se asocian a diarrea y colectivamente son referidas a *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD), todas ellas, se diferencian según sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico y epidemiología. (22)

De acuerdo a la clasificación de Kauffmann, las cepas de *Escherichia coli* se pueden agrupar en diferentes serogrupos y serotipos basado en el antígeno O, correspondiente al lipopolisacárido de la pared celular, más el antígeno flagelar H compuesto por 75 polisacáridos, y el antígeno K de superficie (Nataro y Kaper, 1998; Kaper et al, 2004)

Tabla N°2: Caracterización de cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas.

BACTERIAS	DESCRIPCIÓN	CUADRO CLINICO	EPIDEMIOLOGIA
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	Fue la primera en describirse. Induce una lesión histopatológica en el intestino conocida como la lesión A/E (Adherencia y eliminación), en donde las bacterias se adhieren a lo enterocitos y causan la eliminación de las microvellosidades intestinales.(23)	-Diarrea acuosa	Principal causa de diarrea en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo. Se presenta en forma endémica hasta en un 6% de la población. (24)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	Este patógeno se adhiere a la mucosa del intestino delgado, invadirla, con la posterior producción y traslocación de plásmidos codificados termolábiles (LT) y/o enterotoxinas termolábiles (ST) (6)	-Diarrea aguda secretora.	Las cepas de este patógeno son endémicas causante de la “diarrea del viajero”(25) Representa el 13% de los cuadros diarreicos en niños bajo los 4 años de edad.

<p><i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ECEI)</p>	<p>Afecta a personas de diferentes rangos etarios, en donde invade el epitelio intestinal provocando lisis de las vacuolas endociticas multiplicándose en el citoplasma con la posterior extensión hacia células epiteliales adyacentes. Produce la liberación del calcio impidiendo la solidificación ósea. (26)</p>	<p>-Diarrea acuosa -Diarrea disintérica.</p>	<p>De carácter endémico en países en desarrollo, representando hasta el 5% de los episodios de diarrea. (26) En Chile se encontró en 2 a 3% de las diarreas agudas, en niños de bajos recursos.</p>
<p><i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH)</p>	<p>Este patógeno tiene la capacidad de adherirse a células endoteliales y producir lesiones a nivel de uniones estrechas localizadas principalmente en el colon. Produce 2 principales tipos de toxina; Verotoxina 1 (VT-1) Y Verotoxina 2 (VT-2), también conocidas como "toxinas Shiga" provocan inhibición proteica y muerte celular sin invasión del enterocito. (27,28) Los serogrupos más comunes son: O157, O26, O11 y los serotipos: H7, H11 y H32.</p>	<p>-Colitis hemorrágica -Síndrome Urémico Hemolítico (SHU) -Insuficiencia Renal Aguda (IRA)</p>	<p>En Chile la incidencia oscila entre 0,1 – 0,7 casos de infecciones intestinal por cada 100.000 habitantes, presentándose mayormente en la Región Metropolitana. Se estima que causan el 1% de las diarreas acuosas y el 30% de las diarreas disintéricas en niños de la Región Metropolitana. El 10% de los niños infectados desarrollan SHU. (28)</p>
<p><i>Escherichia coli</i> enteroagregativa o enteroadherente (ECEA)</p>	<p>Posee propiedades enteroagregativas que se caracterizan por la capacidad de producir un patrón de agregación y adhesión (AA) en monocapas de células HEp-2. La principal característica de AA es la disposición de las bacterias descrito como una configuración de "ladrillos apilados" con la capacidad de formar biopelículas. (29)</p>	<p>-Diarrea aguda -Diarrea persistente</p>	<p>Se asocia a diarrea persistente en preescolares.</p>

<p><i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (ECAD)</p>	<p>Este patógeno coloniza el intestino a través de un patrón de adherencia difusa en las células epiteliales. Su patogenicidad se debe principalmente a las interacciones adhesina-huésped, estas adhesinas pertenecen a la familia Afa/Dr. La presencia concomitante de Afa/Dr en estas cepas sugiere que se puede producir un mecanismo adhesina-receptor-efector, similar a la que se ve en EPEC (30)</p>	<p>-Diarrea en niños inmunológicamente no desarrollados o desnutridos. -No se ha demostrado que cause diarrea en mayores de un año ni en adultos.</p>	<p>Predomina en preescolares y lactantes.</p>
--	--	---	---

3.1 *Escherichia coli* DH5α

Escherichia coli DH5α es un tipo de cepa no patógena que posee muchos genotipos beneficiosos (*recA*, *deoR*, *gyrA*, y *endA1*), que han sido ampliamente usados para múltiples propósitos, tales como la clonación de genes y producción de proteínas, sin embargo, muestra menor fenotipos de crecimiento en comparación con otras cepas de *Escherichia coli*, de esta manera la utilización de este tipo de cepa se ha limitado al laboratorio a pesar de sus múltiples ventajas. (31)

Aspectos básicos de la colonización

La colonización se define como la persistencia indefinida de una población bacteriana particular sin la reintroducción de esa bacteria. Rol Freter fue uno de los pioneros en el campo de la colonización intestinal y concluyó que influyen varios factores en la capacidad de un organismo para colonizar, siendo la competencia por los nutrientes fundamental para la mantención en el ecosistema intestinal (14). Freter planteó una hipótesis a la cual denominó “nicho de nutrientes”, según ésta, para colonizar el intestino, cada especie debe utilizar, al menos un nutriente limitante, mejor que las demás especies (14). Por otra parte señala que las especies invasoras tendrán problemas para colonizar un ecosistema estable como lo es el intestino sano, lo cual es denominado “resistencia a la invasión” (32). *Stecher* y *Hardt et al*, demostraron que cuando *Salmonella serovar Typhimurium* induce la inflamación en colitis del ratón, la composición de la microbiota cambia y su crecimiento se suprime, mientras que el crecimiento de *serovar Typhimurium* aumenta, ya que se demostró que la bacteria es atraída por la quimiotaxis de nutrientes que contienen galactosa hacia la superficie de la mucosa intestinal (33).

Condiciones de crecimiento

Escherichia coli crece mejor en azúcares, incluyendo una amplia gama de mono y disacáridos y no puede crecer en polisacáridos complejos debido a que carece de la enzima hidrolasa de polisacáridos. También puede crecer en aminoácidos y dicarboxilatos. El metabolismo de estos nutrientes requiere de gluconeogénesis para ser utilizados como precursores de macromoléculas como lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicano (14).

El crecimiento de varias especies de bacterias es inhibida en presencia de nitrito y bajos niveles de oxígeno, pH y actividad de agua (A_w) (34). Sin embargo, *E. coli* O157:H7 está adaptada a las condiciones ácidas a través de la síntesis de “proteínas de choque ácido”, activación de enzimas metabólicas para mantener la homeostasis y por el incremento de ácidos grasos de ciclopropano en la membrana citoplasmática (34).

Schilling, 2008, demostró mediante la experimentación con *Escherichia coli* no patógena, que el pH óptimo para el crecimiento de ésta es un pH que bordea el neutro (pH 6-8), por otra parte se produce la inhibición del crecimiento de esta bacteria en condiciones de acidez (pH 4-5) (35).

Otros efectos en la salud del huésped

Infecciones del tracto urinario (ITU): Se ha definido como la presencia significativa de bacterias u organismos patógenos en el sistema urinario. Son más comunes en las mujeres por varios factores de riesgo como el uso de anticonceptivos, deficiencia de estrógenos, factores genéticos, entre otros. El tracto gastrointestinal inferior es una fuente común de

bacterias que causan ITU, con algunas cepas capaces de colonizar la vagina. Estas cepas a menudo provienen de las heces, las cuales ingresan al tracto urinario (TU) a través de la colonización del introito vaginal y el área periuretral. Las bacterias pueden ascender hacia la vejiga y causar cistitis, que normalmente se asocia con los síntomas clásicos de ITU, es decir, dolor, frecuencia y urgencia para orinar (6).

