



Estimulación Eléctrica para el incremento poblacional de *Lactobacillus Rhamnosus*

Ureña M., N.¹, Moreno D., L.¹, González A., M.², García R., R.², Guzmán Q., E.¹
¹Facultad de Diseño Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, México
²CIATEJ A.C. Normalistas 800 Col. Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco, México

Resumen— Este estudio se realizó con el fin de ver la reacción de las bacterias *Lactobacillus Rhamnosus R-001* y *Lactobacillus rhamnosus NH-001* bajo estimulación eléctrica. Esta bacteria probiótica se encuentra dentro del cuerpo humano en la cavidad oral, en el tracto digestivo y la vagina. Se utilizaron diferentes niveles de corriente y tiempo de exposición. Usamos un espectrofotómetro para poder medir la absorbancia de cada uno de los tratamientos y así poder obtener su gráfica de crecimiento. Al obtener los resultados de cada uno de los tratamientos se pueden comparar con los tratamientos bases. Con Lr. R podemos observar que utilizando tiempos de exposición de 30 minutos inhiben a la bacteria, con 15 y 20 minutos a 10 mA mejoraban su crecimiento y con 15 minutos a 20 mA mantiene su comportamiento; con Lr. H utilizando 30 minutos inhiben a la bacteria, con 15 y 20 minutos a 10 mA mejoran su crecimiento y con 15 minutos a 20 mA mantiene su comportamiento. Con esto podemos concluir que la estimulación eléctrica es una alternativa para acelerar o inhibir el crecimiento de estas bacterias.

Palabras clave—Bacterias, estimulación eléctrica, tratamiento, probióticos, *Lactobacillus*.

I. INTRODUCCIÓN

El *Lactobacillus Rhamnosus* (*L. rhamnosus*) es una bacteria que inhibe el crecimiento de células patógenas y protege la microbiota intestinal y vaginal [1]. Es utilizada en productos comerciales para ayudar a prevenir enfermedades estomacales en pacientes pediátricos, tratar la intolerancia a la lactosa, la enfermedad de Crohn, infecciones vaginales causadas por la levadura o colitis ulcerosa [1]. Al estimular el crecimiento de esta bacteria podríamos prevenir enfermedades que ésta bacteria las inhiba, como lo son patologías e infecciones intestinales y vaginales.

La literatura presenta estudios en donde se evalúa el efecto de la corriente eléctrica aplicada en las células, el Dr. Jerrold Petrosky de la Universidad de Loma Linda, California, realizó un estudio con tres diferentes tipos de bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*), se expusieron a una corriente continua de 100 μ A y corriente alterna a 5 y 20 mA; *E. coli* redujo su crecimiento un 9.8% contra el grupo control, *P. aeruginosa* redujo significativamente su crecimiento al estimularse con corriente alterna pero comparando corriente alterna con corriente continua redujo su crecimiento un 38%, *Staphylococcus* redujo su crecimiento solo un 3.9%. En este

mismo estudio se analizaron las actividades celulares como lo son: fosfatasa alcalina, inhibidor de C1, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, etc. Estas actividades se mostraron similares a los estudios base, dependiendo del tipo de electrodos que se utilizan (grafito y cobre) se van a comportar de manera diferente, algunos se inhiben y otros se comportan normalmente [2].

Otros estudios relacionados con la estimulación eléctrica presentan buenos resultado en donde se ha mostrado que el crecimiento del tejido epitelial tiene una mejor cicatrización cuando sufre algún tipo de quemadura grave [3], para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson. Por otro lado, la estimulación eléctrica también ha sido utilizada para el tratamiento del dolor lumbar, para el tratamiento de epilepsia sustituyendo los fármacos que se utilizan hoy en día. [4]. Este estudio se realizó con el fin de estimular células bacterianas mediante impulsos eléctricos a diferentes corrientes, frecuencias y voltajes para evaluar si la bacteria se inhibe, crece o no tiene ningún efecto en la misma [5].

II. METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo con dos tipos diferentes de bacterias, *Lactobacillus rhamnosus R-001* (Lr. R), *Lactobacillus rhamnosus NH-001* (Lr. H), las cuales fueron cultivadas en caldo MRS (Oxoid, UK) bajo condiciones aeróbicas y en agitación, a una temperatura de 37°.

