

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA DE DONANTES Y LAS HECES DE SUS LACTANTES RESIDENTES EN ANTIOQUIA, COLOMBIA^a

CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOTA OF DONOR BREAST MILK AND THE FECES OF THEIR INFANTS RESIDING IN ANTIOQUIA, COLOMBIA

YARA N. CORREA^b, SAMANTHA ROLDÁN^b, OLGA I. MONTOYA^{c*}, PAULA A. MORENO^d,
NELLY P. CASTILLEJO^e, ANDREA VELÁZQUEZ-RESTREPO^d, ALEJANDRA
VARGAS-BUITRAGO^f

Recibido 26-10-2021, aceptado 08-08-2022, versión final 08-09-2022
Artículo Investigación

RESUMEN: La leche materna humana es un alimento integral para los infantes en los primeros meses de vida y por diferentes factores como la morbilidad de la madre, que afecta la lactancia, se recurre a los Bancos de Leche. Este fluido biológico contiene una microbiota con propiedades probióticas, que ayuda al metabolismo de los nutrientes y la maduración del sistema inmunológico principalmente, beneficios que se ven reflejados en la salud del humano hasta la adultez. Se planteó caracterizar la microbiota de la leche humana de donantes y las heces de sus lactantes, provenientes del Banco de leche del Hospital General de Medellín y de mujeres residentes en Antioquia, recolectando un total de 134 muestras. Por identificación morfológica bioquímica o análisis molecular, se encontraron microorganismos con propiedades probióticas principalmente, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, y de alterantes, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y las levaduras. Se comprobó que la leche materna contiene una microbiota nativa que incluye microorganismos comensales y otros con propiedades probióticas, que la presencia de estos últimos se disminuye después de la pasteurización y es necesario implementar pruebas adicionales para la identificación de Bacterias Ácido Lácticas y evitar un descarte innecesario de la leche.

PALABRAS CLAVE: Leche materna; banco de leche humana; propiedades probióticas.

^aYara N. Correa, Y. N., Roldán, S., Olga I. Montoya, O. I., Paula A. Moreno, P. A., Castillejo, N. P., Restrepo, A. V. & Buitrago, A. V. (2023). Caracterización de la microbiota de la leche materna de donantes y las heces de sus lactantes residentes en Antioquia, Colombia. *Rev. Fac. Cienc.*, 12 (1), 6-23. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v12n1.99209>

^bMagíster en Ciencias-Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín, Colombia.

^cProfesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia, Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias.

^{*}Autor para correspondencia: oimontoy@unal.edu.co

^dIngeniera Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

^eAssociated Professor, Universidad CES. Certified in selection and quality control of human milk by the Colombian Ministry of Health. Coordinator of the Milk Bank of HGM

^fEstudiante Ingeniería Química, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

ABSTRACT: Human breast milk is an integral food for infants in the first months of life and due to different factors, such as maternal morbimortality, which affects lactation, Milk Banks are resorted to. This biological fluid contains a microbiota with probiotic properties, which helps the metabolism of nutrients and mainly the maturation of the immune system, benefits that are reflected in human health until adulthood. The objective was to characterize the microbiota of human milk from donors and the feces of their infants, from the milk bank of the General Hospital of Medellin and from women residing in Antioquia, collecting a total of 134 samples. By morphology, biochemical identification or molecular analysis, microorganisms with probiotic properties were found, mainly *Lactiplantibacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*, and alterants like, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and yeasts. It was found that breast milk contains an native microbiota that includes commensal microorganisms and others with probiotic properties, that the presence of the latter decreases after pasteurization and that it is necessary to implement additional tests for the identification of Lactic Acid Bacteria to avoid unnecessary discarding of milk.

KEYWORDS: Breast milk; human milk bank; probiotic properties.

1. INTRODUCCIÓN

La leche materna es un alimento complejo, con una diversidad de nutrientes y de elementos que favorecen el desarrollo del sistema inmunológico y gastrointestinal, incluyendo una microbiota intestinal nativa proveniente de la madre gestante por la ruta enteromamaria a la glándula mamaria (Fernández *et al.*, 2013). Según el estadío de la lactancia, la leche materna se clasifica en calostro, transición y madura (Léké *et al.*, 2019). En 800 mL de leche materna se pueden encontrar un promedio de 107 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) /mL de microorganismos viables (Brandtzaeg, 2010); entre estos están los géneros: *Staphylococcus*, *Weissella*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, y *Bifidobacterium*, que a la vez serán integrantes de la microbiota intestinal de los lactantes (Osorio & Umbarila, 2015).

Los recién nacidos amamantados tienen menor riesgo a las infecciones microbianas, como la Enteritis Necrotizante (NE) y enfermedades relacionadas con la inmunidad, los beneficios que esta aporta permanecen hasta la edad adulta (Patel & Underwood, 2018), sin embargo, hay factores que pueden poner en riesgo la lactancia como la morbimortalidad materna. Por lo tanto, se crearon los Bancos de Leche Humana (BLH) en Latinoamérica, iniciando en Brasil en 1943. Estos se encargan de recolectar, procesar, congelar y distribuir la leche a los lactantes que la necesitan, implementando un proceso de selección y capacitación de las donantes para una correcta extracción y recolección (De la Academia, 2010).

En Antioquia, Colombia, desde mayo del 2013 hasta la fecha, funciona con certificación el Banco del Hospital General de Medellín, que beneficia el 95.21 % de la población infantil antioqueña y el 4.79 % de otros departamentos. Este se regula con las normas y las especificaciones técnicas, dictadas por la Red Nacional de bancos de leche humana de Brasil (Guimaraes *et al.*, 2004).

En el BLH se realizan análisis fisicoquímicos, como la medición de la acidez titulable expresada en grados Dornic ($^{\circ}\text{D}$), siendo caracterizada la leche como ácida cuando presenta un recuento mayor a 105 UFC/mL, la determinación del crematocrito, el proceso de pasteurización, además se realizan las determinaciones microbiológicas (Guimaraes *et al.*, 2004). Cuando las muestras no cumplen ambos parámetros de calidad se descartan.

