

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

**“Evaluación *in vitro* de Cepas de
Bacterias Ácido Lácticas Nativas
con Potencial Probiótico”**

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

**Ma FERNANDA LEÓN REISSIG
MONTEVIDEO, ABRIL 2012**

TUTOR: PhD STELLA REGINENSI
COTUTOR: Msc JORGE BERMÚDEZ

Un árbol filogenético es una hipótesis de relación evolutiva de **un gen** deducida a partir de la secuencia de ese gen en **organismos que existen en el presente**

Para construirlo se deben hacer suposiciones que siempre tienen una cuota importante de error, la cuestión es si esos errores invalidan o no la hipótesis filogenética resultante.

Contenido

<i>Introducción</i>	3
1. Bacterias probióticas.....	4
1.a Bacterias ácido lácticas.	4
1.b Actinobacterias.....	5
2. Microbiota.	6
1. Activación del Sistema Inmune	12
Bifidobacterium sp	13
2. Reducción del colesterol en sangre	16
3. Tolerancia a la lactosa.....	17
4. Prevención de enfermedades intestinales.....	18
3. Probióticos.....	19
a. Generalidades.....	19
b. Tolerancia a la acidez.....	23
c. Tolerancia a las sales biliares	25
d. Adhesión de los microorganismos probióticos a epitelios intestinales	27
4. Objetivo.....	28
5. Materiales y Métodos.....	29
a. Muestras	29
b. Activación.....	29
c. Tolerancia a sales biliares.....	29
d. Tolerancia a la acidez.....	30
e. Estudio de la adhesión in vitro de las cepas de Lactobacillus.	32

f. RAPD.....	33
6. Resultados y Discusión	35
a. Tolerancia a las sales biliares.	35
b. Tolerancia a la acidez.....	36
c. Estudio de adhesión de cepas de Lactobacillus.....	38
d. RAPD.....	38
7. Conclusiones.....	41
8. Agradecimientos.....	43
9. Bibliografía.....	44

Introducción

Hace poco más de un siglo, Ellie Metchnikoff observó que en Bulgaria un gran número de personas vivían más de cien años (Figuroa et al., 2006). Este hecho lo relacionó con el gran consumo de bacterias en las leches fermentadas como una forma de modular la microbiota y así evitar posibles enfermedades y prolongar la vida de la gente. Illiá Metchnikoff obtuvo el Premio Nobel de Medicina en 1908 por sus investigaciones relacionadas a las células que intervenían en la respuesta inmune. El pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un bajo número de bacterias caracterizadas por una morfología en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Tissier sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una microbiota intestinal sana (Mennickent y Green, 2009). Desde entonces, científicos han trabajado para conocer más a dichas bacterias llamadas “probióticas” (palabra de origen griego que significa a favor de la vida) (Figuroa et al., 2006). Los probióticos son principalmente bacterias y levaduras, que mejoran el balance microbiano a nivel intestinal y activan al sistema inmune localizado en dicha parte del tracto digestivo (Donohue y Salminen, 1996; Ishibashi y Yamazaki, 2001; Tuomola et al., 2001; Leverrier et al., 2003; Vinderola y Reinheimer, 2003; Liong y Shah, 2005; Pancheniak y Soccol, 2005; Figuroa et al., 2006; González Rivas y González-Martínez, 2006; Su et al., 2006; Ashraf et al., 2009). Actualmente, los probióticos de consumo humano están ganando interés debido a la enorme evidencia de efectos benéficos en la salud humana, asociados a su consumo en cantidades adecuadas de 10 ufc/mL (Vallejo et al.,

2008; Amin et al., 2009), representando un área en crecimiento en la industria de alimentos (Corcoran et al., 2005). El consumo de productos fermentados con probióticos ha sido utilizado terapéuticamente para modular la inmunidad, por tener efectos anticancerígenos, para disminuir el colesterol sérico y para mejorar la tolerancia a la lactosa, entre otras varias funciones (Gómez Zavaglia et al., 1998; Reid, 1999; Pisano et al., 2008). Existen numerosas definiciones de probióticos, pero la que prevalece es de acuerdo a un consenso científico internacional adoptada en 2002 por la “Joint Committee of World Health Organization” (WHO) y la FAO. Esta establece que los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor” (WHO/FAO, 2002).

La adición de bacterias probióticas en alimentos ha crecido a favor de la salud humana, la selección de cepas bacterianas nuevas con estas características es de interés a nivel industrial.

Los principales microorganismos utilizados como probióticos son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*.

1. Bacterias probióticas.

1.a Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo las más importantes la fermentación de alimentos y su utilización en la producción de vinos y cervezas. Son muy utilizadas en la

industria alimentaria no solamente por su habilidad de acidificar y preservar alimentos, sino también por su importancia en modificar la textura, sabor y desarrollo de aromas en alimentos fermentados (Parra Huertas, 2010). También estas cepas bacterianas aportan valor nutritivo a los alimentos (Ramírez Ramírez et al., 2011).

Las bacterias ácido lácticas comprenden un diverso grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general, son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos y microaerofílicos. La primera y principal función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido láctico, a partir de la fermentación de carbohidratos (Parra Huertas, 2010; Ramírez Ramírez et al., 2011). Las BAL son, además, ácido tolerantes, pudiendo crecer en medios con pH muy bajos (Parra Huertas, 2010).

Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo (de lactantes y adultos) y vagina de mamíferos, entre otras fuentes. En la naturaleza se pueden encontrar los siguientes géneros:

Aerococcus, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, entre otros (Parra Huertas, 2010; Ramírez Ramírez et al., 2011).

1.b Actinobacterias.

Las Actinobacterias constituyen uno de los filos más importantes dentro del género Bacteria. Es característica propia de dicho filo estar integrado por bacterias Gram positivas con un alto contenido de las bases nitrogenadas G + C

(mayor a 55 %) (Gao y Gupta, 2005).

Nuestra comprensión actual de la taxonomía y relaciones evolutivas de las divisiones de actinobacterias se basan, principalmente, en los patrones de ramificación de estas especies de los árboles de 16S rRNA. Diferentes especies se han colocado en este grupo basado en oligonucleótidos de rRNA y análisis filogenéticos basados en secuencias totales y parciales de genes de rRNA 16S, aunque algunas especies no poseen un alto contenido G+C (Gao y Gupta, 2005; Ventura et al., 2007).

Las *Bifidobacterium* representan especies (Xiao et al., 2010), utilizadas como probióticos en alimentos de uso animal y humano.

2. Microbiota.

El cuerpo humano está habitado por un vasto número de bacterias, virus y eucariotas unicelulares; se estima que la microbiota humana contiene aproximadamente 10^{12} ufc/ gramo de contenido intestinal. La microbiota intestinal comprende cerca del 95% del total de células del cuerpo humano. La microbiota coloniza virtualmente cada superficie del cuerpo humano que está expuesto al ambiente externo (Sekirov et al.; 2010).

La mayor parte de la microbiota intestinal está compuesta por anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y aerobios. A pesar de que hay descritos más de 50 phylas, la microbiota intestinal está dominada por 4 de ellas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias* (Sekirov et al., 2010, Gómez Duque y Acero, 2011; Farías et al., 2011). Los anaerobios se encuentran en

mayor proporción que los aerobios y la mayoría (60-90%) son representantes de dos de las principales familias: los *Bacteroides* en un 23% y las *Firmicutes* 64% (Gómez Duque y Acero, 2011).

El tracto gastrointestinal del recién nacido es virtualmente estéril, pero inmediatamente luego del nacimiento, se comienzan a establecer los microorganismos (Collado et al., 2009; Sekirov et al., 2010; Gómez Duque y Acero, 2011; Farías et al., 2011). La microbiota del recién nacido se desarrolla rápidamente y depende muy especialmente de la microbiota materna, la forma de nacimiento, del ambiente y de la higiene al momento de nacer (Collado et al., 2009, Thomas, et al., 2010; Gómez Duque y Acero, 2011) (Tabla 1). Durante el pasaje por el canal de parto, los niños están expuestos a una compleja población microbiana. La evidencia de que el inmediato contacto con microorganismos durante el nacimiento puede afectar el desarrollo de la microbiota intestinal viene del hecho de que la microbiota intestinal de los niños y la microbiota vaginal de la madre muestran similitudes (Sekirov et al., 2010). En el caso de los niños nacidos por cesárea tienen un retraso en la colonización de bacterias comensales y la composición microbiana es diferente en comparación con los niños nacidos por parto natural, estando definida por las bacterias del ambiente hospitalario, médicos y personas presentes en el momento del nacimiento (Sekirov et al., 2010; Thomas et al., 2010). Las bacterias dominantes en el intestino del recién nacido vía natural (parto) son las bacterias anaerobias facultativas, como *Escherichia coli*, *Enterococcus* y *Enterobacter* (Collado et al., 2009).

Tabla 1. Factores que intervienen en la composición de la microbiota intestinal*

Factor	Efecto
Tipo de parto	En niños nacidos por cesárea se retarda la colonización por Bacteroidetes, Bifidobacterias y <i>E.coli</i>
Niños prematuros	Aumenta la colonización por <i>Clostridium difficile</i>
Tipo de alimentación	Leche materna y fórmulas ricas en oligosacáridos aumentan las colonias de <i>Bifidobacterium</i>
Condiciones de higiene	Malas condiciones se relacionan con la temprana colonización de Enterobacterias
Unidad de recién nacidos	Exposición a antibióticos altera la composición normal de la microbiota

*Adaptado de Gómez Duque y Acero, 2011.