Este procedimiento se inició cultivando 100 μ l de cada bacteria en 8mL de caldo MRS, posteriormente fue incubado en agitación por un periodo de 16 horas, seguido a esto fue removido una muestra de 100 μ l para volver a cultivarlas en 8mL de caldo MRS y 100 μ l de la muestra anterior, para así poder ser observadas en el espectrofotómetro la absorbancia de la misma y así obtener una gráfica de crecimiento durante un periodo de tiempo para poder compararla con las otras pruebas.

Con otra muestra de 100 μ l en 8ml de caldo MRS, se realizó el tratamiento a las bacterias con un generador de ondas (BK PRECISION 4003A, 4MHZ FUNCTION GENERATOR WITH COUNTER) cuadrada, senoidal y triangular. En donde se establecieron los parámetros de amperaje (5 mA, 10mA y 20 mA), tiempo de exposición (10 min, 15 min, 20 min y 30

min) y una frecuencia de 30Hz para poder realizar diferentes pruebas y examinar su efecto en cada uno de los cultivos.

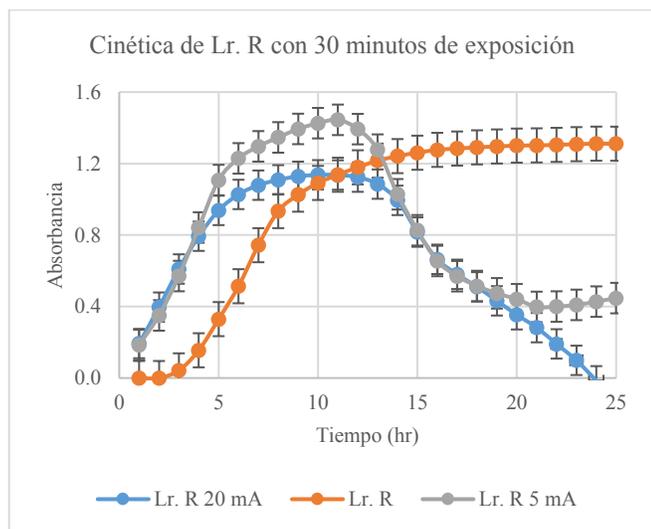
Se realizó el primer tratamiento a las bacterias junto con el generador de ondas a 5 y 20 mA con un tiempo de exposición de 30 min a 30 Hz. Posteriormente fue medida la velocidad de crecimiento bacteriano por espectrofotometría durante 24 hrs, con una longitud de onda de 490 nm para medir la absorbancia en el cultivo.

Posteriormente se continuó con el segundo tratamiento a las bacterias junto con el generador de ondas a 10 mA con un tiempo de exposición de 10, 15 y 20 min a 30 Hz. Posteriormente fue igualmente medida la velocidad de crecimiento bacteriano por espectrofotometría durante 24 hr, con una longitud de onda de 490 nm para medir la absorbancia en el cultivo.

El tercer tratamiento a las bacterias fue bajo los parámetros de 20 mA, con un tiempo de exposición de 10, 15 y 20 min a 30 Hz. Posteriormente fue medida la velocidad de crecimiento bacteriano durante 24 hr, con una longitud de onda de 490 nm para medir la absorbancia en el cultivo.