En la leche materna se encuentran microorganismos viables que pueden ser comensales, alterantes o con propiedades probióticas. Dentro de estos últimos están las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), las cuales hacen parte de la microbiota nativa de la leche materna y son esenciales para el buen desarrollo del sistema inmunológico, las BAL deben cumplir con las pruebas respectivas para confirmar las propiedades, según la FAO en 2002 (De la Torre, 2014; De la Academia, 2010).

Se propuso como objetivo del trabajo caracterizar la microbiota de la leche pre y post-pasteurizada de las donantes del banco del Hospital General de Medellín (HGM) y de mujeres residentes en el área metropolitana del Valle de Aburrá, además de la microbiota de las heces de sus lactantes.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recolección de las muestras de la leche humana y de las heces de lactante

Se recolectaron en frascos estériles las 40 muestras de leche de donantes del Banco del HGM según los cuatro pasos del proceso para aceptación y descarte de leche: 10 de leche ácida mayor a 8°Dornic ($LP > 8^{\circ}\text{D}$), 10 de leche no ácida menor a 8° Dornic ($LP < 8^{\circ}\text{D}$), 10 de leche pasteurizada (LP) y 10 de leche post-pasteurizada positiva en el caldo Brila ($LPBVGC+$). También, se recolectó tras la higiene del pezón las 27 muestras de leche cruda (LC) de mujeres externas al hospital. Además, se recogieron de la superficie del pañal las 67 muestras de las heces de cada lactante con hisopo en tubos con peptona al 1 % p/v (peso/volumen) (Jiménez *et al.*, 2008). Se transportaron a 4°C al laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia (UN), sede Medellín. Se determinó el pH para las muestras de leche, el valor del crematocrito y acidez Dornic fue proporcionado por el banco. Hubo consentimiento tanto de las madres como de los directivos y del Comité de Investigación del HGM con registro 01_05052015.

2.2. Aislamiento, recuento y morfología de los tipos de microorganismos

A todas las muestras se le realizó diluciones seriadas (101, 102, 103) en peptona al 0.1 % p/v y se caracterizó por morfología macroscópica en los medios de cultivo específicos. Sólo las leches ácidas se procesaron en dos tiempos, a las cero horas y tras refrigeración a las 24 horas para diferenciar resistencia a temperatura y competencias entre grupos microbianos.

Microorganismos comensales: Se hizo el recuento de los microorganismos mesófilos aerobios según la NTC 4519, en el Agar Plate Count (PC-Merck). Los Coliformes Totales y Fecales según el Decreto 616 de 2006, por el método del Número Más Probable (NMP), en caldo Fluorocult LMX.

Microorganismos alterantes: Se determinó *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva según el Decreto 616 de 2006, en el Agar Baird Parker (BK-Merck). Las levaduras se detectaron en el Agar Extracto de Levadura, Glucosa y Cloranfenicol (YGC-Merck). Y para las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se utilizó el Agar Cristal-Violeta Rojo Neutro Bilis Dextrose (VRBD-Merck), y en Agar Eosin Azul de Metileno (EMB-Merck) para confirmar la presencia de *Escherichia coli*.

Microorganismos con propiedades probióticas: Se aisló en agar MRS (de MAN, ROGOSA y SHARPE) con azul de anilina para lactobacilos (Merck), en agar M17 para lactococos y enterococos (Merck), y en Agar Propionato TOS (Merck) con suplemento mupirocina (MUP 100 g/L) para bifidobacterias (Vlková *et al.*, 2009).

Posteriormente se analizaron las frecuencias de UFC/mL y se purificaron los aislados de interés (Talebi, 2017).

2.3. Caracterización de morfología microscópica de los tipos de microorganismos

Tinción de Gram: A cada aislado bacteriano se les clasificó microscópicamente con la coloración de Gram se denominan como: Bacilos Gram Negativos (BGN) y Cocos Gram Positivos (CGP) (Smith & Hussey, 2019).

Prueba de la Catalasa: A cada aislado bacteriano se les diferenció bioquímicamente con peróxido de hidrógeno al 10 % v/v (Tankeshwar, 2013).

Prueba de hemólisis: A cada aislado bacteriano en el Agar Sangre al 5 % v/v (AS) se le identificó su capacidad de lisar o no los glóbulos rojos humanos (Casarotti *et al.*, 2017).

Prueba de la Oxidasa: A cada aislado bacteriano se les diferenció bioquímicamente según la producción del citocromo oxidasa al utilizar el oxígeno molecular en contacto con el reactivo de amino-N-dimetil-anilina (Tankeshwar, 2022).

Tubo germinal: A cada aislado de levadura se clasificó en suero bovino, se incubó a 35°C /2 h y se observó presencia o ausencia de hifas al microscopio (100 X) (Al-Said *et al.*, 2022).

2.4. Pruebas de propiedades probióticas

Los aislados de BAL con características macro y microscópicas de interés ajustados a 0.5 McFarland, se incubaron en Caldo MRS a 37°C /18 h, se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos, y se separó el extracto del pellet para realizar las siguientes propiedades probióticas (PP) (Moreno *et al.*, 2011).

Las PP primarias seleccionaron los aislados de BAL entre la capacidad de resistir a la acidez (un pH 2.0 con HCl 1M) y a jugos digestivos (sales biliares al 0.3% p/v), y se hizo recuento en agar MRS de microorganismos viables (UFC/mL) (FAO/WHO, 2002).

Las PP secundarias evaluaron la capacidad de inhibición de los aislados probióticos frente a patógenos, por el método turbidimétrico de microdilución en caldo. El extracto de las bacterias se adiciona en placas multipozo con los patógenos *Salmonella sp.*, *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*. La placa se incubó durante 20 horas con agitación en un lector de placas de ELISA acoplado al espectrofotómetro (MultiskanGo, Thermo), con lectura de absorbancia a una D.O de 600 nm cada hora (Barreras *et al.*, 2012; Wiegand *et al.*, 2008).