Septicemia: La septicemia es la presencia de microorganismos en la sangre. ExPEC (extra intestinal patogenic *Escherichia coli*) es otro tipo de cepa virulenta que causa alteraciones fuera del TGI. Es el grupo de microorganismos más común que causa septicemia. Pueden entrar en la sangre a través de heridas abiertas y quemaduras, o se pueden trasladar desde el tracto renal o gastrointestinal, un proceso llamado translocación bacteriana. La septicemia que tiene su origen en el TU se conoce como urosepsis. Desde la sangre, las cepas ExPEC pueden infectar órganos distantes, causando insuficiencia orgánica múltiple y shock (6).

4. Probiótico casero: kéfir

Se define kéfir como una bebida láctea, la cual se cree, se originó en los países del Cáucaso hace unos 2000 años, ésta es sometida a fermentación tanto láctica como alcohólica, contiene bajo porcentaje de alcohol, naturalmente carbonatada con un sabor ligeramente ácido, a levadura y de consistencia cremosa. Cuando esta bebida se agita produce espuma y efervescencia (36).

La fermentación tiene inicio con la adición de los gránulos de kéfir a leche fresca, éstos son insolubles en agua, con un tamaño y forma irregular, variando de 0,3-3,5 centímetros de

diámetro (36). La biomasa del grano de kéfir al fermentar aumenta el 5-7%, y si son conservados cuidadosamente pueden mantener su actividad durante años (37).

Los granos de kéfir están compuestos de microorganismos inmovilizados en polisacáridos y proteínas de la matriz, donde varias especies de bacterias y levaduras conviven en asociación simbiótica (*Farnworth y Mainville, 2008 ; Garrote et al, 2010*). En este ecosistema hay una población de microorganismos relativamente estable, que interactúa con otros miembros de la comunidad. Esta población ofrece la síntesis de metabolitos bioactivos, que son esenciales para el crecimiento del grano y la inhibición de microorganismos, tales como los patógenos alimentarios y contaminantes (*Garrote et al, 2010*).

Levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas son generalmente encontradas como constituyentes del kéfir. Los géneros encontrados con mayor frecuencia son; *Saccharomyces, Candida, kluyveromyces, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc y Acetobacter*. (38)

Las bacterias ácido lácticas son las principales responsables de la conversión de la lactosa presente en la leche, en ácido láctico, lo que provoca la disminución del pH en este medio (37). Es sabido que muchos productos metabólicos de las bacterias ácido lácticas tienen un gran poder de inhibición sobre bacterias patógenas. Esta actividad antagónica puede implicar diferentes mecanismos, tales como la competición por nutrientes disponibles y producción de metabolitos inhibitorios (peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos, diacetil y bacteriocinas) (39).

Por otra parte la levadura fermentadoras de lactosa producen etanol y CO2 (37).

Tabla N°3: Bacterias encontradas en granos de kéfir y fermentado de kéfir

Lactobacilli	
<i>Lactobacillus kéfir</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus viridescens</i>
Lactococci	
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	
<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>	
Streptococci	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Enterococci	
<i>Enterococcus durans</i>	
Leuconostocs	
<i>Leuconostoc sp.</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

Bacterias ácido acéticas	
<i>Acetobacter sp.</i>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	
Otras bacterias	
<i>Bacillus sp</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: Farnworth E. Kefir: a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Food*, 2005, 2:1-17.

Tabla N° 4: Levaduras encontradas en granos de kéfir y fermentado de kéfir.

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Saccharomyces turicensis</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida valida 6</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Pichia fermentans</i>

Fuente: Farnworth E. Kefir: a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Food*, 2005, 2:1-17.

Tipos de producción del kéfir

Existen tres formas principales de producción de kéfir, el proceso artesanal casero, el proceso comercial mediante el método de Rusia y el método comercial usando cultivos puros.

La producción artesanal consiste en la inoculación de la leche con una cantidad variable de granos los cuales fermentan durante un período comprendido entre 18 a 24 horas a 20-25°C, al final del proceso de fermentación los granos se tamizan y se pueden utilizar para una nueva fermentación, mientras que la bebida kéfir se almacena a 4°C lista para el consumo. La agitación durante la fermentación influye en la composición microbiana del kéfir, favoreciendo el desarrollo de lactococos homofermentativos y levaduras.

El segundo método, conocido como el “método de Rusia”, permite la producción de kéfir en una escala más grande, y utiliza un método de fermentación en serie, desde el precolado resultante de la primera fermentación de los granos (38).

Existen diferentes métodos industriales de la producción de kéfir, pero todos se basan en el mismo principio. La leche se inocula con cultivos puros aislados de granos de kéfir, en donde la fase de maduración se puede realizar o no, que consiste en mantener el kéfir a 8-10°C durante un máximo de 24 horas para permitir el crecimiento de microorganismos, principalmente de levaduras contribuyendo al sabor específico del producto. Aunque la bebida comercial está disponible en muchos países, no siempre están presente las propiedades tradicionales del kéfir (38).

Kéfir y su efecto antimicrobiano

Santos et al, 2003, observó el comportamiento antagonista de lactobacilos aislados de granos de kéfir contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Shigella flexneri* y *Y. enterocolitica*. *Silva et al, 2009*, observó la inhibición de *Candida albicans*, *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* por kéfir cultivado en azúcar morena. Por otro lado, *Chifiriuc et al, 2011*, observó que toda la leche fermentada con granos de kéfir tenía actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. Enteritidis*, pero no inhibió *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Todos estos estudios indican que la actividad antimicrobiana del kéfir se asocia con la producción de ácidos orgánicos, péptidos (bacteriocinas), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, el etanol y diacetilo. Estos compuestos pueden tener efectos beneficiosos no sólo en la reducción de patógenos transmitidos por los alimentos y bacterias de deterioro durante la producción y el almacenamiento de bebidas, sino también en el tratamiento y prevención de infecciones vaginales y gastroenteritis (*Farnworth, 2005 ; Sarkar, 2007*) (8).

Golowczyc et al, 2004, establecieron que los sobrenadantes de lactobacilos homofermentativos ejercerían una acción bactericida sobre *Salmonella* lo cual estaría asociado al bajo pH de los mismos (36). Por otra parte *Kakisu et al, 2004*, hallaron que el kéfir inhibiría la germinación de endosporas de *Bacillus cereus* y, si los gránulos de kéfir se hallarían contaminados con endosporas de este patógeno, paulatinamente irían perdiendo dicha contaminación hasta desaparecer a través de los sucesivos repiques en leche no contaminada (36).

5. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) corresponden a un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, no patógenas, no formadoras de esporas, no toxigénicas, fermentadoras, caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos. El grupo se subdivide en bacterias homo y heterofermentativas en función de los productos de su metabolismo. Las homofermentativas se caracterizan porque el único producto de la fermentación de los carbohidratos es el ácido láctico. Las segundas pueden originar, además, dióxido de carbono, etanol o ácido acético (40).

Las Bacterias ácido lácticas son los microorganismos más frecuentemente utilizados como probióticos, debido a su inhibición competitiva de la colonización de bacterias patógenas en el tracto intestinal y sus efectos beneficiosos sobre el sistema inmune intestinal y eje intestino-cerebro (29); destacando los géneros de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y dentro del género *Streptococcus* la especie *S. thermophilus* (41).

Se han utilizado en el procesamiento de alimentos debido a que generan cambios característicos de sabor y por su capacidad de disminuir el pH y producir agentes antimicrobianos (38). Permiten conservar alimentos gracias a la producción de sustancias inhibidoras como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas inhibidoras y bacteriocinas (41). Las bacteriocinas son sustancias proteicas antimicrobianas secretadas por algunas bacterias contra los microorganismos, principalmente contra bacterias Gram positivas (42). En contraste con las bacterias Gram-positivas, las bacterias Gram-negativas, tales como *E. coli* O157: H7, poseen dos membranas, una interna y otra externa, lo cual

impide que las bacteriocinas hidrófobas puedan penetrar (34). *Helander et al, 1997*, sugirió que el ácido láctico o cítrico en combinación con bacteriocinas, sería ideal para la inhibición de bacterias Gram-negativas en los alimentos (34).