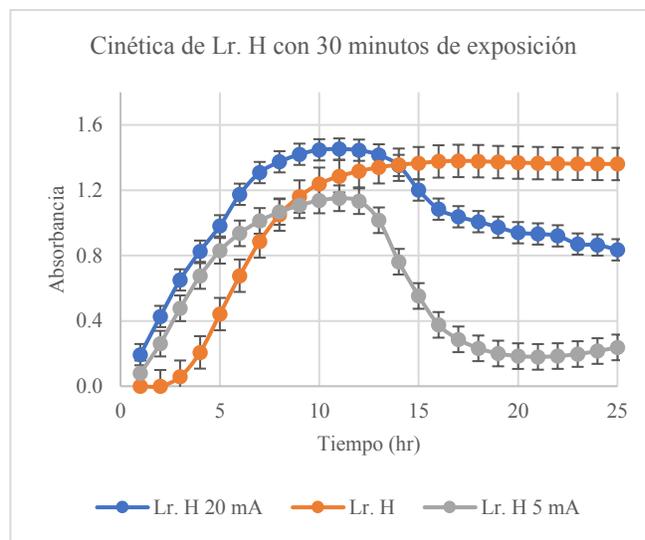
III. RESULTADOS

En el primer tratamiento de la bacteria Lr. R bajo los parámetros de 5mA a 30 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 1) se vio que el comportamiento de la bacteria fue estable durante las primeras 10 horas en fase exponencial y posteriormente se inhibe. Mientras que el tratamiento a 20 mA a 30 min de tiempo de exposición y 30 Hz se pudo ver que el comportamiento de la bacteria fue estable durante las primeras 11 horas en fase exponencial y posteriormente muere.



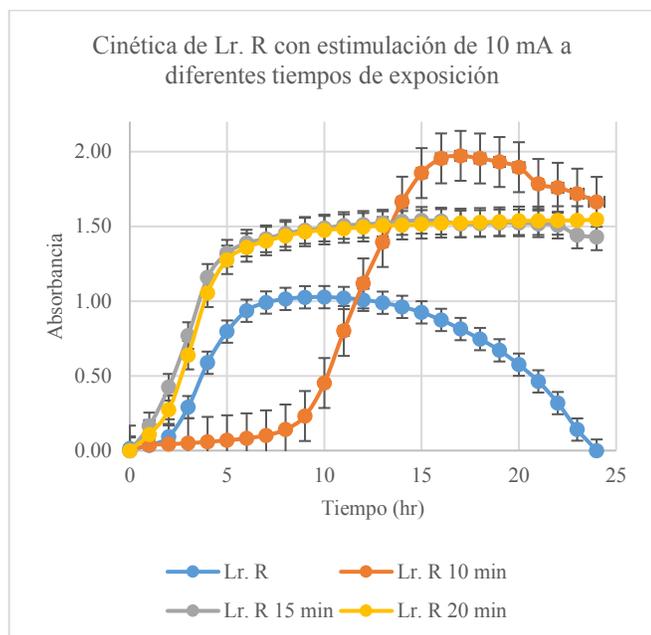
Gráfica 1: Primer tratamiento: Lr. R a 30 minutos de exposición comparado con la bacteria sin estimulación a 5 y 20 mA

El primer tratamiento de la bacteria Lr. H bajo los parámetros de 5 mA a 30 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 2) se pudo ver que el comportamiento de la bacteria fue estable durante las primeras 12 horas en fase exponencial y posteriormente muere. Mientras que el tratamiento a 20mA a 30 min de tiempo de exposición y 30 Hz se pudo ver que el comportamiento de la bacteria fue estable durante las primeras 12 horas en fase exponencial y posteriormente se inhibe.



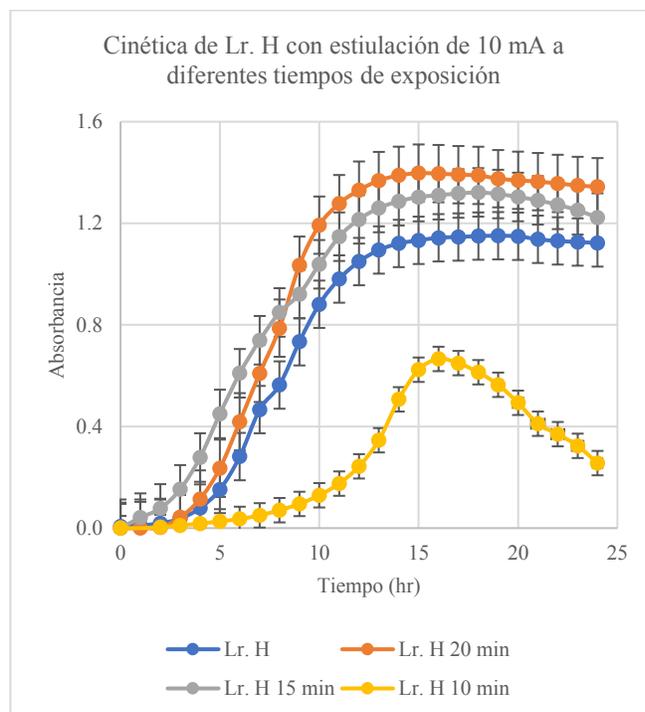
Gráfica 2: Primer tratamiento: Lr. H a 30 minutos de exposición comparado con la bacteria sin estimulación a 5 y 20 mA