2.5. Caracterización bioquímica

Se utilizó la metodología del kit de API 50CHL, el 20E y el 20NE system (BioMérieux, 2018) para la identificación de las BAL, de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y de los Bacilos gram negativo (BGN) no enterobacterias, respectivamente. Y finalmente se realizó la identificación de las cepas de BAL con el software APIWEB.

3. RESULTADOS

3.1. Parámetros poblacionales y su relación con la microbiota

El promedio de edad de las mujeres donantes fue de 24 años y del lactante fue de tres meses. En las muestras hubo cuatro de calostros, 13 de leche de transición y 50 de leche madura. Además, hubo 67 de heces de lactante.

3.2. Características fisicoquímicas de las muestras de leche analizadas

En la Tabla 1 se reporta el promedio del crematocrito, de acidez Dornic y de pH de cada uno de los tipos de leche.

3.3. Distribución de la microbiota en todos los tipos de muestras de leche analizadas

Se observó un recuento promedio de 3×102 UFC/mL de comensales, con mayor frecuencia en leche cruda y ácida, leche que fue descartada, frente a la leche pasteurizada y post-pasteurizada, leche que fue acepta-

Tabla 1: Resultados de los promedios de los parámetros fisicoquímicos en todas las muestras de la leche. $LP > 8^{\circ}D$ (Leche ácida con valor mayor a 8° Dornic); $LP < 8^{\circ}D$ (Leche pre-pasteurizada no ácida con valor menor a 8° Dornic); LP (Leche pasteurizada); LP BVGC+ (Leche positiva en caldo BRILA), Kcal/L (kilocaloría por litro). Fuente: Elaboración propia

Tipo de leche	Crematocrito (Kcal/L)	Ph 0h	pH 24h	Promedio pH	Promedio acidez Dornic
$LP > 8^{\circ}D$	N/A	6,47	6,34	6,19	10
$LP < 8^{\circ}D$	630	N/A	6,65	6,65	4,2
LP	630	N/A	7,13	7,13	4,2
LPBVGC(+)	596	N/A	6,95	6,95	3,5
Leche cruda	N/A	x	N/A	x	N/A
Promedio total	617	N/A	N/A	6,77	5,47

da. Además, los coliformes totales fueron más frecuentes en la leche ácida, y se confirmó la presencia de coliformes fecales en tres muestras. En la Figura 1, las frecuencias relativas en la leche pre-pasteurizada no ácida de estafilococos, enterobacterias y las levaduras del 80 %, 90 % y 30 %, mientras en las de leche pasteurizada las frecuencias fueron del 10 %, del 70 % y del 10 %, respectivamente. Para la leche ácida a las cero horas fue del 70 % de estafilococos, del 90 % de enterobacterias y del 40 % de levaduras, mientras que, a las 24 horas, las frecuencias disminuyen al 50 %, del 70 % y del 30 %, respectivamente.

En la leche pre-pasteurizada no ácida, hubo recuento de 3×102 UFC/mL, las frecuencias fueron del 40 %, del 80 % y del 70 % para enterococos, lactobacilos y bifidobacterias, mientras en las de leche pasteurizada, se obtuvo el mismo recuento de UFC/mL, pero su frecuencia fue del 10 %, del 30 % y del 20 % respectivamente. Y en la leche ácida a las cero horas, las frecuencias fueron del 50 %, del 70 % y del 60 % para lactobacilos, enterococos y bifidobacterias, se obtuvieron los mismos resultados a las 24 horas. En la leche post-pasteurizada, sólo en el 20 % de ellas se contaron entre 8 y 50 UFC/mL de lactobacilos, enterococos y bifidobacterias. En la Tabla 2 se resume la distribución de los microorganismos comensales, los alterantes y los probióticos, en los pasos del procesamiento de la leche en el BLH, además la microbiota de probióticos en las heces. En dos muestras de las leches ácidas $> 8^{\circ}D$ y en una de leche post-pasteurizada se pudo identificar *E. coli*.

3.4. Caracterización morfológica y bioquímica

Las muestras pre y post-pasteurizadas $LP62 > 8D$, $LP63 > 8D$ y $LP93BVGC(+)$ correspondieron a *Escherichia coli*, aisladas de agar EMB con colonias verde metálico y al Gram se observaron bacilos Gram negativos, hemolíticos, catalasa positiva y oxidasa negativa. Las muestras post-pasteurizadas $LP94BVGC(+)$ y $LP93BVGC(+)$ se identificaron como *Pasteurella trehalosi* (Con porcentajes de identidad del 92,9 % y del 96,3 % respectivamente), cuyas colonias eran grandes, rugosas y con borde irregular, y al Gram se observaron bacilos Gram negativos, no hemolíticas y catalasa y oxidasa positivas. En la Tabla están reportados los resultados de las pruebas de caracterización bioquímica con el kit API 20NE para *Pasteurella trehalosi*. También se halló en leche cruda, CGP agrupados en racimo (*S. aureus*), BGN pequeños (*Shigella spp*, *E.*