6. Conducta de consumo de kéfir en poblaciones afectadas con diarrea

La diarrea se define como el aumento en el contenido líquido, frecuencia y volumen de las heces producto de una alteración en el transporte de agua y electrolitos en el intestino (43).

Puede ser provocada por diferentes causas, entre ellas por una alteración en la secreción activa de electrolitos Na⁺ y Cl⁻ que conducen el agua desde la sangre hacia la luz intestinal en gran cantidad, superando la capacidad de absorción del colon, ocasionando así la diarrea.

Vibrio cholerae y *Escherichia Coli* Enterotoxigénica son las principales bacterias que producen diarrea, de tipo secretora, a través de la liberación de enterotoxinas, las cuales, al unirse a la membrana celular aumentan la concentración de AMPc intracelular generando un movimiento de agua y electrolitos desde la mucosa hacia el lumen (44).

Lo más utilizado para el tratamiento de diarrea son fármacos derivados del grupo de los opiáceos como la codeína, loperamida y difenoxilato, los cuales ejercen su efecto a nivel central y en el tubo digestivo, en este último, producen la contracción de las fibras musculares aumentando la presión intraluminal, inhiben la liberación de acetilcolina y favorecen la absorción de agua e iones (45). Su efecto inhibitor de la motilidad radica en el incremento del tono muscular en el antro y píloro gástrico provocando un retraso del vaciamiento gástrico. Por otra parte, disminuyen la actividad peristáltica al aumentar el tono y las contracciones no propulsivas en intestino delgado y colon de tal manera que se

impida el avance de la masa fecal (45). Por otro lado, los probióticos actualmente se utilizan como soporte en el tratamiento de la diarrea aguda. Se han descrito mecanismos que explicarían la acción de los probióticos en los episodios diarreicos, como la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactante), la disminución del pH intestinal por el estímulo de organismos productores de ácido láctico, los cuales favorecen el crecimiento de organismos más beneficiosos y por la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producto de la fermentación colónica de la fibra dietética. Adicionalmente, se han descrito probióticos que aumentan la resistencia a la colonización al competir con los microorganismos patógenos por los sitios de unión en el endotelio intestinal y por los nutrientes que requieren éstos para su desarrollo y supervivencia. Es importante destacar que muchos modelos experimentales han revelado que los probióticos difieren en sus mecanismos de acción, no solamente entre especies de probióticos, sino además entre cepas (46).

A partir de toda la información recopilada, acerca de los beneficios de este producto natural, decidimos aplicar una encuesta para obtener información acerca del nivel de conocimiento que la población adulta tiene de esta bebida láctea fermentada, y si la consume ante episodios de diarrea.

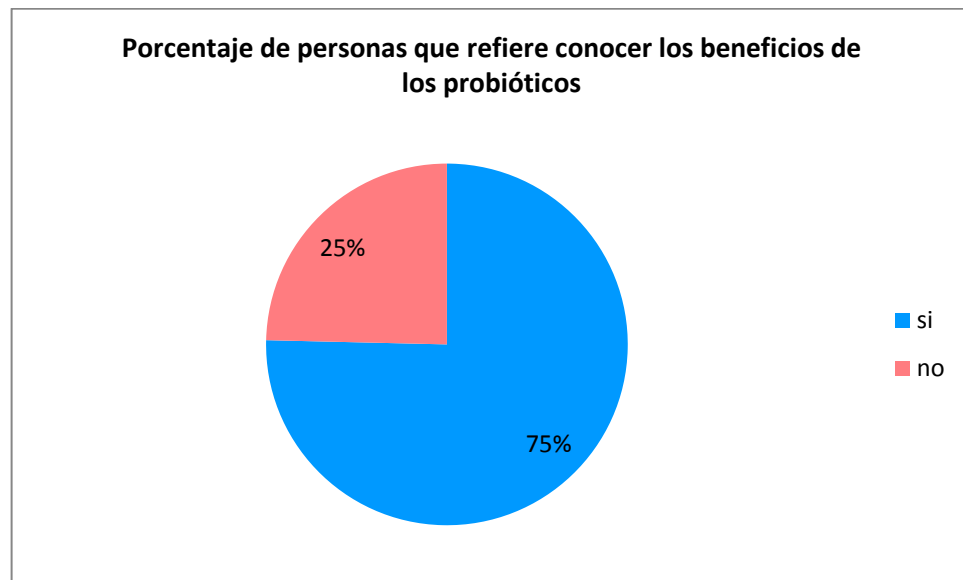
El instrumento aplicado consta de 8 preguntas cerradas, con un tiempo de aplicación estimado de 10-15 minutos por persona.

En primera instancia, se aplicó a un “n piloto” de 20 personas para comprobar si las preguntas eran entendidas por las personas y para corregir eventuales errores ya sea de

redacción o de conceptos. Finalmente, se aplicó a un total de 268 personas, durante el período de un mes captando a sujetos por medio de redes sociales las cuales contestaron la encuesta vía internet, y personas captadas en lugares de concurrencia pública, siendo en este caso contestada de forma escrita.

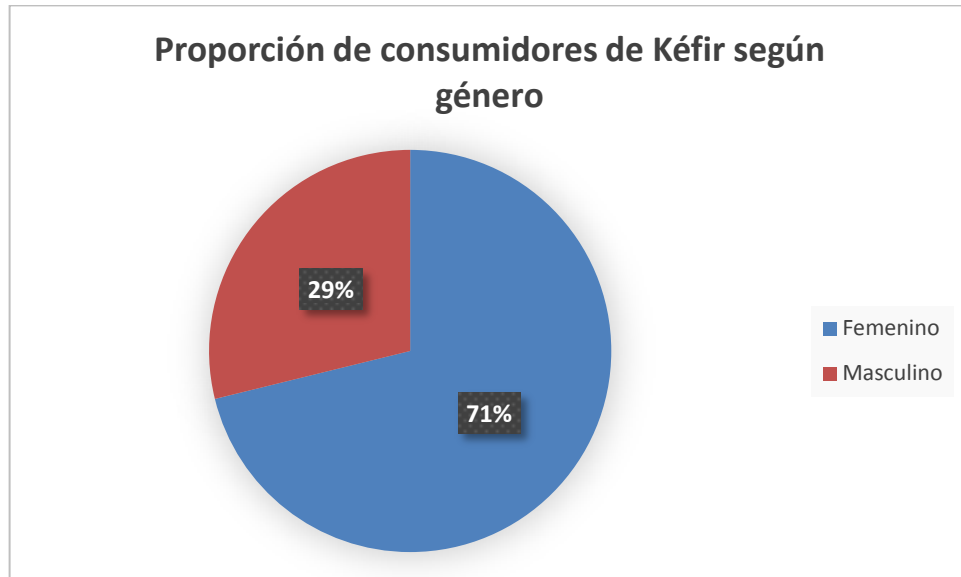
Los resultados más relevantes se muestran a continuación.