El segundo tratamiento de la bacteria Lr. R bajo los parámetros de 10 mA a 10 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 3), se pudo ver que la bacteria no muestra un crecimiento hasta la hora 10 y su fase exponencial se mantiene hasta la hora 16, posteriormente se puede ver la fase estacionaria durante 2 horas y comienza a morir en la hora 18. En los tratamientos de 10 mA a 15 y 20 minutos, muestran un mayor crecimiento en la fase exponencial de 0 a 5 horas y en la fase estacionaria se mantiene hasta alcanzar las 24 horas.



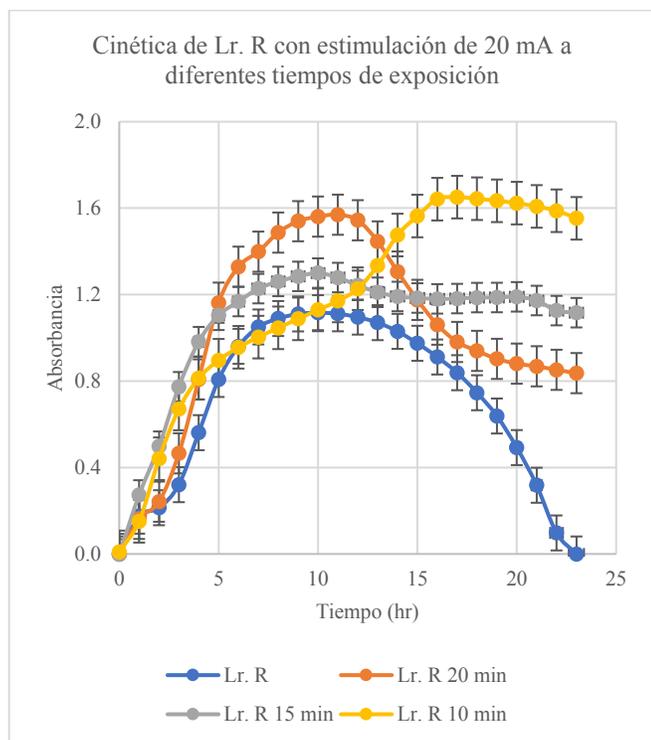
Gráfica 3: Segundo tratamiento de Lr. R a 10 mA con diferentes tiempos de exposición

Mientras que en el segundo tratamiento de la bacteria Lr. H bajo los parámetros de 10 mA a 10 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 4), comienza su etapa exponencial en la hora 6 y finaliza en la hora 11, posteriormente la fase estacionaria duro un lapso de 3 horas para después empezar a morir. El tratamiento de 10 mA a 15 min de tiempo de exposición y 30 Hz tiene un crecimiento exponencial de 12 horas, para después llegar a una fase estacionaria donde su absorbancia pico fue de 1.322 en la hora 18, posteriormente permanece estable hasta alcanzar las 24 horas. El tratamiento de 10 mA a 20 min de tiempo de exposición y 30 Hz tiene un crecimiento exponencial durante las primeras 12 horas, para después empezar la fase estacionaria donde su absorbancia pico fue de 1.398 en la hora 13, posteriormente permanece estable hasta alcanzar las 24 horas.