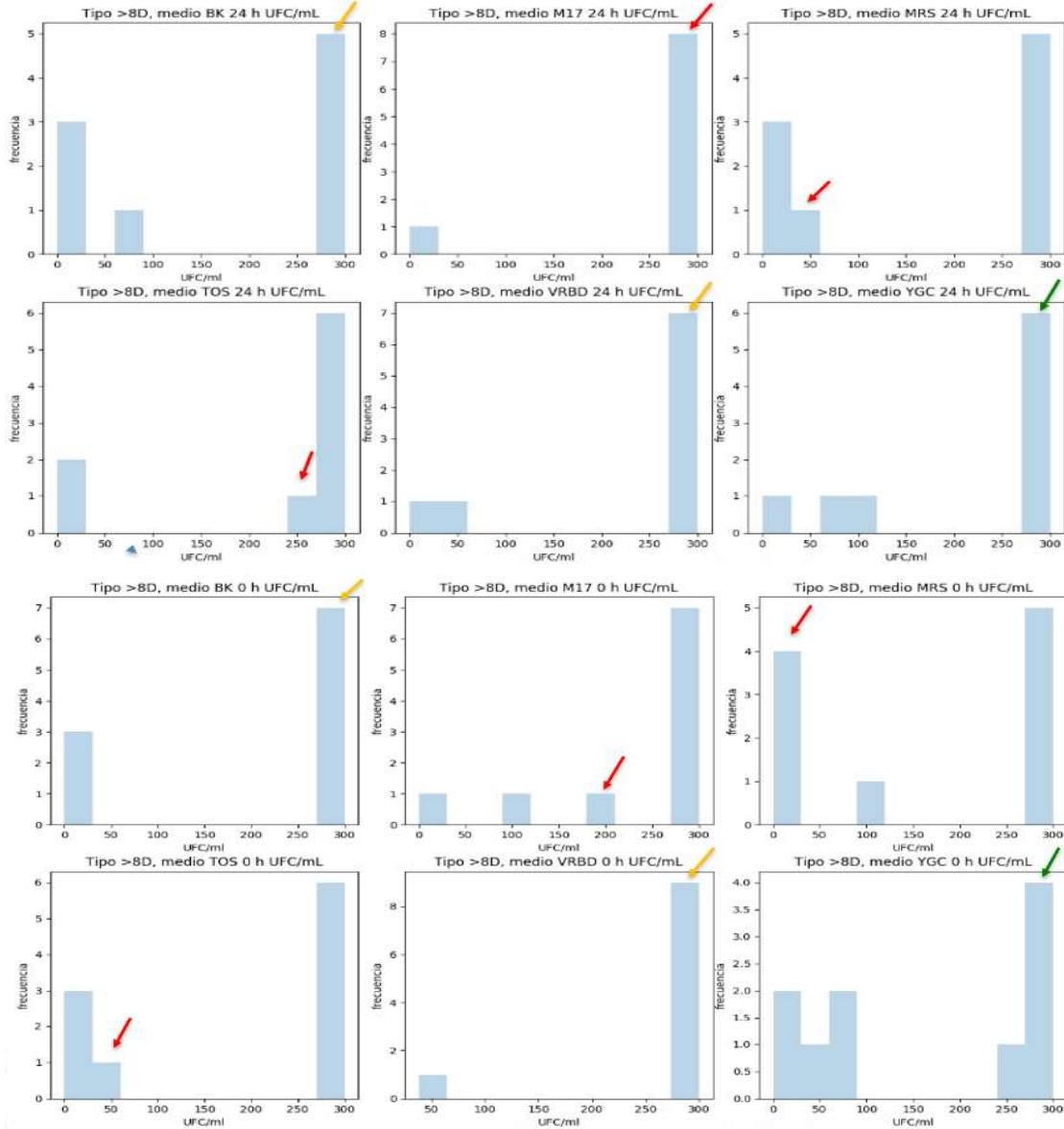


Figura 1: Frecuencia absoluta de la microbiota probiótica y alterantes para las muestras de leche ácida al inicio (0h) y luego de refrigeración (24h) con un pH 6.3. Agar Baird Parker (BK), Agar M17, Agar MRS (de MAN, ROGOSA y SHARPE), Agar Propionato TOS con mupirocina, Agar Crystal-violet neutral-red bile dextrose (VRBD), Agar yeast extract glucose chloramphenicol (YGC). Las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) se señalan con flechas amarillas para Estafilococos y Enterobacteriaceae, verdes para Levaduras y rojas para Bacterias Ácido lácticas. Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 2: Recopilación de frecuencias relativas de todos los tipos de los microorganismos encontrados en todas las muestras analizadas. LC (Leche materna cruda y calostro); *LA* > 8D (Leche ácida con valor mayor a 8° Dornic); *LP* < 8°D (Leche pre-pasteurizada no ácida con valor menor a 8° Dornic); BVGC+ (Leche positiva en caldo BRILA), H (Heces), No crecimiento (–), No aplica (NA); Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) Fuente: Elaboración propia

CEPAS (%) 3×10^2 (1×10^5 UFC/mL)	LC	<i>LP</i> > 8°D	<i>LP</i> < 8°D	LP	<i>LP</i>		Frecuencia relativa en probióticos	(AGAR M5)
					<i>B</i>	BVGC+		
Coliformes totales	3,0%	12,5%	17,5%	5,0%	5,0%	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i>	5,0%	6,0%	5,0%	-	-	NA	NA	NA
Otras	1,5%	7,5%	5,0%	-	5,0%	NA	NA	NA
<i>Enterobacteriaceae</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,4%	10,0%	2,5%	-	-	NA	NA	NA
Levaduras	7,5%	20,0%	17,5%	15,0%	5,0%	NA	NA	NA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3,0%	-	-	-	-	6,0%	17,6%	Homo láctico
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6,0%	7,5%	-	-	-	11,9%	44,1%	Hetero láctico
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1,5%	-	-	-	-	1,5%	5,9%	Hetero láctico
<i>Enterococcus faecium</i>	1,5%	2,5%	2,5%	5,0%	-	4,5%	23,5%	Hetero láctico
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	-	1,5%	2,9%	Hetero láctico
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	3,0%	5,9%	Hetero láctico

Tabla 3: Resultados de perfil bioquímico para *Pasteurella trehalosi* en API 20 NE. Fuente: Elaboración propia