Grafica N°1: Porcentaje de personas que refiere conocer los beneficios de los probióticos



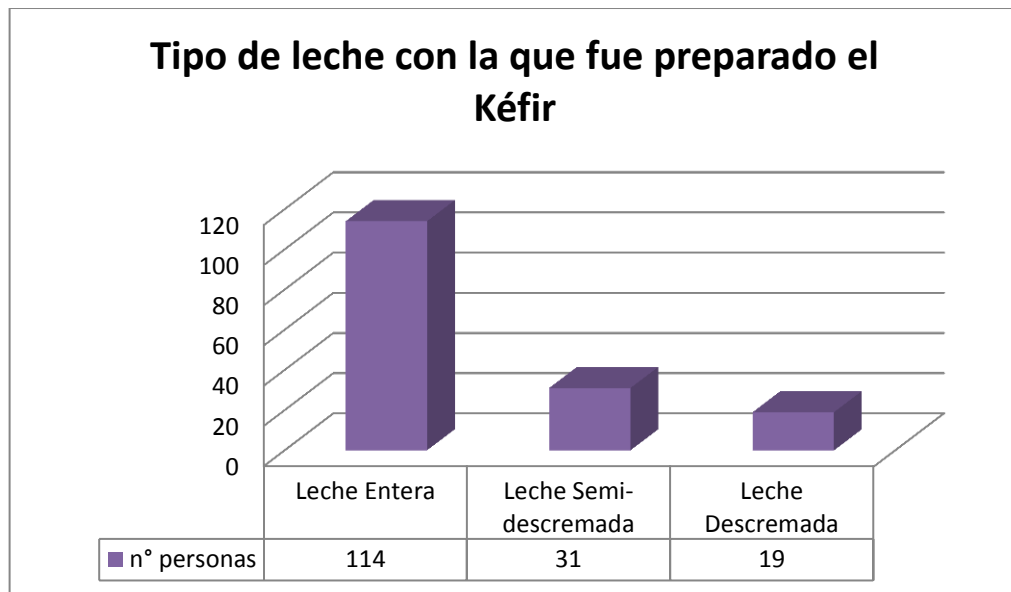
Del total de encuestados el 75% (n=202), dice conocer los beneficios de los productos probióticos, mientras que un 25% (n=66) refiere no tener conocimiento alguno de los beneficios propios de los probióticos.

Grafica N°2: Proporción de consumidores de kéfir según género



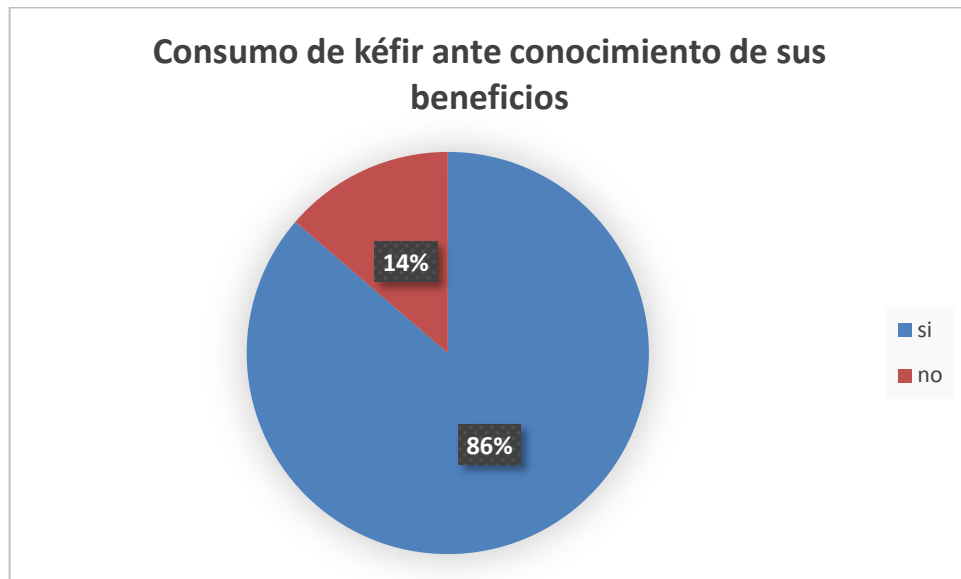
Un 71% (n=116) de los encuestados que refirió haber consumido kéfir en algún momento son de sexo femenino, mientras que un 29% (n=47) son de sexo masculino.

Gráfica N° 3: Tipo de leche con la que fue preparado el kéfir



Un 11,6% (n=19) de la población encuestada refiere haber consumido kéfir preparado con leche descremada. La mayoría de la población encuestada (69,5%, n=114) dice preparar el kéfir con leche entera. Cabe destacar que también hubo personas que consumieron kéfir preparado con leche semidescremada (18,9%, n=31).

Gráfica N°4: Consumo de kéfir ante conocimiento de sus beneficios



Un 86% de la población a la cual se le aplicó la encuesta, que conoce el kéfir como probiótico, manifestó que lo consumiría luego de conocer sus propiedades y beneficios para la salud, y un 14% de ellos no lo consumiría.

Tabla n° 5: Consumo de kéfir ante eventos de diarrea según rango etario.

Rango etario	n total (%)	Presencia de diarrea n=78	%	Consumo de kéfir durante episodios de diarrea	%	Alivio de síntomas de diarrea	%
18-25 años	108 (40)	28	26	7	25	4	57
26-37 años	101 (38)	35	35	5	14	3	60
38-45 años	24 (9)	8	33	2	25	0	0
46-57 años	24 (9)	6	25	1	17	1	100
58-65 años	11 (4)	1	9	0	0	0	0

De la presente tabla, podemos decir que del total de la población encuestada, un 29% (n=78) refirió haber presentado diarrea en el último tiempo, en donde destaca un 35% (n=35) del grupo de 26-35 años y un 33% (n=9) de 38-45 años. El grupo de 58-65 años, que representa el 4% de la población total, fue el que tuvo el menor porcentaje con sólo un 9% (n=1) de presencia de diarrea. Con respecto al consumo de kéfir durante estos episodios de diarrea, el 19% de las personas que presentaron diarrea lo consumen, destacando el grupo etario de 38-45 años y de 18-25 años con un 25% cada uno.

Al preguntar si sintieron algún alivio de síntomas de diarrea al consumir kéfir, el 19% respondió afirmativamente, un 60% de la población entre 26-37 años y 57% del grupo de 18-25 años respondieron de igual forma.

A partir de la información recabada a través de la encuesta, se planteó la interrogante acerca del efecto de este probiótico casero sobre *Escherichia coli*.

Hipótesis

El ácido láctico, producido por las bacterias presentes en el fermentado casero de kéfir, afecta el crecimiento del microorganismo entérico modelo *Escherichia coli* DH5 α , lo que puede explicar el uso de este probiótico como un tratamiento alternativo para la diarrea.

Objetivo general

Determinar el efecto que ejerce un preparado casero de kéfir, sobre la proliferación de bacterias entéricas utilizando como modelo de estudio a *Escherichia coli* DH5 α .

Objetivos específicos

- Identificar el efecto que ejerce el pH del medio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α .
- Cuantificar el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α expuesta a condiciones de acidez dadas por el fermentado de kéfir y el ácido láctico.

Metodología

1. EXPERIMENTACIÓN: Estudio del efecto de fermentado de kéfir casero sobre *Escherichia coli* en condiciones de laboratorio

Estudio de tipo experimental en donde se trabajó con un cultivo bacteriano modelo *Escherichia coli* DH5 α y una bebida probiótica láctea fermentada (kéfir).

Las variables a analizar son: pH según tiempo de incubación del preparado de kéfir y crecimiento de colonias de *Escherichia coli* DH5 α .

1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

1.2.1 FERMENTADO DE KEFIR

Se utilizó kéfir de gránulo pequeño proveniente del Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, el cual fue mezclado con leche 26% materia grasa para obtener un fermentado de kéfir.

Se dispuso de cinco muestras del fermentado, en cada una de ellas se midió el pH con pH metro “Oakton” al tiempo cero (t0), 12 hrs. (t12), 24 hrs. (t24), 48 hrs. (t48) y 72 hrs. (t72) de fermentación. Ésto nos permitió obtener muestras con distintas concentraciones de ácido láctico, ya que a mayor tiempo de fermentación y menor pH mayor es la producción de este ácido orgánico.

1.2.2 CRECIMIENTO DE BACTERIA *Escherichia coli* DH5 α

Preparación de glicerol

A partir de un glicerol almacenado a -20°C se sembró *Escherichia coli* DH5 α en caldo Luria Bertani, compuesto de 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de bacto triptona y 10 g/l de Cloruro de sodio, a 37°C bajo agitación continua (200 rpm) overnight, para la obtención de células puras y aisladas.

Luego, bajo esterilidad se realizó el preinóculo de *Escherichia coli* DH5 α en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con caldo Luria Bertani, el cual se llevó a 37°C overnight hasta alcanzar fase exponencial (0,5 u.a). Cada etapa de crecimiento fue monitoreada midiendo la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro.