La lactancia es muy importante tanto para el desarrollo como para el establecimiento de la microbiota intestinal de los niños. La leche materna satisface todos los requerimientos nutricionales de los recién nacidos y a su vez, la lactancia protege a los neonatos de posibles infecciones (Olivares et al., 2008). Diversas investigaciones sugieren que el efecto protector de la leche materna se debe a la acción combinada de varios componentes presentes en la misma, como por ejemplo inmunoglobulinas, ácidos grasos antimicrobianos, lizosima, lactoferrina y glucoproteínas y péptidos antimicrobianos (Olivares et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que la leche materna no es un medio estéril, sino que constituye una excelente fuente continua de bacterias comensales para el intestino del lactante. Dichas bacterias pueden ejercer un papel muy importante en la protección y en la menor incidencia de infecciones del niño (Olivares et al., 2008). Las bacterias más comúnmente aisladas de la leche materna pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Tabla 2), siendo los últimos los que han generado un mayor interés en los científicos (Olivares et al., 2008).

El desarrollo del ecosistema intestinal puede ser diferente en lactantes alimentados con leche materna que en los alimentados con fórmulas lácteas (Amarri et al., 2006). La leche materna presenta bacterias ácido lácticas así como factores bifidogénicos, los cuales favorecen el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias preferentemente (Olivares et al., 2008). En el caso de los niños alimentados con fórmulas abundan los *Clostridium*, enterobacterias y *Streptococcus* (Amarri et al., 2006; Olivares, M et al., 2008 Gómez Duque y Acero, 2011).

Luego del destete, el tipo de dieta determinará la distribución de bacterias en el intestino, comenzando a formarse lo que será la microbiota en el adulto (Maity y Misra, 2009, Gómez Duque y Acero, 2011). El tracto gastrointestinal en el humano adulto está habitado por una compleja y dinámica población de aproximadamente 500 especies microbianas diferentes las cuales viven bajo un equilibrio dinámico y complejo, en un área aproximada de 300 m² (Mejía Rodríguez et al., 2007; Collado et al., 2009; Sekirov et al.; 2010; Williams, 2010; Gómez Duque y Acero, 2011). Generalmente participan dos tipos de microorganismos: bacterias nativas

benéficas (Maity y Misra, 2009; Gómez Duque y Acero, 2011), que han logrado una relación simbiótica con el hospedero durante un largo período de evolución, y las bacterias potencialmente patógenas (Maity y Misra, 2009).

Tabla 2. Especies bacterianas aisladas de leche materna de mujeres sanas.*

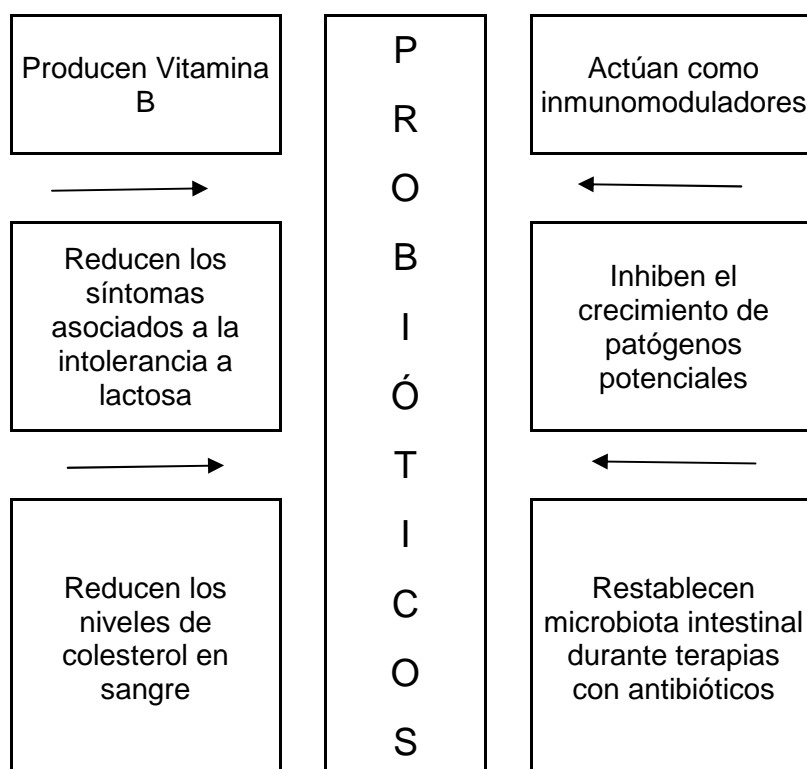
Grupo bacteriano	Especies principales
<i>Staphylococcus sp</i>	<i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>S. capitis</i> <i>S. aureus</i>
<i>Streptococcus sp</i>	<i>S. salivarius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. parasanguis</i> <i>S. peoris</i>
<i>Lactobcillus sp.</i>	<i>L. gasseri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. salivariusb</i> <i>L. reuteri</i>
<i>Enterococcus sp</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>

*Adaptado de Olivares et al., 2008

Se ha mostrado que la composición microbiana dominante del intestino es estable durante la adultez y que la composición varía entre individuos (Collins y Gibson, 1999; Collado et al., 2009). Sin embargo, a medida que pasan los años, la motilidad intestinal disminuye retardando el tránsito y llevando a una alteración de los nutrientes. Estos cambios afectan la composición de la microbiota intestinal,

produciendo una disminución de las especies de bifidobacterias y lactobacilos, aumentando el número de las enterobacterias, estafilococcus y de estreptococcus (Gómez Duque y Acero, 2011). La microbiota del intestino influye en la salud del hospedero mediante un impacto en la barrera de defensa, funciones inmunes y utilización de nutrientes (Pía Taranto et al., 2005; Collado et al., 2009). Tabla 3.

Tabla 3. Influencia de las bacterias probióticas en la salud.*



*Adaptado de Pía Taranto et al. 2005.

Se puede decir que la microbiota intestinal es un “órgano” activo el cual está implicado en diferentes procesos, tales como: la mejora de la biodisponibilidad de nutrientes y de la degradación de los componentes de la dieta que no son digeribles, el aporte de nuevos nutrientes y la remoción de componentes altamente dañinos (Collado et al., 2009). Para una eficiente digestión y una

máxima absorción de nutrientes, es esencial que se mantenga un correcto balance entre los microorganismos de la microbiota (Maity y Misra, 2009). La microbiota intestinal es de gran importancia para procesar los polisacáridos de la dieta, afectando así el almacenamiento de la energía. Varios miembros de la microbiota pueden producir vitaminas y proveérselas al hospedero, sobretodo complejos de vitamina K y vitamina B (Collado et al.; 2009; Farías et al., 2011). Si se comparan animales convencionales con animales sin microbiota intestinal, estos últimos requieren un 30% más de energía en la dieta y suplementación de vitaminas K y B para mantener el peso corporal del animal (Collado et al.; 2009). De acuerdo con la actividad metabólica, las bacterias que están presentes en la microbiota intestinal de adultos, se puede dividir en 3 grupo: bacterias productoras de ácido láctico, bacterias de putrefacción y otros tipos de microorganismos (Gómez Duque y Acero, 2011). Tabla 4.

1. Activación del Sistema Inmune

La superficie de las mucosas está protegida por el sistema inmunitario adaptativo local: el tejido linfoide asociado al intestino, quien representa la mayor masa de tejido linfoide en el cuerpo humano (Isolauri et al., 2001). Consecuentemente, constituye un elemento fundamental de la inmunidad total del hospedero. Los diferentes eventos regulatorios de la respuesta inmune intestinal ocurren en diferentes compartimentos en el hospedero: agregados en los folículos, en las Placas de Peyer y distribuidos en la mucosa, en el epitelio intestinal y en sitios secretores (Isolauri et al., 2001).

Tabla 4. Grupos de bacterias presentes en la microbiota intestinal*

Grupo bacteriano	Especies principales
Bacterias productoras de ácido láctico	<i>Bifidobacterium sp</i>
	<i>Lactobacillus sp</i>
	<i>Streptococcus sp</i>
	<i>Enterococcus sp</i>
	<i>S. aureus</i>
Bacterias de putrefacción	<i>Clostridium prefiingens</i>
	<i>Clostridium sp</i>
	<i>Bacteroides sp</i>
	<i>Veillonela sp</i>
	<i>E Coli sp</i>
	<i>Peptococcaceae sp</i>
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	<i>Staphylococcus sp</i>
Otros microorganismos	<i>Eubacterium sp</i>
	<i>Ruminococcus sp</i>
	<i>Megaspharea sp</i>
	<i>Mitsuokello sp</i>

*Adaptado de Ramírez Ramírez et al., 2011.