	<i>LP94 BVGC</i> (+) <i>YGCa</i>	<i>LP93 BVGC</i> (+) <i>YGCa</i>		<i>LP94 BVGC</i> (+) <i>YGCa</i>	<i>LP93 BVGC</i> (+) <i>YGCa</i>
NO ₃ (Nitrato de Potasio)	+	+	MAN (D-Manitol)	–	–
TRP (L-Triptófano)	–	–	NAG (N-Acetyl glucosamina)	–	–
GLU (D-Glucosa)	–	–	MAL (D-Maltosa)	–	–
ADH (L-Arginina)	–	–	GNT (Gluconato potásico)	–	–
URE (Úrea)	–	–	CAP (Ácido cáprico)	–	–
ESC (Esculina citrato férrico)	–	±	ADI (Ácido adípico)	–	–
GEL (Gelatina)	–	±	MLT (Ácido málico)	–	–
PNPG (4-nitrofenil-βD-galactopiranósido)	+	±	CIT (Citrato trisódico)	–	–
GLU (D-Glucosa)	–	–	PAC (Ácido fenilacético)	–	–
ARA (L-Arabinosa)	–	–	OX (Oxidasa)	–	–
MNE (D-Manosa)	–	–			

coli, con porcentajes de identidad del 81,6 % y 92,9 %, respectivamente) y levaduras (*Candida albicans*), los cuales fueron catalasa positiva y hemolíticos, confirmados por crecimiento en agar BK, los kits API 20E, API 20C AUX y prueba de tubo germinal al microscopio, que demostró una prolongación de las hifas a partir de una levadura.

El perfil bioquímico de identificación por medio del API 50 CHL para *Levilactobacillus brevis* se reporta en la Tabla 4. Dentro de los microorganismos con propiedades probióticas se encuentran: cuatro aislados de *Enterococcus faecium*, dos provenientes de leches pasteurizadas, uno de leche pre y post-pasteurizada; un aislado de *Leuconostoc mesenteroides* de leche pasteurizada y dos aislados de heces de los lactantes, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Levilactobacillus brevis*, y de leche cruda se aisló *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*. En la Tabla 4 están reportados los resultados de la caracterización morfológica y algunas pruebas de propiedades probióticas para los microorganismos anteriores. Los resultados de las pruebas probióticas evidenciaron que todos aislados presentaron resistencia a pH ácido y a la concentración digestiva de sales biliares, de los cuales sólo dos cepas lograron inhibir el crecimiento de los tres patógenos. presentaron mejor potencial probiótico *Levilactobacillus brevis* aislado de heces y *Enterococcus faecium* aislado de leche post-pasteurizada.

Tabla 4: Resultados de perfil bioquímico para *Levilactobacillus brevis* en API 50CHL (API 50 CH - H74). Fuente: Elaboración propia

0	—	10-GAL (Galactosa)	+	20-MDM (Metil- αD-Manopiranósido)	—	30-MEL (D- Melobiosa)	+	40-TUR (D- Turanosa)	—
1-GLY (Glicerol)	—	11-GLU (Glucosa)	+	2121-MDG (Metil- αD-Glucopiranósido)	—	31-SAC (D- αSacarosa)	+	41-LYX (D- αLixosa)	—
2-ERY (Eritrol)	—	12-FRU α(Fructosa)	+	22-NAG (N- Acetilglucosamina)	+	32-TRE (D- Trehalosa)	+	42-TAG (D- Tagatosa)	+
3-DARA (D- Arabinosa)	—	13-MNE (Manosa)	+	23-AMY (Amigdalina)	±	33-INU (Inulina)	—	43-DFUC (D- Fucosa)	—
4-LARA (L- Arabinosa)	+	14-SBF (Sorbosa)	—	24-ARB (Arbutina)	+	34-MLZ (D- Melecitosa)	—	44-LFUC (L- Fucosa)	—
5-RIB Ribosa)	+	15-RHA (Ramnosa)	±	25-ECS (Eculina)	±	35-REF (D- Rafinosa)	—	45-DARL (D- Arabitol)	—
6-DXYL (D- Xilosa)	—	16-DUL (Dulcitol)	—	26-SAL (Salicina)	+	36-AMD (Almidón)	—	46-LARL (L- Arabitol)	—
7-LXYL (L- Xilosa)	—	17-INU (Inositol)	—	27-CEL (D- Celobiosa)	+	37-GLYG (Glicógeno)	—	47-GNT (Gluconato de potasio)	±
8-ADO (D- Adonitol)	—	18-MAN (Manitol)	+	2828-MAL (D- Maltosa)	+	38-XLT (Xilitol)	—	48-2KG (Potasio 2- ceto- gluconato)	—
9-MDX (Metil- βD-Xilopiranósido)	—	19-SOR (Sorbitol)	—	29-LAC (D-Lactosa)	+	39-GEN (Gentiobiosa)	+	49-5KG (Potasio 5- ceto- gluconato)	—

Tabla 5: Resultados de las pruebas probióticas. BGP: Bacilos gram positivos, CGP: Cocos gram positivos, R: Resistencia; NR; No resistencia; C: Crecimiento; NC: No crecimiento del patógeno, *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Levilactobacillus brevis* (*Lb. brevis*), *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lb. paracasei*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Fuente: Elaboración propia

Microorganismos	Características y pruebas probióticas de las cepas				
	Morfología de la colonia	Morfología en Tinción de Gram	pH ácido	Sales biliares a0.3 %	Antagonismo frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecium</i> LP70	Blanca, mediana y cremosa	CGP	R	R	NC, NC, C
<i>Enterococcus faecium</i> LP74	Blanca, mediana y cremosa	CGP	R	R	NC, C, NC
<i>Levilactobacillus brevis</i> H74	Azul oscuro, grande y brillante	BGP	R	R	NC, NC, NC
<i>Enterococcus faecium</i> LP76 < 8D	Blanca, mediana y cremosa	CGP	R	R	NC, NC, C
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LP84	Blanca, grande y cremosa	CGP	R	R	NC, C, C
<i>Enterococcus faecium</i> LP80 BV GC (+)	Blanca, mediana y cremosa	CGP	R	R	NC, NC, NC
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> H61	Azul medio, mediana y brillante	BGP	R	R	NC, C, C
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Blancas, rugosa, opacas	BGP	R	R	NC, NC, C
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	Blancas, cremosas, brillantes	BGP	R	R	C, NC, NC