1.2.3 PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE KÉFIR Y *Escherichia coli* DH5 α

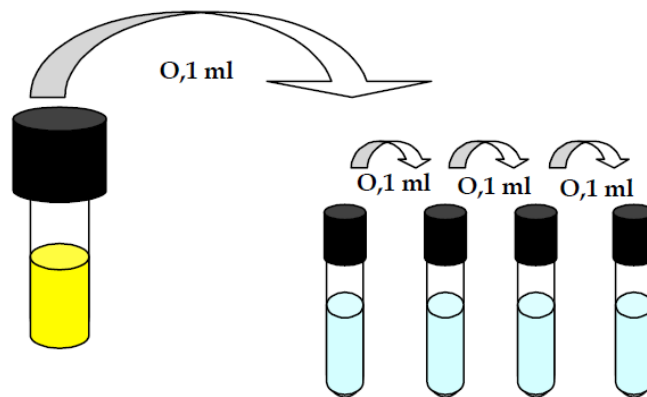
Bajo condiciones de esterilidad se tomó una alícuota de 100 uL de cada cultivo de *Escherichia coli* DH5 α en fase exponencial y 1 mL de cada muestra de fermentado de kéfir, y se llevó a 37°C durante 2 horas. Se determinó este tiempo para asemejarse al período en el que el kéfir y las bacterias interactúan durante el proceso digestivo.

Las muestras quedaron de la siguiente forma:

Muestra 1	Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α * + Fermentado kéfir (t0)
Muestra 2	Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α * + Fermentado kéfir (t12)
Muestra 3	Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α * + Fermentado kéfir (t24)
Muestra 4	Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α * + Fermentado kéfir (t48)
Muestra 5	Bacterias <i>E. coli</i> DH5 α * + Fermentado kéfir (t72)

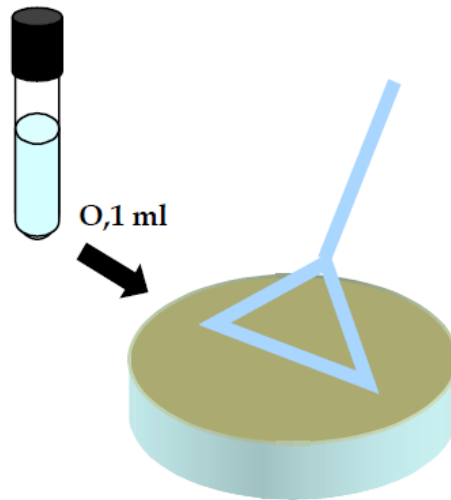
**Muestra de *E. coli* DH5 α cultivada overnight a 37°C hasta alcanzar fase exponencial.*

Para evitar una sobrepoblación de bacterias *Escherichia coli* DH5 α , cada muestra fue diluida en solución salina (0,85%) de la siguiente manera:



Ejemplo de dilución Muestra 1: Bacterias *E. coli* DH5 α + Fermentado de Kéfir (t0).

Finalmente, del último tubo Eppendorf (más diluido) se tomó una alícuota de 100 μ l, la cual, bajo esterilidad se inoculó en un medio de cultivo Agar MacConkey.



1.2.4 INOCULACIÓN DE MUESTRA EN AGAR MacConkey

El agar MacConkey es un medio de cultivo que favorece el crecimiento de bacterias Gram Negativas. Está constituido de sales biliares y cristal violeta, que inhiben a bacterias Gram Positivas y algunas Gram Negativas que no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Contiene lactosa como único carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que varían en el tono rojo dependiendo de la cantidad de ácido producido (47).

Cada muestra fue inoculada en este medio durante 24 hrs. a 37°C.

1.2.5 MUESTRA EXPERIMENTAL CON ÁCIDO LÁCTICO

Se trabajó con 4 muestras a distintos pH (pH 7, pH 6, pH 5, pH 4,5), las que se obtuvieron al valorar con Ácido láctico para obtener el pH deseado.

Con el objetivo de determinar el efecto del ácido láctico sobre el modelo bacteriano utilizado, en cada muestra se inoculó 100 ul de *Escherichia coli* DH5 α y se incubó durante 2 horas a 37°C. Luego se procedió a diluir la mezcla, y se realizó un triplicado con la muestra más concentrada (D1) y la más diluida (D3) en Agar MacConkey.

1.3 ANÁLISIS DE DATOS

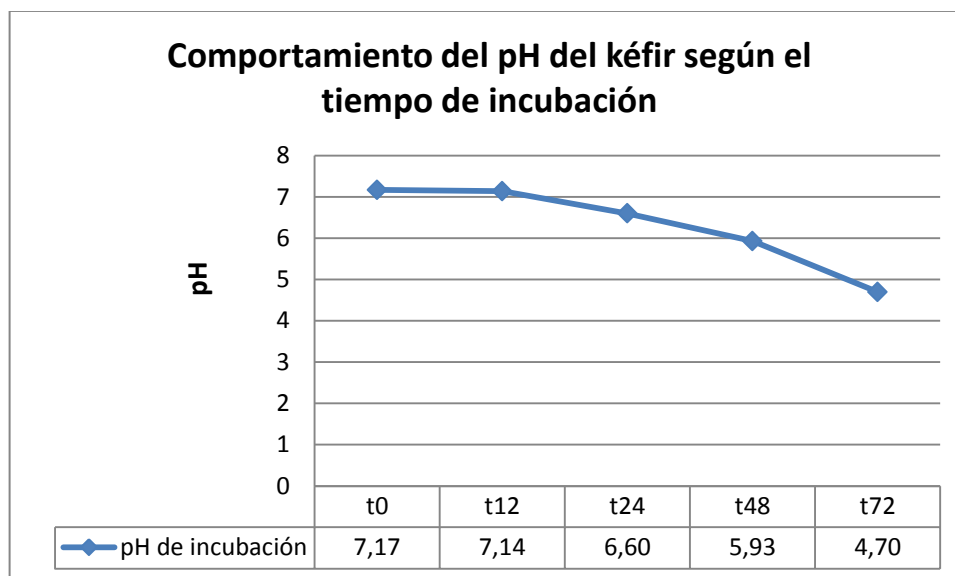
Los datos fueron registrados, tabulados y graficados, utilizando el programa Microsoft Office Excel 2010. Con respecto al conteo de UFC, se aplicó logaritmo como tratamiento matemático de estos resultados para diferenciarlos y hacerlos estadísticamente más manejables, además se calculó y graficó las respectivas desviaciones estándar de cada muestra, y se aplicó la prueba estadística de Chi^2 para determinar la relación entre las dos variables estudiadas.

Resultados

1. EFECTO DEL KEFIR CASERO SOBRE *Escherichia coli* DH5 α

A continuación se presentan los resultados de la experimentación realizada en laboratorio

Grafica N°1: Comportamiento del pH del kéfir según el tiempo de incubación.



La gráfica N°1 nos muestra la variación del pH que presenta el preparado de kéfir durante las horas de incubación que van desde el tiempo cero (t0) hasta 72 horas después de iniciada la fermentación del preparado probiótico.

La disminución del pH se hace notar a las 24 horas de iniciada la fermentación, en donde el pH disminuye de 7,17 (pH inicial) a 6,60 (pH t24).

