

**Maestría en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
UN AISLAMIENTO NATIVO DEL GÉNERO
LACTOBACILLUS CON PROPIEDADES
PROBIÓTICAS Y SU POTENCIAL USO EN LA
INDUSTRIA LÁCTEA**

Lic. Bioq. Sylvia Enid Vázquez Zeballos
Julio, 2014
Montevideo- Uruguay

Orientadores Dr. Pablo Zunino
Dra. Mary Lopretti

Orientador estadístico Dr. Walter Norbis



Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología
Centro Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias-UdelaR



Departamento de Bioprocesos
y Biotecnología-Laboratorio
Tecnológico del Uruguay

Tribunal

Dr. Felipe Schelotto (Instituto de Higiene – Facultad de Medicina).

Dra. Susana Castro (Facultad de Ciencias – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

Dra. Paola Scavone (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable)

Dedicatoria

*A mis tres pequeños grandes maestros por quienes lucho y trabajo por ser
mejor cada día y a vos mi amor que cambiaste mi vida para siempre.*

Agradecimientos

Gracias Mary por ser mi tutora y amiga.

Mil gracias Pablo por tus enseñanzas y guía y por estar ahí cada vez que te necesité.

Como agradecerte Walter tus enseñanzas en estadística y tu paciencia.

Quisiera agradecer de forma especial a la Lic. Fabiana Rey del Departamento de Biotecnología y Bioprocesos del LATU por su apoyo y gestión a lo largo de todo el proyecto.

A mis amigas del alma por el aguante...

A mi amiga y compañera Pola por todas sus correcciones y enseñanzas en estos largos años.

A mis compañeras del laboratorio Luciana y Silvana por haberme alentado siempre para que termine de escribir...

A mis hijos Belu y Santy por ayudarme a cuidar a Emili para poder escribir....

A mi madre por su ayuda y enseñanzas de vida.

A Eve por su ayuda y dedicación diaria.

A la Dra. Sabina Vidal del Departamento de Biotecnología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias donde se realizaron los ensayos moleculares.

Al Lic. Omar Robledo por el asesoramiento brindado y su importante participación en los análisis moleculares y filogenéticos.

A la Dra. Claudia Etcheberhe, la Qca. Farm. Patricia Draper y la Qca. Farm. Guadalupe Paolino por proporcionarme el Kit de extracción de ADN y el asesoramiento y ayuda.

Al sector de Microbiología del LATU por haberme proporcionado la cepa de *Salmonella* y los cultivos iniciadores del yogur.

Al sector Lácteos del LATU por proporcionarme peróxido de hidrógeno.

A los técnicos en lechería Sergio Borbonet y Rony Pelaggio por su participación en la elaboración del yogur.

Al Dr. Wilner Martínez y al Bach. Luciano Estable por haberme entrenado en cultivos celulares.

Al Laboratorio Tecnológico del Uruguay quienes confiaron en mi propuesta y me dieron todo el apoyo económico sin el cual no se hubiera podido llevar adelante la investigación.

Al Ing. Alberto Pérez Bruno Gerente de Quesos de Conaprole y la Sra. Lucía Stirling Jefa de Desarrollo de Productos de Conaprole, quienes me dieron el aval cuando presenté el proyecto.

Tabla de Contenido

Tribunal.....	2
Dr. Felipe Schelotto (Instituto de Higiene – Facultad de Medicina)	2
Dra. Susana Castro (Facultad de Ciencias – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).....	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Tabla de Contenido	6
Resumen	11
INTRODUCCIÓN	12
INTRODUCCIÓN	13
LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	13
PROBIÓTICOS	14
a) Generalidades	14
b) Requisitos Para una Bacteria que Será Usada Como Probiótico	14
i) Adhesión a Células	15
ii) Reducción o Exclusión de la Adherencia de Patógenos.....	15
iii) Persistencia y Multiplicación	16
iv) Producción de Ácidos, Peróxidos, Bacteriocinas y/o Biosurfactantes	16
v) Ser Seguras.....	17
vi) Capacidad de Coagregación	17
vii) Resistencia al pH Estomacal y a las Sales Biliares	17
PROBIÓTICOS Y SUS USOS TERAPÉUTICOS.....	18
Probióticos en pediatría.....	19
Gastroenteritis Infecciosa	19
Diarrea asociada a antibióticos	20
Enterocolitis necrotizante	21
Alergia y enfermedad atópica en niños.....	21
Infecciones respiratorias	21
Probióticos en cirugía gastrointestinal	22
Vaginitis bacteriana.....	22
Intolerancia a la lactosa y absorción de calcio	23
GÉNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	23

FERMENTOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA	24
Generalidades	24
Yogur.....	24
Probióticos en la Industria Láctea	25
Recomendaciones de la ingesta diaria de probióticos	26
Producción de exopolisacáridos y su interés a nivel industrial	27
SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS PROBIÓTICAS.....	27
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
Objetivos Generales.....	32
Objetivos Específicos	32
CAPÍTULO 1	33
CAPÍTULO 1	34
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN AISLAMIENTO DEL GÉNERO <i>LACTOBACILLUS</i> DE ORIGEN HUMANO	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Aislamientos e Identificación	34
Identificación Molecular	35
Extracción de ADN y PCR.....	35
Electroforesis	36
Precipitación del ADN	36
Análisis Filogenético.....	37
RESULTADOS.....	38
Aislamientos e Identificación	38
Identificación Molecular	40
Análisis BLAST on-line	41
Análisis Filogenético.....	42
DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO 2	46
DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DEL AISLAMIENTO	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Resistencia a sales biliares.....	47
2. Tolerancia al pH.....	47
3. Modelo Gástrico <i>in Vitro</i>	48

4. Actividad Antibacteriana Frente a <i>Salmonella</i> sp.	48
5. Ensayo de Adhesión Evaluado por Radiactividad	49
Desarrollo de la Línea Celular.....	49
Cultivo bacteriano.....	50
Ensayo de Adhesión.....	50
6. Ensayo de Adhesión Evaluado por Recuento y Microscopía.....	51
7. Capacidad para formar biofilms.....	52
8. Producción de glucano insoluble	53
9. Coagregación y Autoagregación	54
Cepas bacterianas	54
10. Producción de Peróxidos	56
Análisis estadístico.....	56
RESULTADOS.....	58
1. Resistencia a sales biliares.....	58
2. Tolerancia al pH.....	59
3. Modelo Gástrico <i>in Vitro</i>	60
4. Actividad Antibacteriana Frente a <i>Salmonella</i> sp.	61
5. Ensayo de Adhesión Evaluado por Radiactividad	62
6. Ensayo de Adhesión Evaluado por Recuento y Microscopía.....	63
7. Producción de polisacáridos extracelulares.....	64
8. Producción de glucano insoluble	65
9. Coagregación y autoagregación.....	66
10. Producción de Peróxidos	68
DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO 3.....	73
CAPÍTULO 3	74
CARACTERIZACIÓN INDUSTRIAL DEL AISLAMIENTO HA9-2.....	74
MATERIALES Y MÉTODOS	74
1. Fermentaciones en Leche.....	74
2. Sensibilidad a antibióticos	75
3. Tolerancia del Aislamiento a 45 °C	76
4. Conservación del Aislamiento por Liofilización.....	77
5. Conservación del Aislamiento por Congelamiento	78
RESULTADOS.....	79

1. Fermentaciones en Leche	79
2. Sensibilidad a Penicilina, Dicloxacilina, Vancomicina y Estreptomicina	82
3. Tolerancia del Aislamiento a 45 °C	87
4. Conservación del Aislamiento por Liofilización.....	88
5. Conservación del Aislamiento por Congelamiento	88
DISCUSIÓN	89
CAPÍTULO 4	92
DISEÑO Y ELABORACIÓN DE UN YOGUR PROBIÓTICO EN PLANTA PILOTO	92
MATERIALES Y MÉTODOS	92
1. Estudios de fermentaciones del aislamiento probiótico en cocultivo con las bacterias del yogur.....	92
Desarrollo del inóculo de las bacterias del yogur	92
Desarrollo de inóculo del aislamiento probiótico	93
Fermentaciones Realizadas	93
Variables Analizadas	94
2. Elaboración del yogur con el agregado del probiótico.....	95
Desarrollo del inóculo para la elaboración del yogur	95
Elaboración de yogures tradicionales y yogures con el agregado del probiótico	95
RESULTADOS	96
1. Estudios de fermentaciones del aislamiento probiótico en cocultivo con las bacterias del yogur.....	96
2. Elaboración del yogur con el agregado del probiótico.....	99
Resultados del análisis estadístico	101
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	103
Conclusiones	104
Perspectivas	105
Publicaciones en revistas arbitradas	105
Presentaciones en eventos científicos	105
ANEXO I – ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
ANEXO II– MEDIOS DE CULTIVO.....	111
ANEXO III– ENSAYOS BIOQUÍMICOS	112
Prueba catalasa.....	112
Procedimiento:	112
Interpretación de resultados.....	112

Coloración de Gram (Técnica de Hucker)	112
Procedimiento:	112
Interpretación:	112
REFERENCIAS	113

Resumen

La utilización de fermentos en la elaboración de productos lácteos es una práctica diaria a nivel industrial. En nuestro país los mismos son comprados a multinacionales extranjeras que se dedican a producir y comercializar fermentos, muchos de los cuales incorporan bacterias probióticas.

*En el presente trabajo se realizó el aislamiento y la identificación por pruebas bioquímicas y moleculares de una cepa de *Lactobacillus paracasei* de origen humano.*

*Con el objetivo de probar propiedades probióticas del aislamiento se llevaron a cabo estudios de resistencia al pH, tolerancia a sales biliares y se realizó un Modelo Gástrico in vitro. Los resultados permiten afirmar que dicho aislamiento presentaría la habilidad de sobrevivir al pasaje a través del tubo digestivo. También se estudió la capacidad de adhesión del aislamiento a células Caco2. Los ensayos que se evaluaron mediante recuento en placa mostraron que cada célula de la línea Caco2 se adhieren 1.33 bacterias de *Lactobacillus paracasei*.*

Además de las propiedades ya mencionadas, es recomendable que una cepa probiótica tenga la capacidad de formar agregados. En este sentido se evaluó su capacidad de autoagregación así como su capacidad de coagregación con bacterias que pueden encontrarse en el intestino. También se buscó analizar la capacidad de producir polisacáridos extracelulares así como peróxido de hidrógeno. De acuerdo a los resultados obtenidos, el aislamiento en estudio presentó la capacidad de formar grandes agregados con las cepas ensayadas. También resultó ser formadora de slime y productora débil de glucano insoluble en agua cuando el medio se suplementó con un 10 % de sacarosa. También se comprobó la producción de peróxido de hidrógeno en el cultivo.

*Para lograr una mayor caracterización se realizaron fermentaciones ácido lácticas (FAL) en leche, se evaluó la actividad antimicrobiana frente a un patógeno gastrointestinal como *Salmonella sp.* y se determinó la sensibilidad a Dicloxacilina, Penicilina y Estreptomicina por medio de un antibiograma modificado.*

*El aislamiento exhibió buen crecimiento en leche. Se detectaron los halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella sp.* y las curvas de inhibición del crecimiento bacteriano en función de las concentraciones de antibiótico.*

Además se realizaron estudios de conservación del aislamiento por congelamiento y liofilización, habiéndose recuperado el 100% de viabilidad a los 80 días post congelamiento.

Para evaluar posibles aplicaciones industriales se llevaron a cabo fermentaciones de la cepa probiótica en cocultivo con cultivos iniciadores de yogur y se realizó la elaboración de un yogur a nivel de planta piloto con muy buenos resultados.

*En conclusión, este aislamiento de *Lactobacillus paracasei* aislada de materia fecal humana es un prometedor candidato a ser usado en la preparación de productos probióticos.*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LA MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal es un ecosistema formado por una gran diversidad de especies bacterianas (Ley *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2010; Aureli *et al.*, 2011) la cual se encuentra en íntimo contacto con la mucosa intestinal o la interfase epitelial. La microbiota, la mucosa y el mucus forman la barrera mucosal, un importante sistema de defensa contra potenciales factores inmunogénicos o patogénicos presentes en el lumen. Esta interfase epitelial separa el lumen que contiene la microbiota y residuos orgánicos de alimentos y secreciones (intestinales, biliares, pancreáticas, gástricas y salivales) del sistema linfoide asociado al intestino (GALT).

Los microorganismos que constituyen la microbiota están distribuidos a lo largo del tracto digestivo, produciendo enzimas que tienen importantes funciones en el aprovechamiento de nutrientes de los alimentos ingeridos y afectando significativamente en sentido positivo el desarrollo del sistema inmune del hospedero (Backhed *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006; Cani *et al.*, 2009; Aureli *et al.*, 2011).

Las células que constituyen el sistema inmune entérico responsables de la defensa frente a patógenos están concentradas en la estructura linfática que se localiza en la lámina propia del tracto gastrointestinal. Numerosas estructuras foliculares y Placas de Peyer forman parte del GALT junto con linfocitos T y B y células presentadoras de antígeno. La microbiota de cada individuo es diferente pero existen al menos 57 especies bacterianas que se consideran comunes en todos los seres humanos (Aureli *et al.*, 2011).

La interacción entre la microbiota y el hospedero genera para ambos ventajas de diferentes tipos. Es vital que el sistema inmune reconozca los componentes de la microbiota y establezca con ellos estados de tolerancia, lo que se logra mediante mecanismos complementarios. Por ejemplo, las bacterias de la microbiota limitan la expresión de factores de virulencia y muchas bacterias comensales son capaces de suprimir el proceso inflamatorio (Caballero *et al.*, 2007; Aureli *et al.*, 2011).

PROBIÓTICOS

a) Generalidades

La palabra probiótico deriva del Latín “pro”- para y del griego “biotic”-vida (Sinagh *et al.*, 2011). En el año 2001 la FAO definió a los probióticos como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico en la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001). Luego de su ingestión deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago y a las sales biliares intestinales, implantándose transitoriamente en el organismo (Gismono *et al.*, 1999; Ronka *et al.*, 2003).

b) Requisitos Para una Bacteria que Será Usada Como Probiótico

Desde el año 1989, Fuller estableció características que debe presentar una cepa bacteriana para ser considerada como probiótico para su empleo en humanos. Debe ser de origen humano, con efectos benéficos demostrados científicamente, estable a las condiciones de almacenamiento y microbiológicamente caracterizada. Entre otros atributos, es recomendable que tenga la capacidad de i) adherirse a las células epiteliales, ii) reducir o excluir la adherencia de patógenos, iii) persistir y multiplicarse en el trato gastrointestinal y/o vaginal, iv) producir ácidos, peróxidos, bacteriocinas y/o biosurfactantes v) ser segura, no invasiva, no carcinógena, no patógena vi) formar agregados y así lograr una flora normal balanceada y vii)

resistir las barreras naturales ofrecidas por el pH gástrico y por las sales biliares en el intestino (Fuller, 1989; Reid, 1999; Scavone, 2003; Reinheimer *et al.*, 2006).

i) Adhesión a Células

La capacidad bacteriana de adherirse a la mucosa intestinal es considerada uno de los principales criterios de selección de probióticos (Ouwehand *et al.*, 1999; Scavone, 2003). El mucus tiene un rol dual en el mantenimiento de la microbiota ya que por un lado proporciona a las bacterias colonizadoras un medio de adhesión inicial y proliferación (Juntunen *et al.*, 2001), y por otro lado un exceso en la secreción del mismo puede inhibir la adhesión bacteriana al epitelio. La adhesión de células probióticas al epitelio intestinal está asociada con la estimulación del sistema inmune (Juntunen *et al.*, 2001).

Los lactobacilos son componentes de la microbiota vaginal normal. Reid sugiere que la adhesión de lactobacilos a las células uroepiteliales interferiría con la adhesión de patógenos por impedimento estérico; también se ha sugerido que la mencionada exclusión puede ser por competencia (Reid, 2001; Scavone, 2003).

ii) Reducción o Exclusión de la Adherencia de Patógenos

Hay cepas de lactobacilos que no presentan propiedades de adhesión pero tienen la capacidad de eliminar patógenos produciendo ácidos, bacteriocinas, peróxidos, etc.

Lactobacillus casei Shirota, por ejemplo, presenta la capacidad de excluir a *Escherichia coli* ya que compiten por los mismos receptores en los sitios de adhesión pero el probiótico presenta más afinidad por los mismos (Lee *et al.*, 2000).

iii) Persistencia y Multiplicación

Según Jacobsen y col. la colonización de las mucosas gastrointestinales y vaginales por *Lactobacillus* spp. es transitoria, por lo que el consumo de dichos probióticos no debe interrumpirse a los efectos de contar con un inóculo permanente (Jacobsen *et al.*, 1999).

iv) Producción de Ácidos, Peróxidos, Bacteriocinas y/o Biosurfactantes

Las bacterias lácticas producen ácido láctico por fermentación. El piruvato, por reacciones alternativas, puede también oxidarse y decarboxilarse hasta producir ácido acético u otros compuestos (Brock *et al.*, 1993).

Algunas bacterias lácticas producen oxidasas o superóxido dismutasas capaces de producir especies oxigenadas como el peróxido de hidrógeno que causan estrés oxidativo, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos. Este mecanismo es utilizado por muchas bacterias y en el caso de los probióticos puede conferir la capacidad de excluir patógenos intestinales (Song *et al.*, 1999; Jimenez, 2010).

Muchas bacterias producen proteínas que inhiben o inactivan especies relacionadas o cepas diferentes de la misma especie, Estos agentes se denominan bacteriocinas. Los grupos de genes que codifican a las bacteriocinas generalmente se localizan en plásmidos aunque también han sido descritas bacteriocinas codificadas por genes cromosomales. (Brock *et al.*, 1993; Scavone, 2003).

Los biosurfactantes son sustancias producidas por los propios microorganismos, que se acumulan en las interfases y facilitan la incorporación de sustratos inmiscibles en agua (De Jonghe *et al.*, 2005). Se ha demostrado que contrarrestan la adhesión y la formación de biofilms de microorganismos patógenos; poseen además propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales e incluso antitumorales (Scavone, 2003, Yañez *et al.*, 2013).

v) Ser Seguras

Las bacterias utilizadas como probióticos deben ser seguras. Para su uso en humanos, las cepas seleccionadas deben ser de origen humano por lo cual en muchas ocasiones se las aísla de materia fecal de bebés lactantes alimentados a pecho exclusivo desde el nacimiento (Reinheimer *et al.*, 2006). Las cepas analizadas hasta el momento han resultado no carcinógenas y no patógenas (Reid, 1999; Scavone, 2003). Ocasionalmente se han relacionado bacterias probióticas con infecciones pero en pacientes inmunocomprometidos (Wagner *et al.*, 1997).

vi) Capacidad de Coagregación

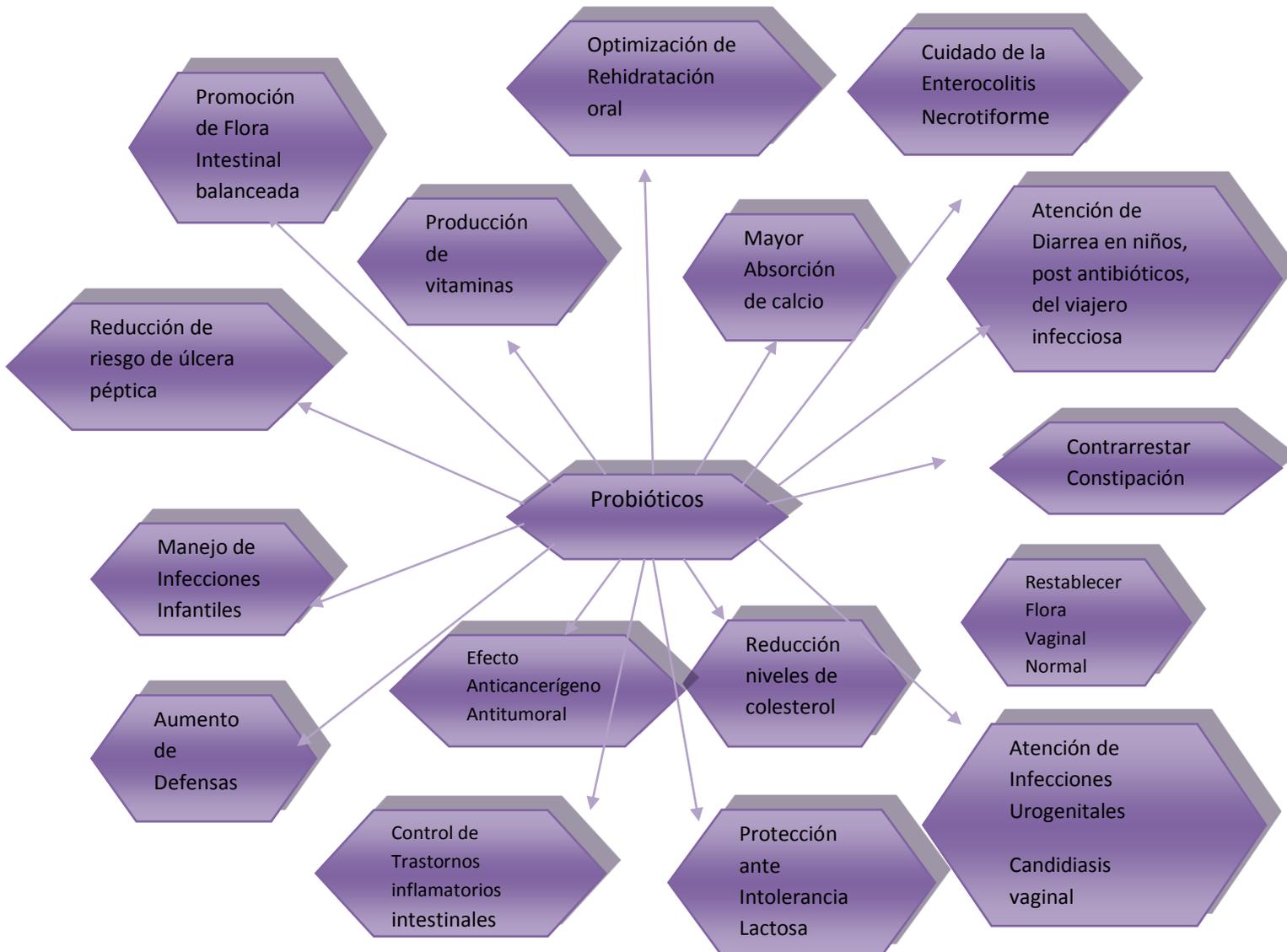
En el caso de los probióticos, la coagregación es la capacidad de formar una microbiota constituida por varias especies de bacterias, entre las que se pueden incluir los patógenos, pero con la condición de que el organismo dominante no sea patógeno por ejemplo *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. En estos casos se busca la coagregación de las bacterias probióticas con componentes de la microbiota urogenital e intestinal y la formación de biofilms estables y no infecciosos (Reid, 1999; Scavone, 2003).

vii) Resistencia al pH Estomacal y a las Sales Biliares

Los lactobacilos presentes en el intestino provienen de la dieta por lo que tienen la capacidad de sobrevivir al pH estomacal y las sales biliares (Reid, 2001). Cuando se seleccionan cepas para ser utilizadas como probióticos las mismas deben lograr sobrepasar estas barreras biológicas así como la acción de enzimas propias de la digestión (Reinheimer *et al.*, 2006).

PROBIÓTICOS Y SUS USOS TERAPÉUTICOS

Los probióticos han sido utilizados terapéuticamente con muchos fines, principalmente como alternativa al consumo de antibióticos (Esquema 1). Se los ha utilizado para modular la inmunidad en lo referente a alergias producidas por antígenos alimentarios, disminuir el colesterol, prevenir el cáncer, mejorar la intolerancia a la lactosa de pequeños lactantes, en diarrea y constipación, en infecciones urinarias, en infecciones gastrointestinales y en la candidiasis vaginal, entre otros usos (Reid, 1999; Scavone, 2003; Sinagh *et al.*, 2011).



Esquema 1. Usos terapéuticos de las bacterias probióticas (datos obtenidos de Ballabriga, 2001).

Probióticos en pediatría

En las primeras etapas de la vida los mecanismos de inmunidad innata son los más importantes. El calostro y la leche de pecho aumentan la resistencia a infecciones entéricas ya que pasan a través de la leche factores antimicrobianos (inmunidad pasiva) (Aureli *et al.*, 2011). Por otra parte se comienzan a producir funciones inmunes específicas ya que el sistema inmune del neonato debe comenzar a dar respuesta ante patógenos y a su vez tolerar antígenos de la dieta y de bacterias no patógenas. La falta de respuestas adecuadas en este sentido conduce a infecciones recurrentes, inflamatorias, así como enfermedades autoinmunes y alergias (Zuccotti *et al.*, 2008). En este sentido es crítico el proceso de educación del sistema inmune durante las primeras horas de vida, a las cuatro horas del nacimiento la microbiota intestinal del bebé ya comienza a formarse, se produce la transferencia de antígenos de la microbiota transmitidos de la madre al hijo durante las primeras 48 horas de contacto (Zuccotti *et al.*, 2008). La producción de IgA secretoria es uno de los mecanismos inmunológicos básicos que permite la tolerancia oral y la protección contra patógenos. Los lactantes alimentados con fórmulas suplementadas con probióticos presentan una producción natural de esta inmunoglobulina. Se ha demostrado el efecto de los probióticos en la prevención y el control de desórdenes gastrointestinales agudos y crónicos (Zuccotti *et al.*, 2008).