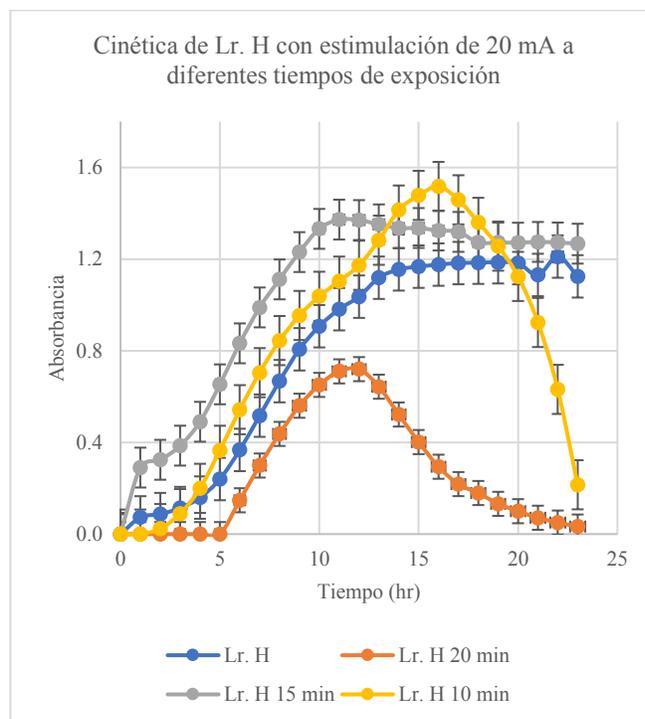
Gráfica 4: Segundo tratamiento de Lr. H a 10 mA con diferentes tiempos de exposición

En el tercer tratamiento de Lr. R a 20 mA a 10 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 5) su etapa exponencial duro 16 horas con una absorbancia pico de 1.677 en la hora 13, posteriormente permanece estable hasta alcanzar las 24 horas. El tratamiento de 20 mA a 15 min de tiempo de exposición y 30 Hz su etapa exponencial dura 7 horas, donde su absorbancia pico es de 1.3 en la hora 10, durante las siguientes 3 horas la bacteria muestra una pérdida de absorbancia y posteriormente permanece estable hasta alcanzar las 24 horas. El tratamiento de 20 mA a 20 min de tiempo de exposición y 30 Hz tiene una etapa exponencial de 9 horas, donde su absorbancia pico es de 1.57 en la hora 11, su etapa exponencial se muestra durante las siguientes 3 horas y posteriormente comienza a morir.



Gráfica 5: Tercer tratamiento de Lr. R a 20 mA con diferentes tiempos de exposición

Contra el tercer tratamiento de Lr. H a 20 mA a 10 min de tiempo de exposición y 30 Hz (gráfica 6) su etapa exponencial dura 16 horas con una absorbancia pico de 1.517, para posteriormente en la hora 17 comenzar a morir. El tratamiento de 20 mA a 15 min de tiempo de exposición y 30 Hz muestra una fase exponencial de 9 horas, con una absorbancia pico de 1.373 en la hora 11, durante las siguientes 7 horas muestra pérdida de absorbancia a 1.27, para posteriormente permanecer estable hasta alcanzar las 24 horas. El tratamiento de 20 mA a 20 min de tiempo de exposición y 30 Hz comienza su crecimiento en la hora 5, su fase exponencial dura 6 horas, con una absorbancia pico de 0.72, la fase estacionaria dura 2 horas y en la hora 14 comienza a morir.



Gráfica 6: Tercer tratamiento de Lr. H a 20 mA con diferentes tiempos de exposición

IV. DISCUSIÓN

Basándonos en los resultados se pudo identificar el mejor tratamiento para lograr hacer crecer la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. Se requirió realizar varias pruebas en donde se expuso la bacteria a diferentes parámetros. A continuación, se estarán discutiendo los principales hallazgos de este estudio. Debido a que *L. rhamnosus* es una bacteria Gram positiva, hacen su estimulación más fácil, ya que solo cuentan con una pared celular interna y una pared de peptidoglucano, pero carecen de membrana externa [6]. Esto quiere decir que se puede llegar más fácil a excitarlas. Esto nos lleva a concluir que la razón por las cuales en las primeras pruebas con los parámetros (Tiempo de exposición: 30 minutos, Amperaje variados y con una frecuencia de 30 Hz) la bacteria se inhibe, fue debido a que el tiempo de exposición fue muy prolongado.