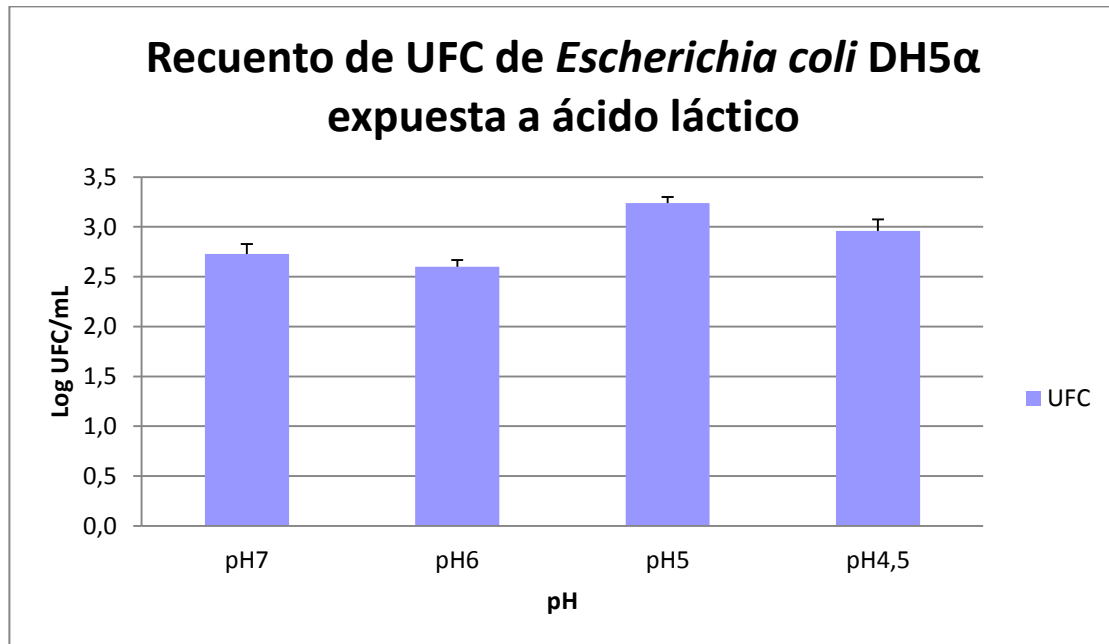
Finalmente a las 72 horas de iniciada la fermentación, el preparado de kéfir presenta una acidez importante con un pH 4,7, lo que indica presencia de ácido láctico en el preparado probiótico.

En la figura N°1 se muestra el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli* DH5 α en agar MacConkey, las cuales fueron contadas manualmente, como indica la imagen, dando los resultados expuestos en la Grafica N°2 y la Grafica N°3.

Figura N°1: Conteo de UFC de *Escherichia coli* DH5 α en Agar MacConkey.

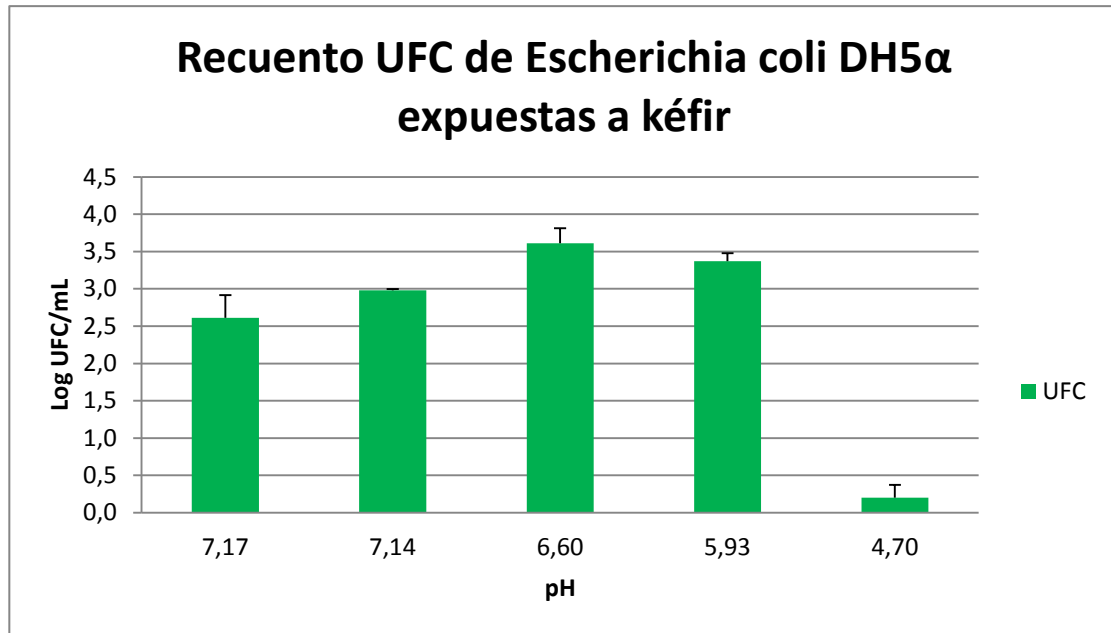


Grafica N°2: Recuento de UFC de *Escherichia coli* DH5α expuesta a ácido láctico



En la gráfica N°2, se puede observar el crecimiento de *Escherichia coli* DH5α medido en UFC (unidades formadoras de colonias). A un pH 5 se puede observar el mayor crecimiento de *Escherichia coli* DH5α con un promedio de log 3,2 UFC (1734 UFC) y una desviación estándar de 0,06. En el medio con mayor acidez (pH 4,5) el crecimiento de *Escherichia coli* DH5α es similar al crecimiento de la muestra con pH 5, con un promedio de log 3,0 UFC (913 UFC) con una desviación estándar de 0,12, por lo que no hubo inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* expuesta a ácido láctico.

Grafica N°3: Recuento de UFC de *Escherichia coli* DH5 α expuestas a kéfir



En la siguiente gráfica se observa el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α medido en UFC (unidades formadoras de colonias) formadas luego de ser expuestas a distintos pH del preparado de kéfir. Luego de 24 horas de fermentación se obtuvo un pH 6,6 en el cual se produjo la mayor cantidad de crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α con un promedio de log 3.6 UFC (4419 UFC) y una desviación estándar de 0,2.

En el tiempo 72, en donde el pH es de 4,7, se observa un crecimiento casi nulo de *Escherichia coli* DH5 α con un promedio de log 0,2 (1,3 UFC) con una desviación estándar de 0,17, lo que indica una acidez importante en el medio de cultivo dado por la presencia de ácido láctico.

Se aplicó la prueba estadística de χ^2 , tanto para la experimentación con ácido láctico y con kéfir, para determinar la dependencia de las variables estudiadas, planteándose las siguientes hipótesis:

Experimentación con ácido láctico

Hipótesis nula (H₀): El crecimiento de UFC de *Escherichia coli* DH5 α es independiente de la acidez presente en la experimentación con ácido láctico.

Hipótesis alternativa (H₁): El crecimiento de UFC de *Escherichia coli* DH5 α es dependiente de la acidez presente en la experimentación con ácido láctico.

$$X^2 \text{ calculado} > X^2 \text{ tabulado} \rightarrow H_0 \text{ se rechaza}$$

$$X^2 \text{ calculado} = 0,00444961$$

$$X^2 \text{ tabulado} = 0,1$$

A través de la prueba de χ^2 se sostiene, con un nivel de confianza de 95%, que el crecimiento de UFC, expuesto a ácido láctico, es independiente de las condiciones evaluadas en el presente estudio, por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

Experimentación con kéfir

Hipótesis nula (H₀): El crecimiento de UFC de *Escherichia coli* DH5α es independiente de la acidez presente en la experimentación con kéfir.

Hipótesis alternativa (H₁): El crecimiento de UFC de *Escherichia coli* DH5α es dependiente de la acidez presente en la experimentación con kéfir.

$$X^2 \text{ calculado} > X^2 \text{ tabulado} \rightarrow H_0 \text{ se rechaza}$$

$$X^2 \text{ calculado} = 0,31345677$$

$$X^2 \text{ tabulado} = 0,1$$

A través de la prueba de χ^2 se sostiene, con un nivel de confianza de 95%, que el crecimiento de UFC de *Escherichia coli* DH5α, expuesto a kéfir, es dependiente del pH, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza.