Gastroenteritis Infecciosa

Muchos estudios recientes han demostrado la eficiencia de cepas probióticas específicas en la reducción de los síntomas producidos por gastroenteritis infecciosas (Davidson *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*; 2004; Guandalini *et al.*, 2006; Michail *et al.*, 2006; Szajewska *et al.*, 2006). Los probióticos pueden reducir la duración de la diarrea en cuanto a los días así como disminuir la frecuencia de los episodios diarreicos en las primeras horas (Van Niel *et al.*, 2002; Binns *et al.*, 2010).

En el caso de gastroenteritis por rotavirus se ha utilizado una terapia combinada de rehidratación oral con *Lactobacillus GG* con muy buenos resultados (Guandalini *et al.*, 2000; Szajewska *et al.*, 2001; Szymanski *et al.*, 2006).

El consumo de productos probióticos al parecer favorece la capacidad de restablecer la biota intestinal tras episodios de diarrea en niños e interfiere con el desarrollo de patógenos, por mecanismos de competencia de la adhesión o por la producción de sustancias antibacterianas (Reid, 1999; Ballabriga, 2001; Senok *et al.*, 2005). Por este motivo, uno de los criterios de selección de probióticos es la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos gastrointestinales como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* (Annuk *et al.*, 2003; Saarela *et al.*, 2005; Calderon, *et al.*, 2007). En este sentido, no se pueden sacar conclusiones definitivas ni generalizadas ya que los resultados con infecciones bacterianas son aún poco concluyentes (Aureli *et al.*, 2011).

Se precisan más investigaciones para definir mejor los microorganismos probióticos efectivos y las dosis óptimas (Binns *et al.*, 2010). Hasta el momento los resultados más prometedores se han asociado a *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, y *Bifidobacterium bifidum*.

Diarrea asociada a antibióticos

Muchos antibióticos inducen la producción de diarrea durante o después de su utilización. Estudios recientes demuestran una disminución de la diarrea asociada a antibióticos cuando el tratamiento se realiza combinado a la administración de probióticos (Cremonini *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2002; Szajewska *et al.*, 2006 a; Aureli *et al.*, 2011). La efectividad del tratamiento es cepa dependiente siendo *Lactobacillus GG* y *Saccharomyces boulardi* los que cuentan con más evidencia en este sentido (D'Souza *et al.*, 2002; Szajewska *et al.*, 2006 a; Binns *et al.*, 2010).

Enterocolitis necrotizante

La enterocolitis necrotizante es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en prematuros, en los cuales se produce una respuesta inflamatoria exagerada dándose una necrosis isquémica en el intestino. Una reciente revisión sobre el tema muestra que el tratamiento con probióticos en bebés prematuros y de bajo peso al nacer disminuye el riesgo de ocurrencia y/o muerte por esta enfermedad (Deshpande *et al.*, 2010; Aureli *et al.*, 2011).

Alergia y enfermedad atópica en niños

En 2007 se realizó un estudio con 187 pacientes, de los cuales 119 sufría de asma, 131 de rinitis y 63 presentaban ambos síntomas, todos niños entre dos y cinco años. La administración del probiótico *L. casei* DN-114001 redujo en un 36 % la ocurrencia de rinitis. El estudio mostró que la colonización del probiótico persistió de seis a ocho meses en la mayoría de los niños analizados. Son numerosos los estudios que demuestran la efectividad de los probióticos en las diferentes reacciones alérgicas (Kukkonen *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Valsecchi *et al.*, 2008,) pero los resultados no son concluyentes salvo para eccema atópico. Recientes revisiones afirman que falta evidencia que apoye el uso de probióticos para dermatitis atópica: la evidencia apunta a una mayor eficiencia en su prevención que en su utilización como tratamiento (Boyle *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Van der *et al.*, 2010).

Infecciones respiratorias

Recientes estudios muestran efectos positivos de los probióticos sobre el sistema respiratorio, principalmente en la prevención y reducción de las infecciones respiratorias por el aumento de la secreción de IgA en la mucosa bronquial (Aureli *et al.*, 2011).

Probióticos en cirugía gastrointestinal

Si bien la microbiota intestinal contribuye de manera importante en la salud del hospedero, en situaciones de estrés como como las que se producen post cirugía gastrointestinal, se pueden producir infecciones originadas en la microbiota del paciente, fenómeno que se conoce como “origen intestinal de la sepsis”. La evidencia científica muestra que algunos probióticos contribuyen a la prevención de infección en pacientes quirúrgicos, pero la administración de probióticos debe ser ensayada cuidadosamente previo a su uso en paciente críticos (Correia *et al.*, 2012).

Vaginitis bacteriana

La vaginitis bacteriana es una condición bastante común que se caracteriza por un reemplazo de *Lactobacillus* spp. de la vagina de la mujer por bacterias anaerobias como *Atopobium*, *Prevotella*, *Gardenerella* y *Mobiluncus* spp. o *Mycoplasma* intracelular así como bacterias aerobias-anaerobias facultativas como *E. coli* y *Enterococcus* spp. (Anukam *et al.*, 2006). Esto causa un aumento de pH y en muchos casos mal olor. El tratamiento común se basa en administración oral o vaginal de metronidazol o clindamicina, pero en general no es altamente efectivo y se produce una recurrencia de la infección. Se ha demostrado la efectiva utilización de los lactobacilos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* RC-14 en el tratamiento de la vaginitis bacteriana con un 90 % de efectividad (Anukam *et al.*, 2006).

También se ha probado que un lactobacilo endógeno vaginal con propiedades probióticas puede interferir con la presencia de *Gardnerella* por alteración de los biofilms formados por este patógeno, reduciendo de esta forma el riesgo de vaginitis bacteriana (Saunders *et al.*, 2007; Mc Millan *et al.*, 2011).

Intolerancia a la lactosa y absorción de calcio

La intolerancia a la lactosa, causada por la falta de la enzima *beta-galactosidasa* cuya función es clivar la lactosa liberando glucosa y galactosa para ser metabolizada, afecta al 70 % de la población mundial. Dietas deficientes en lácteos llevan a estos pacientes a sufrir osteoporosis. La incorporación de probióticos en productos lácteos fermentados puede producir *lactasa* bacteriana en el medio (un tipo de *beta-galactosidasa* que se produce en el intestino delgado), lo que disminuye la concentración de lactosa y por ende los síntomas en las personas que presentan esta intolerancia. Esto permite incorporar este tipo de alimentos en sus dietas, favoreciendo además la absorción de calcio (Singh *et al.*, 2011).

GÉNERO LACTOBACILLUS

Es importante destacar que las capacidades de una determinada cepa que la llevan a ser considerada probiótica son exclusivas de esa cepa y no se pueden realizar extrapolaciones a especies o géneros (Aureli *et al.*, 2011). Diferentes cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son las que más comúnmente se utilizan por sus propiedades probióticas, tanto en la industria alimentaria como farmacéutica. También se utilizan algunas levaduras y cepas del género *Bacillus*. Los lactobacilos se caracterizan por ser bastones de longitud variable con disposición en cadenas (Scardovi, 1986; Brock *et al.*, 1993). Las especies son en su mayoría homofermentativas, encontrándose algunas heterofermentativas. Son más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, pudiéndose desarrollar bien a valores de pH 5. Por este motivo son responsables de las etapas finales en las fermentaciones ácido lácticas naturales.

FERMENTOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

Generalidades

La utilización de fermentos en la elaboración de productos lácteos es una práctica que se realiza hace cientos de años en todo el mundo. En nuestro país las compañías nacionales y multinacionales productoras de lácteos compran los cultivos iniciadores a empresas extranjeras que se dedican a desarrollar y producir fermentos. Los fermentos lácticos o cultivos iniciadores se pueden definir como cultivos de microorganismos utilizados para producir cambios bioquímicos durante la elaboración y maduración de los diversos productos lácteos (Sandine, 1985; Borbonet, 2001). Están constituidos por bacterias que fermentan la lactosa produciendo ácido láctico junto a bacterias que fermentan el ácido cítrico y los citratos para obtener diversos aromas (Madrid, 1990).

Debido al alto costo que significa para la industria láctea nacional importar los *starters*, es de suma importancia contar con cepas nativas que presenten propiedades que permitan definir las como probióticas, que puedan ser incorporadas a procesos productivos, disminuyendo así los costos de producción.

Yogur

El yogur es el producto ácido y coagulado elaborado con el cultivo mixto de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada de vaca, oveja, búfala y cabra, de forma que los microorganismos estén presentes y viables en el producto en un mínimo de 10 millones de bacterias por gramo (Tamime *et al.*, 1991). Frecuentemente se fabrican yogures con fines dietéticos o terapéuticos que tienen la particularidad de incorporar bacterias probióticas (Hekmat *et al.*, 2009).

Probióticos en la Industria Láctea

Los probióticos, han sido incorporados en tabletas, cápsulas, cereales, fórmulas infantiles y derivados lácteos como las leches fermentadas, leches acidófilas dulces, yogur y, más recientemente, queso (Saito, 2004; Taranto *et al.*, 2005; Sinagh *et al.*, 2011). Las cepas probióticas seleccionadas para ser utilizadas en la industria láctea deben satisfacer no solo los criterios probióticos sino también criterios químicos y tecnológicos como ser:

- i) **propagación económica**, por lo cual deben ser capaces de crecer en medios de bajo costo como por ejemplo el suero de queso (Charteris *et al.*, 1998a; Reinheimer *et al.*, 2006).
- ii) **viabilidad durante la propagación**, ya que durante la producción a escala industrial las bacterias están sujetas al estrés oxidativo durante la propagación, estrés térmico y químico (por ejemplo durante el congelamiento), efectos de pH, etc (Reinheimer *et al.*, 2006).
- iii) **sensibilidad a antibióticos**, en este sentido es deseable que las especies probióticas presenten sensibilidad a los antibióticos que se utilizan comúnmente en los tratamientos para humanos, siendo seguras en este aspecto, ya que de darse una transferencia horizontal de genes a nivel del intestino sería posible el pasaje de genes de resistencia hacia bacterias patógenas (Charteris *et al.* 1998 b; Reinheimer *et al.*, 2006).
- iv) **ser capaces de crecer y vivir en leche**, así como proporcionar características sensoriales aceptables (Reinheimer *et al.*, 2006).
- v) **interacciones con otras especies**, se deben controlar los efectos antagónicos o sinérgicos que se pueden dar entre las diferentes cepas que integren un cultivo mixto para la elaboración de productos probióticos fermentados; no se deben presentar efectos inhibitorios de los cultivos

iniciadores hacia los probióticos (Vinderola *et al.*, 2002; Reinheimer *et al.*, 2006).

- vi) sobrevivir durante el procesamiento y almacenamiento del producto**
(Reinheimer *et al.*, 2006).

Recomendaciones de la ingesta diaria de probióticos

La concentración mínima de microorganismos probióticos así como el período óptimo de su administración para provocar efectos benéficos aún no está clara. La definición de probióticos solo establece que los mismos deben administrarse en “cantidades adecuadas”. La dosis puede depender del vehículo que acompañe al microorganismo, de la cepa utilizada y del estado nutricional e inmunológico del individuo (Saxelin *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 1996; FAO, WHO; 2006).

En Japón se desarrolló un estándar para leches fermentadas y bebidas de bacterias ácido lácticas en el cual se estipuló un valor de 1×10^7 ufc por g o mL para ser considerado un alimento probiótico dosis que es recomendada por varios autores (Ishibashi *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995) . Otros autores señalan que un producto fermentado debería contener 10^6 ufc por gramo de producto al momento de ser consumidos (Rybka *et al.*, 1995; Blanchette *et al.*, 1996; Gómes *et al.*, 1999).

Para Vinderola *et al.* (2000) la ingesta diaria debe ser mayor a 100 gramos de producto que contengan 10^6 ufc/g de bacterias viables, sugiriendo como dosis terapéutica diaria de 10^8 .

Producción de exopolisacáridos y su interés a nivel industrial

Muchas bacterias, en especial las lácticas, acompañan su crecimiento con la producción de polisacáridos extracelulares (EPS). Estos polisacáridos pueden permanecer unidos a la bacteria como cápsulas o pueden ser liberados al medio como *slime*. Los EPS pueden ser de importancia para la bacteria que los produce por su participación en los procesos de adhesión, infección en el caso de patógenos (Hettwer *et al.*, 1995; Wilches, 2004) y protección (Von Wright *et al.*, 1987; Gamar *et al.*, 1997; Charteris *et al.*, 1998; Jimenez, 2010; Nicolaus *et al.*; 2010). Los mismos presentan a su vez un valor comercial ya que muchos tienen propiedades de gelificación, emulsión, estabilización, aumento de la viscosidad, son fuente de monosacáridos, etc. Es una práctica corriente su utilización en la elaboración de alimentos ya sea como aditivos naturales o mediante el uso de cultivos productores de EPS *in situ*. Se obtienen por esta vía productos con texturas mejoradas y con potenciales beneficios para la salud del consumidor (Roberts *et al.*, 1995; Reinheimer *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS PARA BACTERIAS PROBIÓTICAS

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible (NCCLS, 1999). Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas. Las primeras pruebas de difusión en agar se realizaron inoculando la superficie de una placa de agar con el microorganismo en estudio, colocando pequeñas cubetas (de metal o vidrio) sobre el agar y agregando las soluciones de los diferentes antimicrobianos dentro de ellas

(Wheat P., 2001). Los agentes antimicrobianos difundían en el medio en forma radial alrededor de la cubeta e inhibían el desarrollo del microorganismo en la zona donde su concentración era suficientemente alta. Las áreas de inhibición grandes indicaban una actividad antimicrobiana más efectiva. Este método fue modificado en 1947 por Bondi y col. incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel de filtro lo cual significó un gran adelanto ya que se podían preparar un gran número de pruebas idénticas. En 1966, después de los estudios realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CIM correspondientes (Bauer *et al.*, 1966). Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido, y aun es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo. El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas a la temperatura adecuada de acuerdo al tipo de microorganismo y al cabo de este tiempo se estudia el halo de inhibición del crecimiento alrededor del filtro. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por el NCCLS (ahora CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute). Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas.

Los antibiogramas típicos están desarrollados utilizando el medio Mueller Hinton, diseñados para evaluar la sensibilidad de bacterias patógenas y no para probióticos. Según el “Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos” realizado en Argentina en el año 2001 (FAO/WHO, 2001), el mismo expresa en el

punto 7.1, en relación a los perfiles de resistencia antimicrobiana de los probióticos...”, en la actualidad no se dispone de métodos fenotípicos normalizados que estén reconocidos internacionalmente para los lactobacilos y las bifidobacterias (no patógenos). La consulta reconoció la necesidad de elaborar ensayos normalizados para establecer perfiles de resistencia a los medicamentos en los lactobacilos y las bifidobacteria”, aspecto que fue ratificado por la consulta a expertos realizada por la FAO en el 2006.

En la Unión Europea las bacterias probióticas para uso como aditivos en raciones para animales deben cumplir con las características descritas en la directiva 87/153/EEC (Danielsen, 2003). La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) definió puntos de corte microbiológicos que permiten categorizar a las bacterias lácticas como resistentes o susceptibles. Los mismos surgen del estudio de la distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los antimicrobianos elegidos en poblaciones pertenecientes a una unidad taxonómica única (especie o género). La parte de la población que se desvía claramente de la población normal susceptible es categorizada como resistente. Los datos utilizados para definir estos puntos de corte fueron tomados de investigaciones publicadas y de programas de monitoreo europeos (EFSA, 2012).

HIPÓTESIS

“Existen aislamientos nativos de origen humano del género *Lactobacillus* que presentan características que permiten considerarlos como probióticos”.

“Dichos aislamientos pueden ser incorporados a cultivos iniciadores con la finalidad de producir yogur”.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Obtener un aislamiento de *Lactobacillus* sp. de origen humano con propiedades probióticas.

Estudiar la posibilidad de utilizar dicho aislamiento en un cultivo iniciador de un yogur.

Objetivos Específicos

Aislar e identificar cepas del género *Lactobacillus spp.* de origen humano.

Seleccionar una como candidata a ser caracterizada y empleada como probiótico.

Evaluar el potencial probiótico del aislamiento seleccionado.

Estudiar el comportamiento del aislamiento probiótico cultivado en presencia de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* de origen comercial.

Realizar la elaboración de un yogur a nivel de planta piloto.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN AISLAMIENTO DEL GÉNERO *LACTOBACILLUS* DE ORIGEN HUMANO

El objetivo del presente capítulo fue obtener aislamientos nativos de lactobacilos de origen humano, realizar caracterizaciones fenotípicas por pruebas bioquímicas primarias y secundarias y seleccionar uno para su caracterización genotípica. La identificación se realizó por observación morfológica de las colonias desarrolladas, tinción de Gram, prueba catalasa, crecimiento en microaerofilia y aerobiosis y un test comercial API 50 CH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) que consiste en la realización de 49 fermentaciones de diferentes azúcares. La identificación molecular se realizó en base a la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S, comparación con la base NCBI y un posterior análisis filogenético de la secuencia obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos e Identificación

A partir de materia fecal de un bebé lactante de cuatro meses alimentado a pecho exclusivamente desde el nacimiento, se realizó un cultivo en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe, OXOID) por 24 hs, en una jarra de microaerofilia (AnaeroJar, OXOID), sin agitación, a una temperatura entre 37-40 °C (Annuk *et al.*, 2003). A partir del mismo se realizaron aislamientos y sucesivos reaislamientos en MRS agar en las mismas condiciones para obtener colonias puras. A los efectos de verificar la pureza de los cultivos se realizaron cultivos en el medio no selectivo PCA (Plate Count Agar, OXOID), a 37°C en condiciones tanto de aerobiosis como de microaerofilia. Los aislamientos fueron sometidos a la prueba de producción de catalasa, tinción de Gram, observación morfológica del tipo de colonias que se desarrollaron,

crecimiento en aerobiosis y microaerofilia y un test para *Lactobacillus* API 50 CH, analizado por el API LAB Plus software Versión 4.0 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Los aislamientos de lactobacilo se conservaron a -20 °C y -80 °C utilizando como crioprotectores glicerol al 20 % y leche en polvo descremada reconstituída al 10% previamente tratada a 113 °C por 15 minutos.

Identificación Molecular

Extracción de ADN y PCR

A los efectos de completar la identificación se realizó la extracción del ADN genómico con el Kit Promega, Wizard ® Genomic DNA Purification Kit, USA, para realizar posteriormente una PCR con los cebadores universales para el gen que codifica el ARNr 16S 8-27 de avance y 1492 reverso, secuencia (5' a 3') AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y GGTTACCTTGTTACGACTT respectivamente (Hugenholtz *et al.*, 1998; Lane, 1991; Rappe *et al.*, 2003). El ADN amplificado se envió para su secuenciación al Instituto Pasteur de Montevideo. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base NCBI y analizadas por el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analyzer) versión 4.

La reacción de PCR se realizó utilizando Taq polimerasa (FERMENTAS), buffer PCR (concentración final Tris-HCl 10 Mm, KCl 50 mM, sin magnesio), MgCl₂ 1.5 mM y desoxinucleótidos trifosfato (Espinosa, 2007). La concentración de cebadores utilizada fue 10 µM y de desoxinucleótidos 200 µM. Se utilizaron 1 µl del ADN extraído de los cultivos puros y 1.0 U de Taq polimerasa en un volumen total de reacción de 100 µl. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C por 5 min seguida de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización 94 °C 1 min, hibridación de cebadores 55 °C 1 min, elongación 72 °C 3 min) y una extensión final por 7 min a 72

°C seguida de 4 °C 10 min. Para excluir la posibilidad de fallas en la extracción del ADN y/o la presencia de inhibidores en las muestras, dos ADN genómicos bacterianos se sometieron a PCR con los cebadores universales. Se utilizó como control negativo agua ultrafiltrada. La calidad del ADN extraído se verificó por electroforesis.

Electroforesis

El ADN genómico extraído y el producto de la amplificación por PCR se cuantificaron en un gel de agarosa al 1% en buffer Tris-Acetato 40 mM -EDTA 1mM (TAE 1X) pH 8,5 al que se le adicionó bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó un marcador que permitió realizar una cuantificación del tamaño (número de pb) del producto de PCR, LADDER PLUS (FERMENTAS LIFE SCIENCE). Se preparó adicionando 1 µl de ladder a 3 µl de H₂O y 1 µl de buffer de carga. La solución de corrida contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % de azul de bromofenol, 0,03 % de xieno cianol FF, 60 % de glicerol y 60 mM EDTA.

Precipitación del ADN

El ADN producto de la reacción de PCR se precipitó por adición de cuatro volúmenes de etanol absoluto a la muestra, se dejó actuar 30 min y se centrifugó 30 min a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante con pipeta. Se procedió a lavar con 100 µl de etanol 70 % durante 10 min en frío. Pasado el tiempo se centrifugó a velocidad máxima 10 min. El sobrenadante se retiró con pipeta y se secó en estufa 8 min a 50 °C para eliminar todos los restos de alcohol. Se resuspendió el *pellet* en la mitad de agua y se volvió a cuantificar en una electroforesis por comparación de la intensidad de la banda con un marcador de concentración conocida.

Análisis Filogenético

Con las secuencias obtenidas se realizaron comparaciones con la base de datos de GenBank por medio de la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente se obtuvieron las secuencias de algunas de las cepas que presentaron homología y se procedió a un análisis filogenético incluyendo la secuencia de interés (llamada 27F OR para la región 5') y otras obtenidas de dicha base de forma independiente (ej: *Lactobacillus acidophilus*).

Se generó un árbol filogenético construido a partir del método de Neighbor Joining utilizando el algoritmo de Jukes-Cantor para la construcción de la matriz de similaridad. Asimismo se realizó un test de "Interior Branch" de 1000 réplicas, para determinar el porcentaje de confiabilidad en las construcciones de los agrupamientos.

RESULTADOS

Aislamientos e Identificación

Luego de 154 aislamientos y reaislamientos en MRS agar, se obtuvieron dos aislamientos que según su identificación primaria resultaron Gram positivos (Imagen 1), exhibieron buen crecimiento aerobio y anaerobio, prueba catalasa negativa, bacterias no móviles y no esporuladas y disposición en bastones encadenados. Según la identificación realizada con el API 50 CH (Imagen 2, Tabla 1) uno de ellos correspondería a *Lactobacillus acidophilus* con un perfil dudoso (85 % de confianza) el que se denominó HA9-1 y el otro sería un *Lactobacillus paracasei* con un 97 % de confianza que se denominó HA9-2. Se decidió continuar los estudios con este último aislamiento por no haber productos en nuestro país que contengan esta especie de lactobacilo.

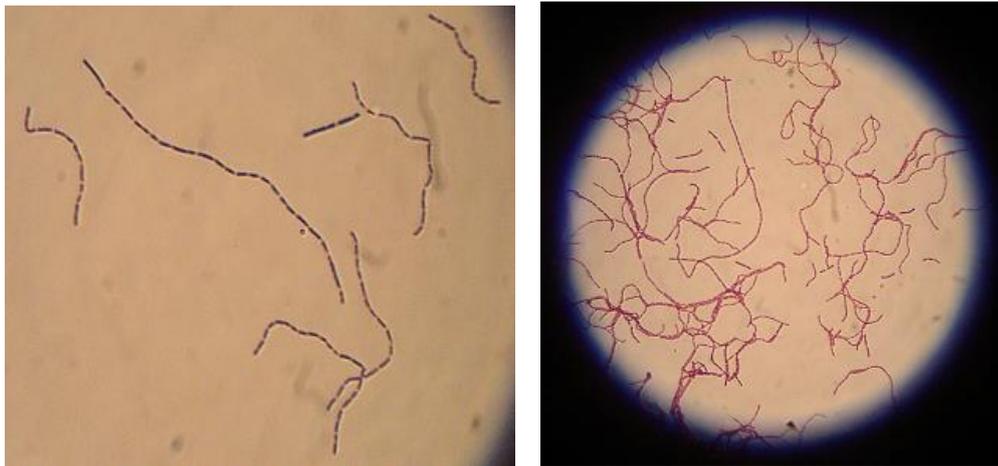


Imagen 1. Fotografías de tinciones de Gram del aislamiento seleccionado.