4. DISCUSIÓN

En el Banco del HGM, se analizó en total siete Litros de leche materna con un promedio del crematocrito de 617 Kcal/L, indicando un valor calórico óptimo para la población infantil, coincidiendo con la investigación realizada por Peixoto *et al.* (2021) donde el 46.4% de las muestras se clasificaron como normocalóricas. Otros reportes realizados con leche materna sin pasteurizar han reportado valores del crematocrito por encima de 700 Kcal/L, clasificándose como hipercalórica, la cual es de suma importancia para los lactantes prematuros o con bajo peso al nacer, disminuyendo la mortalidad y morbilidad (Moreno *et al.*, 2018). Cabe resaltar que este parámetro depende de las características de la madre, el período de lactancia y el almacenamiento de la muestra (Oliveira *et al.*, 2022). Tras la pasteurización, se disminuyó este parámetro, igual a lo obtenido en el Instituto Fernandes Figueira (IFF) de Río de Janeiro, Brasil (Vieira *et al.*, 2004). También hubo una disminución en la acidez Dornic, debido a que el tratamiento térmico destruyó los microorganismos, lo cual concuerda con los hallazgos de Bhisikar *et al.* (2018).

El descarte de leche en el BLH-HGM se realizó por un recuento mayor a 1×105 UFC/mL de microorganismos viables en caldo Brila luego de 48h de incubación, pero en este estudio se encontró que un recuento de 3×103 UFC/mL de comensales, y una alta acidez, también fue debido a un recuento alto de BAL al desdoblar la lactosa (Zhao *et al.*, 2020). En las leches ácidas a las 0 y 24 h de refrigeración hubo una disminución del pH y de la carga de comensales y alterantes, mientras las BAL, siguieron creciendo lentamente, lo que supone un control de estas últimas frente a las primeras. Incluso un estudio en el Banco de Leche del Hospital 12 de octubre en Madrid, España realizado por Vázquez *et al.* (2013), indicó que no existe una fuerte relación entre la acidez Dornic y el crecimiento bacteriano, aunque sí tiene una alta sensibilidad a la acidez causada por alta carga de BGN. Por lo tanto, el análisis de la calidad microbiológica y la microbiota nativa de la leche, puede ocasionar que se presente una imprecisión en el criterio de selección fisicoquímico y microbiológico, por tanto, se debería verificar los tipo de microorganismos antes de su descarte.

En el análisis de frecuencia relativa de los microorganismos en todas las muestras, se observó que la leche cruda tenía una menor cantidad de comensales y alterantes, en comparación con la leche pre-pasteurizada del banco, demostrando la importancia de la asepsia en la toma de muestra. Los coliformes y las levaduras fueron los únicos termotolerantes y las enterobacterias, al estar en la leche pasteurizada, indicaron contaminación secundaria en el proceso, lo que sugirió medidas correctivas al banco. Autores han detectado microorganismos contaminantes en muestras de leche materna, Dewitte *et al.* (2015) reportaron la presencia de *Staphylococcus spp.* en leche pasteurizada recolectada en el banco de leche regional del área de Nord-Pas-de-Calais en Francia. De la población de probióticos, tanto *L. brevis* como *E. faecalis* solo fueron detectados en las heces, mientras *L. rhamnosus* y *L. paracasei*, se aislaron tanto de leche cruda como de heces. Finalmente, *L. plantarum* y *E. faecium*, estaban en leche ácida. Reportes previos han identificado estas mismas especies en muestras de leche materna (Murphy *et al.*, 2017; Luz *et al.*, 2021; Anjum *et al.*, 2022) y heces de lactantes (Zhang *et al.*, 2020; Romyasamit *et al.*, 2020; Tarrah *et al.*, 2019).

Pasteurella trehalosi identificada en muestras post-pasteurizadas ha sido aislada de pacientes con casos de endocarditis, septicemia e infecciones en heridas por Corbel (2012). Además, Pannaraj *et al.* (2017), logró identificar por métodos moleculares la presencia de especies de la familia *Pasteurellaceae* en leche cruda humana. Estos resultados sugieren que, pese a la pasteurización, ciertas bacterias soportan este tratamiento o son una contaminación post-pasteurización, lo que es un riesgo para la salud del lactante. Además, demuestra la necesidad de la prueba post-pasteurización en BVGC.

Los microorganismos identificados bioquímicamente fueron: *Lb. brevis* y *Lb. paracasei* aislados de las heces de los lactantes, *L. mesenteroides*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* provenientes de leche materna. Al ser sometidos a sales biliares y a pH ácido, todos presentaron resistencia a estas condiciones, similar a estudios previos de Fathia *et al.* (2014), quienes aislaron *Lb. brevis* de las heces de los lactantes, y fue resistente a jugos gástricos e inhibió el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Por otra parte, Muñoz *et al.* (2013), comprobaron la resistencia de *Lb. paracasei* aislado de heces de infantes alimentados solo con leche materna, bajo estas mismas condiciones y el antagonismo frente a *Listeria monocytogenes*. La resistencia de *L. mesenteroides* a estas condiciones también fue determinada por Serrano *et al.* (2016), quienes también lo aislaron de leche materna proveniente de un banco. Los resultados de resistencia a pH ácido y sales biliares de *Lacticaseibacillus rhamnosus* concuerdan con la investigación de Rajoka *et al.* (2017), para quienes también esta cepa sobrevivió bajo las mismas condiciones, este microorganismo, inhibió *Haemophilus influenzae* y *Salmonella sp*, *Streptococcus pneumoniae*, resultados similares a los reportados por el mismo autor, que encontró que este microorganismo inhibió a *Salmonella*. Para *Lactiplantibacillus plantarum*, los resultados de las pruebas probióticas, concuerdan con los resultados obtenidos por Emser *et al.* (2017) que comprobaron la resistencia a las sales biliares y a pH ácido. Este microorganismo inhibió *Salmonella sp*. y *E. coli*, en un estudio anterior realizado por Prabhurajeshwar & Chandrakanth (2017) evaluaron el antagonismo de varias especies de *Lactobacillus spp*. frente a diferentes patógenos, se verificó que estos lactobacilos eran capaces de inhibir a *E. coli*.