La modulación de la inmunidad del hospedero es uno de beneficios más comunes obtenidos a partir del consumo de probióticos (Mercenier et al., 2002; Farías et al., 2011); la exclusión o eliminación de microorganismos reconocidos como potenciales antígenos es mediada por el sistema inmune gastrointestinal, conocido como GALT (Tejido Linfoide Asociado al Intestino) (Ouwehand y Salmínem, 2003, Gómez Duque y Acero, 2011). El intestino es una de las principales superficies que está en contacto con agentes exógenos, como

alergenos, virus, bacterias, protozoarios y levaduras, en el cuerpo humano, por lo que tiene un rol primario en la defensa del huésped contra agresiones externas por medio de la mucosa intestinal, el mayor sistema inmune asociado a mucosas, y la interacción con la microbiota intestinal, tanto residente como en tránsito (Collado et al., 2009). Las especies y cepas que comprenden la microbiota intestinal es amplia y variada. Existe suficiente evidencia como para sugerir que bacterias probióticas ejercen sus efectos benéficos en la inmunidad del hospedero mediante el aumento de respuestas inmunitarias tanto inespecíficas (función fagocítica, actividad de células NK) como específicas (producción de anticuerpos, citoquinas y proliferación linfocitaria) (Ouwehand y Salmínem, 2003).

La modulación del sistema inmune se asocia con la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal y a la activación del sistema inmune por diferentes mecanismos celulares a nivel del epitelio (Ouwehand y Salmínem, 2003; Isolauri et al., 2010). La adhesión de las bacterias probióticas a receptores en la superficie de células epiteliales del intestino (enterocitos), puede activar procesos de señalización que dirige a la síntesis de citoquinas, afectando la función de los linfocitos en la mucosa (Kailasapathy y Chin, 2000; Mercenier et al., 2003), y su proliferación en las Placas de Peyer (Gómez Zavaglia et al., 1998; Van Coillie et al., 2006; Collado et al., 2009). Ha sido comprobado que las cepas con mayor adhesión tienen un efecto más importante en el sistema inmune que las cepas con menor adherencia (Ouwehand y Salmínem, 2003).

Es posible clasificar a los componentes de la microbiota intestinal de acuerdo a los efectos que ejercen sobre la salud de hospedero: bacterias con efectos potencialmente patogénicos, bacterias que presentan una mezcla de actividad

patogénica y benéfica, o bacterias estrictamente con efecto benéfico .

Bifidobacterium y *Lactocabillus* pertenecen a este último grupo y son los géneros más frecuentes, localizados para su aislamiento y caracterización como bacterias probióticas. (Vinderola et al., 2011).

La microbiota intestinal influye en el desarrollo de los componentes humorales del sistema inmune de la mucosa y también modulan la producción de las citoquinas por parte de las células T y T Helpers tipo 1 o tipo 2, influenciando las funciones de las células dendríticas, de linfocitos B y de células epiteliales (Isolauri et al., 2001; Gómez Duque y Acero, 2011). Los anticuerpos tal como la Inmunoglobulina A (IgA) son producidos por células plasmáticas del sistema inmune, dependiendo de mecanismos que incluye la presentación de antígenos por las células M (Mercenier et al., 2003; Maity y Misra, 2009). La IgA secretada es encontrada específicamente en la superficie de la mucosa intestinal y actúa evitando que los patógenos se adhieran y penetren la pared intestinal, generando que las bacterias probióticas sean mostradas como potenciadores de la producción, por las células plasmáticas, de las IgAs, aumentando los niveles de las mismas tanto en modelos animales como en modelos humanos (Maity y Misra, 2009). Diversos estudios demuestran que compuestos como el butirato, ácido graso de cadena corta producidos por la microbiota intestinal, producto de su actividad como un metabolito esencial para el aporte de energía a los enterocitos, tiene la capacidad de disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 6 (IL 6) y la interleuquina 1 (IL1) (Gómez Duque y Acero, 2011). El bloqueo de la actividad de TNF por parte de los probióticos conlleva a la inhibición de la cascada inflamatoria y la inducción de la apoptosis

celular (Jurado García et al., 2012).

2. Reducción del colesterol en sangre

El hígado se localiza en un sitio estratégico, lo cual le permite estar en contacto con buena parte de las sustancias endógenas y exógenas (García García, 2006). Hay sustancias que pasan por este órgano depurándose, no saliendo a la circulación general, como por ejemplo la insulina o las sales biliares (García García, 2006).

El hígado utiliza colesterol para producir ácidos biliares, los cuales son secretados en el intestino delgado, donde son luego reabsorbidos, siendo enviados nuevamente al hígado (Roberfroid, 2000; González Rivas y González Martínez, 2006; Maity y Misra, 2009). Mientras que estos ácidos biliares están en el intestino, pueden ser escindidos por ciertas bacterias que habitan en el intestino, lo cual ha sido evidenciado en modelos animales, en los que, cuanto mayor es la cantidad de bacterias en el intestino, mayor es el porcentaje de eliminación de ácidos biliares. Si las bacterias intestinales están escindiendo e inhibiendo la reabsorción de sales biliares, éstas últimas no podrán ser recicladas; por tanto el colesterol almacenado en el hígado comenzará a disminuir ya que se comenzarán a sintetizar ácidos biliares a partir del colesterol debido a la falta de reciclaje de los ácidos biliares. La mayoría del colesterol encontrado en sangre proviene del hígado, por tanto este efecto ayudaría a disminuir los niveles del colesterol sérico (Maity y Misra, 2009).

Taranto et al. (2000, 1998) demostraron que *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, en un modelo experimental, el efecto del probiótico administrado en forma terapéutica y preventiva a dosis baja, obteniendo una disminución significativa del 20-38% del colesterol total y 22-55% de triglicéridos. También la administración de *Lactobacillus reuteri* produjo un aumento de la relación HDL/LDL. Estos resultados son muy promisorio, de acuerdo al autor.

3. Tolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa es un problema que afecta a más del 70% de la población mundial (Vénica et al., 2011). La intolerancia congénita a lactosa es causada por una deficiencia en la enzima lactasa (o b-galactosidasa; b-gal) a nivel de la mucosa de la parte superior del intestino delgado, resultando así en la imposibilidad de digerir este disacárido (Taranto et al., 2005; Vénica et al., 2011). Esta enzima actúa desdoblando la lactosa en sus componentes glucosa y galactosa, los cuales son transportados al hígado para ser utilizados finalmente como fuente de energía (Vénica et al., 2011).

Cuando se tiene una disminución o ausencia de lactasa, la lactosa no digerida en el intestino delgado pasa al intestino grueso y allí es fermentada por la microbiota intestinal, con producción de agua, ácidos grasos y gas abdominal causando desórdenes intestinales (Roberfroid, 2000). Los probióticos producen β -D-galactosidasa que autodigiere la lactosa, mejorando así, su tolerancia y los síntomas (Kailasapathy y Chin, 2000; Roberfroid, 2000, Prebióticos y Probióticos; Vénica et al., 2011).

Estudios en humanos demostraron que la lactosa en el yogur (producto

fermentado) es asimilada más fácilmente que la misma cantidad presente en la leche. Estos resultados se deben a un aumento de la actividad b-gal luego de la ingesta de yogur, cuyo origen es microbiano y no de mucosa (Taranto et al., 2005).

4. Prevención de enfermedades intestinales

Mediante estudios se ha comprobado que animales criados en un ambiente libre de bacterias son altamente susceptibles a infecciones, por lo que la microbiota es considerada un importante constituyente de la barrera de defensa de las mucosas (Fernández et al., 2003). Los probióticos tienen un efecto antagónico frente al crecimiento de patógenos, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, entre otros. Las bacterias probióticas aumentan la resistencia contra patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Esto incluye colonización competitiva y producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico, bacteriocinas (Tabla 5) y otros metabolitos primarios: peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono (Figuroa et al.; 2006, Bhutada et al., 2011). Mediante la colonización competitiva, los probióticos inhiben la adhesión de patógenos gastrointestinales a la mucosa intestinal. La producción de ácidos orgánicos disminuye el pH intestinal, inhibiendo el desarrollo y colonización de patógenos o bacterias no deseadas, y la producción de elementos tóxicos derivados del metabolismo (amonio, fenol, aminas, etc.) (Figuroa et al.; 2006; Gómez Duque y Acero, 2011). Dichos ácidos orgánicos aumentan los movimientos peristálticos, removiendo indirectamente los patógenos ya que aumenta el tiempo de tránsito por el intestino. A su vez, numerosas bacteriocinas

muestran acción antagónica contra los patógenos (Kailasapathy y Chin, 2000). Un balance entre los grupos microbianos presentes en el intestino humano es crucial para mantener la salud, por ello se puede llegar a un estado de enfermedad cuando dicho balance bacteriano se ve perturbado. (Kailasapathy y Chin, 2000; Fernández et al., 2003; Figueroa et al., 2006; Yateem et al., 2008; Collado et al., 2009).

3. Probióticos

a. Generalidades

Los microorganismos más utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, conocidos como bacterias ácido lácticas (Fernández et al., 2003; Barrenetxe et al., 2006, Álvarez Araújo., 2010; Barakat et al., 2011; Bhadoria y Mahapatra., 2011). Las bifidobacterias (Fig. 1) son habitantes normales en el tracto intestinal, encontrándose en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal. Comprenden cerca del 25% de la microflora; sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad. Caracterizadas generalmente como gram-positivas, existen alrededor de 30 especies incluidas en el género *Bifidobacterium* (Figueroa et al., 2006).