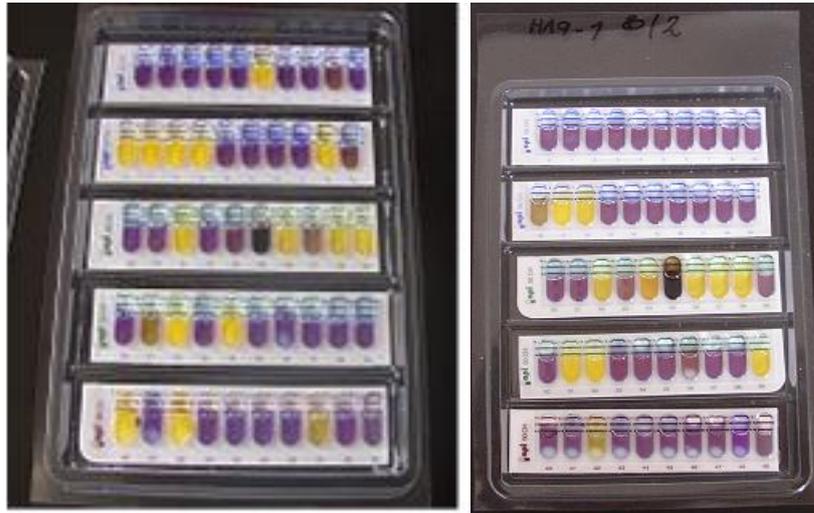


Imagen 2. Resultado del API para el aislamiento HA9-2 (izquierda) y HA9-1 (derecha).

Galería	Identificación	Taxón	Pruebas en contra
API 50 CHL V5.1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97.5	MDG,21, LAC,29 INU,33,
API 50 CHL V5.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	85.2	GAL,75,MNE,96

Tabla 1. Resultados de identificación del API 50 CH realizados a la cepa HA9-2 (arriba) y HA9-1 (abajo).

Identificación Molecular

En la electroforesis (Imagen 3) se observó una sola banda de amplificación de un tamaño aproximado de alrededor de 1500 pb, tamaño esperado para el gen que codifica para el ARNr 16 S en bacterias según los cebadores utilizados; con este resultado se confirmó que el protocolo de PCR empleado fue efectivo para el aislamiento bacteriano seleccionado.

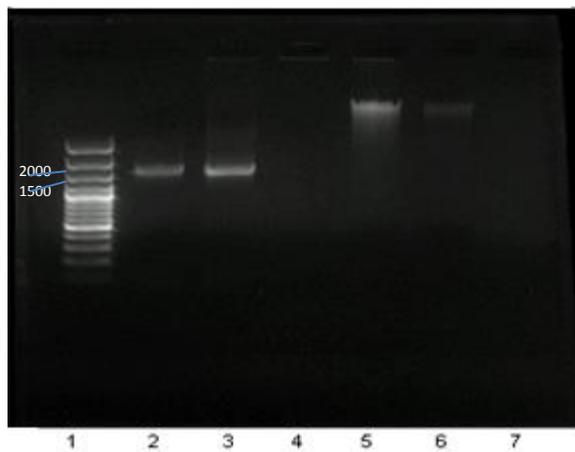


Imagen 3. Gel de agarosa del ADN extraído y de los productos de PCR. Carril 1 marcador de tamaño, carril 2 control positivo de PCR (ADN genómico), carril 3 fragmento amplificado, carril 4 control negativo de la PCR, carril 5 y 6 ADN genómico extraído.

Como resultado de la secuenciación se obtuvo una secuencia de aproximadamente 300 pares de bases, correspondiente a la región 3' (no mostrado) y una secuencia de aproximadamente 700 pb correspondiente a la región 5' prima (Figuras 1).

```
CTGCCCTTAANTGNNGGATNACATTTGGAANCNGATGNTAATANCGCATAGATCCNANAACCGCATGNTT
CTTGGCTGANNGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTANCTAGTTGGTGAGGT
AATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGCCAATTGGGACTGAGACACG
GCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAC
TGTTGNCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTANGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCANGCGGTTTTTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGAANTGCGTANANNTATGG
```

Figura 1. Secuencia de la región 5' del producto de PCR (ADNr 16S).

Análisis BLAST on-line

En la Tabla 2 se presenta la lista de las secuencias y cepas que presentaron homología con la secuencia problema luego de la realización del BLAST on-line en la base de datos de GenBank.

Tabla 2. Lista de las secuencias de las especies y cepas de GenBank que presentaron homología en el BLAST on-line con la secuencia 5' y se usaron en el análisis filogenético.

Nº de acceso en NCBI	Especie	% de identidad
EU187503.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain IMPC 2.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Sisto <i>et al.</i> 2009)	97 %
AB362764.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 1944	97 %
AB362763.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 1942	97 %
AB362762.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 1940	97 %
AB362702.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0638	97 %
EF697963.1	Uncultured <i>Bacilli bacterium</i> clone MS082A1_H10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Frank <i>et al.</i> 2007)	97 %
DQ413240.1	<i>Lactobacillus casei</i> strain Ru2-2i 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97 %
AY675252.1	<i>Lactobacillus casei</i> strain LC3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97 %
AF306539.1	<i>Lactobacillus sp.</i> P8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (Pourcher <i>et al.</i> 2001)	97 %
AB219051.1	<i>Lactobacillus sp.</i> L02 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence (Haruta <i>et al.</i> 2006)	97 %
AB070609.1	<i>Lactobacillus sp.</i> B5406 gene for 16S rRNA (Uchida <i>et al.</i> 2004)	97 %
AY363372.2	<i>Lactobacillus sp.</i> rennanqilfy14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96 %
AY339128.2	<i>Lactobacillus sp.</i> rennanqilyf5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	96 %

Análisis Filogenético

El análisis de la relación filogenética de la secuencia 5' (27f OR) con el método de Neighbor Joining utilizando el algoritmo de Jukes-Cantor para la construcción de la matriz de similaridad, agrupó a la secuencia blanco con 99 % de confiabilidad en el cluster dominado por las secuencias correspondientes a *L. paracasei* (Figura 2).

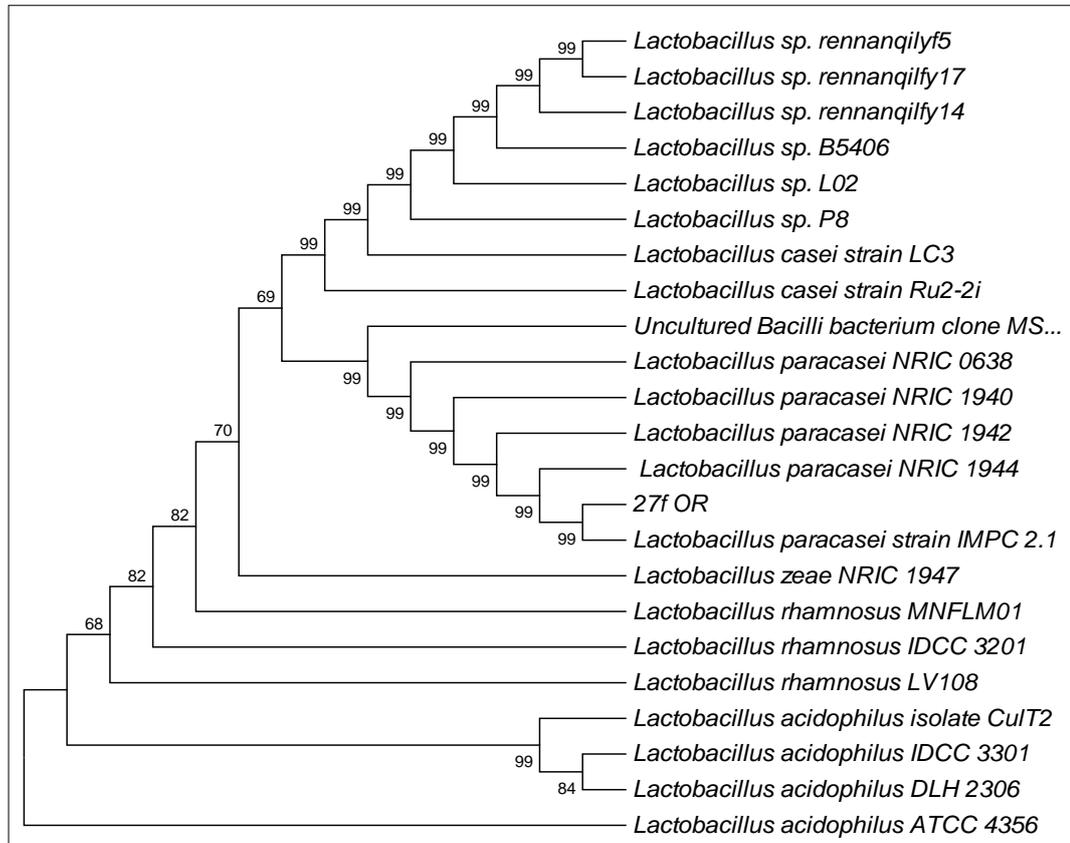


Figura 2. Árbol filogenético utilizando método Neighbor Joining con distancia de Jukes-Cantor, se indica porcentaje de confiabilidad para la construcción de cada rama.

DISCUSIÓN

Según los resultados de las pruebas bioquímicas el aislamiento seleccionado corresponde al género *Lactobacillus*. Del Api 50 CH se desprende que el mismo corresponde a la especie *L. paracasei* con un 97 % de confianza.

La secuencia nucleotídica obtenida para la región 3' fue muy corta y presentó muchos N (nucleótidos no determinados) por lo que se decidió no incluirla en el análisis.

Del análisis molecular realizado con el producto de amplificación de la región 5' surge que a pesar de que el tamaño de la secuencia no es el óptimo para un análisis como el que se llevó a cabo, que no se editaron los cromatogramas para intentar mejorar la secuencia que presentaba algunos N, y el alto grado de conservación observado en esta región del gen ribosomal 16S, los resultados obtenidos revelaron una relación de dicha secuencia con cepas de la especie *Lactobacillus paracasei*.

Con base en los resultados bioquímicos y moleculares obtenidos podemos sugerir entonces que se aisló una cepa pura de *Lactobacillus* sp. con una alta probabilidad de corresponder a la especie *L. paracasei*.

Sería aconsejable volver a realizar la secuenciación con el objetivo de obtener secuencias solapantes y poder reconstruir una única secuencia para realizar los análisis filogenéticos. También se puede plantear la utilización de cebadores internos para obtener secuencias más cortas.

La elección de la base NCBI no fue la más adecuada ya que la comparación es más confiable si se realiza utilizando la base de datos de secuencias ribosomales (RDP), que está curada, para confirmar la identidad (www.cme.msu.edu/RDP/) según la recomendación de la consulta de expertos de la FAO (FAO, 2006).

Dado que las propiedades probióticas son cepa específicas la consulta de expertos de la FAO (2006) plantea que luego de la identificación con el ADN que codifica para el ARNr 16S se debería completar dicha caracterización genética con la realización de técnicas internacionales como Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, en este sentido se deberían completar los estudios moleculares para poder contar con un enfoque polifásico que nos permita hablar de género y especie.

De todos modos, esta fase del estudio permitió disponer de probable aislamiento de *L. paracasei* para el desarrollo final de un producto con potencial probiótico. Esta especie ha sido reportada en forma frecuente en la literatura como probiótico en particular en la manufactura de productos lácteos (Ganesan *et al.*, 2014; Lavari *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DEL AISLAMIENTO

Los probióticos deben sobrepasar algunas barreras biológicas; entre otras un pH ácido a nivel del estómago, la exposición a sales biliares y la acción de enzimas como la pepsina. Una vez en el intestino, las bacterias probióticas deben tener la capacidad de colonizar el órgano, para lo cual serían relevantes los mecanismos de adhesión bacteriana al mucus y a la superficie celular. Su adhesión involucraría la activación del sistema inmunitario del huésped y la exclusión de bacterias patógenas como requisito para su actividad probiótica.

Con el objetivo de probar propiedades probióticas del aislamiento, en el presente capítulo se llevaron a cabo estudios de resistencia al pH, tolerancia a sales biliares y se realizó un Modelo Gástrico *in vitro*. También se estudió la capacidad de adhesión del aislamiento HA9-2 a células Caco2, derivadas de adenocarcinoma de colon, empleadas como un modelo de intestino y la actividad antibacteriana ante un importante patógeno alimentario como es *Salmonella* spp.

Para que una cepa sea considerada probiótica además de las propiedades ya mencionadas es recomendable que tenga la capacidad de formar agregados. En este sentido se evaluó su capacidad de autoagregación así como su capacidad de coagregación con bacterias que pueden encontrarse en el intestino como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Escherichia coli*. Además se buscó analizar la capacidad de producir biofilms mediante la determinación de la producción de *slime* por la técnica de macrométodo en tubo y la producción del exopolisacárido glucano. Con el objetivo de determinar si el aislamiento HA9-2 era productor de peróxido de hidrógeno, mecanismo utilizado por muchas bacterias

para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, y en el caso de los probióticos para excluir patógenos intestinales, se analizó su producción en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Resistencia a sales biliares

La sensibilidad bacteriana a las sales biliares se analizó sobre placas de MRS conteniendo 0.5 % y 0.9 % de sales biliares deshidratadas (Difco) y sobre agar sin sales biliares como control (Klaenhammer *et al.*, 1995). Las placas se incubaron por 24 y 48 hs y posteriormente se realizaron los recuentos.

En resumen, a partir de una placa de cultivo fresco se transfirieron colonias a un tubo que contenía solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %) y se ajustó la concentración celular en 1.5×10^8 ufc/ml por medida de absorbancia a 560 nm. Se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril para poder realizar recuento en superficie. Se sembraron 0.1 ml de la dilución correspondiente en placas conteniendo MRS y MRS con 0.5 % y 0.9 % v/v de sales biliares. Las placas se incubaron a 37 °C en jarra de microaerofilia y se controlaron las colonias a las 24 y 48 hs. Se llevaron adelante 3 ensayos independientes por triplicado.

2. Tolerancia al pH

Los efectos de un pH bajo sobre la viabilidad celular se analizaron por el método de Mayra-Makinen *et al.* (1983) con modificaciones. El aislamiento se cultivó en 50 ml de caldo MRS, en jarra de microaerofilia sin agitación toda la noche. Posteriormente se separaron las células bacterianas desde el cultivo (5 ml) por centrifugación a 3500 g por 20 min. Se resuspendieron en 5 ml de solución salina fisiológica a valores de pH de 1,9 y 3,0 y se incubaron por 30 min a 37°C. Se determinó el número de

células viables por recuento en placa de MRS. Se utilizó como control una solución salina de pH 6,0. Se llevaron adelante tres ensayos independientes por triplicado.

3. Modelo Gástrico *in Vitro*

Se empleó un modelo gástrico *in vitro* a los efectos de determinar la habilidad del aislamiento de sobrevivir a la acción conjunta de condiciones ácidas y acción de proteasas que sufriría la bacteria luego de la ingestión (Crittenden *et al.*, 2001).

El modelo gástrico *in vitro* consistió de 6 ml de un jugo gástrico simulado con solución HCl/KCl 0.1 M pH 2.1 conteniendo 500 U/ml de pepsina A y 1.0 g/l de peptona bacteriológica. Un cultivo bacteriano cultivado en las condiciones ya descriptas (2.1) detenido antes de la fase estacionaria de crecimiento, se centrifugó a 3500 g durante 20 min y se resuspendió en una solución de peptona bacteriológica (1 g/l). Luego se adicionaron igual número de bacterias al modelo gástrico y a un tubo control (To) a una concentración final de 1×10^8 ufc/ml ajustada por medidas de absorbancia a 560 nm. La solución en los tubos control consistió en 6 ml de buffer fosfato 6 M pH 6.5 y 1 g/l de peptona bacteriológica. Las células se incubaron en el modelo (T1 ensayo) y en el control (T1 control) por 60 min a 37 °C en condiciones aerobias sin agitación. Se tomaron muestras en tiempo cero y tiempo final y se determinó la concentración bacteriana por recuento en placa de MRS. Fueron conducidos tres ensayos independientes por triplicado.

4. Actividad Antibacteriana Frente a *Salmonella* sp.

A los efectos de evaluar la capacidad del aislamiento HA9-2 de inhibir el crecimiento de un patógeno gastrointestinal como *Salmonella* sp., se realizó un ensayo de discos sobre agar con modificaciones (Jacobsen *et al.* 1999; Fraga *et al.* 2005).

En resumen, 20 µl de un cultivo fresco de HA9-2 (concentraciones entre 1×10^4 y 1×10^8 ufc/ml) fueron inoculados sobre discos de papel de filtro de 1 cm de diámetro

previamente esterilizados y colocados sobre una placa de agar MRS. La placa fue incubada por 24 horas en jarra de microaerofilia y luego cubierta con 10 ml de agar (1,5 %) inoculado con un cultivo fresco de *Salmonella* sp. (1×10^8 ufc/ml) e incubada a 37°C en condiciones aerobias. Los posibles efectos inhibitorios del MRS fueron testeados en cada placa. La capacidad de inhibición del crecimiento fue determinada por medidas de la zona de inhibición que rodea el disco, se midieron los halos de inhibición en varias direcciones diferentes y se utilizó un promedio. Se condujeron tres ensayos por triplicado.

La cepa de *Salmonella* sp. utilizada pertenece al banco de cepas del LATU y es de origen alimenticio.

5. Ensayo de Adhesión Evaluado por Radiactividad

Desarrollo de la Línea Celular

Se realizó el desarrollo de la línea celular Caco-2 a los efectos de realizar ensayos de adhesión. La misma fue aislada originalmente de un adenocarcinoma de colon humano, se obtuvo desde ATTC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Las células se cultivaron rutinariamente a 37 °C, en una atmósfera con 5 % CO₂-95 % aire en un medio esencial mínimo modificado Eagle Dulbecco con 2 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomomicina y 1 % de aminoácidos no esenciales. Se realizaron pasajes de la línea celular cuando se llegaba a un 80 % de confluencia (Folle *et. al*, 2007).

Se analizó la contaminación por *Mycoplasma* por medio de la tinción de Hoechst 33258 (Verma *et al.*, 1995). Este es un colorante fluorescente que se une al ADN en zonas ricas en AT, de existir una contaminación por *Mycoplasma* aparecen zonas teñidas extranucleares. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (Axioplan 2 imaging HBO 100).

Cultivo bacteriano

A partir de un cultivo bacteriano madre almacenado a -80 °C en glicerol al 40 %, se inoculó al 1% un caldo MRS al que se le adicionaron 10 µl/ml de timidina (metil-1,23H) (4.44 TBq mmol⁻¹ o 117 Cimmol⁻¹) para ser metabolizada y se incubó a 37 °C toda la noche. Se estandarizó el número de bacterias en (10⁷-10⁸ ufc/ml) ajustando la absorbancia a 560 nm en 0.55 en un cultivo desarrollado en frío (Ouwehand et al., 2000).

Ensayo de Adhesión

El ensayo de adhesión a la línea celular Caco2 se realizó como fue descrito previamente por Kirjavainen *et al.*, 1998 y Ouwehand *et al.*, 1999, 2000, con modificaciones.

Las células Caco2 se desarrollaron en placas multipocillo hasta confluencia total (7.0e5 células). Las células se observaron con un microscopio invertido (Willwetzlar GMBH). Las placas se lavaron dos veces con PBS, se agregaron 500 µl de la suspensión bacteriana marcada radiactivamente mezclada con 500 µl del medio de las células sin suero ni antibiótico, y se incubó por 1 h a 37 °C. Las bacterias no adheridas se removieron por medio de tres lavados con PBS, las bacterias adheridas se liberaron y lisaron con 1% de SDS-0.1 mol/l de NaOH por incubación a 60 °C por 1h.

La adhesión se expresó como el porcentaje de radioactividad registrado luego de la adhesión, relativo a la radioactividad de la suspensión microbiana previo a su adición al cultivo. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Beckman LS Analyzer 6000 IC) para lo cual las muestras se mezclaron con 10 ml de un *cocktail* de centelleo. Se realizó un experimento por triplicado debido al elevado costo del ensayo.

6. Ensayo de Adhesión Evaluado por Recuento y Microscopía

La adhesión bacteriana también se evaluó de acuerdo al método de Coconnier *et al.* (1992), con modificaciones efectuadas por Kimoto *et al.* (1999) y otras incorporadas por nosotros.

Luego de 30 días de pasajes, las monocapas de células Caco-2, se prepararon sobre placas multipocillo hasta confluencia total (7.0×10^5 células). Se lavaron tres veces con buffer salino fosfatado (PBS: NaCl 0.8%, K_2HPO_4 0.121%, KH_2PO_4 0.034%, pH 7.2). Cultivos de toda la noche del aislamiento (5 ml) y los controles se cosecharon y lavaron dos veces con 5 ml de PBS y luego se resuspendieron en el mismo buffer para minimizar los efectos ácidos (Mayra-Makinen *et al.*, 1983).

Las células bacterianas (0.5 ml en PBS, MOI 1.07×10^2) se mezclaron con 0.5 ml del medio de cultivo para células Caco-2 y la mezcla se agregó en cada pocillo de la monocapa de células Caco-2. Las placas se incubaron a $37^\circ C$. Luego de 1 h de incubación, las monocapas se lavaron tres veces con PBS estéril. Las bacterias adheridas se liberaron adicionando 200 μ l de tripsina y dejándola actuar 5 min; posteriormente se realizó un recuento en placa por siembra en superficie en condiciones anaerobias. Se condujo un ensayo por triplicado.

Como control positivo en ambos ensayos se utilizó por un lado *L. acidophilus* ATCC 4356 el cual se sabe que adhiere a esta línea celular (Campana *et al.*, 2012). *L. rhamnosus* ATCC 53103 (Bernet *et al.*, 1994) también fue utilizado como control positivo en los estudios realizados por recuento. Se utilizaron además como controles pocillos vacíos, pocillos sólo con células y pocillos sólo con bacterias.

Para realizar la observación al microscopio las células se cultivaron en una caja de cultivo con un cubre objeto dentro, de modo que las células se desarrollaran sobre el cubre objeto en monocapa. Se siguieron todos los pasos descriptos anteriormente para realizar la adhesión, posteriormente las células y las bacterias adheridas se

fijaron con una fina capa de metanol al 90 % por exposición durante 20 min. El cubre objeto se secó y se cubrió con safranina durante 1 min. Se lavó con agua destilada y se volvió a secar. Luego se colocó sobre un porta objetos y se observó al microscopio.

7. Capacidad para formar biofilms

Los biofilms son agregaciones de células bacterianas, incluidas en una matriz de polisacáridos extracelulares y materia orgánica de producción propia que le confiere a la bacteria la capacidad de persistir en el ambiente. Los biofilms formados a nivel del tracto gastrointestinal y urogenital femenino pueden contener lactobacilos benéficos, los que juegan un rol protector.

La capacidad de producir biofilms se evaluó mediante la determinación de la producción de *slime*. Se define la producción de *slime* como la capacidad de producir sustancia adherente. Se utilizó la técnica de “macrométodo en tubo” descrita por Christensen *et al.*, 1982 con las modificaciones efectuadas por Carbonero, 1991.

Brevemente, se inocularon tubos que contenían 10 ml de un cultivo fresco del aislamiento en caldo MRS y se incubaron sin agitación entre 24 y 72 horas en estufa a 37°C, en condiciones de aerobiosis. Tras la incubación, se vació el contenido de los tubos con pipeta y se lavaron suavemente tres veces con agua destilada. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente. Se fijaron con calor pasándolos tres veces por la llama del mechero y a continuación se tiñeron con 10 ml de solución de violeta de genciana al 0,1 % durante 1 minuto. Luego se vaciaron, se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron invertidos en estufa a 40 °C.

A las 24, 48 y 72 horas se evaluó la producción de *slime* en función del grosor de la película formada en la superficie del tubo, se establecieron tres categorías (+1, +2, +3). Se consideró prueba (+) si había tinción de la pared del tubo y prueba (-) en

caso contrario. Como control positivo se utilizó la cepa *L. rhamnosus* ATCC 53103 (Landersjö *et al.*, 2002) y un tubo de vidrio al que se le efectuó el mismo tratamiento pero con medio sin inocular. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado, cada uno de los cuales fue evaluado por dos observadores, a ciegas.

8. Producción de glucano insoluble

Los exopolisacáridos presentan importancia por su participación en los procesos de adhesión, en la formación de biofilms y debido a sus aplicaciones industriales por su capacidad de actuar como gelificantes, emusificantes, etc. El glucano es un tipo de polisacárido extracelular que se presenta en forma soluble o insoluble en agua. El glucano insoluble participaría de manera predominante en los mecanismos de adhesión de algunas cepas a superficies lisas (Carbonero, 1991). En este estudio se analizó la capacidad de producción de glucano insoluble en agua según el método de Ghione *et al.* descrito por Carbonero (1991).