En las segundas pruebas se muestra un comportamiento diferente: ya que algunas bacterias se inhiben y otras crecen. Como lo son 4 de los casos en donde los resultados inhiben la bacteria (Todos los casos de Lr. R y Lr. H a 10 min con tiempo de exposición) en donde el tratamiento fue de un tiempo de exposición variado, pero con un amperaje a 10 mA. Con esta evidencia se concluye que la razón por la cual se inhiben es porque el amperaje es muy bajo y no llegan a estimularse completamente para que muestren un crecimiento significativo. Sin embargo, los dos últimos casos de Lr. H en este tratamiento (Tiempo de exposición variado, Amperaje:

BIBLIOGRAFÍA

10 mA, frecuencia de 30 Hz) mostraron unos resultados diferentes ya que éstas se lograron estimular el crecimiento.

El comportamiento de las terceras pruebas fue variado ya que el crecimiento fue irregular, 4 de los casos en donde los resultados mostraron inhibición del crecimiento (Lr. R y Lr. H a un tiempo de exposición de 10 y 20 minutos, Amperaje de 20mA, Frecuencia de 30 Hz). Ésta evidencia puede significar que la razón por la cual se inhiben fue el tiempo de exposición, ya que se contaba con un amperaje promedio y frecuencia para poder lograr un crecimiento, pero no se obtuvo tener todas las condiciones correctas. Sin embargo, Lr. R y Lr. H en este tratamiento (Tiempo de exposición de 15 min a un amperaje de 20 mA, con una frecuencia de 30Hz) mostraron unos resultados diferentes ya que estas se lograron estimular y mostraron un crecimiento.

Cabe resaltar que a pesar de que son las mismas bacterias, son aisladas de distintas partes del cuerpo, es por eso que se muestra un comportamiento variado, ya que ninguna bacteria tiene la misma estructura que las demás. Se debe tomar en cuenta la estructura para poder analizar el efecto de la estimulación eléctrica en la misma.

En los estudios donde se mostró que la bacteria se inhibía, se pudiera tomar como un pre estudio para agilizar el proceso de cicatrización en quemaduras, ya que el tratamiento para agilizar la cicatrización es dañar el tejido para poder estimularlo y que empiece a reproducirse de una manera más efectiva e independiente.

V. CONCLUSIÓN

Una vez terminados los estudios se pueden determinar que los resultados donde se muestra un crecimiento mayor que en la bacteria sin estimulación pueden ser aprovechados en el área de microbiología, para poder aumentar el número de Lactobacilos en la microbiota intestinal, ya que es una bacteria no patógena la cual ayuda a la digestión del ser humano.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos el gran apoyo de parte del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ) ya que sin ellos esta investigación no hubiera sido posible.

También agradecemos a la Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG) y a sus profesores por el gran apoyo brindado durante el tiempo en el que se realizó esta investigación.

[1] Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2013). *Introducción a la microbiología* (1st ed.). Buenos Aires, [etc.]: Panamericana.

[2] Cynthia B Kincaid Kathleen H Lavoie (1989). Inhibition of Bacterial Growth In Vitro Following Stimulation with High Voltage, Monophasic, Pulsed Current. <http://dx.doi.org/10.1093/ptj/69.8.651>

[3] Villanueva, V., Calle, J., Perucho, A., Asensio, J., & Andrés, J. (2017). *Nuevas Terapias: Estimulación eléctrica percutánea en dolor lumbar y cervical*. *Scielo.isciii.es*. Retrieved 7 March 2017, from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462007000300007

[4] García-March, G., Sánchez-Ledesma, M., & Broseta, J. (2017). *Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde: Situación actual*. *Scielo.isciii.es*. Retrieved 7 March 2017, from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-14732008000500002

[5] Garrido D, Suau A, Pochart P, Crochet S, Gotteland M. Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* Lal-containing product in human volunteers. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 248: 249-56.

[6] Vizcarrondo M., Gutierrez, S. (2008). *Morfología y Tinción de los Microorganismos*. Disponible en : http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Morfolog%C3%ADa_y_Tinci%C3%B3n.pdf, Acceso 30/07/2017.