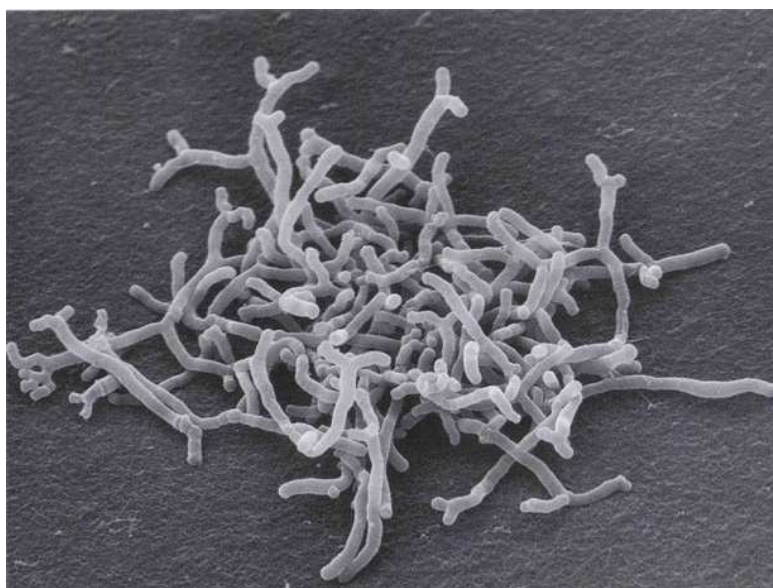


Figura 1. Microscopía electrónica de *Bifidobacterium longum*.

Fuente: <http://www.mokkka.hu/drupal/en/node/9638>).

Los lactobacilos (Fig. 2) son bacterias gram-positivas, anaerobias o anaerobias facultativas, estrictamente fermentativas, representando el grupo de bacterias ácido lácticas más ubicuo (Figuroa et al., 2006). En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto gastrointestinal y el tracto genital, constituyendo parte importante de la microbiota nativa del humano (Figuroa et al., 2006; Mejía Rodríguez et al., 2007). Al ser comensales normales de la microbiota de mamíferos, lactobacilos y bifidobacterias han sido utilizados de forma segura en la fermentación de alimentos, garantizando a *priori* su inocuidad (Mejía Rodríguez et al., 2007). A pesar que su uso en diversos alimentos y suplementos en todo el mundo, apoyan dicha conclusión, bacterias probióticas son teóricamente responsables de ciertos efectos secundarios, como ser infecciones sistémicas, actividades metabólicas perjudiciales, estimulación inmune excesiva en individuos susceptibles,

transferencia genética, entre otras (Mejía Rodríguez et al., 2007).

Reconociendo la importancia de asegurar la inocuidad, inclusive en bacterias consideradas generalmente como inocuas (GRAS), es recomendado que una cepa probiótica sea caracterizada, por lo menos, con las siguientes pruebas: determinación de resistencia a antibióticos, evaluación de determinadas actividades metabólicas (deconjugación de sales biliares, producción de D-Lactato, entre otras), si produce efectos secundarios durante el estudio en humanos, vigilancia epidemiológica de incidentes adversos en consumidores, si la cepa en estudio proviene de una especie que produce una toxina que afecta a mamíferos, debe realizarse un ensayo para determinar si produce toxinas, si la cepa en estudio proviene de una especie con potencial hemolítico, se debe determinar su actividad hemolítica, entre otras pruebas (WHO/FAO, 2002).

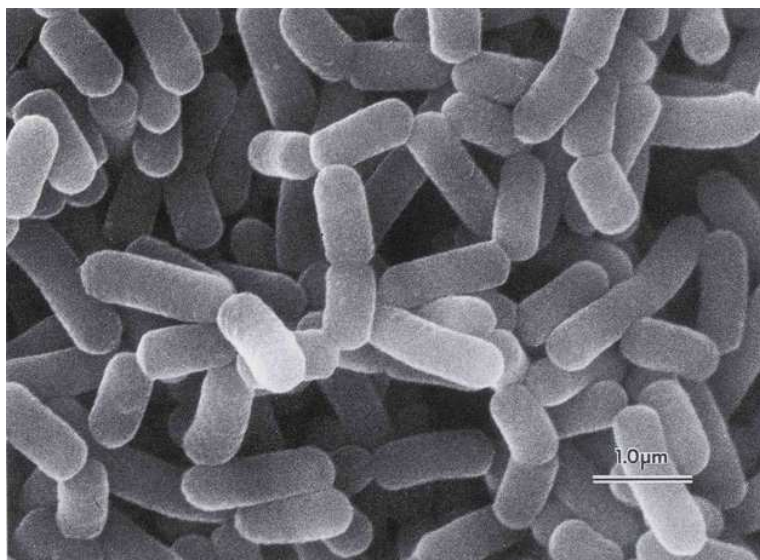


Figura 2. Microscopía electrónica de *Lactobacillus casei*.

Fuente: <http://www.mokkka.hu/drupal/en/node/9638>.

Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas producidas por BL

Bacteriocinas	Microorganismo productor	Referencia
Nisina	Lc. Lactis	Hurst (1981)
Lactocina S	L. sake	Mortvedt et al. (1991)
Lacticina 481	Lc. Lactis	Piard et al. (1992)
Pediocina PA-1/AcH	P. acidilactici	Herdenson et al. (1992)
Sakacina A	L. sake	Holck et al. (1992)
Sakacina P	L. sake	Tichaczek et al. (1992)
Leucocina A-UAL 187	Ln. Gelidum	Hastings et al. (1991)
Mesentericina Y 105	Ln. Mesenteroides	Hécharde et al. (1992)
Enterocina A	E. faecium	Aymerich et al. (1996)
Divercina V 41	C. divergen	Metivier et al. (1998)
Lactocina MMFII	Lc. Lactis	Ferchini et al. (2001)
Lactococina G	Lc. Lactis	Nissen-Meyer et al. (1993)
Lactococina M	Lc. Lactis	van Belkum et al. (1991)
Lactacina F	L. johnsonii	Allison et al. (1994)
Plantaricina A	L. plantarum	Nissen-Meyer et al. (1993)
Plantaricina S	L. plantarum	Jiménez-Díaz et al. (1995)
Plantaricina EF	L. plantarum	Anderssen et al. (1998)
Plantaricina JK	L. plantarum	Anderssen et al. (1998)
Acidocina B	L. acidophilus	Leer et al. (1995)
Carnobacteriocina A	C piscícola	Worobo et al. (1995)
Divergicina	C. divergen	Worobo et al. (1995)
Enterococina P	E. faecium	Cintas et al. (1997)
Enterococina B	E. faecium	Nes y Holo (2000)
Helveticina J	L. helveticus	Joerger y Klaenhammer (1986)
Helveticina V- 1829	L. helveticus	Vayghan et al. (1992)

*Adaptado de Chen y Hoover, 2003.

Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) se adaptan muy bien a las condiciones gastrointestinales, en especial aquellos microorganismos considerados como probióticos (Mejía Rodríguez et al., 2007). Estos microorganismos poseen características que los hacen pasibles de ser seleccionados como complementos en la dieta humana y animal: capacidad para tolerar los ácidos gástricos, capacidad para tolerar la bilis en el intestino, adherencia a la superficie epitelial, actividad antagonista contra patógenos y capacidad de colonizar temporalmente el intestino (Kotsou et al., 2008; Vallejo et al., 2008). Luego de la ingesta, las bacterias probióticas se enfrentan a dichas barreras biológicas hostiles (Mejía Rodríguez et al., 2007; Sánchez et al., 2007).

La necesidad de una buena tolerancia a la acidez estomacal por parte de los potenciales probióticos es requerida para un exitoso pasaje por el estómago (Liong y Shah, 2005); es frecuentemente evaluado por medio de su habilidad de sobrevivir a bajos pHs por 3 horas (tiempo promedio de pasaje por el estómago). Además, para que sobrevivan al pasaje por el duodeno hasta llegar al sitio de acción en el intestino, los potenciales probióticos deben mostrar una tolerancia considerable a la secreción de bilis; esto se evalúa generalmente *in vitro*, haciendo crecer las cepas en un medio que contiene sales biliares (Kotsou et al., 2008).

b. Tolerancia a la acidez

A pesar de las diferencias existentes entre cepas y especies, los microorganismos generalmente muestran una gran sensibilidad a valores de pH por debajo de 3, por lo tanto, la tolerancia a la acidez es considerada como una de las principales

propiedades utilizadas para seleccionar bacterias potenciales como probióticos (Corcoran et al., 2005). Antes de alcanzar el tracto intestinal, las bacterias probióticas primero deben sobrevivir al tránsito por el estómago, donde la secreción de ácido gástrico constituye un primer mecanismo de defensa contra microorganismos ingeridos (Dunne et al., 2001).

La tolerancia a la acidez de *Lactobacillus* es atribuida por la presencia de un gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático. Los microorganismos gram positivos utilizan un mecanismo conocido como F₁-F₀ ATPasa como protección en condiciones de acidez. La F₁-F₀ ATPasa es una subunidad enzimática múltiple, conteniendo una porción catalítica (F₁), incorporando subunidades para la hidrólisis de ATP; y una porción integral de membrana (F₀) que incluye subunidades que funcionan como canales de membrana para la translocación de protones (Corcoran et al., 2005) (Fig. 3).