Se realizó un cultivo del aislamiento durante 18 a 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia a partir del cual se inocularon con 1 ml tubos que contenían 9 ml de MRS suplementado con sacarosa al 5 % y 10 % respectivamente. Los cultivos se incubaron en las mismas condiciones que las descritas anteriormente (2.1). Luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min y el sedimento se lavó tres veces con agua destilada. El sedimento se resuspendió en agua destilada y la concentración celular se ajustó por medidas de absorbancia, en el ensayo y en el control hasta un mismo valor. Luego se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min. Posteriormente, el sedimento se tiñó con una solución comercial de violeta de genciana-etanol al 1 % durante 1 min, y se lavó nuevamente tres veces con agua destilada. El residuo teñido se extrajo con 2 ml de etanol absoluto y se diluyó con agua destilada hasta el volumen original del cultivo. El ensayo se evaluó midiendo la densidad óptica de la solución a 305 nm. Se utilizó como control un cultivo realizado en un medio sin

sacarosa para descontar la tinción absorbida por las estructuras bacterianas. El valor de densidad óptica (DO) corregido (COD) corresponde a la producción de glucano real de la bacteria que se obtiene restando del resultado del ensayo los valores obtenidos para el control. La producción de glucano se consideró como:

AUSENTE (-): COD menor a 0,05

DEBIL (+): COD de 0,05 a 0,15

MARCADA (++) : COD de 0,15 a 0,45

PESADA (+++): COD mayor de 0,45

Se realizaron dos ensayos independientes por duplicado.

9. Coagregación y Autoagregación

Cepas bacterianas

En estos ensayos se empleó una cepa de *E. coli* perteneciente al banco de cepas del LATU; es de origen alimenticio y está identificada y caracterizada por ensayos bioquímicos realizados por la propia Institución.

Las cepas de referencia *L. rhamnosus* 53103 y *L. acidophilus* 4356 pertenecen al banco ATCC.

Para evaluar la facultad de autoagregación del aislamiento HA9-2, así como su capacidad de coagregación con bacterias que pueden encontrarse en el intestino como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *E. coli*, se realizó el ensayo de Cisar y Kolenbrander (1979) con modificaciones. Se realizó un cultivo del aislamiento HA9-2 por 18 a 24 h en MRS a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se centrifugaron 10 ml del cultivo a 3500 rpm durante 10 min; se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5 ml de PBS, pH 7,2, estéril. Se realizaron tres lavados sucesivos del sedimento el cual se resuspendió en

buffer de coagregación (Tris 0,001 M pH 8,0; MgCl₂ 0,1 mM; CaCl₂ 0,1 mM, NaCl 0,15 M y 0,02% de NaNO₃). La concentración celular se ajustó en 1x10¹⁰ ufc/ml midiendo la absorbancia a 660 nm (DO = 2) para cada cepa a ensayar. Se mezclaron 300 µl del cultivo del aislamiento de *L. paracasei* en estudio (HA9-2) con 300 µl de la bacteria a coagregar. Para el estudio de la autoagregación se mezclaron 300 µl del cultivo de HA9-2 con 300 µl del buffer de coagregación. Se agitó durante 10 segundos y se dejó a temperatura ambiente 1 o 2 horas. Luego, la suspensión bacteriana se homogeneizó en vortex y se dejó en reposo durante toda la noche.

Los resultados del ensayo se evaluaron a las 24 horas tanto en reposo como después de agitar los tubos, de acuerdo al siguiente criterio:

- : ausencia de agregación (agregados no visibles en la suspensión celular).
- +: agregación apreciable pero débil (agregados pequeños y uniformes en la suspensión celular).
- ++: agregación pesada (agregados definidos, fácilmente visibles aunque la suspensión permanece turbia sin que éstos sedimenten inmediatamente).
- +++ : aglutinación de la mayoría de las bacterias (agregados grandes que sedimentan rápidamente dejando una pequeña turbidez en el sobrenadante).
- ++++: grandes agregados (sedimentan rápidamente dejando un sobrenadante claro).

De las suspensiones obtenidas se tomaron alícuotas para observar al microscopio óptico (LEITZ Laborlux 12 Pol) los agregados sin teñir. Se llevaron a cabo dos ensayos independientes por triplicado y los resultados fueron evaluados por dos observadores, a ciegas.

10. Producción de Peróxidos

Con el objetivo de determinar si el aislamiento HA9-2 es productor de peróxido de hidrógeno, se evaluó la capacidad de producción en un cultivo bacteriano durante 24 horas. La técnica se basa en la oxidación ferrosa del xilenol naranja (Annuk *et al.*, 2003). Las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones aerobias a 4 °C y la concentración de H₂O₂ se midió usando el método de Ou y Wolf (1996). Brevemente, se mezclaron 75 µl de la muestra a analizar con 1,425 ml de FOX1 (D-sorbitol 100 mM y xilenol naranja 100 µM; SIGMA en ácido sulfúrico 25 mM) y sulfato ferroso de amonio hexahidratado 250 µM (SIGMA), la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

Las proteínas floculadas y las células se eliminaron por centrifugación y se leyó la absorbancia a 560 nm. La concentración de H₂O₂ (%) se interpoló de una curva estándar y se expresó como % de H₂O₂ por ml de muestra.

Análisis estadístico

Para comparar los resultados de los tres ensayos independientes realizados por triplicado, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) bajo la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre ensayos (Sokal y Rohlf, 1998). El supuesto de normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene (Sokal y Rohlf, 1998). En caso de encontrarse diferencias significativas entre ensayos, se utilizó el test de Tuckey para verificar entre que ensayos existieron tales diferencias (Sokal y Rohlf, 1998). En aquellos casos en que sólo se realizaron o se obtuvieron datos de dos ensayos por triplicado y como consecuencia se dispuso de un bajo número de repeticiones, se utilizó el test de permutaciones (Permutation test) (Manly, 1997). En los casos que no se cumplió con los supuestos del ANOVA, se utilizó el análisis de

varianza no paramétrica de Kruskal – Wallis (H) y en caso de encontrar diferencias significativas el test a posteriori de Mann-Whitney corregido con el criterio de Bonferroni. En todos los casos para aceptar o rechazar las hipótesis se utilizó un nivel de probabilidad $p = 0.05$. Para la mayoría de los ensayos y variables analizadas se calcularon los desvíos típicos, los intervalos de confianza al 95% y el coeficiente de variación (variabilidad de los datos en torno a la media).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Excell (versión 2010) y el programa Past (versión 2.17) (Hammer y Harper, 2001).

RESULTADOS

1. Resistencia a sales biliares

Se determinó en un 60 % la viabilidad bacteriana luego de 48 h de incubación en una concentración de sales biliares de 0,5 % en el medio (Gráfico 1). Cuando se aumenta la concentración de sales biliares al 0,9 % la viabilidad disminuyó al 50 % con respecto al control. Según el análisis estadístico cuando se compararon las diferentes condiciones los datos fueron normales y presentaron homogeneidad de varianza. Se encontraron diferencias significativas ($p=0.0016$) en el ANOVA y según la comparación de Tuckey las mismas son entre el control y las dos condiciones de ensayo ($p=0.011$ y $p=0.002$), pero no hay diferencias significativas cuando el medio se suplementa con 0.5 % y 0.9 % de sales biliares deshidratadas ($p=0.774$). En la comparación entre repeticiones los datos no fueron normales pero sí presentaron homogeneidad de varianzas. Se encontraron diferencias significativas entre ensayos (ANOVA), entre las medias de los ensayos 1 y 2.

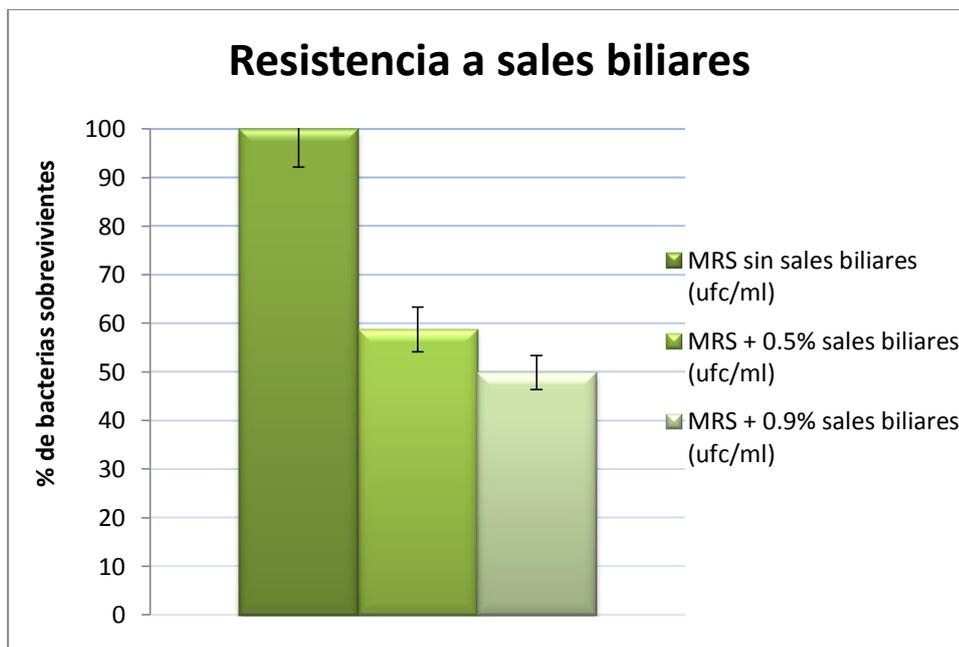


Gráfico 1. Resistencia a sales biliares determinada por recuento en placa con 0,5 % y 0,9 % de sales biliares.

2. Tolerancia al pH

Al someter la bacteria a valores extremos de pH (3,09 y 1,91) en comparación con un valor control (pH 6,1), pudo observarse una disminución de la concentración celular del 18 y 90 % respectivamente luego de 30 min de exposición (Gráfico 2). Según el análisis estadístico cuando se realizó la comparación entre las diferentes condiciones los datos no fueron normales y no presentaron homogeneidad de varianzas, hay diferencias significativas entre las tres condiciones ($p=3.9 \times 10^5$). Cuando se realizó la comparación entre las repeticiones los datos fueron normales y homogéneos y se encontraron diferencias significativas para valores de pH de 3 y 6, no registrándose diferencias significativas a pH 2.

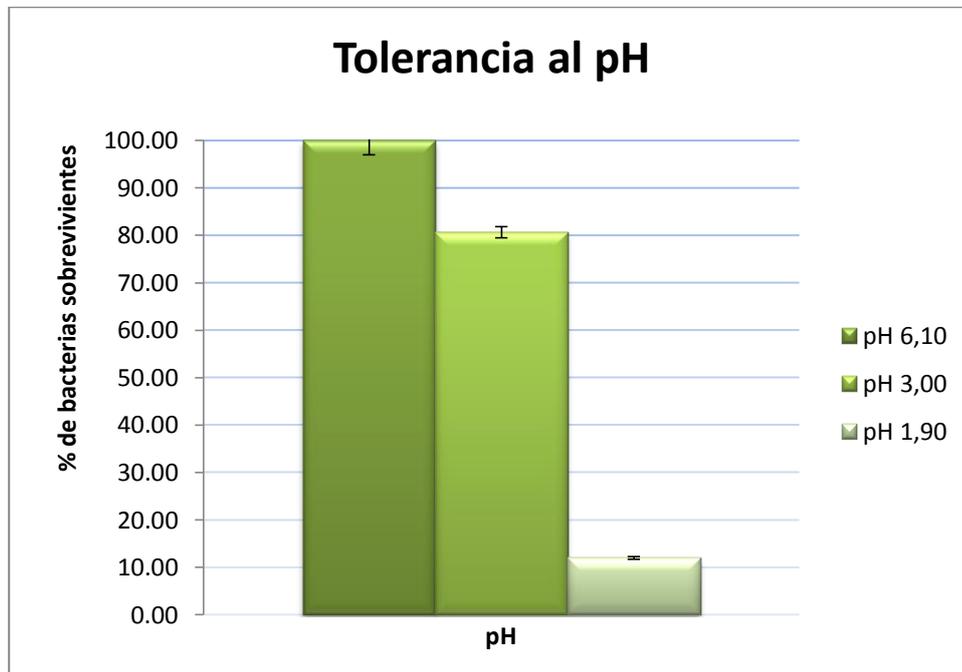


Gráfico 2. Tolerancia al pH del aislamiento expresada como % de células viables comparadas con un control con pH sin modificar.

3. Modelo Gástrico *in Vitro*

El 20 % de la población bacteriana sobrevivió a la acción combinada del pH y proteasas, similares condiciones a las que la bacteria tendría que soportar luego de su administración oral (60 min de exposición) (Gráfico 3). También se apreció que más de un 20 % no sobrevivió en el control por lo que la peptona bacteriológica no sería un medio óptimo para la supervivencia bacteria. De todos modos, podría inferirse que si se considera como 100% el número de bacterias que sobreviven en el control (78,3% del recuento inicial), aproximadamente el 26.8 % de las bacterias sobrevivirían a la acción del medio gástrico. Según el análisis estadístico cuando se realizó la comparación entre las diferentes condiciones los datos no fueron normales y no presentaron homogeneidad de varianzas, hubo diferencias significativas entre las tres condiciones ($p=9.3 \times 10^{-6}$). Cuando se realizó la comparación entre las repeticiones en el control los datos fueron normales y en el modelo con el pH ácido y la adición de pepsina los datos no fueron normales. En todos los casos existió homogeneidad de varianzas y no se encontraron diferencias significativas (ANOVA) entre ensayos.

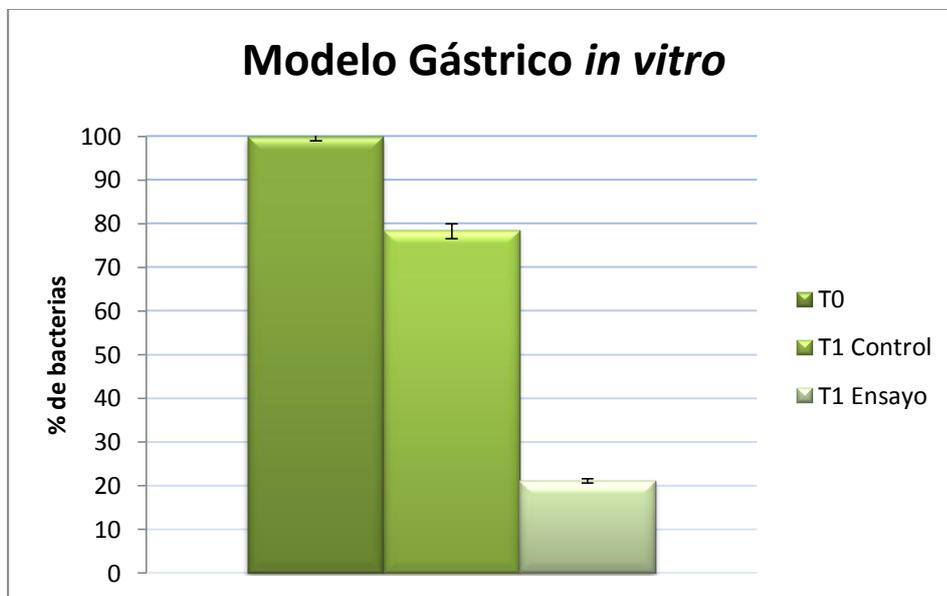


Gráfico 3. Resultados de la exposición durante 60 min al Modelo Gástrico *in vitro*.

4. Actividad Antibacteriana Frente a *Salmonella* sp.

De los resultados de la capacidad del aislamiento en estudio de presentar actividad antibacteriana frente a un patógeno gastrointestinal por medio de la inhibición de su crecimiento (Gráfico 4), se observó que a concentraciones del lactobacilo inferiores a 1×10^6 no se evidenció inhibición del crecimiento de esta cepa de *Salmonella* sp. (concentración 1×10^8 ufc/ml). A concentraciones superiores se produjo un halo de inhibición de entre 19 y 21 mm. A concentraciones de 10^6 y 10^7 no se produjeron diferencias significativas en el tamaño de los halos de inhibición ($p=0.1693$), pero si hubo diferencias si se las compara con una concentración de 10^8 ($p=2.44 \times 10^{-8}$). En las zonas de la placa lejanas al crecimiento del lactobacilo no se observó inhibición del crecimiento. Del análisis estadístico surge que los datos fueron normales para concentraciones del patógeno de 10^7 y se registraron valores iguales, lo que impide una estimación de varianza, e imposibilita hacer un ANOVA. Para concentraciones del patógeno de 10^8 se encontró homogeneidad de varianzas entre muestras, pero no se encontraron diferencias significativas (ANOVA) entre los ensayos.

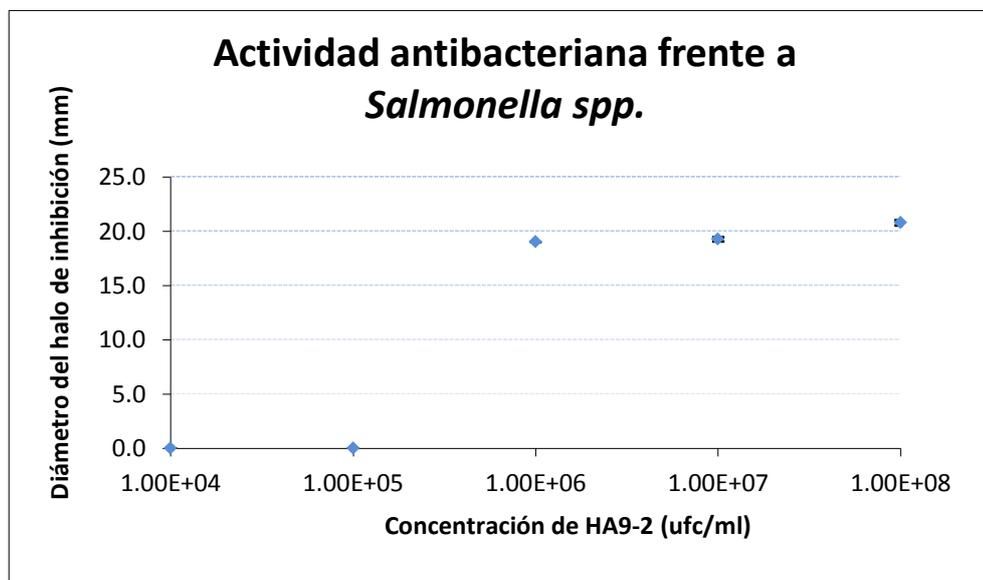


Gráfico 4. Diámetros de inhibición del crecimiento de *Salmonella* (mm) vs diferentes concentraciones del aislamiento HA9-2.

5. Ensayo de Adhesión Evaluado por Radiactividad

Los resultados del ensayo de adhesión evaluado por radiactividad pueden verse resumidos en la Tabla 3. Se observó un 3,26 % de radiactividad recuperado luego de la adhesión para el control positivo por lo que el ensayo se condujo correctamente. En el caso de nuestro aislamiento el porcentaje de adhesión registrado fue del 2,58 %. Según los resultados del análisis estadístico no existieron diferencias significativas de adhesión entre el control positivo y el aislamiento en estudio ($p=0.399$), de la comparación entre réplicas surge que los coeficientes de variación fueron menores a 30 por lo que hubo poca variabilidad de los datos en torno a la media.

Tabla 3. Ensayo de adhesión seguido por radioactividad. + Control Positivo de adhesión (*L. acidophilus* ATCC 4356. HA9-2 (aislamiento en estudio).

Muestra	Promedio de bacterias por célula MOI (inicial)	Promedio de bacterias por célula MOI (final)	% adhesión promedio \pm Desvío típico
control +	107	3.49	3,26 \pm 0.89
HA9-2 t₁	107	2.77	2,58 \pm 0.67

6. Ensayo de Adhesión Evaluado por Recuento y Microscopía

Los resultados del ensayo de adhesión seguido por recuento en placa y microscopía pueden verse en la Tabla 4. Se recuperó post adhesión el 1,24 % de las bacterias aproximadamente y se adhirieron 1,33 bacterias por célula. Según los resultados del análisis estadístico no existieron diferencias de adhesión con el control positivo de *L. rhamnosus* ($p=0.141$), ni entre los controles ($p=0.606$), pero si hubo diferencias con el control de *L. acidophilus* ($p=0.041$). Del análisis de las repeticiones se observó que los coeficientes de variación fueron menores a 30 por lo que hubo poca variabilidad de los datos en torno a la media.

Tabla 4. Resultados de la adhesión seguida por recuento en placas de MRS y recuento de las células en cámara de Neubauer.

Cepa	Promedio Bacterias por célula inicial MOI	Promedio Bacterias por célula final MOI ± Desvío típico	% bacteria adherida promedio ± Desvío típico
HA9-2	107	1.333 ± 0.130	1.244 ± 0.121
Rha (+)	107	1.624 ± 0.172	1.516 ± 0.152
Acidoph (+)	107	1.752 ± 0.169	1.636 ± 0.167

7. Producción de polisacáridos extracelulares

El aislamiento de *L. paracasei* HA9-2 presentó la capacidad de formar *slime*, a la cual se le adjudicó la categoría 3 de acuerdo a los criterios previamente definidos (Imagen 4, Tabla 5). No se observaron diferencias en la película formada tras 24, 48 y 72 horas de incubación. No hubo tinción en el tubo utilizado como control negativo, registrándose producción de *slime* categoría entre dos y tres en los tubos correspondientes al control positivo. Según los resultados del análisis estadístico los coeficientes de variación fueron menores a 30 por lo que hubo poca variabilidad de los datos en torno a la media

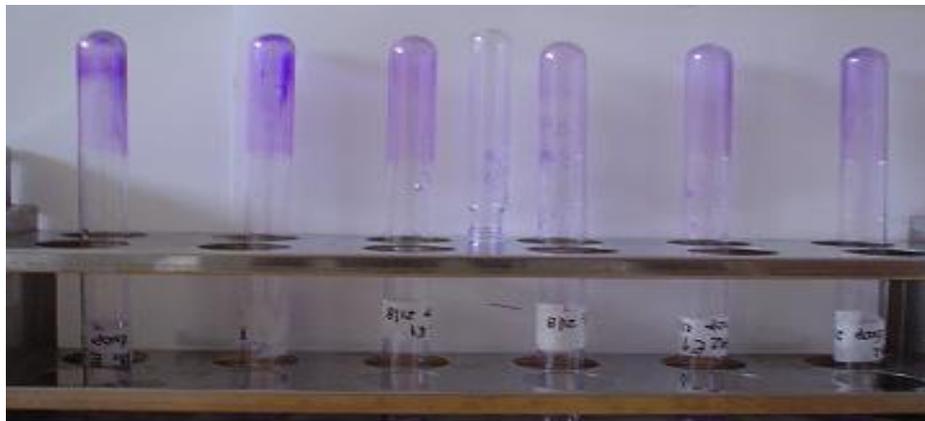


Imagen 4. Producción de *slime*, de izquierda a derecha se observan, tres tubos del aislamiento HA9-2 (réplicas), un tubo control y tres tubos del control positivo *L. rhamnosus* ATCC 53103.

Tabla 5. Producción de *slime* del aislamiento HA9-2, de *L. rhamnosus* y del control negativo.

Cepa	24 h	48 h	72 h
HA9-2	+++	+++	+++
Control <i>L. rhamnosus</i>	+++	+++	+++
Control - Tubo sin bacteria	--	--	--

8. Producción de glucano insoluble

Los resultados de producción de glucano insoluble en agua por el aislamiento HA9-2 en medios suplementados con diferentes concentraciones de sacarosa se presentan en la Tabla 6. De acuerdo a estos resultados, no se determinó producción de glucano en el medio suplementado con 5 % de sacarosa, pero sí hubo una producción débil en medio suplementado con sacarosa al 10 %. Según los resultados del análisis estadístico hay diferencias significativas en la producción de glucano cuando el medio se suplementó con 5 % y 10 % de sacarosa ($p=0.003$). Se observó poca variabilidad cuando se calculó el COD para 10 % de sacarosa y mucha variabilidad para 5 % de sacarosa. En este último caso se informó que no había producción de glucano a esta concentración de sacarosa, pero dada la gran variabilidad de los datos este resultado debe valorarse con precaución.

Tabla 6. Valores de densidad óptica a 560 nm determinados en cultivos en MRS suplementados con 5 % y 10 % de sacarosa y en MRS sin sacarosa. COD corresponde al valor de densidad óptica corregido.

Ensayo Glucano	MRS	MRS+5% sacarosa	MRS+10% sacarosa
Media Abs ± Desvío típico	0,147±0,039	0,142±0,039	0,216±0,057
Media COD ± Desvío típico		0	0,068±0,027

9. Coagregación y autoagregación

De acuerdo con los resultados obtenidos, el aislamiento en estudio presentó la capacidad de formar grandes agregados con las cepas ensayadas y consigo misma (Imagen 5, Tabla 7). La agregación aumentó al dejar las soluciones que contenían las bacterias en reposo durante toda la noche con respecto a la que se obtuvo luego de agitar. Es de destacar que luego de la agitación, en todos los casos, la agregación obtenida se correspondió con la categoría (+++) previamente definida con aglutinación de la mayoría de las bacterias, evidenciada por la presencia de agregados grandes que sedimentan rápidamente dejando una pequeña turbidez en el sobrenadante. Los resultados fueron concordantes entre los diferentes observadores.