Discusión

Con respecto a los resultados obtenidos en la experimentación en laboratorio, el pH del preparado de kéfir disminuyó considerablemente a las 72 horas de inicio de la fermentación, registrándose un pH de 4,7 en este tiempo de incubación. Esto difiere con estudios como el realizado por *Garrote et al, 2000*, en donde se registró un pH de 3,67 a las 48 horas de iniciada la fermentación (48). Cabe destacar que en este estudio, los granos de kéfir fueron inoculados en leche libre de grasa o descremada a diferencia de nuestro estudio, en donde la leche utilizada para la fermentación del kéfir contenía un 26% de materia grasa. Por otra parte *Dobson et al, 2011*, observó un cambio nulo en el pH del preparado de kéfir durante las primeras 18 horas, seguido de una disminución aguda del pH a 4,5 dentro de las 24 horas de fermentación (49), a diferencia de lo obtenido en nuestro estudio, ya que a las 24 horas de iniciada la incubación del kéfir se registró un pH de 6.6 (en este estudio también se utilizó leche descremada). Otra investigación que muestra una disminución del pH del preparado de kéfir en menos tiempo que en la nuestra, es el de *Leite et al, 2013*, en donde al igual que los estudios anteriores se utilizó leche descremada para la inoculación del granulo de kéfir, obteniéndose como resultado un pH de 5,64 y 4,85 en los tiempos 12 h y 24 h respectivamente (50). El uso de leche descremada, y en consecuencia el menor contenido de materia grasa en la fermentación del kéfir, podría influir en el gran descenso del pH en comparación a lo registrado en nuestra investigación. Otra de las posibles causas de este comportamiento del pH, es que a diferencia de las investigaciones citadas, el pH inicial, es decir, el pH a tiempo cero (t_0) de la fermentación del kéfir en nuestro estudio fue de 7,17, en comparación a 6,5 registrado en los estudios mencionados

(Garrote *et al*, 2000, pH t0= 6,6; Dobson *et al*, 2011, pH t0= 6,5; Leite *et al*, 2013, pH t0= 6,55). Este pH (6,5) fue registrado en nuestra investigación a las 24 horas de iniciada la fermentación del kéfir.

Se ha atribuido al kéfir muchos beneficios sobre la salud, destacando su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. Van Wyk, 2001, realizó pruebas in vitro con extractos libres de células de kéfir, en donde el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes* fueron inhibidos (51). En nuestra investigación el crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α se vio afectado ante las condiciones dadas por el preparado de kéfir, evidenciándose en el tiempo 72, en donde el pH del medio tuvo un registro de 4,7, dando como resultado el crecimiento de sólo 1,3 UFC, a diferencia de las 4419 UFC observadas en el tiempo 24 (pH 6,6). Garrote G. *et al*, 2000, observo la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* con un preparado de kéfir con valores de pH entre 3,32 y 4,25 (48). La causa exacta de la inhibición del crecimiento de bacterias por medio del kéfir es desconocida, pero puede ser por la acción antagonista de las Bacterias Acido Lácticas que son capaces de prevenir la adherencia, el establecimiento, la replicación, y/o la acción patógena de ciertos enteropatógenos. El mecanismo no está claro, pero puede incluir la actividad del ácido láctico y ácidos volátiles, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo y bacteriocinas (52).

Se ha reportado que la sinergia entre el ácido láctico y el ácido acético inhiben a *Escherichia coli* (Garrote *et al*, 2000). El ácido láctico ha sido descrito como un ácido más fuerte que el ácido acético (Piard y Desmazeaud, 1991). En nuestra muestra control fue

utilizado el ácido láctico a distintas concentraciones, generando distintos pH que no provocaron la inhibición de *Escherichia coli*. A diferencia de lo registrado por *Garrote et al, 2000*, en donde para evaluar si los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético) eran los únicos agentes responsables de los efectos de inhibición, realizó la suplementación de estos ácidos en leche, tanto en conjunto como por separado, teniendo como resultado la inhibición de *Escherichia coli* solo cuando la leche fue suplementada con ambo ácidos y cuando fue suplementada con ácido láctico, no así con ácido acético. *Schilling, 2008*, por otra parte, utilizó ácido acético para describir el rango de pH en donde se inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, obteniendo como resultado el no crecimiento de *Escherichia coli* en el rango de pH 4-5. (35)

La inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α , solo se observó ante el preparado de kéfir, no así ante el ácido láctico, lo que se puede atribuir a la acción de otros agentes que provocan este efecto como la presencia de otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, el acetaldehído, diacetilo y bacteriocinas (52), éstas últimas son proteínas o péptidos bacterianos con actividad bacteriostática frente a especies estrechamente relacionadas genéticamente (*Schillinger, 1996*)(53). De esta manera, podemos decir que nuestra hipótesis no fue comprobada, ya que el ácido láctico producido por el preparado de kéfir no es el único agente causal de la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α . Además, se ha descrito que *Escherichia coli* es tolerante a pH bajos si se cultiva en fase exponencial en pH ligeramente ácido, o si ha entrado en fase estacionaria (*Arnold y Kaspar, 1995*) (54). En nuestra investigación *Escherichia coli* DH5 α fue sembrada en fase exponencial lo que explicaría el crecimiento de ésta ante las

condiciones de acidez existentes. Junto a esto, mecanismos como el aumento de la capacidad de tamponamiento dentro de la bacteria y el aumento de la producción de proteínas de membrana (*Booth, 1985*) (55) indican que el pH por sí solo no tiene efecto inhibitorio del crecimiento de *Escherichia coli*.

Conclusión

La experimentación en laboratorio nos permitió evidenciar in situ la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* DH5 α por el preparado de kéfir, lo cual no podemos atribuir a la acción del ácido láctico por sí solo, ya que en las muestras controles de ácido orgánico no se observó la inhibición del crecimiento del modelo bacteriano utilizado, por lo que nuestra hipótesis no fue comprobada. Esto tiene un respaldo bibliográfico extenso, basado principalmente en que la inhibición del crecimiento de este patógeno se debe a otros agentes producido por las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el kéfir, además del ácido láctico, como el ácido acético, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo y bacteriocinas que en su conjunto ejercen el efecto inhibitorio. Cabe recalcar que *Escherichia coli* DH5 α , es una bacteria no patógena, lo que significa que puede reaccionar de manera distinta a las cepas patógenas de *Escherichia coli*. Por lo tanto, para poder verificar si las bacterias que forman parte del kéfir ejercen un efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* patógena, es necesario realizar otros estudios, basados en una metodología similar a la realizada en la presente trabajo.

Referencias

- (1) Pandey V, Berwal V, Solanki N, Singh Mali N. Probiotics: Healthy bugs and nourishing elements of diet. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2015, 5: 81–87.
- (2) Rivero M, Santamaría A, Rodríguez-Palmero M. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles, *Nutrición Hospitalaria*, 2005, 20:135-146.
- (3) Sheikh S, Pallagatti S, Kalucha A, Kaur H. Probiotics. Going on the natural way. *J Clin Exp Dent*, 2011, 3:150-154.
- (4) De Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2008, 111:1-66.
- (5) Li M, Liang P, Li Z, Wang L, Zhang G, Gao H, Wen S, Tang L. Fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation have comparable effects on the re-establishment of mucosal barrier function in mice with intestinal dysbiosis. *Front Microbiol*, 2015, 692.
- (6) Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian Journal of Microbiology*, 2010, 2:59-72.
- (7) Schwartz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*, 2003, 54:393-399.

- (8) Machado de Oliviera A, Lemos M, Silva R, Soares A, Trajano J, Flosi V. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, *Braz J Microbiol*, 2013, 44:341–349.
- (9) Sekirov I, Brett Finlay B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *The Journal of Physiology*, 2009, 587:4159-4167.
- (10) Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiology*, 2008, 16:107-114.
- (11) Malago J, Koninkx J, Marinsek-Logan R. Probiotic Bacteria and Enteric Infections: The Intestinal Microbiota and Probiotics. Springer Science Business Media B.V, 2011.
- (12) Holdeman L, Good I, Moore W. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *American Society of Microbiology*, 1976, 31:359-375.
- (13) Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology. 1995.
- (14) Conway T, Cohen P. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. American Society for Microbiology Press, 2015, 3:10.
- (15) Romero R. *Microbiología y Parasitología Humana: Escherichia*. 2007; pp 753.
- (16) Palmer C, Bik E, Digiulio D, Relman D, Brown P. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 2007, 5:177.