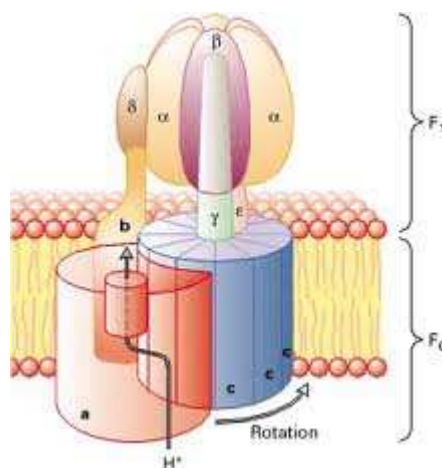


Figura 3. Modelo de la estructura del complejo F₁-F₀ ATP en la membrana plasmática de bacterias.

Fuente: <http://greatcourse.cnu.edu.cn>.

El complejo **F₁F₀** realiza dos reacciones acopladas: el **F₀** transporta iones

(protones o sodio) a través de una membrana y el segmento **F1** une el ADP y el fosfato para formar el ATP. La energía de este proceso proviene de la formación de un gradiente electroquímico compuesto de iones con carga (H^+) proporcionado por la cadena de transporte de electrones que bombea los H^+ hacia el compartimiento contrario al que se encuentra el complejo **F1** que sintetiza el ATP. Este proceso se conoce como transducción de energía (Domínguez-Ramírez et al., 2005)

c. Tolerancia a las sales biliares

La bilis es una solución acuosa de color amarillo verdoso, sintetizada en el hígado y secretada en la porción superior del duodeno por el ducto biliar. El mayor constituyente orgánico de la bilis son las sales biliares y, en menor cantidad, el colesterol, fosfolípidos, y el pigmento biliverdín. Las sales biliares son sintetizadas a partir del colesterol en el hígado, y son almacenadas como aminoácidos conjugados en la vesícula biliar (Dunne et al., 2001; Leverrier et al., 2003; Sánchez et al., 2007).

Las sales biliares son muy tóxicas, por lo que su síntesis y catabolismo deben ser regulados de manera estricta (García García, 2006). En condiciones fisiológicas, el 70% de los ácidos biliares en el humano están compuestos por ácido cólico, 30% por ácido quenodesoxicólico y otros ácidos biliares secundarios que producen las bacterias al pasar por el intestino (García García, 2006). A partir del ácido cólico, se deriva el ácido desoxicólico y del quenodesoxicólico el ácido litocólico. Este último se conjuga con glicina o taurina, productos que no se reabsorben de forma eficiente y nunca constituyen más del 5% de las sales biliares en forma normal.

Por otro lado, el ácido ursodeoxicólico se considera un isómero del ácido quenodesoxicólico. Una vez sintetizados ambos ácidos, se conjugan con glicina o taurina, mejorando la solubilidad. Dichos ácidos conjugados se encuentran como sales aniónicas a pH fisiológico, llamándose sales biliares (García García, 2006).

La concentración de las sales biliares en el intestino delgado está en el rango de 0,2% - 2.0% (w/v), dependiendo del tipo y cantidad de alimento ingerido. La formación de bilis se considera un proceso vital, ya que durante la digestión, la bilis es secretada en el intestino, jugando un rol muy importante en la emulsificación y absorción de grasas y en la transformación en productos más solubles de sustancias que serán eliminadas (Dunne et al., 2001; García García, 2006). Además, la bilis muestra una fuerte actividad antimicrobiana induciendo disgregación de la membrana lipídica y también causando estrés oxidativo en el ADN. Por lo tanto, la tolerancia a las sales biliares en concentración fisiológica es crucial para la colonización del intestino por las bacterias probióticas (Dunne et al., 2001; Kristoffersen et al., 2007; Sánchez et al., 2007). Las sales biliares no conjugadas no actúan de la misma forma que las sales biliares conjugadas en la solubilización y absorción de lípidos (Walker y Gilliland, 1993). Muy poco se sabe sobre el mecanismo de respuesta y de tolerancia a la bilis por las bacterias ácido lácticas; se cree que varias proteínas de membrana están involucradas en el mecanismo de resistencia. Científicos han sugerido que enzimas responsables de la no conjugación de las sales biliares sean parte de dicho mecanismo, aumentando moderadamente la resistencia a la bilis, disminuyendo la potente toxicidad de las sales biliares conjugadas (González Rivas y González Martínez, 2006; Sánchez et al., 2007). La tolerancia a la bilis es considerada una

característica muy importante en probióticos, que les permite sobrevivir, crecer y realizar sus actividades en el intestino delgado (Walker y Gilliland, 1993).

d. Adhesión de los microorganismos probióticos a epitelios intestinales

La habilidad de adherirse a la mucosa intestinal es uno de los criterios de selección más importantes para la determinación de microorganismos utilizados como potenciales probióticos debido a que es un pre requisito para poder colonizar el intestino (Tuomola et al., 2001). Esto previene la inmediata eliminación por los movimientos peristálticos y también provee una ventaja competitiva en este ecosistema intestinal (Kos et al., 2003). Sin la adhesión a la mucosa intestinal, la concentración de probióticos sería muy baja, por tanto el efecto benéfico de los probióticos sería insignificante (González Rivas y González Martínez, 2006). La adhesión bacteriana es inicialmente basada en interacciones físicas no específicas entre dos superficies, lo cual permite luego interacciones específicas entre las adhesinas (usualmente proteínas) y receptores complementarios. La auto-agregación de las cepas probióticas parece ser necesaria para que se dé la adhesión a células epiteliales del intestino (Kos et al., 2003). La adhesión de los probióticos a células intestinales es también considerada muy importante en la estimulación del sistema inmune. La adhesión a las células M o a las Placas de Peyer pueden, así, ser un importante determinante de la estimulación del sistema inmune por parte de los microorganismos probióticos (Tuomola et al., 2001; Isolauri et al., 2010).

4. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar y determinar como posibles bacterias probióticas diferentes cepas de *Lactobacillus* autóctonos, aislados de leche bovina y caprina.

Objetivos específicos: se realizaron 3 estudios “*in vitro*” para obtener información relacionándole criterios biológicos de selección de cepas de *Lactobacillus* para ser utilizados como probióticos. Los objetivos específicos son:

1. Evaluar la tolerancia a sales biliares.
2. Determinar la sensibilidad de las bacterias a cambio de pH, simulando la acidez gástrica.
3. Analizar la adhesión de las cepas de *Lactobacillus* por la hidrofobicidad “*in vitro*” en presencia de xileno.

5. Materiales y Métodos

a. Muestras

Se seleccionaron 7 cepas de *Lactobacillus*, las cuales se conservaron a -20 °C en viales con leche descremada y glicerol, pertenecientes a la colección del Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía, UDELAR. Se detallan en la Tabla 6 las cepas de *Lactobacillus* utilizadas en el presente trabajo.

Todo el material utilizado en la parte experimental se esterilizó en autoclave de acuerdo a la estabilidad de los medios de cultivos y soluciones, determinando el tiempo y la temperatura para cada caso.

b. Activación

Las cepas se activaron en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, OXOID), incubándose a 37 °C durante 24 h. Este procedimiento se realizó previo a cada ensayo, al igual que la determinación de la pureza en Agar MRS, incubándose en condiciones microaerófilas y a 37°C.

c. Tolerancia a sales biliares

Las cepas de *Lactobacillus* en estudio se evaluaron de acuerdo a la técnica descrita por Vallejo et al., 2008, en Agar MRS más sales biliares de origen bovino y en PCA sin sales biliares como control positivo.

Se prepararon 200 mL de agar MRS, se esterilizó y se le adicionaron 3 mL de

sales biliares cuando la temperatura del agar disminuyó a 50° C. Las cepas en estudio fueron previamente crecidas por 16 h en caldo MRS (Mac Farland 0.5).

Se transfirieron a la superficie de las placas 100 µL de cada cepa en estudio, correspondiente a la dilución 1/10 y 1/100. Se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37° C por 24 h.

La sensibilidad a las sales biliares se analizó con cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* (control negativo, no crece en presencia de sales biliares) sembradas con rastrillo en agar MRS más sales biliares en condiciones aerobias por 24 h, a 37° C. El control positivo se realizó al sembrar en PCA sin sales biliares, en las mismas condiciones detalladas anteriormente.

d. Tolerancia a la acidez

Para determinar la resistencia a la acidez, se utilizó el protocolo publicado por Vinderola et al., 2003 modificado.

Para preparar la solución de simulado gástrico (SSG), se utilizó una solución de suero fisiológico (SSF) NaCl 0.5%, pepsina y ácido clorhídrico concentrado (10 M).

En la solución final de simulado gástrico, la enzima pepsina se encontraba a una concentración de 0.3% y a un pH de 2.5.

La preparación de la biomasa bacteriana se realizó una vez activadas las cepas, se inocularon 2 ml de las cepas en estudio crecidas por 16 h (Mac Farland 0.5) a 30 mL de caldo MRS, en matraces Erlenmeyer de 100 mL. Se incuban a 37° C

durante 16 h.