Imagen 5. Observación al microscopio de la agregación del aislamiento HA9-2 con *L. rhamnosus* (izquierda) y con *E. coli* (derecha) de las bacterias sin teñir (Magnificación 500 x).

Tabla 7. Resultados de los ensayos de coagregación y autoagregación del aislamiento HA9-2 con *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *E. coli*

Cepas	Agregación sin agitación	Agregación con agitación
	Promedio de observación	Promedio de observación
HA9-2 con HA9-2	++++	+++
HA9-2 con <i>E. coli</i>	+++	+++
HA9-2 con <i>L. acidophilus</i>	++++	+++
HA9-2 con <i>L. rhamnosus</i>	++++	+++

- : ausencia de agregación (agregados no visibles en la suspensión celular).+ : agregación apreciable pero débil (agregados pequeños y uniformes en la suspensión celular). ++ : agregación pesada (agregados definidos, fácilmente visibles aunque la suspensión permanece turbia sin que éstos sedimenten inmediatamente). +++ : aglutinación de la mayoría de las bacterias (agregados grandes que sedimentan rápidamente dejando una pequeña turbidez en el sobrenadante). ++++ : grandes agregados (sedimentan rápidamente dejando un sobrenadante claro).

10. Producción de Peróxidos

Según los resultados obtenidos se observó un aumento en la producción de H_2O_2 en el cultivo del aislamiento HA9-2 realizado en condiciones aerobias a 37 °C (Gráfico 5) luego de las tres horas de incubación, registrándose un pico cerca de la hora cinco. Según los resultados del análisis estadístico los coeficientes de variación fueron menores a 30 por lo que hubo poca variabilidad de los datos en torno a la media.

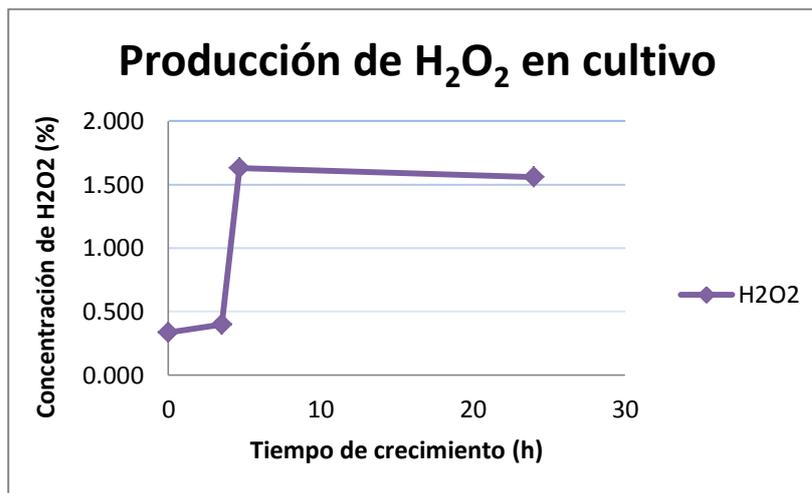


Gráfico 5. Concentración de peróxido en función del tiempo de cultivo, a 37°C.

DISCUSIÓN

Es asumido que los probióticos administrados en forma oral deben enfrentarse a condiciones ácidas en el estómago y a la exposición a la bilis en el intestino durante su tránsito a través del tubo digestivo. Los resultados obtenidos en cuanto a la modificación de la viabilidad del aislamiento expuesto a condiciones ácidas similares al pH estomacal y la exposición del mismo a sales biliares como modelo de la exposición a la bilis en el organismo, permiten sugerir que nuestro aislamiento presenta la habilidad de sobrevivir a éstas condiciones. Las mismas son requisitos imprescindibles para poder considerar a la bacteria como probiótica. Trabajos anteriores han reportado la pérdida de viabilidad de una cepa de *Lactobacillus murinus* cuando se la expuso a una concentración de sales biliares de 0.1% m/v durante cuatro horas (Fraga *et al.*, 2005).

Los resultados del modelo gástrico realizado permiten afirmar que más del 26,0 % de las células bacterianas sobrevivirían el pasaje a través del estómago, porcentaje notoriamente mayor al obtenido cuando se estudiaron sólo los efectos de un pH ácido. Según lo reportado por Charteris en 1998 (Charteris *et al.*, 1998 c), una cepa de *Lactobacillus fermentum* KLD que retuvo el 30 % de viabilidad luego de ser expuesta a este mismo modelo fue considerada intrínsecamente tolerante al tránsito gástrico. En el mismo trabajo el agregado de proteínas de leche al modelo gástrico producía tolerancia total, aspecto que debería ser evaluado en futuros ensayos para determinar la pérdida de viabilidad en presencia de la matriz y así tenerlo en cuenta en el diseño del producto.

Con respecto a los ensayos de adhesión a células Caco2 los resultados obtenidos por recuento fueron menores a los obtenidos por radiactividad y a los observados por microscopio. Esto podría deberse a un efecto deletéreo de la tripsina utilizada para

separar las bacterias adheridas o que el tiempo de exposición no haya sido suficiente como para recuperar todas las bacterias adheridas.

Según nuestros resultados de adhesión, el aislamiento HA9-2 presentó un MOI de 2.77 cuando la misma se evaluó por radiactividad y de 1.33 al evaluarla por recuento. Según lo reportado por Bernet *et al.* en el año 1994 dos cepas probióticas, *Lactobacillus acidophilus* LA1 y LA3 presentaron alta capacidad de adhesión a células Caco2 con MOIs de 1.55 y 0.66 respectivamente. Fernandez *et al.*, en el 2003 también consideraron que *Lactobacillus gasseri* U0002 (MOI 2.33) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (MOI 2.13) probióticos eran adherentes fuertes a esta línea celular (Fernandez *et al.*, 2003). En base a los resultados podemos afirmar que nuestro aislamiento presenta la habilidad de adherirse a la línea celular Caco2, lo cual nos permite inferir que podría adherirse *in vivo* al intestino y así favorecer la colonización y activación del sistema inmune, ejerciendo una de sus principales funciones como probiótico. Si bien el aislamiento HA9-2 presenta la habilidad de adherirse a células Caco2 mantenidas en cultivo, sería necesario realizar ensayos *in vivo* que confirmaran esta capacidad.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella* sp. hacen pensar que HA9-2 produciría alguna sustancia difusible con actividad antibacteriana. Zonas de inhibición de 19 a 21 mm permiten pensar en una actividad antagónica fuerte en comparación con los resultados reportados por Annuk *et al.* en el 2003. Los discos utilizados como control no presentaron zonas de inhibición por lo que los halos de inhibición del crecimiento se deben exclusivamente a la acción de dicha sustancia. La ausencia de zonas de inhibición en regiones de la placa lejanas al crecimiento del lactobacilo permite inferir que la inhibición del crecimiento no se produjo por efecto del medio MRS. Hubiera sido aconsejable en este ensayo utilizar cepas indicadoras como controles positivos pero no se contaba con ese material. Esta capacidad del aislamiento le proporciona una cualidad interesante ya que *Salmonella* sp. es un

importante patógeno de transmisión alimentaria a nivel mundial, afectando principalmente a niños menores de cinco años y adultos mayores. En Uruguay el serotipo más frecuente asociado a enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS) es *S. enteritidis* relacionado principalmente a huevos, pollo y a derivados (Betancor et al., 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aislamiento de *L. paracasei* en estudio HA9-2 presentó la capacidad de formar grandes agregados con las cepas ensayadas y consigo misma. Esta propiedad disminuye la eliminación por arrastre de los patógenos que puedan coagregar con él en el tracto gastrointestinal y podría mejorar la efectividad de las sustancias antibacterianas producidas por el probiótico, por aumento del tiempo de exposición. (Charteris et al., 1998; Reinheimer et al., 2006). Sanchez et al., en 2011 realizaron ensayos similares para evaluar la coagregación y autoagregación y de los nueve aislamientos seleccionados todos presentaron una coagregación fuerte o normal con *E. coli*.

El aislamiento en estudio también resultó ser formador de biofilms y productor débil de glucano insoluble en agua cuando el medio se suplementó con un 10% de sacarosa. La capacidad de algunos lactobacilos de formar biofilm ha sido reportada anteriormente por otros investigadores, esto posibilita a nivel industrial la utilización de biofilms en reactores de fermentación continua (Rangaswamy et al., 2008; Abe et al., 2013). La formación de biofilms implica la producción de exopolisacáridos los cuales proporcionan al aislamiento valor agregado si se considera su incorporación en productos lácteos fermentados, debido a sus propiedades de gelificación, emulsión, estabilización, aumento de la viscosidad y por ser fuente de monosacáridos, (Ruas et al., 2002; Yang et al., 2010; Nikolic et al., 2012). También podrían actuar como fracciones del alimento no digeribles dando al aislamiento una potencial capacidad prebiótica (Torino et al., 2000; Reinheimer et al., 2006). La producción de glucano insoluble dependió de la concentración de

sacarosa del medio, análogo a lo reportado por Carbonero *et al.*, en 1991. Este EPS participaría de manera predominante en los mecanismos de adhesión de algunas cepas a superficies lisas (Carbonero, 1991).

Cabe destacar que tanto los ensayos de producción de biofilm como los de agregación se podrían haber cuantificado por medidas de densidad óptica, lo que habría permitido la comparación de los resultados obtenidos con los reportados por otros autores como Jones *et al.*, en el 2009 quienes reportaron la producción de biofilm por varias cepas de *Lactobacillus reuteri*.

Con respecto al peróxido de hidrógeno, se determinó su producción en el cultivo. Este podría ser entonces uno de los mecanismos por el cual el aislamiento HA9-2 excluye un patógeno alimentario común como es la *Salmonella* spp. A nivel industrial la producción de peróxido de hidrógeno por el probiótico puede suponer una ventaja ya que podría prolongar el tiempo de vida útil por control del desarrollo de patógenos durante el almacenamiento.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN INDUSTRIAL DEL AISLAMIENTO HA9-2

El hecho que una determinada cepa cumpla con los requisitos establecidos para probióticos no es suficiente para poder incorporarla en un proceso industrial en el cual estará sometida a condiciones de stress de diferente tipo. En particular pensando en su incorporación en la industria láctea Reinheimer estableció una serie de criterios a cumplir (Reinheimer *et al.*, 2006). El objetivo del presente capítulo fue evaluar parte de estas capacidades, por lo cual se realizaron fermentaciones en leche, a los efectos de determinar las características de crecimiento del aislamiento, se evaluó la sensibilidad a diferentes antibióticos de uso común en la clínica, de diferentes grupos, se sometió el aislamiento a condiciones de temperatura similares a las que experimentaría en caso de ser incorporado en un proceso de elaboración de yogur y se evaluaron diferentes maneras de mantenimiento a largo plazo como el congelamiento a -80 °C y la liofilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Fermentaciones en Leche

Se realizaron fermentaciones en leche a los efectos de estudiar las curvas de crecimiento del aislamiento HA9-2 en medios lácteos. Para el desarrollo del inóculo se realizó un cultivo durante toda la noche del aislamiento, transfiriendo tres o cuatro colonias de un cultivo mantenido en MRS-agar a un tubo con 10 ml de leche libre de semisólidos reconstituida al 10 % y previamente tratada térmicamente (113 °C, 15 min). El cultivo se incubó a 37°C durante 16 hs en jarra de microaerofilia y luego se centrifugó a 3500 g por 30 minutos y se resuspendió en suero fisiológico, ajustando la concentración inicial por absorbancia a 560 nm en 1×10^9 unidades

formadoras de colonias (ufc). Luego se transfirieron volúmenes de inóculo a matraces que contenían 500 ml de leche descremada tratada térmicamente, de modo que la concentración inicial fuera de 1 % v/v (10^7 ufc/ml aproximadamente).

Al inicio del ensayo (tiempo cero) se tomaron cuatro muestras de la siguiente forma: 7 ml para determinar el pH (744 pH Meter Metrohm), 10 ml para determinar acidificación por titulación con NaOH 0.1 N, 0,1 ml para determinar ufc/ml por recuento en placa de MRS y 10 ml para determinar la biomasa. Los matraces se colocaron en estufa a 37 °C sin agitación y el cultivo se evaluó por 29 horas, realizando tomas a diferentes tiempos (0,2, 4, 6, 7.5, 25.5 y 29.5 horas). Como control se procedió de forma análoga con un matraz sin inocular. La titulación se llevó a cabo según norma ISO 6091:1980 con soda 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Para determinar la biomasa se centrifugó cada toma a 3.500 rpm durante 30 minutos (Hettich Zentrifugen D-7200). Los sobrenadantes se descartaron y los tubos se colocaron en estufa a 40 °C hasta peso constante (aproximadamente ocho días), que se determinó por pesada directa en balanza analítica (Mettler Toledo AG204). A cada valor de biomasa obtenido se le restó el valor de biomasa determinado a tiempo cero a los efectos de restar lo aportado por la leche y el inóculo. Se llevaron adelante tres ensayos independientes por triplicado.

2. Sensibilidad a antibióticos

A los efectos de determinar el comportamiento de HA9-2 frente a diferentes antibióticos de distintos grupos de uso común en la clínica, se realizó un ensayo empleando discos de papel de filtro impregnados con diferentes concentraciones de Penicilina (β -lactámico), Dicloxacilina (β -lactámico), Vancomicina (glicopeptídico) y Estreptomomicina (aminoglucósido) (Bauer *et al.*, 1996).

Brevemente, HA9-2 se cultivó en 10 ml de caldo MRS en jarra de microaerofilia a 37 °C por 18-24 hs. Posteriormente se esparcieron 200 μ l del cultivo en la superficie

de las placas de MRS-agar sobre las cuales se colocaron discos de papel de filtro estériles (diámetro 1.6 cm) impregnados con 20 µl de diferentes concentraciones de Dicloxacilina (SIGMA concentraciones entre 0,15-2,5 µg/ml), Penicilina (SIGMA 10MU concentraciones entre 0,006-0.200 µg/ml), Vancomicina (SIGMA potencia mayor a 900 µg/mg concentraciones entre 4,19-63 µg/ml) y Estreptomina (SIGMA potencia 730 U/mg concentraciones entre 0,35-13 µg/ml). Las placas fueron incubadas por 24 hs en condiciones de microaerofilia a 37 °C. Se determinaron los radios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, los cuales se graficaron en función de la concentración del antibiótico. Como control se utilizaron discos sin impregnar. Fueron conducidos tres ensayos independientes por triplicado para la Dicloxacilina y Penicilina y dos ensayos independientes por triplicado para la Vancomicina y Estreptomina.

3. Tolerancia del Aislamiento a 45 °C

Cultivos del aislamiento fueron sometidos a la temperatura y el tiempo de exposición que se utiliza en la elaboración de yogur (45°C, 3 hs) con el fin de estudiar su comportamiento en estas condiciones.

En resumen se realizó un cultivo en 10 ml de caldo-MRS, en microaerofilia a 37 °C por 18-24 hs sin agitación, se realizó un pasaje a un medio fresco y se incubó *overnight* en las mismas condiciones. Posteriormente se inoculó un tubo que contenía 5 ml de leche previamente tratada térmicamente (100 °C, 30 min) ajustando la concentración en 10⁸ ufc/ml por medidas de absorbancia a 560 nm utilizando para ello un tubo con 5 ml de agua estéril. Se realizó una toma de 1 ml para un recuento inicial. El tubo se incubó a 45°C durante 3 hs y una vez transcurrido dicho lapso se realizó un nuevo recuento. Como control del proceso de pasteurización se incubaron por siete días tubos conteniendo 10 ml de leche. Posteriormente se realizaron siembras en diferentes medios a los efectos de evaluar

la presencia de: bacterias aerobias mesófilas totales (PCA, OXOID y MRS, OXOID), anaerobias (PCA, OXOID y MRS, OXOID), y hongos y levaduras (PDA (Potato dextrose Agar, OXOID) e YPD (Yeast Potato Dextrose). Se condujeron 3 ensayos por duplicado.

4. Conservación del Aislamiento por Liofilización

Tanto para las actividades de investigación como para las industriales basadas en la utilización de microorganismos es crucial el poder preservar las cepas microbianas por largos períodos de tiempo (Zomora, 2003). El método de conservación seleccionado debe maximizar las posibilidades de mantener las características originales de la cepa por las cuales fue seleccionada (Stanbury *et al.*, 1995 en Zomora, 2003).

En la industria alimentaria se conservan pequeñas cantidades de cultivos conocidos como cultivos de reserva. Cuando estos se reactivan para su utilización industrial, se deben utilizar sistemas de siembra a gran escala que nos permitan obtener el volumen necesario para inocular los fermentadores de producción (Tamime *et al.*, 1991 y Salminen *et al.*, 1998 en Zomora, 2003). Estos cultivos deben contener el máximo número de células viables, ser cepas puras libres de contaminación y ser activos en las condiciones del procesamiento.

Para la conservación del aislamiento en estudio por liofilización se utilizó leche descremada como crioprotector externo (Friss de Kereki *et al.*, 1991; Muro *et al.*, 1989; Kirsop *et al.*, 1984). En resumen, un matraz con 50 ml de caldo-MRS previamente autoclavado a 121 °C por 15 min, fue inoculado con 4 o 5 colonias de un cultivo fresco. Se incubó por 18 hs en estufa a 37 °C en condiciones de microaerofilia sin agitación. Posteriormente se traspasó el medio con las células a tubos estériles y se centrifugó a 3500 g por 30 min descartando el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 20 ml de MRS y 20 ml de leche descremada (reconstituída al 20 % y esterilizada 115 °C 13 min) de modo de tener una concentración final de leche al 10 %. Se realizó un recuento inicial para conocer la concentración en el cultivo madre. La liofilización se realizó en el equipo disponible en el INIA, en tubos que contenían 4 ml de cultivo. Los liofilizados se conservaron a temperatura ambiente. A los 80 días de haberse realizado la liofilización se realizó un recuento de tres de los tubos para evaluar los efectos del proceso en la viabilidad bacteriana.

5. Conservación del Aislamiento por Congelamiento

Para la conservación del aislamiento en estudio por congelamiento se utilizaron la leche y el glicerol como crioprotectores externo e interno respectivamente (Friss de Kereki *et al.*, 1991; Muro y Luchi, 1989; Kirsop y Snell, 1984). En resumen un matraz con 50 ml de caldo-MRS previamente autoclavado a 121°C por 15 min, fue inoculado con 4 o 5 colonias de un cultivo fresco. Se incubó por 18 hs en estufa a 37°C en condiciones de microaerofilia sin agitación. Posteriormente se traspasó el medio con las células a tubos estériles y se centrifugó a 3500 g por 30 min descartando el sobrenadante. El sedimento con las células se resuspendió en 15 ml de glicerol al 80 % en agua (concentración final 40 %) y 15 ml de leche descremada al 20 % y pasteurizada (concentración final 10 %). Se realizó un recuento inicial para conocer la concentración en el cultivo madre. Cada tubo conteniendo 5 ml de cultivo se colocó en N₂ líquido por 3 horas y luego se llevó a un freezer a -70°C. Se realizó recuento a los 80 días para evaluar los efectos del proceso en la viabilidad bacteriana.

RESULTADOS

1. Fermentaciones en Leche

La producción de ácidos orgánicos expresada como ácido láctico correspondió con la acidez producida en el medio (Gráfico 6). Es importante seguir ambos parámetros en una fermentación ya que la posible capacidad buffer de los medios de cultivo puede hacer que no se correlacionen linealmente (Rivas et al., 2006). El pH inicial fue de 6,65 llegando a 5,83 a las 25 horas. El pH óptimo de crecimiento de *L. paracasei* es de 5,4-5,8, por lo que la bacteria nunca se encontró bajo condiciones óptimas de pH (Salminen *et al.*, 1998).

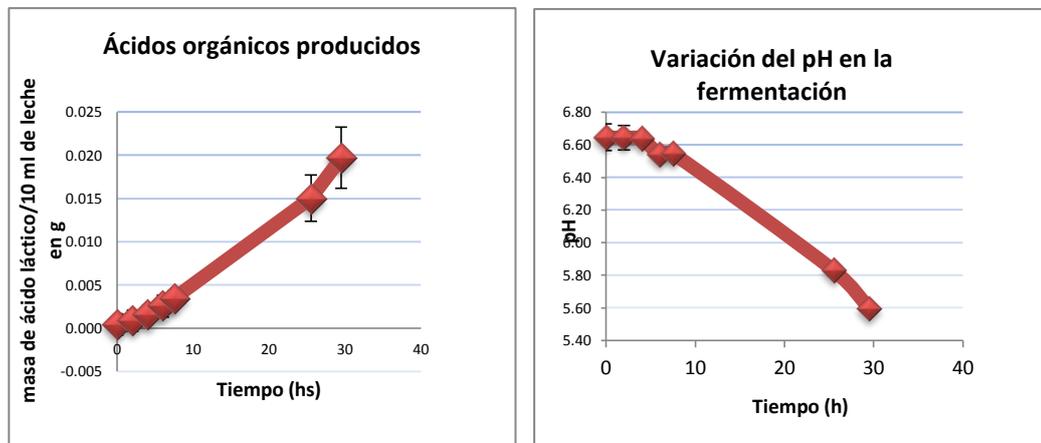


Gráfico 6. a) Producción de ácidos orgánicos en leche expresados como ácido láctico y determinados por titulación del medio de cultivo (derecha). b) Variación del pH en 29 horas de fermentación (izquierda).

La curva de cinética de crecimiento expresadas como de biomasa en función del tiempo (Gráfico 7a) y recuento de células viables en función del tiempo (Gráfico 7b) presenta una fase lag de alrededor de cuatro horas de duración, que se corresponde con los ácidos orgánicos generados en el medio de cultivo productos del metabolismo primario. La fermentación comenzó con una concentración bacteriana de aproximadamente 8.7×10^5 ufc/ml, y al cabo de 29 hs, ya en fase estacionaria desde la hora 10 aproximadamente, el recuento se ubicó en el orden de 3×10^7

ufc/ml. La velocidad específica de crecimiento no se pudo determinar con exactitud ya que harían falta puntos intermedios de recuento entre la hora seis y la hora 29 pero se estima se encuentra entre 0.44 h⁻¹ y 0.70 h⁻¹, con una productividad máxima de biomasa de 1.46 g/L/h,

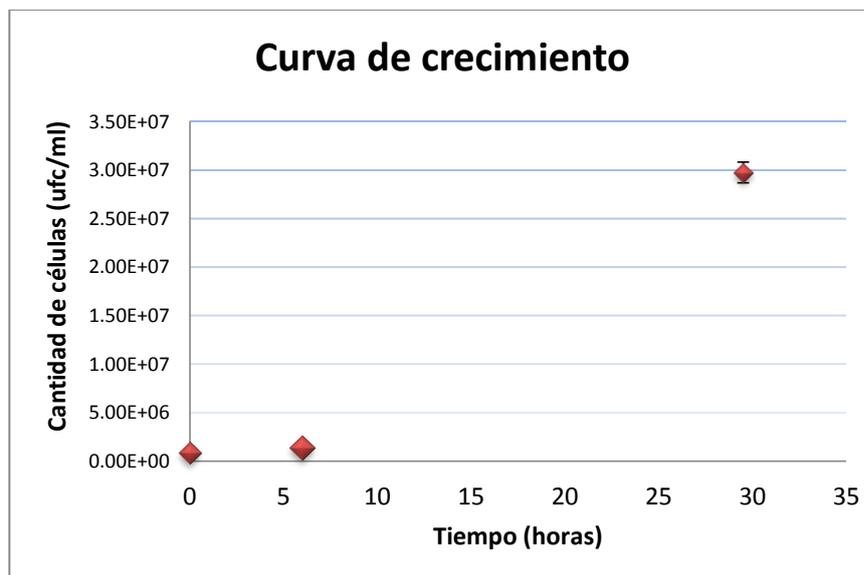
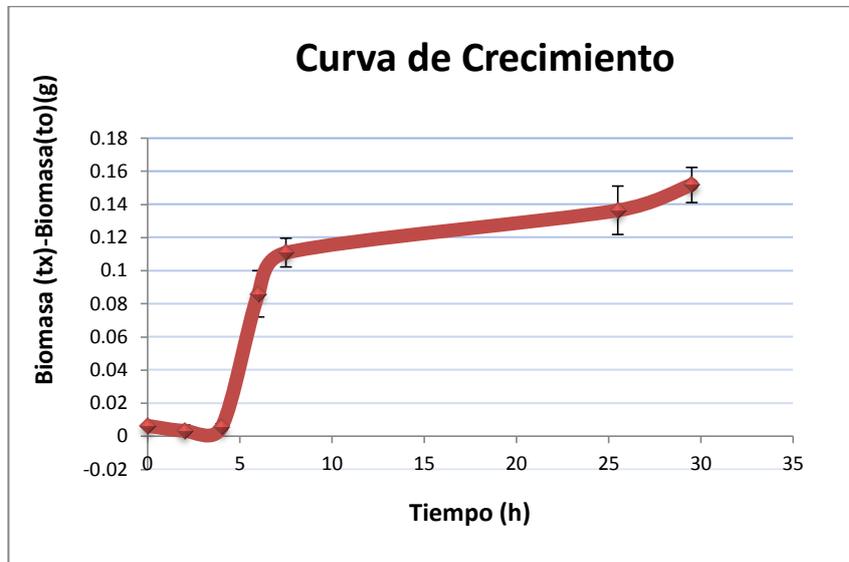


Gráfico 7. Curva de crecimiento en leche determinada por a) la biomasa (expresada en g) producida en 10 ml de cultivo durante 29 horas b) recuento de bacterias viables.