5. CONCLUSIONES

Se comprobó que la leche materna contiene una microbiota nativa que incluye microorganismos comensales y otros con propiedades probióticas, los cuales colonizan al infante principalmente en la lactancia.

En todos los tipos de las muestras de leche cruda, ácida y pre-pasteurizada no ácida, se obtuvo la frecuencia de microbiota alterante en un 50%, en cambio, en los tipos de la leche pasteurizada y post-pasteurizada sólo en el 20% de las muestras. Entre estos se encontraron principalmente, *S. aureus* con una frecuencia del 14%, *E. coli* con un 8% y las levaduras con un 28%. Con respecto a BAL se encontró, que los más frecuentes fueron *Lactiplantibacillus plantarum* con 26,5% y *Enterococcus faecium* con 17,6%.

En el banco del HGM, la pasteurización es vital para evitar la transmisión de los microorganismos potencialmente patógenos, pero ocasiona una disminución en la carga de probióticos, siendo primordial una adecuada manipulación de la leche en cada proceso del banco. Se observó que el parámetro de descarte de la acidez Dornic, no solo indica la presencia de patógenos, sino que también hay Bacterias Ácido Lácticas responsables de la acidificación de la leche. Por lo tanto, es necesario implementar pruebas más rápidas y que ayuden a identificar BAL, con el fin de evitar descartes de leches con probióticos que puede contribuir positivamente en el lactante.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo y colaboración de los directivos del HGM a las nutricionistas Nelly Castillejo y Neira, así como a todas las donantes del banco de leche. Especial agradecimiento a la supervisión general de la directora del laboratorio de microbiología de la UN Olga Inés Montoya Campuzano y al grupo de investigación en probióticos, además de la bacterióloga y auxiliares del laboratorio.

Contribución de los autores

Olga I. Montoya: Asesora, investigadora y revisora del artículo. Supervisor y guía en el desarrollo de procesos en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Nelly P. Castillejo: Asesora e investigadora en el procesamiento de las muestras del laboratorio del banco de leche del hospital General de Medellín.

Samantha Roldán, Paula A. Moreno, Andrea Velásquez-Restrepo y Alejandra Vargas-Buitrago: Estudiantes del pregrado de Ingeniería Biológica, realizaron ensayos de laboratorio, análisis de datos y edición del artículo de investigación.

Yara Correa: Líder investigativo en ensayos de laboratorio, procesamiento de datos y edición del artículo de investigación.

Referencias

- Al-Said, A. A., Salama, H. F. & El-Asuoty, M. S. (2022). Evaluation of the Potential Risks of Raw Milk Collected from Different Sources in El-Behaira Governorate. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 72(1).
- Anjum, J., Zaidi, A., Barrett, K. & Tariq, M. (2022). A potentially probiotic strain of *Enterococcus faecalis* from human milk that is avirulent, antibiotic sensitive, and nonbreaching of the gut barrier. *Archives of Microbiology*, 204(2), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-02754-8>

- Barreras, A., Tamayo, A. R., Villar, V. M. Del, & Valdez, J. Á. O. (2012). Evaluation of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* to the K9CATH peptide by the resazurin microtiter method and the reference broth microdilution method. *Scientific Journal of Veterinary Advances*, 1, 137–141.
- Bhisikar, S., Mondkar, J., Manerkar, S., Goel, S., DODsouza, D. & Baveja, S. (2018). Improving quality of banked milk: Utility of Dornic acid test. *The Indian Journal of Pediatrics*, 85(4), 272–275.
- Brandtzaeg, P. (2010). The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of pediatrics*, 156(2), S8–S15.
- Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Svetoslav, Todorov, D., Nero, L. A., Rahal, P., Lúcia, A., Penna, B., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P. & Penna, A. L. B. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 67(4), 289–301. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2>
- Corbel, M. (2012). *Yersinia, pasteurella and francisella*. In D. Greenwood, R. Slack, M. Barer & W. Irving, *Medical Microbiology* (18), 350–358. Churchill Livingstone Elsevier.
- De la Academia, C. D. P. ABM Protocolo Clínico Nro. 8: Almacenamiento de Leche Humana. Información para el Uso Casero en Bebés a Término (Protocolo Original Marzo 2004; Revisión Nro. 1 Marzo 2010).
- De la Torre, M. J. L. Lactancia materna. Asociación Española de Pediatría. Trabajo de investigación. 10 Oct. 2014. Documento PDF disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/lm.pdf>.
- Dewitte, C., Courdent, P., Charlet, C., Dumoulin, D., Courcol, R. & Pierrat, V. (2015). Contamination of human milk with aerobic flora: Evaluation of losses for a human milk bank. *Archives de Pediatrie*, 22(5), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2015.02.011>
- Emser, K., Barbosa, J., Teixeira, P. & de Morais, A. M. M. B. (2017). *Lactobacillus plantarum* survival during the osmotic dehydration and storage of probiotic cut apple. *Journal of Functional Foods*, 38, 519–528.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In joint FAO/WHO working group report
- Fathia, B., Annick, L., Robin, D., Thami, E., Abderrahmane, B. & Philippe, T. (2014). Characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal Of Microbiology Research*, 8(3), 297–303. doi: 10.5897/ajmr2013.6404
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 1–10.