Luego de la incubación, se centrifugaron los 30 ml de caldo MRS obtenida a 6000 g durante 10 min a 5 ° C. El pellet bacteriano se lavó 3 veces con 10 mL de H₂O destilada estéril (H₂O d.e), y fue resuspendido en 5 ml de Buffer Fosfato a pH 6.5 0.1 M (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄). A partir de la biomasa obtenida, se tomaron 100 µL y se colocaron en tubos con 9.9 mL de SSF NaCl 0.5% (los tubos control negativo no contienen pepsina) y 100 µL en tubos con 9.9 mL de solución de simulado gástrico (SSG) para determinar la sensibilidad a la acidez gástrica.

Todos los tubos, tanto los control sin pepsina como los tubos con SSG, se analizaron a la hora 0 (H₀, sin incubación), y a las 3 h (H₃) luego de incubarse a 37° C. Pasadas las mismas, se realizaron diluciones desde 10⁻² hasta 10⁻⁶ en SSF estéril, sembrándose esta última dilución en placas con agar MRS. Se incubaron por 24 h en condiciones de microaerofilia a 37° C. El crecimiento de cada cepa a las diferentes horas y en diferentes condiciones nos indica la resistencia a la acidez de pH 2.5.

Tabla 6. Cepas seleccionadas.

Especie	Cepa	Fuente de referencia
<i>Lactobacillus casei</i>	27139	ATCC 27139
<i>Lactobacillus casei</i>	7469	ATCC 7469
<i>Lactobacillus casei</i>	96*	Leche cruda de cabra
<i>Lactobacillus casei</i>	98*	Leche cruda de vaca
<i>Lactobacillus casei</i>	98 LP*	Leche en polvo
<i>Lactobacillus casei</i>	99*	Leche cruda de cabra
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	53.1*	Leche cruda de vaca
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	36.5*	Leche cruda de vaca

*Cepas aisladas en Unidad Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía.

e. Estudio de la adhesión *in vitro* de las cepas de *Lactobacillus*.

La adhesión de las cepas bacterianas a superficies, como el epitelio intestinal, se evaluó *in vitro* simulando la adherencia de las mismas a solventes no polares. Los estudios de hidrofobicidad se realizaron según el protocolo de Majidzadeh Heravi et al., 2011 con modificaciones, para determinar a través de porcentajes de hidrofobicidad la tendencia a la adhesión epitelial (mayor porcentaje de hidrofobicidad, mayor adherencia).

En matraces Enreilmeyer de 100 mL con 30 mL de caldo MRS se inocularon con 2 mL de una suspensión de las cepas en estudio equivalente al tubo Mac Farland 0.5; se incubaron a 37°C por 12 h., se centrifugaron a 12000 g durante 7 minutos

a 5° C para la obtención de la biomasa bacteriana. A continuación se lavaron los pellets 2 veces con 20 mL de agua destilada estéril, resuspendiendo los pellets en 4 mL de Buffer Fosfato a pH 6.5 0.1 M (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄). A 2 mL de los 4 mL de biomasa, se transfirieron a tubos con 10 mL de buffer PBS, se midió la absorbancia a 560 nm de cada tubo (A₀). A cada tubo se le adicionaron 2.2 mL de Xileno, se mezclaron durante 2 min, dejándose reposar por 20 min. Se evaluó la D.O a 560 nm de la fase acuosa (A_H).

La disminución de la absorbancia en la fase acuosa fue considerada como una medida de la hidrofobicidad de la superficie de las células bacterianas (porcentaje de hidrofobicidad, %H). %H fue calculada según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = ((A_0 - A_H)/A_0) \times 100$$

f. RAPD

Se realizaron análisis de los perfiles para las cepas de *Lactobacillus casei* 96, 99, 98 y 98 LP FAGRO, utilizando la técnica RAPD con el primer OPR 13.

La técnica RAPD (Random Amplification of Polimorphic DNA) se realizó con 25 µL de una mezcla de reacción 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 1 U Taq polimerasa (Fermentas, USA), 1 mM primer OPR 13 (Ronimus et al., 1997) y 20 ng de DNA (la extracción se realizó con el kit de purificación DNA Fermentas, International Inc Usa, de acuerdo a las especificaciones técnicas del kit). Las amplificaciones en PCR se reaizaron en un Corbett CG1-96 Termociclador (palmtop computer interface). Los parámetros de ciclos de PCR incluyen la desnaturalización a 94°C por 3 min y 45 seg; 35 ci clos consistiendo de 94°C por

15 seg, 36°C por 15 seg y 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 4 min. Las reacciones RAPD-PCR fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa 1.8% usando buffer TBE-0.5 X, corridas de 10 V/cm por 1 h, teñidas con GOOD VIEW y visualizados por transiluminador de UV.

Las cepas en estudio se confirmaron su identificación por secuenciación del 16S rDNA. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea. Las secuencias de DNA fueron comparadas con aquellas de la base de datos NCBI Blast.

6. Resultados y Discusión

a. *Tolerancia a las sales biliares.*

Los resultados para determinar la tolerancia a sales biliares de las especies de *Lactobacillus* en estudio se determinaron en dos medios de cultivo: a) uno control positivo en agar PCA y b) en agar MRS con sales biliares (MRS-SB).

Las cepas control utilizadas fueron *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*.

En la Tabla 7 se detallan los crecimientos a diferentes diluciones decimales en PCA. Tanto las cepas control de *Bacillus* como las cepas de *Lactobacillus* en evaluación, crecieron en medio PCA.

El efecto de las sales biliares sobre las cepas de *Lactobacillus* y controles en medio de cultivo MRS-SB se indican en la Tabla 7. Existe diferente sensibilidad entre las cepas en estudio a la acción de las sales biliares. Las cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 27139, FAGRO 99, FAGRO 98, FAGRO 98LP y de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 y FAGRO 36.5 son resistentes a las concentraciones de sales biliares evaluadas. Por el contrario, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* FAGRO 53.1 no creció en presencia de sales biliares, siendo sensible a estas últimas.

Tabla 7. Crecimiento de cepas de *Lactobacillus* y cepas control (*B. subtilis* y *B. licheniformis*) en medio PCA y MRS-SB.

CEPA	MEDIO MRS-SB		MEDIO PCA*	
	DILUCIÓN		DILUCIÓN	
	1/10	1/100	1/10	1/100
Lb. Casei				
ATCC 27139	+	+	+	+
FAGRO 96	+	+	+	+
FAGRO 98	+	+	+	+
FAGRO 98LP	+	+	+	+
Lb. rhamnosus				
7469	+	+	+	+
36.5	+	+	+	+
53.1	-	-	+	+
B. subtilis				
	-	-	+	+
B. licheniformis				
	-	-	+	+

(+) Crecimiento positivo; (-) crecimiento negativo.

*medio de control de crecimiento de las cepas en evaluación, PCA.

b. Tolerancia a la acidez.

Las cepas en estudio que toleraron pH 2.5 fueron: *Lactobacillus casei* (ATCC 27139, FAGRO 98, FAGRO 98LP) y *Lactobacillus rhamnosus* (FAGRO 36.5 y FAGRO 53.1) se esquematizan en la Tabla 8 y Figura 4. Estas cepas toleraron por 3 h de incubación un pH de 2.5, indicando que los *Lactobacillus casei* (ATCC 27139, FAGRO 98, FAGRO 98LP) y *Lactobacillus rhamnosus* (FAGRO 36.5) son

capaces de sobrevivir al ambiente del tracto gastrointestinal, las cuales no son afectadas a pH ácidos y a concentraciones altas de sales biliares. Mientras que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

Tabla 8. Resultados de la siembra en MRS de cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en SSF y en SSG (0.5% NaCl; pH 2.5) durante 3 horas.

CEPAS	CONTROL H ₀	CONTROL H ₃	pH 2.5 H ₃
Lb. Casei			
ATCC 27139	+	+	+
FAGRO 96	+	+	+
FAGRO 98	+	+	+
FAGRO 98LP	+	+	+
Lb. rhamnosus			
ATCC 7469	+	+	-
FAGRO 36.5	+	+	+
FAGRO 53.1	+	+	+

(+) Crecimiento positivo; (-) crecimiento negativo; H₀ (en SSF) Control a tiempo 0; H₃ (en SSF) ensayo a tiempo 3 (3 h); pH 2.5 H₃ (SSG).



Fig. 4. Siembra control H₃ y en sg H₃ de 3 cepas problema: *Lactobacillus casei* 96, *Lactobacillus casei* 98LP y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469.

c. Estudio de adhesión de cepas de *Lactobacillus*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de hidrofobicidad (Fig. 5) fueron bastante variables entre las cepas de *Lactobacillus* a evaluar. La cepa con mayor porcentaje de hidrofobicidad fue la de *Lactobacillus casei* FAGRO 98, presentando un porcentaje del 22.8% (Tabla 8). Contrariamente, la cepa con menor carácter hidrofóbico fue la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, presentando un %H del 0.4%. El resto de las cepas presentaron porcentajes intermedios (Tabla 8).