En los experimentos de Fermentaciones en Leche evaluados por seguimiento del pH, los coeficientes de variación fueron menores a 30 %, por lo que los datos fueron

pocos variables. Para las determinaciones de ácido láctico producido en el medio hasta las cuatro horas de fermentación, los valores calculados del coeficiente de variación fueron muy variables ($> 60\%$), a las seis horas se presentaron variables (entre 30% y 60%) y luego de este tiempo poco variables ($<30\%$). En el caso de la biomasa a tiempo cero y a cuatro horas la misma fue variable (entre 30% - 60%), a las dos horas muy variable ($> 60\%$) y luego de las cuatro horas poco variable ($< 30\%$). Para la curva de crecimiento expresada como las ufc/ml en función del tiempo los datos fueron poco variables ($<30\%$).

2. Sensibilidad a Penicilina, Dicloxacilina, Vancomicina y Estreptomicina

De la lectura de sensibilidad del aislamiento a la Penicilina (SIGMA 10MU) se puede afirmar que en las condiciones del ensayo la concentración mínima a la cual el aislamiento HA9-2 es sensible se encuentra en el entorno de los 0,0062 $\mu\text{g/ml}$ (Gráfico 8, Imagen 5). En el caso de la Dicloxacilina (SIGMA), la sensibilidad se presenta a concentraciones de antibiótico mayores a 0,1562 $\mu\text{g/ml}$ (Gráfico 9, Imagen 5).

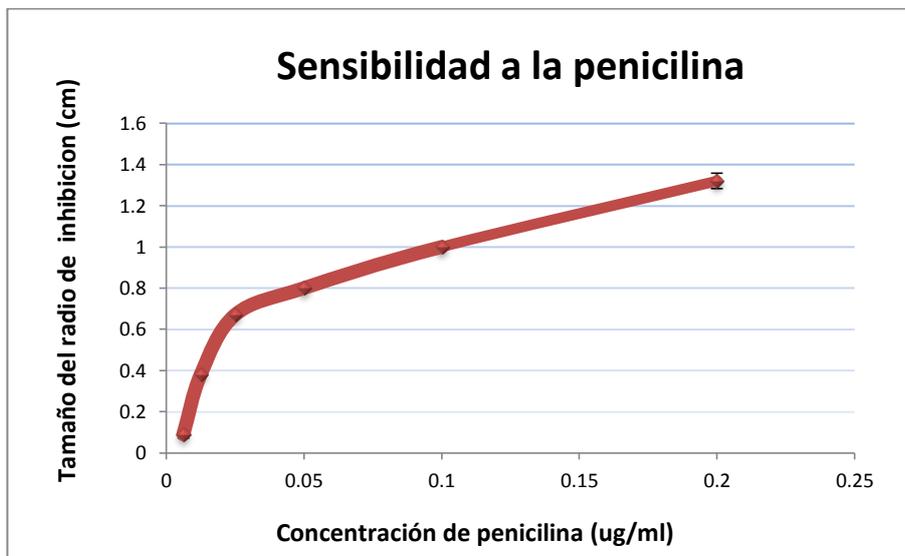


Gráfico 8. Sensibilidad a Penicilina del aislamiento HA9-2 expresada en función de la distancia de inhibición a diferentes concentraciones de antibiótico

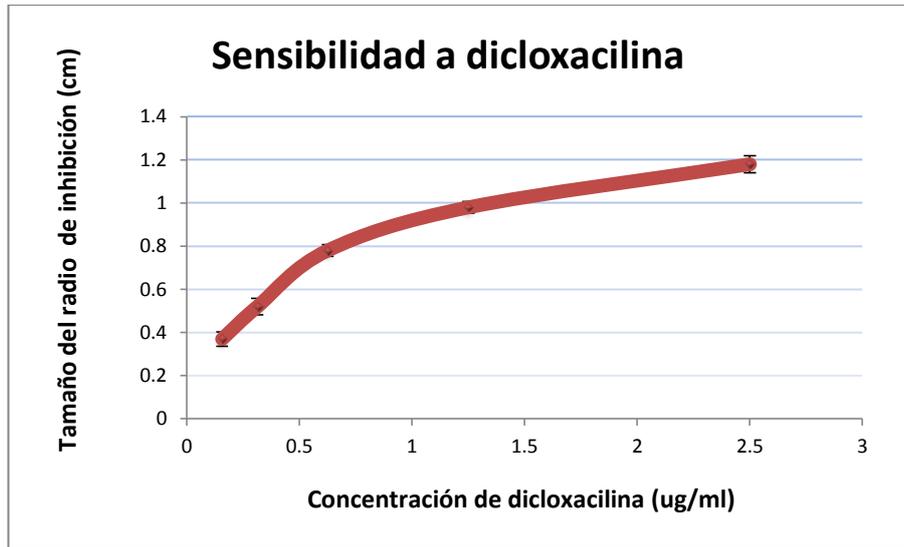


Gráfico 9. Sensibilidad a Dicloxacilina del aislamiento HA9-2 expresada en función de la distancia de inhibición a diferentes concentraciones de antibiótico.



Imagen 5. Ensayo de discos para penicilina (izquierda) y dicloxacilina (derecha).

En el Gráfico 10 se presentan los resultados del ensayo de discos para el antibiótico Vancomicina. Entre las concentraciones 4,19 y 33,50 ug/ml de Vancomicina, no se observaron halos de inhibición del crecimiento. Por debajo del disco de papel se observó crecimiento, el cual disminuía notoriamente en el caso de la concentración de 33,5 ug/ml. Para la concentración de 63 ug/ml se observó un pequeño halo de inhibición alrededor del disco de un radio de 0,15 cm y no se evidenció crecimiento debajo del disco. La concentración mínima a la cual el aislamiento HA9-2 presentó sensibilidad, en las condiciones de este ensayo, se encuentra entonces entre 33,5 y

63 $\mu\text{g/ml}$. Según Wilkerson *et al.* (2000) del Texas Department of Health, una MIC \geq 32 $\mu\text{g/ml}$ representa una verdadera resistencia a Vancomicina, contrario a lo pensado anteriormente donde el límite era de 8 $\mu\text{g/ml}$. Según estos criterios que son comparables parcialmente con los resultados obtenidos ya que no se trata de la misma técnica, el aislamiento HA9-2 es resistente a Vancomicina, lo cual es esperable ya que en general *Lactobacillus paracasei* presentan este tipo de resistencia de manera intrínseca (Hamilton-Miller *et al.*, 1998). Se debería probar por técnicas moleculares que la resistencia es intrínseca y no adquirida en un plásmido para descartar la posibilidad de transferencia horizontal.

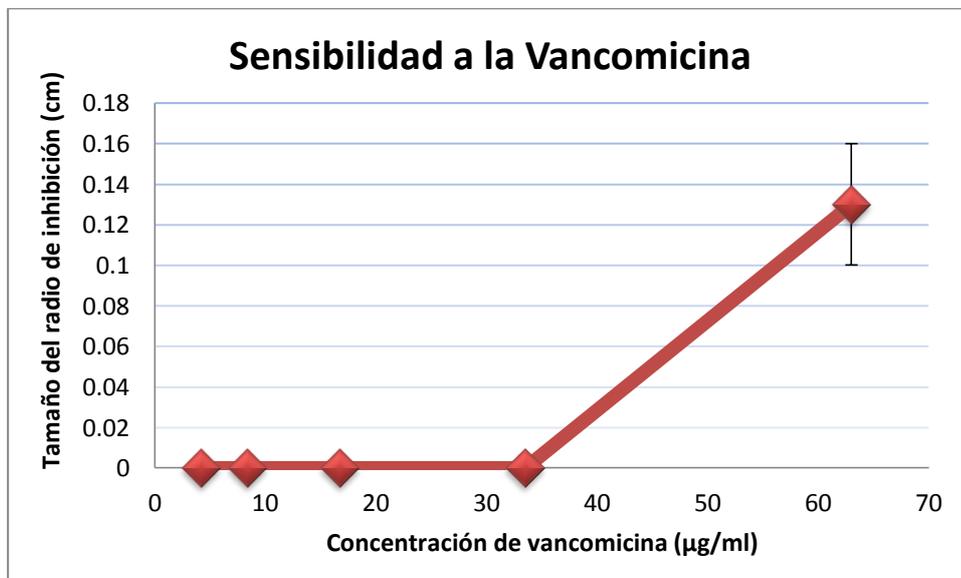


Gráfico 10. Sensibilidad a Vancomicina del aislamiento HA9-2 expresada en función de la distancia de inhibición a diferentes concentraciones de antibiótico.

En el Gráfico 11 se presentan los resultados del ensayo de discos para el antibiótico Estreptomomicina. Como puede observarse a concentraciones de 0,81 $\mu\text{g/ml}$ no se producen halos de inhibición, entre 1,62 y 13,00 $\mu\text{g/ml}$ si se producen pequeños halos difusos difíciles de medir con precisión. Cabe destacar que entre las concentraciones de 1,62 y 6,50 $\mu\text{g/ml}$ si bien se observaron los halos, se observa algo de crecimiento debajo de los discos; mientras que a la concentración de 13,00 $\mu\text{g/ml}$ no se observa crecimiento debajo del disco.

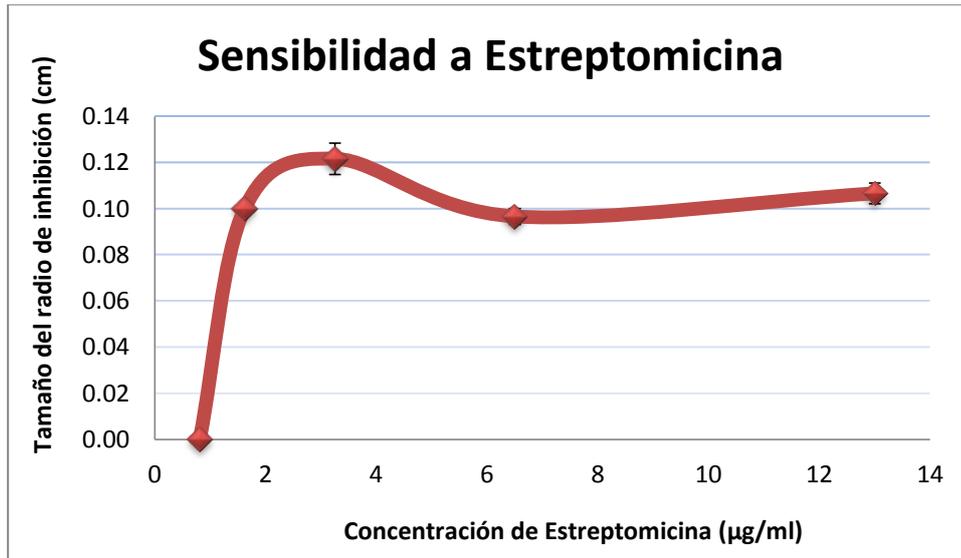


Gráfico 11. Sensibilidad a Estreptomina del aislamiento HA9-2 expresada en función de la distancia de inhibición a diferentes concentraciones de antibiótico.

Los resultados según el análisis estadístico fueron normales para todos los antibióticos ensayados. En los casos de Penicilina y Dicloxacilina hubo homogeneidad de varianzas, no registrándose diferencias significativas en el ANOVA para Penicilina a ninguna concentración mientras que para Dicloxacilina solo hubo diferencias significativas a concentraciones de 0,1562 ug/ml. Para el antibiótico Estreptomina a concentraciones de 3,25 ug/ml y para Vancomicina los datos presentaron homogeneidad de varianzas, y no se encontraron diferencias significativas (ANOVA), pero el test de Permutaciones mostró diferencias significativas. Para las demás concentraciones del antibiótico Estreptomina los datos no presentaron homogeneidad por lo cual se aplicó estadística no paramétrica y no se encontraron diferencias significativas entre los ensayos (Anexo 1).

En la siguiente Tabla (8) se presenta un resumen de los resultados obtenidos y el correspondiente valor de corte propuesto por la EFSA (EFSA, 2012) para *Lactobacillus paracasei*. En los caso de Penicilina y Dicloxacilina se utiliza el valor

propuesto para Ampicilina un β -lactámico derivado de Penicilina, para Vancomicina no hay valores de corte propuestos por EFSA.

Los discos utilizados como control negativo no presentaron zonas de inhibición, por lo que los halos de inhibición del crecimiento se debieron exclusivamente a la acción de las diferentes concentraciones de antibiótico utilizadas en los ensayos.

Tabla 8. Resumen de resultados de comportamiento del aislamiento frente a diferentes antibióticos ensayados

Antibiótico	Concentración de antibiótico a partir de la cual el aislamiento es sensible ($\mu\text{g/ml}$)	Punto de corte propuesto por EFSA ($\mu\text{g/ml}$)	Evaluación propuesta
Penicilina	0.006	4 (para Ampicilina)	Sensible
Dicloxacilina	0.15	4 (para Ampicilina)	Sensible
Estreptomicina	13	64	Sensible
Vancomicina	33.5-66	NR por EFSA/32 por Wilkerson <i>et al.</i> , 2000.	Resistente

3. Tolerancia del Aislamiento a 45 °C

Como puede verse en el Gráfico 12 no se produjo una disminución en la viabilidad de la bacteria al someterla a 45 °C durante 3 horas. Por el contrario, se pudo observar crecimiento de la misma con un aumento de la concentración celular de casi el 40 %. Cuando se evaluó la Tolerancia del aislamiento a la temperatura y al tiempo de producción de yogur, los datos fueron normales pero no homogéneos y el test de Kruskal – Wallis no mostró diferencias significativas (Anexo 1).

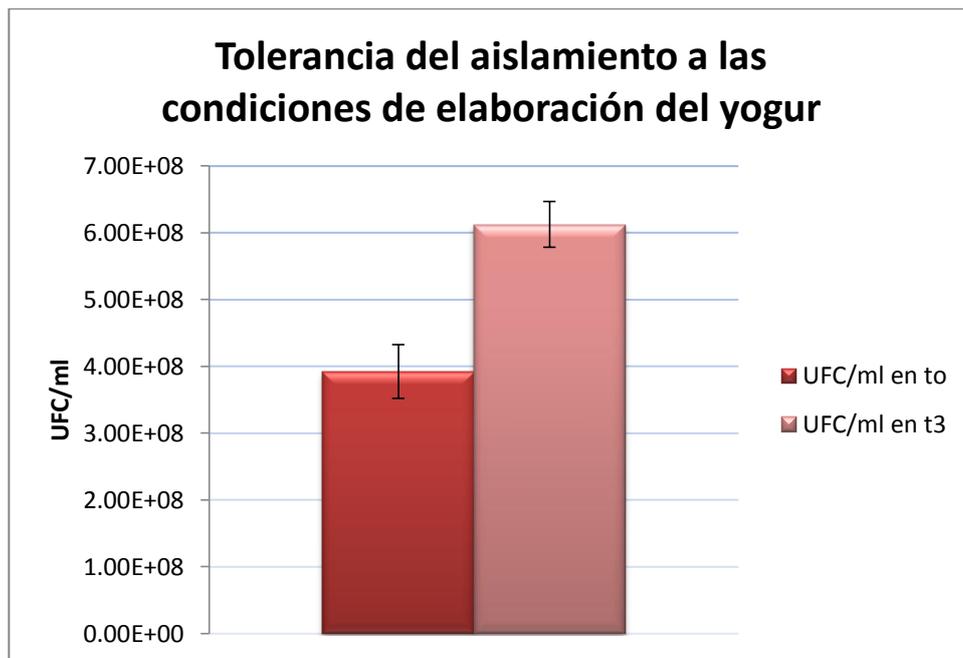


Gráfico 12. Recuentos previos y posteriores a someter al aislamiento a condiciones de temperatura y tiempo similares a una de las etapas de elaboración de yogur.

4. Conservación del Aislamiento por Liofilización

Los resultados de los recuentos iniciales y post liofilización pueden verse en la Tabla 9. Se pudo observar una importante disminución en la viabilidad bacteriana a los ochenta días de realizada la liofilización. Según surge del análisis estadístico a tiempo final los datos fueron normales y homogéneos y no hubo diferencias significativas (ANOVA). A tiempo cero, se determinó el CV menor a 30 por lo cual hay poca variabilidad de los datos en torno a la media (Anexo 1).

Tabla 9. Resultados del recuento bacteriano pre y post liofilización (80 días)

	Recuentos Pre liofilización	Recuentos Post liofilización
Media (UFC/ml)	2.20E+08	2.93E+02
Desvío estándar	1.51E+07	5.34E+01
Intervalo de confianza t	----	13.68
Coficiente de variación (CV)	6.88	----

5. Conservación del Aislamiento por Congelamiento

De acuerdo a los resultados de congelamiento del aislamiento (Tabla 10) no se produjo descenso en la viabilidad durante el proceso ni en el almacenamiento, ya que el recuento que se realizó 80 días post congelamiento mostró la misma concentración bacteriana. Se determinó el CV menor a 30 por lo cual hay poca variabilidad de los datos en torno a la media (Anexo 1).

Tabla 10. Resultados del recuento bacteriano previo al congelamiento y a los 80 días.

	Recuentos Pre congelamiento	Recuentos Post congelamiento
Media UFC/ml	1.31E+09	1.40E+09
Desvío típico	7.02E+07	1.06E+08
Coficiente de variación (CV)	5.36	7.57

DISCUSIÓN

El aislamiento HA9-2 exhibió buen crecimiento en leche, comportándose como fermentador lento ya que el pH no varió en más de una unidad durante 6 horas de cultivo en esas condiciones (Huggins *et al.*, 1984). Además, mostró una baja producción de ácido láctico en comparación con lo reportado por otros autores (Xu *et al.*, 2006; Estela *et al.*, 2007). El desarrollo de la acidez puede provenir de otros productos de fermentación. Estudios anteriores han demostrado que cepas de lactobacilos de diferentes grupos de fermentación producen pequeñas cantidades de ácido succínico (Annuk *et al.*, 2003). Hubiera sido aconsejable la utilización de técnicas como Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) para verificar la producción de ácido láctico y determinar otros productos del metabolismo. Si bien la velocidad específica de crecimiento no se pudo determinar con exactitud un valor de 0.40 h⁻¹ es análogo o incluso mayor al reportado para otros lactobacilos (Adamerg *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Estela *et al.*, 2007). Por las características del crecimiento, puede concluirse que sería posible obtener la biomasa necesaria para su empleo como probiótico ya que se obtuvo una alta productividad de biomasa similar a la obtenida por otros investigadores (Estela *et al.*, 2007). En futuros ensayos se modularán las condiciones de concentración inicial y de incubación con el fin de alcanzar una mayor concentración de células bacterianas (10⁸ ufc/ml) para obtener un producto probiótico con una dosis elevada.

En esta parte del estudio se obtuvieron además las curvas de inhibición del crecimiento bacteriano en función de las concentraciones de tres antibióticos. La posible sensibilidad frente a los antibióticos ensayados, los cuales son de uso corriente en la clínica, aparecería como ventajosa en caso de su administración en seres humanos, ya que una cepa con distintas resistencias podría representar un potencial peligro para la salud del consumidor. El aislamiento resultó resistente a Vancomicina, lo cual es esperable ya que en general *Lactobacillus paracasei* presenta

este tipo de resistencia de manera intrínseca (Hamilton-Miller et al., 1998). Se debería probar por técnicas moleculares que la resistencia es intrínseca y no adquirida en un plásmido para descartar la posibilidad de transferencia horizontal. Hubiera sido aconsejable en este ensayo utilizar cepas como control positivo pero no se contaba con ese material.

Con respecto a la tolerancia del aislamiento a la temperatura de 45 °C por 3 horas, condiciones que sufriría de ser incorporado a un proceso de producción de yogur, podemos concluir que no solo tolera dicha temperatura sino que aumenta su concentración.

Tanto el proceso de congelamiento como el almacenamiento a -70 °C no produjeron descenso en la viabilidad de la bacteria. En cambio, si bien la liofilización es un método que permite un mantenimiento de las bacterias por mayor tiempo, este proceso comprometió de manera considerable la viabilidad del probiótico. Una de las posibles causas de la pérdida de viabilidad podría estar relacionada con la temperatura en la cual se mantuvieron los liofilizados (temperatura ambiente). Futuros ensayos deberían repetir la liofilización y mantener el liofilizado a 4 °C, así como evaluar otros protocolos de liofilización, ya que ésta es una de las formas de comercialización de los cultivos iniciadores para la industria láctea.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

DISEÑO Y ELABORACIÓN DE UN YOGUR PROBIÓTICO EN PLANTA PILOTO

Con el objetivo de evaluar la capacidad del aislamiento HA9-2 de ser incorporado a un proceso de elaboración de yogur se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio en cocultivo con las bacterias que forman parte del cultivo iniciador de yogur, con el fin de evaluar posibles efectos sinérgicos o antagónicos que puedan afectar su desarrollo y en consecuencia al producto final.

Dado que hay diferencias de comportamiento de las bacterias cultivadas a diferentes escalas se elaboró un yogur con el agregado del aislamiento probiótico y se lo comparó con un yogur tradicional elaborado en las mismas condiciones a escala piloto. Los productos obtenidos se evaluaron desde el punto de vista sensorial por un panel del LATU (Laboratorio Tecnológico del Uruguay) entrenado para este fin.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudios de fermentaciones del aislamiento probiótico en cocultivo con las bacterias del yogur

Desarrollo del inóculo de las bacterias del yogur

El cultivo iniciador de yogur fue proporcionado por el Banco de Fermentos del LATU, estando compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (concentración 10^5 ufc/ml).

A partir del cultivo madre del Banco de Fermentos del LATU se inocularon al 1 % dos tubos que contenían 10 ml de leche en polvo libre de semisólidos reconstituida al 10 % con agua destilada y previamente esterilizada en autoclave abierto a 100°C

durante 30 min. Los mismos fueron incubados en estufa a 42 °C (media entre las dos temperaturas óptimas de las bacterias que forman el cultivo iniciador), a los efectos de mantener la población balanceada. La incubación se realizó en condiciones aerobias sin agitación durante 3 hs 20 min, hasta el momento que se cortó la leche. Posteriormente los tubos se colocaron a 4 °C para su utilización al día siguiente (19 hs).

Desarrollo de inóculo del aislamiento probiótico

A partir de un cultivo fresco en MRS, se inoculó al 10 % un matraz que contenía 50 ml de caldo MRS previamente esterilizado y se incubó en condiciones aerobias sin agitación toda la noche a 37°C. Los tubos se centrifugaron a 3500 g 15 min y las bacterias se resuspendieron en solución fisiológica. Luego, por medidas de absorbancia a 560 nm se ajustó la concentración celular en aproximadamente 1×10^7 ufc/ml en dos tubos con 5 ml de solución fisiológica estéril.

Fermentaciones Realizadas

A) Fermentación con el aislamiento HA9-2

Un matraz que contenía 500 ml de leche libre de semisólidos (CONAPROLE) estéril se inoculó al 1 % con el aislamiento probiótico (10^7 ufc/ml).

B) Fermentación con las bacterias del yogur

Un matraz que contenía 500 ml de leche libre de semisólidos (CONAPROLE) estéril se inoculó al 1 % con el cultivo iniciador de yogur explicado anteriormente (1×10^6 ufc/ml).

C) Fermentación de un cultivo mixto

Un matraz que contenía 500 ml de leche libre de semisólidos (CONAPROLE) estéril se inoculó al 1 % con el aislamiento probiótico y al 1 % con el *starter* de yogur.

D) Fermentación Control

Como control se utilizó un matraz de 500 ml que contenía 500 ml de leche libre de semisólidos (CONAPROLE) estéril, sin inocular.

Todos los matraces fueron incubados en estufa a 42°C, en condiciones aerobias, sin agitación por 3 hs 25 min.

Variables Analizadas

Se realizaron tomas de 10 ml para determinar la acidez del medio por medida directa con peachímetro (744 pH Meter Metrohm) y los ácidos orgánicos como ácido láctico por titulación con NaOH. También se realizaron tomas de 0,1 ml o 1 ml según el cultivo para realizar recuentos de bacterias totales. Los mismos se realizaron en MRS-agar, por siembra en superficie. Se incubaron por 48 hs a 37°C, se contaron y se volvieron a incubar por 72 hs más a 45°C a los efectos de favorecer el desarrollo de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La titulación se llevó a cabo según NORMA IDF 86-198 ISO 6091:1980 con soda 0.1 N valorada contra patrón secundario utilizando fenolftaleína como indicador.