- Guimaraes, V., Guerra de Almedia, J. A. & Reies, F. (2004). Normas técnicas para bancos de leche humana, Red Nacional de bancos de leche humana, Brasil. Centro de Referencia Nacional para Bancos de Leche humana – Instituto Fernandes Figueira / Fundación Oswaldo Cruz / Ministerio de Salud.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2016). Decreto 616 de 2006, Ministerio de Protección social. <https://www.ica.gov.co/etattachment15425e0f-81fb-4111b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2009). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. NTC 4519. https://books.google.com.co/books?id=ndVmtAEACAAJ&dq=NTC+4519&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J. & Rodríguez, J. M. (2008). Oral administration of Lactobacillus strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4650-4655. <https://doi.org/10.1128/AEM.02599-07>
- Léké, A., Grognet, S., Deforceville, M., Goudjil, S., Chazal, C., Kongolo, G. & Biendo, M. (2019). Macronutrient composition in human milk from mothers of preterm and term neonates is highly variable during the lactation period. *Clinical Nutrition Experimental*, 26, 59–72.
- Luz, C., Calpe, J., Manuel Quiles, J., Torrijos, R., Vento, M., Gormaz, M., Mañes, J. & Meca, G. (2021). Probiotic characterization of Lactobacillus strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. *Journal of Functional Foods*, 84, 104599. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104599>
- Moreno, M.A.S., Castro, L.S., Abrão, A.C.F.V. & Coca, K. P.(2018). Food safety and quality of distribution of raw human milk from a University Hospital. *Rev Nutr.* 31(6), 547–556. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-98652018000600004>
- Moreno, R., Salas, E. J., Pérez-Maldonado, C. I. & Jiménez, J. M. (2011). Evaluación del potencial probiótico de lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. *Education*, 27, 428–437.
- Murphy, K., Curley, D., O’callaghan, T. F., O’shea, C. A., Dempsey, E. M., O’toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A. & Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/SREP40597>
- Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., María Vieites, J., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., José Bernal, M., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D. & Gil, A. (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (Lactobacillus paracasei CNCM I-4034, Bifidobacterium breve CNCM I-4035 and Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S51–S62.

- Oliveira, C., Lopes-Júnior, L. C. & Sousa, C. P. de. (2022). Microbiological quality of pasteurized human milk from a Milk Bank of São Paulo. *Acta Paul Enferm*, 35, 1–10.
- Osorio, L. M. & Umbarila, A. S. (2015). Microbiota de la glándula mamaria. *Pediatría*, 48(1), 1–8.
- Pannaraj, P., Li, F., Cerini, C., Bender, J., Yang, S. & Rollie, A. et al. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatrics*, 171(7), 647. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.0378
- Patel, R. M. & Underwood, M. A. (2018, February). Probiotics and necrotizing enterocolitis. In *Seminars in pediatric surgery*, 27(1), 39–46. WB Saunders.
- Peixoto, L. C., Nunes, M. G. S., Silva, M. J. da. & Lira, G. R. de. (2021). Acidez e perfil calórico do leite humano pasteurizado em um banco de leite de Pernambuco. *Revista Enfermagem Digital Cuidado e Promocão Da Saúde*, 6, 1–6. <https://doi.org/10.5935/2446-5682.20210071>
- Prabhurajeshwar, C. & Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical journal*, 40(5), 270–283.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L. & Shi, J. (2017). Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk. *LWT*, 84, 271–280.
- Romyasamit, C., Thatrimontrichai, A., Aroonkesorn, A., Chanket, W., Ingviya, N., Saengsuwan, P. & Singkhamanan, K. (2020). Enterococcus faecalis Isolated From Infant Feces Inhibits Toxigenic Clostridioides (Clostridium) difficile. *Frontiers in Pediatrics*, 8, 612. [https://doi.org/10.3389/FPED.2020.572633/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FPED.2020.572633)
- Serrano Niño, J., Solís Pacheco, J., Gutierrez Padilla, J., Cobián García, A., Cavazos Garduño, A., González Reynoso, O. & Aguilar Uscanga, B. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Human Milk with Potential Probiotic Role. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(3), 170–177.
- Smith, A. C. & Hussey, M. A. (2019). Gram Stain Protocols. <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>
- Talebi Bezmin Abadi, A. (2017). Probiotics as Anti-Helicobacter pylori Agent: State of the Art. *Anti-Infective Agents*, 15(1), 63–68. <https://doi.org/10.2174/2211352515666170216142116>
- Tankeshwar, A. (2013). Catalase test: Principle, Procedure, Results and Applications. Learn Microbiology Online. <https://microbeonline.com/catalase-test-principle-uses-procedure-results/>
- Tankeshwar, A. (2022). Oxidase Test: Principle, Procedure, Results. Microbe Online. <https://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms/>

- Tarrah, A., da Silva Duarte, V., de Castilhos, J., Pakroo, S., Lemos Junior, W. J. F., Luchese, R. H., Fioravante Guerra, A., Rossi, R. C., Righetto Ziegler, D., Corich, V. & Giacomini, A. (2019). Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of *Lactobacillus casei* group strains isolated from infant feces. *Journal of Functional Foods*, 54, 489-497. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.02.004>
- Vázquez-Román, S., García-Lara, N., Escuder-Vieco, D., Chaves-Sánchez, F., De la Cruz-Bertolo, J. & Pallas-Alonso, C. (2013). Determination of Dornic Acidity as a Method to Select Donor Milk in a Milk Bank. *Breastfeeding Medicine*, 8(1), 99–104. doi: 10.1089/bfm.2011.0091
- Vieira, A., Moreira, M., Rocha, A., Pimenta, H. & Lucena, S. (2004). Assessment of the energy content of human milk administered to very low birth weight infants. *Journal De Pediatría*, 80(6), 490–494. <http://dx.doi.org/10.2223/1263>
- Vlková, E., Grmanová, M., Rada, V., Homutová, I. & Dubná, S. (2009). Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech Journal of Animal Science*, 54(12), 552–565. <https://doi.org/10.17221/151/2009-CJAS>
- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zhang, X., Mushajiang, S., Luo, B., Tian, F., Ni, Y. & Yan, W. (2020). The Composition and Concordance of *Lactobacillus* Populations of Infant Gut and the Corresponding Breast-Milk and Maternal Gut. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2985. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.597911/BIBTEX>
- Zhao, J., Fan, H., Kwok, L. Y., Guo, F., Ji, R., Ya, M. & Chen, Y. (2020). Analyses of physicochemical properties, bacterial microbiota, and lactic acid bacteria of fresh camel milk collected in Inner Mongolia. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 106–116. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17023>