Las cepas con porcentajes mayores al 78% indicarían un fuerte carácter hidrofóbico de la superficie celular (Vallejo et al.; 2009). Las cepas problema a evaluar, no presentaron porcentajes mayores a dicho valor, por lo que se puede considerar tanto a las bacterias de *Lactobacillus casei* FAGRO 96, FAGRO 98, FAGRO 98LP, ATCC 27139, como a las de *Lactobacillus rhamnosus* FAGRO 36.5, FAGRO 53.1 y ATCC 7469, con un bajo poder de interacción con las células del tracto gastrointestinal.

d. RAPD

En la Figura 6 podemos ver la corrida electroforética de las diferentes cepas de *Lactobacillus casei* en estudio. Si comparamos el segundo carril (cepa de *Lb. Casei* FAGRO 96) con el tercero (*Lb. casei* FAGRO 99), las corridas son muy similares, por lo que las cepas FAGRO 96 y 99 de *Lactobacillus casei* tienen el mismo perfil electroforético, siendo las mismas cepas. Las corridas del primer y cuarto carril (*Lb. casei* FAGRO 98 y *Lb. casei* FAGRO 98 LP respectivamente)

muestran bandas con diferente peso molecular, demostrando que dichas cepas son distintas.

Tabla 8. Porcentaje de hidrofobicidad (%H) de cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*

CEPA	A ₀	A	H (%)
<i>Lactobacillus casei</i>			
27139	0.754	0.720	4.5
99	0.475	0.451	5.0
98	0.224	0.173	22.8
98 LP	0.547	0.500	8.6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			
7469	0.210	0.202	0.4
36.5	0.513	0.487	5.1
53.1	0.500	0.416	16.8

A₀: absorbancia al tiempo 0; A : absorbancia al tiempo 20 minutos; H %: $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$.

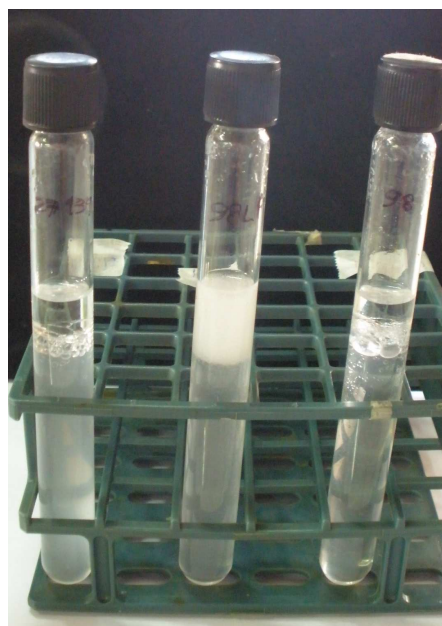


Fig. 5. Tubos con cepas problema (fase acuosa, inferior) y xileno (fase orgánica, superior) en reposo durante 20 minutos.

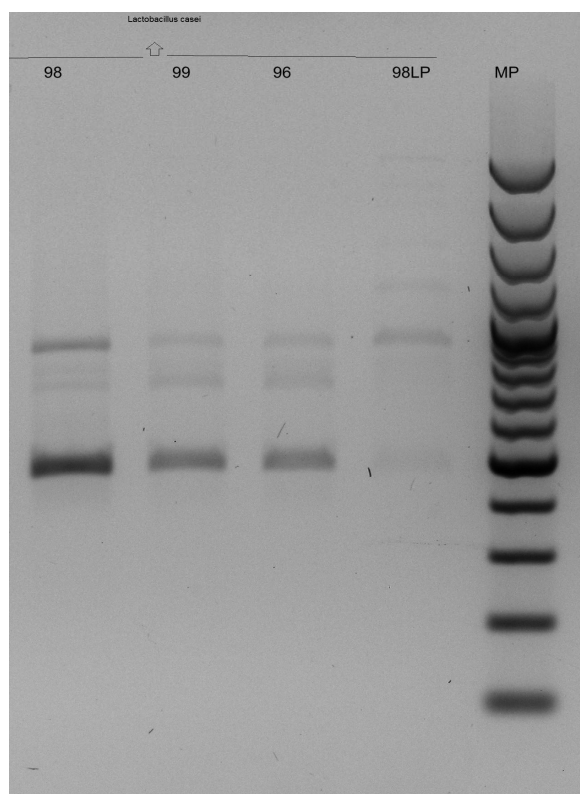


Fig. 6. Resultados del RAPD. Electroforesis de las cepas problema de *Lactobacillus casei* FAGRO 98, 99, 96 y 98 LP. MP: marcador de peso molecular.

7. Conclusiones

En los recientes años el uso de probióticos ha incrementado y se ha usado como una alternativa para disminuir la utilización de antibióticos para tratar o prevenir infecciones, y de esta manera promover el uso de alimentos con ciertas propiedades que favorecen la salud.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la cepa con mayor potencial probiótico es *Lactobacillus casei* FAGRO 98 nativa proveniente de leche cruda de vaca, demostrando que la cepa sobrevive en las condiciones ambientales “*in vitro*” estudiadas del tracto gastrointestinal. Posee la habilidad de sobrevivir a pH ácido y a altas concentraciones de sales biliares, los cuales son factores deseables para el pasaje exitoso a través del tracto gastrointestinal.

La habilidad de adhesión es un factor deseable, aunque ninguna de las cepas llegó a los valores citados en la bibliografía citada.

A pesar de mostrar tolerancia a las sales biliares, *Lactobacillus casei* ATCC 7469 no presenta resistencia a bajos pHs ya que no creció a pH 2.5, y presenta el valor más bajo de Hidrofobicidad (0.4%). La cepa de *L. rhamnosus* 53.1 no presenta tolerancia a bajo pH pero sí a la presencia de sales biliares; su porcentaje de hidrofobicidad es de 16.8%, siendo el segundo valor más alto.

Las cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 27139, 99, 98 LP, y la de *Lactobacillus rhamnosus* 36.5, presentan resistencia tanto a sales biliares como a bajo pH, y sus porcentajes de hidrofobicidad son relativamente similares, pudiéndose considerar su potencial probiótico intermedio entre las cepas de *Lactobacillus*

casei 98 y *Lactobacillus rhmanosus* 53.1.

Los presentes resultados muestran que existen variaciones intraespecie en relación a las propiedades de tolerancia a la acidez y sales biliares. Los estudios relacionados a la adhesión a superficies celulares por la técnica realizada se debería complementar con estudios en cultivos celulares “*in vivo*” para la cepa de *Lactobacillus casei* FAGRO 98.

8. Agradecimientos

A Jorge Bermúdez, Jorge Olivera, Nancy Scarone, Marcela González y sobre todo a Stella Reginensi, todos ellos de la Unidad de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, por la paciencia brindada en el proceso de la tesis.

A mi familia, por el aliento continuo, por las charlas de apoyo.

A mis amigas por estar y entenderme, a Alejandra por ser un pilar fundamental y a Daniel, por impulsarme constantemente a realizarme.

9. Bibliografía.

Álvarez Araújo, L.J (2010). Bacterias Lácticas como Terapia Alternativa para Enfermedades Inflamatorias Intestinales. *Revista de Educación Bioquímica*. 29(1): 2-7.

Amarri, S; Benatti, F; Callegari, M.L; Shahkhalili, Y; Chauffard, F; Rochat, F; Acheson, K.J; Hager, C; Benyacoub, J; Galli, E; Rebecchi, A; Morelli, L (2006). Changes of Gut Microbiota and Immune Markers During the Complementary Feeding Period in Healthy Breast Feed Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 42: 488-495.

Amin, N; Jorfi, M; Khosravi, A.D; Samarbafsideh, A.R; Farajzadeh Sheikh, A. (2009). Isolation and Identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from Plants by PCR and Detection of their Antibacterial Activity. *Journal of Biological Sciences*, 9 (8): 810-814).

Ashraf, M; Arshad, M; Siddique, M; Muhammad, G. (2009). *In Vitro* Screening of Locally Isolated Lactobacillus Species For Probiotic Properties. *Pakistan Veterinary Journal*, 29 (4): 186-190.

Barakat, O.S; Ibrahim, G.A; Tawfik, N.F; El-Kholy, W.I; Gad El-Rab, D.A (2011). Identification and Probiotic Characteristics of Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Domiati Cheese. *International Journal of Microbiology Research*. 3(1): 59-66.

Barrenetxe, J; Aranguen, P; Grijalba, A; Martínez-Peñuela, J.M; Marzo, F; Urdaneta, E. (2006). Modulation of Gastrointestinal Physiology Through Probiotic Strains of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium*. *Anales del Sistema Sanitario*

de Navarra, 29 (3).

Bhadoria, P.B.S; Mahapatra, S.C (2011). Prospects, Technological Aspects and Limitations of Probiotics – A Worldwide Review. *European Journal of Food Research & Review*. 1(2): 23-42.

Bhutada, S.A; Dahikar, S.B; Tambekar, D.H (2011). Probiotic Potential of Commercial Available Probiotic Preparations in Prevention of Enteric Bacterial Infections: An in vitro Study. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*. 9(2): 7-11.

Chen, H y Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.

Collado, M.C; Isolauri, E; Salminen, S; Sanz, Y. (2009). The Impact of Probiotic on Gut Health. *Current Drug Metabolism*, 10: 68-78.

Collins, M.D; Gibson, G. (1999). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Approaches for Modulating the Microbial Ecology of the Gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1052-1057.

Corcoran, B.M; Stanton, C; Fitzgerald, G.F; Ross, R.P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acid Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6): 3060-3067.

Domínguez.Ramírez, L; Tuena de Gómez-Puyou (2005). La F₁F₀ ATP Sintasa: un Complejo Proteico con gran Versatilidad Estructural y Funcional. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 8(1):18-27.

Donohue, D. C y Salminen; S (1996) Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, 5: 25-28.