2. Elaboración del yogur con el agregado del probiótico

Desarrollo del inóculo para la elaboración del yogur

Se realizó un preinóculo e inóculo al 3 % para el cultivo iniciador del yogur en las mismas condiciones anteriores. En forma paralela se desarrolló un cultivo durante toda la noche del aislamiento HA9-2 en condiciones de microaerofilia, sin agitación. Se ajustó la concentración bacteriana del aislamiento probiótico por medidas de absorbancia en 10^7 ufc/ml.

Elaboración de yogures tradicionales y yogures con el agregado del probiótico

En este ensayo se partió de 6 litros de leche comercial entera pasteurizada con 2,6 % de tenor graso. La misma se calentó en el pasteurizador hasta 35-40°C y se le agregaron 120 g de leche en polvo descremada CONAPROLE. La mezcla se pasteurizó hasta los 85 °C durante tres minutos y posteriormente se enfrió hasta aproximadamente 45°C. La leche se trasvasó a seis vasos de bohemia de 1000 ml, cada uno conteniendo 900 ml y se taparon con papel de aluminio.

Todos los matraces fueron inoculados al 3 % con el fermento de yogur y solo tres de ellos con el probiótico al 1 %. Los vasos fueron incubados en baño de agua previamente termostatzado a 42 °C.

Se siguió el pH del medio con pHmetro hasta un valor de pH entre 4,4 y 4,5. En este momento se rompió el coágulo en forma lenta y se cortó en un recipiente con agua fría e hielo.

Se tomó una muestra de cada serie para recuento a tiempo final y a los 5 días de almacenamiento de los yogures en cámara a 4 °C.

Los yogures elaborados fueron analizados por un panel de 30 personas del LATU en dos series, un análisis inicial a las 24 hs de elaboración y un segundo análisis a los 5 días de almacenado en cámara a 4 °C.

RESULTADOS

1. Estudios de fermentaciones del aislamiento probiótico en cocultivo con las bacterias del yogur

En los Gráficos 13 y 14 pueden verse la acidificación del medio así como los gastos de soda que se correlacionan con los ácidos orgánicos formados en los tres tipos de fermentaciones conducidas (fermentación con el aislamiento HA9-2, fermentación con el cultivo iniciador de yogur y fermentación mixta). Según se observa el aislamiento probiótico se encuentra saliendo de la fase lag cuando se detiene la fermentación por lo que no se observan cambios importantes en cuanto a los valores de pH y gastos de soda. En las otras fermentaciones si se producen variaciones importantes en el pH del medio que pasa de 6,23 a 4,48 y 4,42 en el cultivo de las bacterias del yogur y en el mixto con el probiótico respectivamente. Puede observarse una pequeña acidificación mayor en el cultivo mixto con el aislamiento probiótico.

No se observaron variaciones en cuanto al pH y a los gastos de soda en el control.

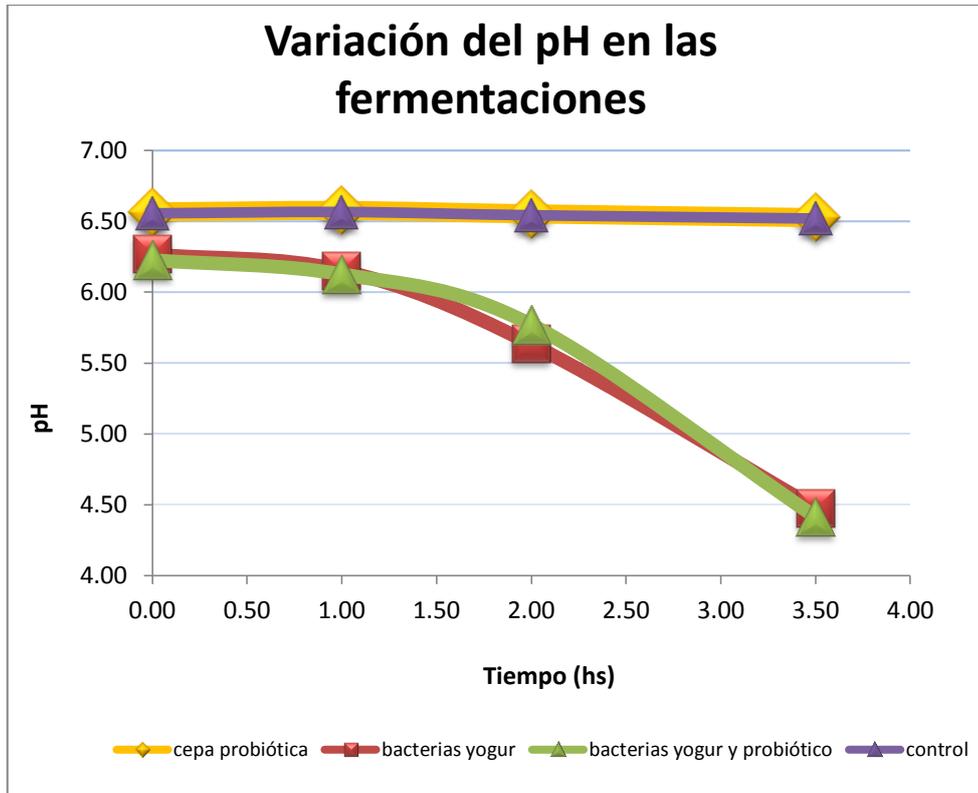


Gráfico 13. Valores de pH registrados a lo largo de las fermentaciones en función del tiempo de incubación. La desviación es tan pequeña que no se ve el símbolo.

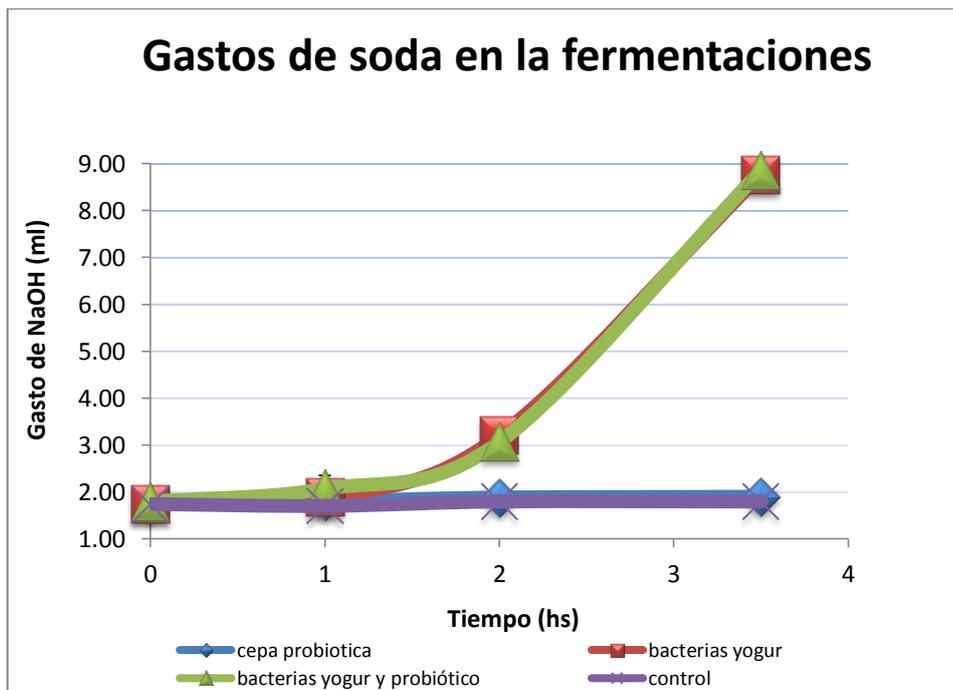


Gráfico 14. Gastos de soda registrados a lo largo de las fermentaciones en función del tiempo de incubación. La desviación es tan pequeña que no se ve el símbolo.

Según los recuentos realizados (Gráfico 15, Tabla 11), entre la hora 1 y la hora 2 de corrida es donde se observan los mayores cambios de pendiente en las tres fermentaciones marcando el final de la fase lag, siendo el cambio más pronunciado para el cultivo mixto con el probiótico. Se podría pensar que los recuentos en este último resultan de la suma de los crecimientos individuales con una pequeña disminución del crecimiento en el cultivo mixto pero con una mayor velocidad. En la Tabla 11 se presentan algunos parámetros de las fermentaciones realizadas en batch como la velocidad específica de crecimiento, la concentración de células iniciales y finales y la duración de la fase lag.

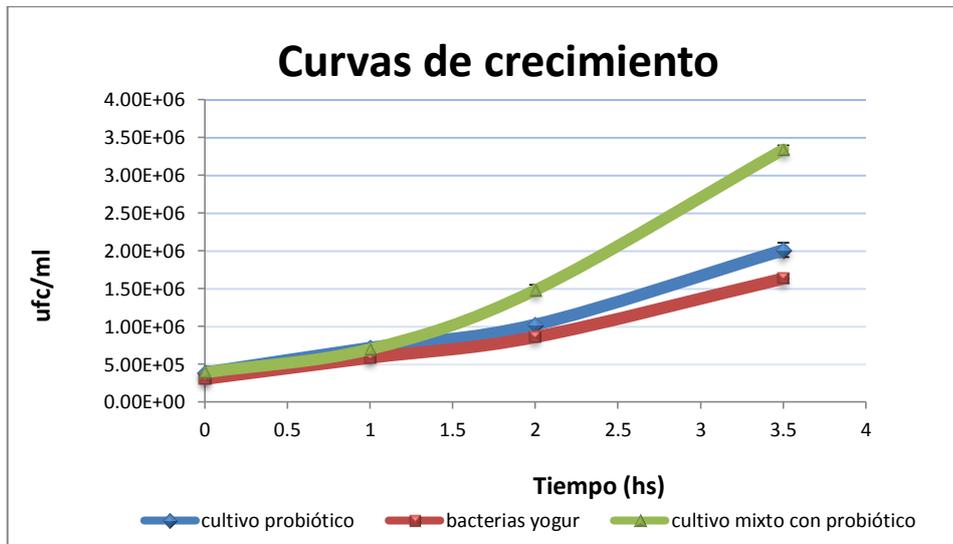


Gráfico 15. Curvas de crecimiento de las fermentaciones determinadas por recuento de microorganismos totales.

Tabla 11. Algunos parámetros de las fermentaciones, duración de la fase lag, No cantidad de células iniciales, N cantidad de células finales, μ velocidad específica de crecimiento.

Fermentaciones/ parámetros	Aislamiento probiótico HA9-2	Cultivo iniciador de yogur	Cultivo Mixto
Duración de la fase lag (horas)	1-2	1-2	1-2
No (ufc/ml)	3.88E+05	3.07E+05	3.90E+05
N (ufc/ml)	2.01E+06	1.63E+06	3.34E+06
μ (h ⁻¹)	0.407	0.406	0.662

2. Elaboración del yogur con el agregado del probiótico

Los resultados del seguimiento del pH en el medio pueden verse en el Gráfico 16, observándose una disminución esperada para un proceso de elaboración de yogur. Si comparamos ambos tipos de yogur puede verse claramente que el yogur probiótico acidifica ligeramente más que el elaborado tradicional. También puede observarse que ambas fermentaciones fueron detenidas a valores distintos de pH.

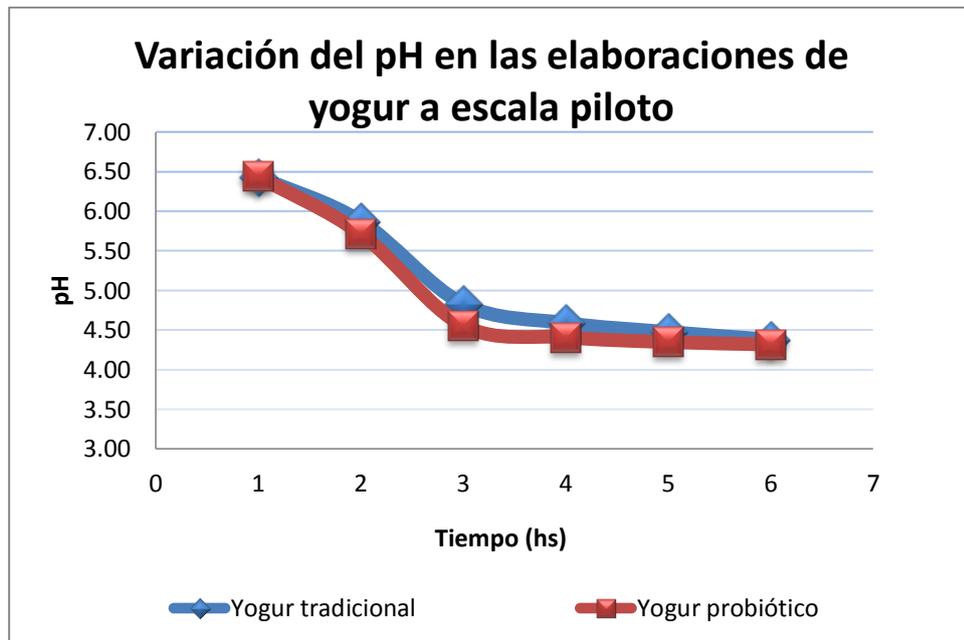


Gráfico 16. Valores de pH registrados a lo largo de la producción de los yogures. La desviación es tan pequeña que no se ve el símbolo

Los recuentos a tiempo final de elaboración y a los 5 días de almacenamiento en cámara a 4 °C pueden verse en la Tabla 12. Se puede observar que las diluciones en el yogur tradicional no fueron adecuadas ya que no se registraron colonias de las bacterias del yogur. Los recuentos registrados en el yogur con probiótico se deben en parte al aislamiento probiótico. Con ello se ve claramente la viabilidad de la bacteria probiótica a lo largo del proceso de elaboración y durante el almacenamiento en las condiciones que fue realizado. Puede observarse además que durante el almacenamiento sigue su crecimiento y pasa de una concentración de

alrededor de 3×10^5 a $3,5 \times 10^6$. Por tanto se llega a una concentración de 10^8 ufc/100 ml de yogur llegándose a obtener la concentración necesaria en el producto para adjudicarle propiedades probióticas.

Tabla 12. Resultados de los recuentos realizados a tiempo final post elaboración y a los 5 días de almacenamiento.

SERIE A Yogur tradicional	UFC/ml media ± desvío típico
Final de la elaboración	$<10^5$
SERIE B Yogur con el agregado de probiótico	UFC/ml ± desvío típico
Final de la elaboración	$3.67e5 \pm 2.89e4$
Después de 5 días de almacenamiento a 4 °C	$3.80e6 \pm 2.65e5$

Según el informe del estudio del panel proporcionado por el departamento AGROPEC (Análisis de Productos Agropecuarios) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, los datos se analizaron en tablas binomiales para dos colas, en donde para 30 juicios se requieren 21 juicios afirmativos para afirmar con un nivel de significancia del 95 % la existencia de diferencias significativas para las dos muestras. Para la primera sesión a las 24 horas de producido el yogur se obtuvieron 16 resultados afirmativos y 14 resultados negativos por lo que no existen diferencias significativas entre ambos yogures (alfa 0.05). Para la segunda sesión a los cinco días de elaborado se registraron 22 resultados afirmativos contra 8 resultados negativos por lo que existe diferencia significativa entre las muestras. De los 22 juicios positivos 17 encontraron el yogur probiótico levemente más ácido.

Resultados del análisis estadístico

Los coeficientes de variación de los parámetros evaluados en las fermentaciones en donde se estudió el comportamiento del lactobacilo en presencia de las bacterias del yogur así como en las elaboraciones del yogur tradicional y el yogur con el probiótico agregado a escala piloto, fueron todos menores de 30, por lo que se produjo poca variabilidad de los datos en torno a la media en cada ensayo.

DISCUSIÓN

Las velocidades específicas de crecimiento determinadas tanto para el aislamiento HA9-2, el cultivo iniciador de yogur y el cultivo mixto, corresponden a microorganismos adaptados a medios lácteos según lo reportado anteriormente por Lomas de León *et al.*, en 2006. Con respecto a la viabilidad de la misma en cultivo mixto con las bacterias del yogur, podemos afirmar que el aislamiento HA9-2 permanece viable por lo que podría ser utilizado como aditivo de un yogur tradicional elaborado con este tipo de fermentos.

Según los resultados obtenidos, el aislamiento presentaría la habilidad de sobrevivir al proceso de elaboración de yogur sin modificar post producción las características sensoriales del mismo. Luego de su almacenamiento continúa su crecimiento por lo que acidifica en alguna medida el medio, variable que podría ser controlada en el proceso de elaboración por ejemplo deteniendo la fermentación previo al almacenamiento por modificación del pH al final del proceso.

En los últimos años son numerosos los reportes de la elaboración de yogures probióticos con distintos efectos (Kuo *et al.*, 2013; Mani-López *et al.*, 2014). En consecuencia, la disponibilidad de un producto de estas características podría constituir una contribución significativa en el campo de los alimentos funcionales en nuestro medio.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Fue posible aislar y caracterizar un aislamiento bacteriano con un promisorio potencial probiótico, volviéndolo interesante dada la tendencia actual de utilizar cepas regionales por seguridad alimentaria y planteando nuevos desafíos a empresas nacionales que se dediquen a producir y comercializar cultivos iniciadores para la industria.

Se ha demostrado además que este aislamiento cumple con los requisitos químicos y tecnológicos para ser incorporado a un proceso de elaboración de yogur.

En conclusión, este aislamiento de *Lactobacillus sp.* HA9-2 obtenido de materia fecal humana es un prometedor candidato para ser utilizado en la preparación de productos probióticos.

Perspectivas

- Repetir la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S y realizar PFGE para completar la identificación molecular.
- Desarrollar un medio de recuento diferencial del aislamiento probiótico.
- Realizar la transferencia de la cepa a una industria nacional que incursione en la producción de fermentos.
- Concluidos los ensayos correspondientes a la maestría se llevó a cabo un segundo proyecto financiado por el LATU, titulado “Escalado de la fermentación de la cepa probiótica HA9-2 para su utilización en la elaboración de quesos”. En el mismo se diseñó un medio económico en base a suero de queso, un desecho de la industria de la láctea para desarrollar el aislamiento probiótico HA9-2. También se desarrolló un queso fundido probiótico a nivel industrial.

Publicaciones en revistas arbitradas

Vázquez* S., Lopretti M., Rey F., Zunino “Capacidad de coagregación, autoagregación, producción de exopolisacáridos, glucano insoluble y peróxido de hidrógeno de una cepa nativa de *Lactobacillus paracasei* HA9-2” *INNOTEC*, 2013, enviado para publicación.

Vázquez* S., Lopretti M., Rey F., Zunino “Sensibilidad a antibióticos, actividad antibacteriana frente a patógenos y fermentaciones ácido lácticas de una cepa nativa de *Lactobacillus paracasei* de origen humano” *INNOTEC*, 2010, vol 5, 39 – 42 p.

Vázquez* S., Crossa M.J., Lopretti M., Rey F. “Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2” *INNOTEC*, 2009, vol 4, 10-14 p.

Vázquez* S., Lopretti M., Rey F., Zunino P. Aislamiento y Caracterización de Cepas Nativas de *Lactobacillus* spp. para su Uso como Probióticos en la Industria Láctea *INNOTEC*, 2007, vol 2, 12-15 p.

Presentaciones en eventos científicos

•Presentación de un póster “Aislamiento y Caracterización de Cepas Nativas de *Lactobacillus* para su uso como Probióticos en la Industria Láctea” en el 3º SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INNOVACION Y DESARROLLO DE ALIMENTOS INNOVA, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Montevideo, Uruguay, octubre 2007. Lic. Sylvia Vázquez Zeballos, Dra. Mary Lopretti, Lic. Fabiana Rey, Dr. Pablo Zunino.

•Presentación oral “Estudio de la Sensibilidad a Antibióticos, Exclusión de Patógenos y Fermentaciones Ácido Lácticas de una Cepa Nativa de *Lactobacillus paracasei* de Origen Humano” en el IV Encuentro Regional de Ingeniería Química - EXPOQUIM 2008 junio-2008, LATU, Montevideo, Uruguay. Lic. Sylvia Vázquez Zeballos, Dra. Mary Lopretti, Lic. Fabiana Rey, Dr. Pablo Zunino.

- Presentación “Desarrollo de un probiótico para la industria láctea” por parte de la Lic. Fabiana Rey en Biolatina setiembre-2008, Brasil.
- Presentación de un póster “Viabilidad del Uso de Suero de Quesería como Base del Medio de Cultivo de la Cepa Nativa Probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2” en el 4º SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INNOVACION Y DESARROLLO DE ALIMENTOS INNOVA, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Montevideo, Uruguay, setiembre 2009. Lic. Sylvia Vázquez Zeballos, Ing. María José Crosa, Dra. Mary Lopretti, Lic. Fabiana Rey.

ANEXO I – ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Resultados del ANOVA para diferentes experimentos (CME= cuadrado medio entre las muestras, CMD, cuadrado medio dentro de las muestras, F= estadístico de Snedecor calculado, p= valor de probabilidad, en negrita si es menor de 0,05) y la comparación de Tukey's. Cuando corresponde los test de Kruskal-Wallis con el Test a posteriori de Mann-Whitney corregido con el criterio de Bonferroni o el test de Permutaciones.

ANOVA Ensayos de tolerancia a sales biliares deshidratadas					
Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
MRS_sin_sales biliares deshidratadas (A)	3272.33	168.89	19.38	0.002	E1 dif E2 y E3=E2
MRS + 0.5% de sales biliares d.(B)	1132.33	49.89	22.7	0.002	E1 dif E2 y E3=E2
MRS + 0.9% de sales biliares d.(C)	689.79	21.22	32.5	0.0006	E1 dif E2 y E3=E2
Comparación entre las tres condiciones A, B y C	4122.7	484.54	8.5	0.0016	A dif B y C; B=C

ANOVA Ensayos de resistencia al pH					Test de Kruskal-Wallis			
Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's	Hc	p	Test a posteriori Mann-Whitney corregido por Bonferroni
%pH 1.90 (A)	0.56	0.91	0.62	0.569	E1=E2=E3			
%pH 3.09 (B)	57.24	9.27	6.18	0.035	E1=E2, E2=E3, E1 dif E3			
%pH 6.00 (C)	489.73	23.25	21.07	0.002	E1 dif E2 y E3, E2=E3			
Comparación entre condiciones	3.39E+18	1.73E+16	195.40	1.41E-15	A dif B y C; B dif C	20	3.90E-05	A dif B y C; B dif C

Condición	ANOVA Ensayos de Modelo Gástrico				Comparación de Tukey's	Test de Kruskal-Wallis		Test a posteriori Mann-Whitney corregido por Bonferroni
	CM E	CM D	F	P		Hc	p	
% pH 6.1 en to (A)	0.00	14.87	0.00	1.000	E1=E2=E3			
% pH 6.1 en tf (B)	2.32	44.15	0.05	0.949	E1=E2=E3			
% pH 2.1 en tf (C)	36.42	33.12	1.10	0.349	E1=E2=E3			
Comparación entre condiciones	15668.60	16.08	974.60	1.048E-23	A dif B y C; B dif C	23.14	9.36E-06	A dif B y C, B dif C

Condición	ANOVA Ensayos de Exclusión de Patógenos				Comparación de Tukey's	Test de Kruskal-Wallis		Test a posteriori Mann-Whitney corregido por Bonferroni
	CM E	CM D	F	P		Hc	p	
Concentración 10 ⁸	1.556	0.778	1.167	0.373	E1=E2=E3			
Comparación entre condiciones concentración 10e4 (A), 10e5 (B), 10e6 (C), 10e7 (D), 10e8 (E)						41.2	2.44E-08	A=B, A y B dif de C, D y E, C=D, C y D dif E

Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
Comparación entre HA9-2 (A); <i>L. rhamnosus</i> control + (B) y <i>L. acidophilus</i> (C) control +	0.14	0.03	5.53	0.044	A=B, B=C, A dif C
ANOVA Ensayos de Adhesión a células CaCO ₂ evaluados por radioactividad					
Comparación entre HA9-2 (A) y <i>L. acidophilus</i> (C) control +	0.62	0.64	0.96	0.399	A=C

Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
Comparación entre la producción en el medio suplementado con 5% de sacarosa (A) y 10% de sacarosa (B)	0.01	0.00	21.66	0.003	A dif B

Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
tiempo 0	6.67E+09	2.67E+10	0.3	0.643	E1=E2=E3
tiempo 6 hs	3.27E+11	6.83E+10	4.8	0.094	E1=E2=E3
tiempo 29 hs	6.25E+12	3.25E+12	1.9	0.300	E1=E2=E3

Concentración de penicilina en ug/ml	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
0.200	0.082	0.017	4.900	0.091	E1=E3 E2 no participa porque no hay varianza entre los datos
0.025	0.006	0.001	4.200	0.072	E1=E2=E3
0.013	0.008	0.002	4.667	0.060	E1=E2=E3
0.006	0.000	0.005	0.077	0.795	E1=E3 E2 no participa porque no hay varianza entre los datos

Concentración de penicilina en ug/ml	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's
1.2500	0	0.0021	0	1	E2=E3 E1 no hay varianza
0.6250	0.0004	0.0017	0.250	0.643	E2=E3 E1 no hay varianza
0.3125	0.0003	0.0033	0.083	0.921	E1=E3 E2 no hay varianza
0.1562	0.0053	0.0008	6.333	0.033	E1difE2 E1=E3

Condición	ANOVA Ensayos de sensibilidad a Vancomicina				Test de Permutaciones			
	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey's	Media muestras 1	Media Muestra 2	p
Concentración Vancomicina (ug/ml) 63	0,015	0.002	7,2	0,055	E1=E2	0.183	0.083	0.0001

Condición concentración de estreptomycinina (ug/ml)	ANOVA Ensayos de sensibilidad a estreptomycinina				Test de Kruskal-Wallis			Test a posteriori Mann- Whitney corregido por Bonferroni
	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey`s	Hc	p	
3.25	0.00042	0.00042	1.923	0.238	E1=E2			
6.50	0.00007	0.00007	1	0.374	E1=E2	1	0.317	E1=E2
13.00	0.00027	0.00027	4	0.116	E1=E2	2.5	0.114	E1=E2
Test de permutaciones t								
	Media muestras 1	Media Muestra 2	p					
3.25	0.113	0.130	0.0001					
6.50	0.093	0.100	0.0001					
13.00	0.100	0.113	0.0001					

Test de Kruskal-Wallis tolerancia de la cepa temperatura y tiempo de producción de yogur		
Hc	p	Test a posteriori Mann-Whitney corregido por Bonferroni
3.714	0.156	E1=E2=E3
3.714	0.156	E1=E2=E3

ANOVA Ensayos de Conservación de la cepa por liofilización					
Condición	CM E	CM D	F	P	Comparación de Tukey`s
Tiempo final	4900	2166.67	2.262	0.185	E1=E2=E3

ANEXO II- MEDIOS DE CULTIVO

MRS (MAN ROGOSA SHARPE) AGAR MARCA OXOID

Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona N° 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13.0
pH final: 6.4 ± 0.2	

MRS CALDO MARCA OXOID

Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona N° 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
pH final: 6.4 ± 0.2	

PCA (Plate count agar) MARCA OXOID

Fórmula (en gramos por litro)	
Triptona	5.0
Extracto de levadura	2.5
Glucosa	1.0
Agar	9.0
pH final: 6.4 ± 0.2	

PDA (Potato dextrose agar) MARCA OXOID

Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de papa	4.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0
pH final: 5.6 ± 0.2	

YPD (Yeast potato dextrose)

Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de levadura	10.0
Glucosa	20.0
Peptona bacteriológica	10.0
Agar	15.0
pH final: 5.6 ± 0.2	

ANEXO III- ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Prueba catalasa

Procedimiento: Se coloca una gota de H₂O₂ al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfiere una porción de colonia sobre el H₂O₂ realizándose una emulsión.