- (17) Foster J. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2:898–907.
- (18) Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman M, Carey K. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun*. 1983, 39:686–703.
- (19) Moller A, Leatham M, Conway T, Nuijten P, de Haan L, Krogfelt K, Cohen P. An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse fecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine. *Infect Immun*, 2003, 71:2142–2152.
- (20) Bergstrom K, Sham H, Zarepour M, Vallance B. Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. *Cell Microbiol* Jan, 2012, 14:475–484.
- (21) Rang C, Licht T, Midtvedt T, Conway P, Chao L, Krogfelt K, Cohen P, Molin S. Estimation of growth rates of *Escherichia coli* BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by in situ rRNA hybridization. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6:434–436.
- (22) Nataro J, Kaper J. Diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998, 11:142–201.
- (23) Guignot J, Segura A, Tran Van Nhieu G. The Serine Protease EspC from Enteropathogenic *Escherichia coli* Regulates Pore Formation and Cytotoxicity Mediated by the Type III Secretion System. *PLoS Pathog*, 2015, 11.

- (24) Vidal J, Canizález A, Gutierrez J, Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Mex*, 2007, 49:376-386
- (25) Ozaki C, Silveira C, Andrade F, Nepomuceno R, Silva A, Munhoz D, Yamamoto B, Luz D, Abreu P, Horton D, Elias W, Ramos O, Piazza R. Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. *PLoS One*, 2015, 10.
- (26) Leonard S, Lacher D, Lampel K. Draft Genome Sequences of the Enteroinvasive *Escherichia coli* Strains M4163 and 4608-58. *Genome Announc*, 2015, 3:1395-1400.
- (27) Alsharif G, Ahmad S, Islam S, Shah R, Busby S, Krachler A. Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112: 5503–5508.
- (28) McNeilly T, Mitchell M, Corbishley A, Nath M, Simmonds H, McAteer S, Mahajan A, Low J, Smith D, Huntley J, Gally D. Optimizing the Protection of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7 Colonization through Immunization with Different Combinations of H7 Flagellin, Tir, Intimin-531 or EspA. *PLoS One*, 2015, 10.
- (29) Arenas M, Martinez Y, Torre A. Clinical Implications of Enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr Gastroenterol Rep*, 2012, 14: 386–394.
- (30) Mansan R, Leite A, Gimenes L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 22.

- (31) Jung S, Smith C, Lee K, Hong M, Kweon D, Stephanopoulos G, Jin Y. Restoration of Growth Phenotypes of *Escherichia coli* DH5 α in Minimal Media through Reversal of a Point Mutation in *purB*. *American Society for Microbiology*, 2010, 76: 6307-6309
- (32) Van der Waaij D, Berghuis-de Vries J, Lekkerkerk L. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hyg*, 1971, 69:405-411.
- (33) Stecher B, Barthel M, Schlumberger M, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, Hardt W. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol*, 2008, 10:1166-1180.
- (34) Työppönen S, Petaja E, Mattila-Sandholm T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83:233-244.
- (35) Schilling A. The Effect of pH on the Bacterium *E. coli*. *California State Science Fair*, 2008.
- (36) Anselmo R, Viora S, Ojeda P, Lausada L. Efecto Antagónico del Kéfir sobre Endosporas y Células Vegetativas de *Bacillus Cereus* y *Clostridium Perfringens*, *Información tecnológica*, 2010, 21: 131-138.
- (37) Lucke F. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci*, 2000, 56:105–115.
- (38) Angulo L, Lopez E, Lema C. Microflora present in kefir grain of the Galician Region. *J. Dairy Res*, 1993, 60:263-267.

- (39) Schillinger U. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biotechnology and Food Safety*, 1990, 55-79.
- (40) Sánchez L, Tromps J. Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim.* 2014, 36.
- (41) Hernández D, Cardell D, Zárata V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99:77-84.
- (42) Verluyten J, Messens W, De Vuys L. The Curing Agent Sodium Nitrite, Used in the Production of Fermented Sausages, Is Less Inhibiting to the Bacteriocin-Producing Meat Starter Culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under Anaerobic Conditions. *American Society for Microbiology*, 2003, 69:3833-3839.
- (43) Gil A. Tratado de Nutrición. En: Nutrición en síndromes diarreicos y malabsorción del adulto. Ed Panamericana. 2010; pp 827-829, 844-845.
- (44) Organización Panamericana de la Salud. Patogenia de la diarrea infecciosa. En: Manual de tratamiento de la diarrea. 1987; pp 42-43.
- (45) Velázquez, Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro M, Protolés A. Farmacología Básica y Clínica. En: Farmacología de la motilidad gastrointestinal, del vómito y de la enfermedad inflamatoria intestinal. Ed. Panamericana. 2008, pp 589.

- (46) Rivero M, Santamaría A, Rodríguez-Palmero M. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutrición Hospitalaria*, 2005, 20: 135-146.
- (47) Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. *Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio*. 2005; pp 134-448.
- (48) Garrote G, Abraham A, De Antoni G. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal and Food Protection*, 2000, 63:364-369.
- (49) Dobson A, O'Sullivan O, Cotter P, Ross P, Hill C. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and associated kefir grain. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 320: 56-62.
- (50) Leite A, Leite D, Del Aguila E, Alvares T, Peixoto R, Miguel M, Silva J, Paschoalin V. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96: 4149-4159.
- (51) Van Wyk J, The inhibitory activity and sensory properties of Kefir, targeting the low-income African consumer market. Master thesis, University of Stellenbosch, 2001.
- (52) Powell J. Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains, Master thesis. University of Stellenbosch, 2006.
- (53) Schillinger U, Holzapfel W. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33:3-5

- (54) Arnold, K. Kaspar, C. Starvation- and stationaryphase-induced acid tolerance in *E. coli* O157 : H7. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:2037–2039.
- (55) Booth R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev*, 1985, 49:359–378.

Anexo

Encuesta para participación en Tesis: **ÁCIDO LÁCTICO**
PROVENIENTE DEL KÉFIR Y SU EFECTO SOBRE
Escherichia coli DH5a

Requisitos: Ser mayor de 18 años.

Región:

Marque con un X sólo una alternativa correcta

Rango de edad:

18-25 años	26-37 años	38-45 años	46-57 años	58-65 años
------------	------------	------------	------------	------------

Sexo: Femenino Masculino

1.- ¿Conoce o ha escuchado acerca de los probióticos?

Sí No

Si la respuesta es Sí:

a) ¿Cuáles?

Kéfir (yogurt de pajaritos)

Yogurt con probióticos (Activia, Next, Surlat)

Bebida láctea (Uno al día, Chamyto, Vilib)

Todos

Ninguno

Otros

b) ¿De qué forma pudo conocerlos?

Medios de Comunicación (TV, Internet, Diario)

Artículos o Revistas Científicas

Por medio de un familiar, vecino o amigo(a).

Otro

2.- ¿Sabe cuáles son los beneficios para la salud?

Sí No

3.- ¿Conoce la forma de preparación del kéfir (yogurt de pajaritos)?

Sí No

4.- Anteriormente ¿Ha tenido la posibilidad de probarlo?

Sí No

Si la respuesta es Sí:

a) ¿Con qué tipo de leche fue preparado?

Leche Entera

Leche Semi-descremada

Leche Descremada

b) ¿Fue agradable para Ud. el sabor?

Sí No

¿De qué forma lo consumió?

Solo

Con yogurt

Con fruta

5.- ¿Consumiría Kéfir (yogurt de pajaritos) luego de conocer las propiedades y beneficios para la salud?

Sí No

Si la respuesta es No:

No me interesa

Me han dicho hace mal

No sé cómo conseguirlo o cómo se prepara

6.- En el último tiempo ¿usted ha sufrido eventos de diarrea?

Sí No

Si la respuesta es Sí: ¿Con qué frecuencia?

1 vez a la semana

1 vez cada 15 días

1 vez al mes

1 vez cada 3 meses

7.- ¿Consumes kéfir durante estos eventos de diarrea?

Sí No

8.- ¿Sintió alivio de los síntomas durante estos episodios de diarrea?

Sí No