Dunne, C; O'Mahony, L; Murphy, L; Thornton, G; Morrissey, D; O'Halloran, S; Feeney, M; Flynn, S; Fitzgerald, G; Daly, C; Kiely, B; O'Sullivan, G; Shanahan, F; Collins, J. K. (2001). In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 386-92.

Farías, M.M; Silva, C; Rozowski, J (2011). Microbiota Intestinal: Rol en la Obesidad. *Revista Chilena de Nutrición*. 38 (2): 228-233.

Fernández, M.F; Boris, S; Barbés, C. (2003). Probiotic Properties of Guman Lactobacilli Strains to be Used in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 449-455.

Figuroa, I; Gómez Ruiz, L; García Garibay, M; Cruz Guerrero, A. (2006). El Beneficio de los Probióticos [Internet], Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Disponible desde: <<http://www.alfa-editores.com/alimentaria/Julio-Agosto06/Beneficio.pdf>> [Acceso Noviembre 2010].

Gao, B; Gupta, R.S. (2005). Conserved Indels in Protein Sequences that are Characteristic of the Phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2401-2412.

Gómez Duque, M; Acero, F. (2011). Composición y Funciones de la Florea Bacteriana Intestinal. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 20 (2): 74-82.

Gómez Zavaglia, A; Kociubinski, G; Pérez, P; De Antoni, G. (1998). Isolation and Characterization of *Bifidobacterium Starins* for Probiotic Formulation. *Journal of Food Protection*, 61 (7): 865-873.

González Rivas, F; González Martínez, B. E. (2006). Criterios de Calidad de los Microorganismos Probióticos y Evidencias sobre Efectos Hipocolesterolémicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7 (1). Disponible desde: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2006/spn061q.pdf>> [Acceso Junio 2010].

Ishibashi, N; Yamazaki, S. (2001). Probiotics and Safety. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 465-470.

Isolauri, E; Sütas, Y; Kankaanpää, P; Arvilommi, H; Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on Immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 444-450.

Kailasapathy, K; Chin, J. (2000). Survival and Therapeutic Potential of Probiotic Organisms with Reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78: 80-88.

Kos, B; Suskovic, J; Vukovic, S; Simpraga, M; Frece, J; Matosic, S. (2003). Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981-987.

Kotsou, M; Mitsou, E; Oikonomou, I; Kyriacou, A. (2008). In Vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology*, 22: 1-17.

Kristoffersen, S.M; Ravnum, S; Tourasse, N.J; Okstad, O.A; Kolsto, A.B; Davies, W. (2007). Low Concentrations of Biles Salts Induce Stress Responses and Reduce Motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. *Journal of Bacteriology*, 189 (14): 5302-5313.

Lactic acid bacteria. Córdoba.: Food and Agriculture Organization of the Lactobacillus casei. Disponible desde: < <http://www.probiotic.org> > [Acceso Setiembre 2009].

Lactobacillus rhamnosus. Disponible desde: <<http://www.probiotic.org>> [Acceso Setiembre 2009].

Leverrier, P.D; Dimova, D; Pichereau, V; Aufray, Y; Boyaval, P; Jan, G. (2003). Susceptibility and Adaptive Response to Bile Salts in Propionibacterium freudenreichii: Physiological and Proteomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7): 3809-3818.

Liong, M.T; Shah, N.P. (2005). Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *Journal Dairy Science*, 88: 55-66.

Maity, T.K; Misra, A.K. (2009). Probiotics and Human Health: Synoptic Review. *Nutrician Journal of Food, Agriculture, Nutricion and Development*, 9 (8): 1778-1794.

Mejía Rodríguez, J.A; Chacón Rueda, Z; Guerrero Cárdenas, B; Otoniel Rojas, J; López Corcuera, G (2007). Obtención de Cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in vitro como Potenciales Probióticas. *Revista Científica*. 2: 178-185.

Mercenier, A; Gaskins, R; Berg, R.D; Corthésy, B; Delespesse, G; Gill, H.S;

Grangette, C; Pouwels, P.H; Scott, F.W; Von der Weid, T (2002) Probiotics and the Immune System-Position Paper. Disponible desde: <<http://www.isapp.net/docs/immune.pdf>>. [Acceso Setiembre 2009].

Olivares, M; Lara-Villoslada, F; Sierra, S; Boza, J; Xaus, J (2008). Efectos Benéficos de los Probióticos de la Leche Materna. *Acta Pedátrica Española*. 66(4): 183-188.

Ouwehand, A; Salmínem, S. (2003). In Vitro Adhesion Assay for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. *Journal of the Society of Microbial Ecology in Health and Disease*, 15: 175-184.

Pancheniak, Reque, E.F; Soccol, C.R. (2005). Biochemical Characterization and Identification of Probiotic *Lactobacillus* for Swine. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 23 (2): 299-310.

Parra Huertas, R.A (2010). Review. Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 5(1): 105-103.

Pisano, M.B; Casula, M; Corda, A; FAdda, M.E; Deplano, M; Cosentino, S. (2008). *In Vitro* Probiotic Characteristics of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fiore Sardo Cheese. *Italian Journal of Food Science*, 4 (20): 505-516.

Prebióticos y probióticos: Alimentos funcionales. Disponible desde: <http://www.amatusalud.es/articulo/prebioticos-y-probioticos-alimentos-funcionales>.

Ramírez-Ramírez, J.C; Rosas Ulloa, P; Velázquez González, M.Y; Ulloa, J.A; Arce Romero, F (2011). Bacterias Lácticas: Importancia en Alimentos y su Efectos en la Salud. *Revista Fuente Año*. 2(7): 1-16.

Reid, G. (1999). Minireview: The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9): 3763-3766.

Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and Probiotics: are they Functional Foods? *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1682s-1687s.

Sánchez, B; Champomier-Verges, M. C; Stuer-Lauridsen, B; Ruas-Madiedo, P; Anglade, P; Baraige, F; G. de los Reyes-Gavilán, C; Johansen, E; Zagorec, M; Margolles, A. (2007). Adaptation and Response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to Bile: a Proteomic and Physiological Approach. *Applied Environmental Microbiology*, 73 (21): 6757-6767.

Sekirov, I; Russell, S.L; Antunes, C.M; Brett Finlay, B (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Rev.* 90: 859-904. BUSCAR REVISTA.

Su, P; Henriksson, A; Mitchell, H. (2007). Survival and Retention of the Probiotic *Lactobacillus casei* LAFTI L26 in the Gastrointestinal Tract of the Mouse. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (2): 120-125.

Taranto, M.P; Médici, M; Font de Valdez, G. (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Revista Química Viva*. 4(1): 26-34.

Taranto, M.P; Médici, M; Perdigón, G; Ruíz Holgado, A.P; Font de Valdez, G. (1998). Evidence for Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic Mice. *Journal of Dairy Science*. 81(9): 2336-2340.

Thomas, D.W; Greer, F.R; Committee on Nutrition: Section of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2010) Clinical Report-Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. *Official Journal of the American Academy of Pediatrics*. 126(6): 1217-

1231.

Tuomola, E; Crittenden, R; Playne, M; Isolauri, E; Salmien, S. (2001). Quality Assurance Criteria for Probiotic Bacteria. *Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl): 393-398.

United Nations and World Health Organization.

Vallejo, M; Marguet, E.R; Etchechoury, V. E. (2008). Potencial Probiótico de Cepas de *Lactobacillus* Aisladas de Quesos Ovinos Patagónicos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. 9 (4) Disponible desde: http://www.respyn.uanl.mx/ix/4/articulos/probioticos_quesos. [Acceso Setiembre 2009].

Van Coillie, E; Goris, J; Cleenwerck, J; Grijspeerdt, K; Botteldoorn, N; Van Immerseel, F; De Buck, J; Vancanney, M; Swings, J; Herman, L; Heyndrickx, M. (2006). Identification of Lactobacilli Isolated from the Cloaca and Vagina of Laying Hend and Characterization for Potential Use as Probiotics to Control Salmonella Enteritidis. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1095-1106.

Vénica, C.I; Perotti, M.C; Wolf, I.V; Zalazar, C.A. (2011) Intolerancia a la Lactosa. Productos Lácteos Modificados. *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 65:50-55.

Ventura, M; Canchaya, C; Tauch, A; Chandra, G; Fitzgerald, G; Chater, K; van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 (3): 495-548.

Vinderola, C.G; Reinheimer, J. A. (2003). Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative "*in vitro*" Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. *Food Research International*, 36: 895-904.

Vinderola, G; Binetti, A; Brums, P; Reinheimer, J. (2011) Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy. Review Article. *Frontiers in Microbiology*. 2(70): 1-6.

Walker, D. K; Gilliland, S. E. (1993). Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76 (4): 956-961.

WHO/FAO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacists*, 67: 449-458.

Xiao, J.Z; Takahashi, S; Nishimoto, M; Odamaki, T; Yaeshima, T; Iwatsuki, K; Kitaoka, M. (2010). Distribution of *in vitro* Fermentation Ability of Lacto-N-biose I, a Major Building Block of Human Milk Oligosaccharides, in Bifidobacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 54-59.

Yateem, A; Balba, M.T; Al-Surrayai; Al-Mutairi, B; Al-Daher, R. (2008). Isolation of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential from Camel Milk. *International Journal of Dairy Science*, 3 (4): 194-199.