Interpretación de resultados: El desprendimiento de burbujas se considera una prueba positiva (Brock et al., 1993).

Coloración de Gram (Técnica de Hucker)

Procedimiento: Se preparan frotis de la bacteria a partir de un cultivo. Con la ayuda de un mechero, se fija el extendido por calor. Se cubre la extensión con cristal violeta y se deja actuar durante un minuto. Se lava con agua corriente y se elimina el exceso de agua. Se cubre la extensión con solución de lugol y se deja actuar por un minuto. Se lava con agua corriente. Se decolora con la solución decolorante 30 segundos (etanol 95 %). Se lavar con agua corriente. Se cubre la extensión con Safranina y dejar actuar por 15 segundos. Se Lava con agua corriente 10 segundos y se seca la preparación al aire. Se Coloca una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Interpretación:

- Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta y se teñirán en azul o violáceas.
- Las Gram negativas se tiñen en rojo o rosa.

REFERENCIAS

- Abe A.; Furukawa S.; Watanbe S.; Morinaga Y. Yeasts and lactic acid bacteria mixed-specie biofilm formation is a promising cell immobilization technology for ethanol fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013, 171(1): 72-79.
- Adamberg K.; Antonsson M.; Vogensen F.; Nielsen E.; Kaska S.; Moller P.; Ardo Y. Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. *Int. Dairy J.* 2005, (15): 873-882.
- Annuk H.; Shchepetova J.; Kullisaar T.; Songisepp E.; Zilmer M.; Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* 2003, (94):403-412.
- Anukam K.; Osazuwa E.; Osemene G.; Ehigiagbe F.; Bruce A.; Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect.* 2006, (8): 2772-2776.
- Aureli P.; Capursob L.; Castellazzi A.; Clerici M.; Giovannini M.; Morellif L.; Poli A.; Pregliasco F.; Salvini F.; Vincenzo G. Review Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research.* 2011, (63): 366-376.
- Backhed F.; Ley R.; Sonnenburg J.; Peterson D.; Gordon J. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005, (307): 1915-1920.
- Ballabriga A. Nutrición en la infancia y adolescencia. Madrid: Ed. Ergon. 2001, p. 625-662.
- Bauer A.; Kirby W.; Sherris J.; Turk. M. Antibiotics Susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Pathol.* 1966, 45: 493-496.
- Bernet M.F.; Brassart D.; Nesser .R.; Servin A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994, (35):483-489.
- Betancor G., Pereira M., Martinez A., Giossa G., Fookes M., Flores K., Barrios P., Repiso V., Vignoli R., Cordeiro N., Algorta G., Thomson N., Maskell D., Schelotto F., Chabalgoity, A.. Prevalence of *Salmonella enteric* in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48(7): 2413-2423.
- Binns C.;Yung Lee M. The use of Probiotics to Prevent Diarrhea in Young Children Attending Child Care Centers: A Review. *J. Exp. Clin. Med.* 2010, 2(6): 269-273.
- Blanchette L.; Roy Q.; Belanger G.; Gauthier S.. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Science.* 1996, (79): 8-15.

Borbonet S. Historia de la Quesería en Uruguay. Montevideo: Ed. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), 2001.

Boyle R.; Bath-Hextall F.; Leonardi-Bee J.; Murrell D.; Tang M. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. *Clin. Exp. Allergy*. 2009, (39): 1117–1127.

Brock D.T.; Madigan M.T. Microbiología. México: Ed. Prentice Hall Hispanoamérica S.A. . 6ª edición, 1993, 956 pp.

Caballero-Franco C.; Keller K.; De Simone C.; Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2007, (292): G315–322.

Calderón O.; Padilla C.; Chaves C.; Villalobos L.; Arias M. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogur natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteridis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2007, (57): 1-6.

Campana R.; Federici S.; Ciandrini E.; Baffone W. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*. *Current Microbiol*. 2012, 64 (4): 371-378.

Cani P.; Delzenne N. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des*. 2009, (15): 1546–1558.

Carbonero M. Tesis de Doctorado. Estudio de *Streptococcus mutans* en un Modelo Experimental. Aportaciones Epitopatogénicas. Universidad Complutense de Madrid, 1991.

Cisar J. O.; Kolenbrander P. E.; McIntire F. C. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun*. 1979, (24): 742-752.

Charteris W.P.; Kelly P.M.; Morelli L.; Collins J.K. Ingredient selection criteria for the probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol*. 1998 a, 54 (4): 123-136.

Charteris W.; Kelly P.; Morelli L.; Collins J. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Protect*. 1998 b, 61 (12): 1636-1643.

Charteris W.; Kelly P.; Morelli L.; Collins. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. App. Microbiol*. 1998 c, (84): 759-768.

Christensen G.; Simpson W.A.; Bisno A.L.; Beachey E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 1982, (37): 318-326.

Coconnier M.H.; Klaenhammer T.R.; Kerneis S.; Bernet M.F.; Servin A.L. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol.* 1992, 58(6): 2034-2039.

Correia M.; Liboredo J.; Consoli M. Review The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Nutrition.* 2012, (28): 230-234.

Cremonini F.; Di Caro S.; Nista E.; Bartolozzi F.; Capelli G.; Gasbarrini G. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002, (16): 1461-1467.

Crittenden R.G.; Morris L.F.; Harvey M.L.; Tran L.T.; Mitchell H.L. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a symbiotic yoghurt. *J. Appl. Microbiol.* 2001, (90): 268-278.

Danielsen M.; Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiology.* 2003, (82): 1- 11.

Davidson G.; Butler R. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders. *Current Opinion Pediatr.* 2000, (12): 477-481.

De Jonghe K.; De Dobbelaere I.; Sarrazyn R.; Höfte M. Control of *Phytophthora cryptogea* in the Hydroponic Forcing of Witloof Chicory with the Rhamnolipid-based Biosurfactant FormulationPRO1. *Plant Pathology.* 2005, 54: 219-226.

Deshpande G.; Rao S.; Patole S.; Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics.* 2010, (125): 921-930.

D'Souza A.; Rajkumar C.; Cooke J.; Bulpitt C. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* 2002, 324:1361.

EFSA. SCIENTIFIC OPINION, Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), *EFSA Journal.* 2012, 10 (6): 2740.

Espinosa L. Capítulo 17, Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología Molecular. México: Ed. Instituto Nacional de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2007, 1 ed, 594 pp.

Estela W.; Rychtera M.; Melzoch K.; Quillama E., Egoavi E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivo batch y continuo. *Rev. Per. Biol.* 2007, 14 (2): 271-275.

FAO; WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powdered milk with live lactic acid bacteria. Expert Consultation Report. Córdoba, Argentina: Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001.

FAO; WHO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Reporte de la Consulta de Expertos. Roma, Italia: Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2006.

Fernandez M.; Boris S.; Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 2003, (94): 449-455.

Folle G.; Martinez W. Cuadernillo Curso Básico de Cultivo de Células PEDECIBA-BIOLOGIA. Uruguay: Ed. Departamento de Genética Toxicológica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 2007.

Fraga M.; Scavone P.; Zunino P. Preventive and therapeutical administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2005, (88): 25-34.

Frank D.; Amand A.; Feldman R.; Boedeker E.; Harpaz N.; Pace, N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. 104 (34): 13780-13785.

Friss de Kereki C.; Gretter M. Métodos de Preservación de Bacterias Lácticas: Congelación y Liofilización (Crioprotectores). Uruguay: Ed. *Comunicaciones Científicas 2as Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria.* 1991, 222 pp.

Fuller R. A Review Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriology.* 1989, (66): 365-378.

Gamar L.; Blondeau K.; Simonet J. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiology.* 1997, (83): 281-87.

Ganesan B.; Weimer B.C.; Pinzon J.; Dao Kong N.; Rompato G.; Brothersen C.; McMahon D. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2014, (116): 1642-1656.

Gismono M.R.; Drago L.; Lombardi A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Inter. J. Antimicrobial Agents.* 1999, 12(4): 287-292.

Gomes A.; MALCATA X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods Technol.* 1999, (10): 139-157.

Guandalini S. Probiotics for children: use in diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006, (40): 244-248.

Guandalini S.; Pensabene L.; Zikri M.; Dias J.; Casali L.; Hoekstra H. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000, (30): 54–60.

Hamilton M.; Fuller R. Probiotics panacea or nostrum. *BNF Nutr Bull.* 1996, (21): 199–208.

Hamilton-Miller J.; Shah S. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Appl. Microbiol.* 1998, (26): 153-154.

Hammer & Harper, Ryan PD. PAST: paleontological statistic software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica.* 2001, 4(1):1–9.

Haruta S.; Ueno S.; Egawa I.; Hashiguchi K.; Fujii A.; Nagano M.; Ishii M.; Igarashi Y. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 2006. 109 (1-2): 79-87.

Hekmat S.; Soltani H.; Reid G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2009, (10): 293–296.

Hettwer U.; Gross M.; Rudolph K. Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *J. Bacteriol.* 1995, 177 (10): 2834-2839.

Hugenholtz P.; Goebel B.M; Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 1998, (180): 4765–4774.

Huggins A.; Sandine W. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strain of lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.* 1984, 67(8): 1674-1679.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 86-198: *Dried milk, Determination of titratable acidity reference method.* Brussels: 1981. Texto equivalente en la Organization for Standarization ISO 6091:1980.

Ishibashi N.; Shimamura S. Bifidobacteria: research and Development in Japan. *Food Technol.* 1993, (47): 126–35.

Isolauri E. The role of probiotics in pediatrics. *Current Pediatrics.* 2004, (14): 104–109.

Jacobsen C.N.; Rosenfeldt N.V.; Hayford A.E.; Moller P. L.; Michaelsen K. F.; Paerregaard A.; Sandstrom B.; Tvede M. Jacobsen M. Screening of probiotics activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, (65): 4949-4956.

- Jimenez M. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Ed: Editorial de la Universidad de Granada, España. 2010, 298 pp.
- Jones B.; Sun F.; Marchesi J. Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMCGenomics*. 2010, 11:46.
- Jones S.; Verslovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*. 2009, 9(35): 1-9.
- Juntunen M.; Kirjavainen P. V.; Ouwehand A. C.; Salminen S. J.; Isolauri E. Adherence of Probiotic Bacteria to Human Intestinal Mucus in Healthy Infants and during Rotavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology*. 2001, (2): 293-296.
- Kimoto H.; Kurisaki J.; Tsuji N.M.; Ohmomo S.; Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Appl. Microbiol*. 1999, (29): 313-316.
- Kirjavainen P.V.; Ouwehand A.C.; Isolauri E.; Salminen S.J. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Letters*. 1998, (167): 185-189.
- Kirsop B.; Snell J. Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods. London: Ed. Academic Press. 1984, pp 207.
- Klaenhammer T.R.; Kleeman E.G. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1981, (41): 1461-1467.
- Kukkonen K.; Savilahti E.; Haahtela T.; Juntunen-Backman K.; Korpela R.; Poussa T. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007, (119): 192-198.
- Kuo C.; Wang S.; Lu C.; Hu H.; Kuo F.; Weng B.; Wu C.; Liu C.; Tsai P.; Lee T.; Chen L.; Cheng K.; Chang L.; Wu D. Long-Term Use of Probiotic-Containing Yogurts Is a Safe Way to Prevent Helicobacter pylori: Based on a Mongolian Gerbil's Model. *Biochem Res Int*. 2013; 2013:594561. doi: 10.1155/2013/59456.
- Landersjö, C.; Yang, Z.; Huttunen, E.; Widmalm, G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules*. 2002, (3): 880-884.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Chichester, UK: Ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Wiley. 1991, pp 115-175.
- Lavari L.; Páez R.; Cuatrin A.; Reinheimer J.; Vinderola G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *J. Dairy. Res*. 2014, (26): 1-8.

- Lee Y.; Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technol.* 1995, (6) :241–245.
- Lee Y.; Lim C.; Teng W.; Ouwehand A.; Toumola E.; Salminen S. Quantitative Approach in the study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, (66): 3692-3697.
- Lee J.; Seto D.; Bielory L. MD Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, (121): 116-121.
- Ley R.; Hamady M.; Lozupone C.; Turnbaugh P.; Ramey R.; Bircher J. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* 2008, (320): 1647–1651.
- Ley R.; Peterson D.; Gordon J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006, (124): 837–848.
- Lomas De León Y.; Rojas de Gante C. Aprovechamiento del suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato: 2006, 475-484.
- Madrid A. Manual de Tecnología Quesera. España: Ed. AMV Ediciones-Mundi-Prensa, 1990.
- Manly, B. F. J. Randomization, Bootstrap, and Monte Carlo Methods in Biology. Ed: Chapman & Hall: London. 2007, 3rd edition.
- Mani-López E.; Palou E.; López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 2014, 97(5): 2578-2590.
- Mayra-Makinen A.; Manninen M.; Gyllenberg H. *Streptococcus suis* adhesin protein and method for producing it. *J. Appl. Bacteriology.* 1983, (55): 241-245.
- McMillan A.; Della M.; Zellar M.; Cribby S.; Martz S.; Hong E.; Fu J.; Abbas A.; Dan T.; Miller W.; Reid G. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2011, (86): 58–64.
- Michail S.; Sylvester F.; Fuchs G.; Issenman R. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006, (43): 550–557.
- Muro M.; Luchi M. Preservação de Microrganismos. Campinas: Ed. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. 1989, 65 pp.
- NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1999.

Nicolaus B.; Kambourov M.; Oner E. Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environm. Technol.* 2010, 31 (10): 1145-1158.

Nikolic M.; López P.; Strahinic I.; Suárez A.; Kojic M.; Fernandez-García M.; Topisirovic L. Characterization of the exopolisaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS produced derivative strain as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 158 (2): 155-162.

Ou P.; Wolf S.P. A discontinuous method for catalase determination at 'near physiological' concentrations of H₂O₂ and its application to the study of H₂O₂ fluxes within cells. *J. Biochem.l and Biophys. Methods.* 1996, (31): 59-67.

Ouwehand A.C.; Isolauri E.; Kirjavainen P.V.; Tölkö S.; Salminen S.J. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is increased in the presence of *Lactobacillus GG* and *L. delbrueckii ssp bulgaricus*. *Letters in Appl. Microbiol.* 2000, (30): 10-13.

Ouwehand A.C.; Kirjavainen P.V.; Shortt C.; Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 1999, (9): 43-52.

Ouwehand A.C. ; Kirjavainen P.V.; Grönlund M-M. ; Isolauri E.; Salminen S.J. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Inter. Dairy J.* 1999, (9): 623-630.

Parra R. Review Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Rev. Bio. Agro* [online]. 2010, 8 (1): 93-105. ISSN 1692-3561.

Pourcher A.; Sutra L.; Hebe I.; Moguedet G.; Bollet C.; Simoneau P.; Gardan L. Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001. 34 (3): 229-241.

Qin J.; Li R.; Raes J.; Arumugam M.; Burgdorf K.; Manichanh C. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010, (464):59-65.

Rangaswamy V.; Ramakrishna S. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor. *Letters in Appl. Microbiol.* 2008, 46(6): 661-666.

Rappe´ M.S., Giovannoni, S.J. The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* 2003, (57): 369-394.

Rivas F.; Garro O. Preparación de cultivos iniciadores. Optimización del sustrato de crecimiento. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina: Ed. Universidad Nacional del Nordeste. 2006, pp 4.

Reid G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Applied Environ. Microbiol.* 1999, (65): 3763-3766.

Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, (73): 437S-443S.

- Reinheimer J.; Zalazar C. Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos. Argentina: Ed. Universidad Nacional del Litoral. 1ª edición, 2006, pp 336.
- Rybk S.; Kailasapathy K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian J. Dairy Technol.* 1995, (50): 51-57.
- Roberts C.M.; Fett W.F.; Osman S.F.; Wijey C.; O'Connor J.V.; Hoover D.G. Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *J. Appl. Bacteriology.* 1995, (78): 463-468.
- Ronka E.; Malinen E.; Saareila M.; Rinta-Koski M.; Aarnikunmes J.; Palva A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, (83:1): 63-74.
- Ruas-Madiedo P.; Hugenholtz J.; Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 2002, (12): 163-171.
- Saarela M.; Mogensen G.; Fonden R.; Mattila-Shandholm T.; Mättö J. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 2000, (84): 197-215.
- Saarela M.; Virkajärvi I.; Alakomi H. L.; Mattila-Shandholm T.; Vaari A.; Suomalainen T.; Mättö J. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis ssp lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J. Appl. Microbiol.* 2005, (99): 1330-1339.
- Saito T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Sci. J.* 2004, (75): 1-13.
- Salminen S.; Von Wright S. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. New York: Ed. Marcel Dekker. 1998, pp 619.
- Sanchez L.; Vichi J.; Llanes M.; Castro E.; Soler D.; Espinosa I.; Kociubinski G.; Ferreira C. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidato a probióticas. *Rev. Salud Anim.* 2011, 33(3): 154-160
- Sandine W.E. In Bacterial starter cultures for food. Florida: Ed. Gilliland S.E., CRC Press Inc.: Boca Raton, 1985, 3-23 p.
- Saunders S.; Bocking A.; Challis J.; Reid G. Effect of *Lactobacillus* challenge on Gardnerella vaginalis biofilms. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces.* 2007, (55): 138-142.
- Saxelin M.; Ahokas M.; Salminen S. Dose response on the faecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1993, (6):119-122.

Scardovi, V. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Ed. Sneath H.A.; Mair N.S.; Sharpe M.E.; Holt J.G.; Williams & Wilkins. 9th edn, Vol 2, 1986, pp 1418-1435.

Scavone P. Monografía Probióticos: definición, caracterización, efectos y utilidades potenciales. Montevideo-Uruguay: Ed. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Laboratorio de Microbiología. 2003.

Senok A.C.; Ismaeel A.Y.; Botta G.A. Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, (11): 958-996.

Singh K.; Kallali B.; Kumar A.; Thaker V. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2011, S287-S290.

Sisto A.; De Bellis P.; Lonigro S.L.; Lavermicocca P. Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1. *Int. J. Food Microbiol.* 2009. 136 (1): 59-65.

Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Ed. Freeman & Co. 1998, pp 896.

Song Y. L.; Matsumiya Y.; Liu C. X.; Kato H.; Watanabe, K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 1999, (37): 3062-3064.

Stanbury P.F.; Whitaker A.; Hall S.J. Principles of Fermentation Technology., Ed. Elsevier/ Pergamon publications. BPC wheatons Ltd. Exeter. 1995, pp 357.

Szajewska H.; Kotowska M.; Mrukowicz J.; Armanska M.; Mikolajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. *J. Pediatr.* 2001, (138): 361-365.

Szajewska H.; Ruszczyński M.; Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* 2006 a, (149): 367-372.

Szajewska H.; Setty M.; Mrukowicz J.; Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006 b, (42): 454-475.

Szymanski H.; Pejcz J.; Jawien M.; Chmielarczyk A.; Strus M.; Heczko P. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains – a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2006, (23): 247-253.

Tamime A. Y.; Robinson R. K. Yogur. Ciencia y Tecnología, España: Zaragoza, Ed. Acibia S. A. 1991, pp 368.

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

Taylor A.; Dunstan J.; Prescott S. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, (119): 184–91.

Torino M.I; Mozzi F.; Sesma F.; Font de Valde G. Effect of stirring on growth and phosphor polysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. En: *Milchwissenschaft*. 2000, (55): 204-206.

Uchida M.; Murata M. Isolation of a lactic acid bacterium and yeast consortium from a fermented material of *Ulva spp.* (Chlorophyta). *J. Appl. Microbiol.* 2004. 97 (6): 1297-1310.

Valsecchi C.; Marseglia A.; Ricci A.; Montagna L.; Leone M.; Marseglia G. Probiotics and children: is an integration useful in allergic diseases? *Pediatr. Med. Chir.* 2008, (30): 197–203.

Van der Aa L.; Heymans H.; van Aalderen W.; Sprikkelman A. Probiotics and prebiotics in atopic dermatitis: review of the theoretical background and clinical evidence. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2010, (21): 355–367.

Van Niel C.; Feudtner C.; Garrison M.; Christakis D. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhoea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2002,(109): 678–684.

Verma R. S.; Babu A. Human Chromosomes, Principles and Techniques. New York: Ed. Mc Graw Hill. 2ed, 1995.

Vinderola C.; Prosello W.; Ghiberto D.; Reinheimer J. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 2000, (83): 1905-1911.

Vinderola C.; Mocchiutti P.; Reinheimer J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* 2002, (85): 721-729.

von Wright A.; Tynkkynen S. Construction of *Streptococcus lactis subsp. lactis* Strains with a Single Plasmid Associated with Mucoïd Phenotype. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1987, 53 (6): 1385-1386.

Wagner R. D.; Warner T.; Roberts L.; Farmer J.; Balish E. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans*-colonized immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 1997, (65): 3345-3351.

Wheat P. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. En: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, Supl S1 (48): 1-4.

Wilches A. Caracterización preliminar de enzimas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos producidos por *Raoutella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2004, Vol 28 (109): 577-584.

Wilkerson W., Archer W., Stabeno D., Stanley S., Perrotta D., Gregg M. Keys to Accurate Laboratory Recognition of Vancomycin Resistance. *Disease Prevention News (DPN) Texas Department of Health* 2000, 60 (11): 8 pp.

Xu G.; Chu J.; Wang Y., Zhuang Y.; Zhang S.; Peng H. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Proc. Biochem.* 2006, (41): 2458-2463.

Yang Z.; Li Sh.; Zhang X.; Zeng X.; Li D.; Zhao Y.; Zhang J.; Capsular and slime-polisaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potencial application in fermented milk products. *J. Bioscience and Bioeng.* 2010, 110 (1): 53-57.

Yañez G., Wong A. Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología.* 2013, 17 (3): 12-28.

Zomora R.L.M. Tesis Doctoral Aislamiento, Identificación y Conservación de Cultivos de Bacterias Lácticas Antagonistas de Microbiota Contaminante de Sangre de Matadero. Universidad de Girona, Instituto de Tecnología Agroalimentaria, 2003, pp 259.

Zuccotti G.; Meneghin F.; Raimondi C.; Dilillo D.; Agostoni C.; Riva E. Probiotics in clinical practice: an overview. *J. Int. Med. Res.* 2008, (36) (Suppl. 1): 1A-53A.