

# **Universidad Nacional del Litoral**

Tesis presentada como parte de los requisitos de la  
Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del  
Grado Académico de Magister en Ciencia y Tecnología de  
los Alimentos

## **“Aislamiento y Caracterización de Lactobacilos intestinales con Potencial Probiótico”**

**Programa de Lactología Industrial (PROLAIN)**

**Bqca. Fernanda Villarreal**

**Director: Dr. Jorge Alberto Reinheimer**

A mi familia

## Agradecimientos

- ☞ Al Dr. Jorge Alberto Reinheimer, mi Director de tesis, por su generosa paciencia y conocimientos y por conducirme por este camino lleno de obstáculos y aciertos, el cual pude recorrer gracias a su permanente apoyo y consejo.
  
- ☞ A Gabriel, por su amistad, compañerismo y por brindarme sus conocimientos.
  
- ☞ A Andrea, por su amistad permanente y los lindos momentos compartidos.
  
- ☞ A Viviana, Nanci, Ana, Mario y todos mis compañeros del PROLAIN, quienes siempre me hicieron sentir partícipe de este gran grupo de trabajo que todos hemos celebrado más de una vez.

El consumidor contemporáneo cada vez se encuentra más expuesto a los nuevos “alimentos funcionales”. Entre ellos, los ya conocidos **Probióticos** ofrecen no sólo propiedades organolépticas y nutritivas definidas, sino que también se postulan como los “mejoradores de la salud del huésped”. Esto se basa en la interacción con la microflora intestinal, siendo esta modulación el aspecto más intensamente estudiado de dichos alimentos.

**Probiótico** puede definirse como “monocultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos que, administrados al hombre o animal como suplemento alimentario, ejercen un efecto beneficioso en el huésped a través del mejoramiento de las propiedades de la microflora indígena”. También se incluyen en esta definición a componentes bacterianos que pueden contribuir a tales efectos.

Las bacterias más ampliamente usadas como probióticos para humanos son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium* spp.

Estos microorganismos deben cumplir una serie de requisitos para ser empleados con tal fin: sobrevivir a las condiciones ambientales, establecerse y colonizar el lugar donde deberá ser activo, no generar respuestas inmunológicas adversas, ni respuestas tóxicas, alérgicas, mutagénicas o carcinógenas, ser genéticamente estables y mantenerse viables durante el procesamiento y almacenamiento del producto que los vehiculiza.

La capacidad de sobrevivir al proceso enzimático de la digestión, la acidez gástrica y las secreciones biliares en el intestino y así conservar su viabilidad, es otro de los requisitos fundamentales para su uso.

En el mundo existe una gran variedad de productos lácteos fermentados y no fermentados, formulados con bacterias probióticas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*): leches ácidas, yogures y leches fermentadas, quesos, cremas ácidas, leches fortificadas y una

considerable variedad de postres.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar bacterias de origen intestinal humano, para luego caracterizarlas desde el punto de vista probiótico y tecnológico.

Para tal fin, se tomaron muestras de materia fecal de bebés previamente seleccionados y por técnicas de aislamiento y purificación que emplean medios de cultivo selectivos y no selectivos, se obtuvieron 54 aislamientos que respondían a la morfología celular de interés. Posteriormente se identificaron bioquímicamente (fermentación de carbohidratos), resultando 50 de ellos pertenecientes a la especie *Lactobacillus casei* y 4 a *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, los estudios genéticos realizados (perfiles RAPD-PCR) orientaron hacia un cambio de identificación: *Lactobacillus casei* se asignó como *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* como *Lactobacillus gasseri*.

En relación a la resistencia de los aislamientos frente a las barreras biológicas del tracto gastrointestinal humano, se estudió la tolerancia de los mismos al exponerlos a una solución gástrica simulada (Método de Desarrollo en Medio Líquido), resultando su viabilidad celular marcadamente cepa dependiente. Otro de los estudios llevados a cabo fue la resistencia a la bilis por el Método de Ensayo de Difusión en Agar (EDA) para el que, a partir de la concentración de 0.6% de bilis, se observaron halos de inhibición del crecimiento bacteriano para la casi totalidad de los aislamientos, con excepción de los clasificados como *Lactobacillus gasseri*, que demostraron la mayor resistencia.

Para estudiar las propiedades probióticas de los aislamientos, se procedió a realizar los siguientes ensayos:

1. Deconjugación de ácidos biliares, para lo cual se formularon medios de cultivos agarizados que contenían cuatro ácidos biliares, individualmente (taurocolato de

sodio, taurodeoxicolato de sodio, glicolato de sodio, glicodeoxicolato de sodio). Como resultado de dicho estudio se encontró que los únicos aislamientos que poseían actividad de deconjugación fueron las cepas de *Lactobacillus gasseri*.

2. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa. El mismo se realizó con el método de Miller. En este estudio, no se detectó actividad de esta enzima en las cepas aisladas.

3. En el estudio de Hidrofobicidad, basado en el equilibrio de distribución de los microorganismos entre una fase polar y no polar, se encontró para la mayoría de los aislamientos porcentajes de hidrofobicidad moderados.

4. Para estudiar el poder inhibitorio que los aislamientos poseían frente a bacterias patógenas, se empleó el Ensayo de Difusión en Agar (EDA) observándose, prácticamente para todas ellas, un efecto inhibitorio (total o parcial) sobre el crecimiento de aquellas.

Para caracterizar tecnológicamente los aislamientos, se procedió a realizar los siguientes ensayos:

1. Resistencia al pH, para lo cual se sembraron los aislamientos en caldo acidificado a tres valores de pH (4.5, 5.0 y 5.5). Como resultado, sólo se observó un leve efecto inhibitorio para algunos aislamientos a pH 4.5.

2. Viabilidad de los aislamientos en leche acidificada, a 5°C. Se realizaron recuentos en placa para evaluar la sobrevivencia de los mismos bajo estas condiciones. Como resultado, pudo concluirse para la totalidad de los aislamientos que la presencia de ácido láctico en la leche y la refrigeración no afectaron la viabilidad celular.

3. Resistencia a compuestos de aroma. Al igual que en el estudio de resistencia al pH, aquí se empleó el método de Desarrollo en Medio Líquido. Como resultado de este

ensayo, se encontró que frente a ambos compuestos (diacetilo y acetaldehído) no se observaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento.

4. Resistencia a sales. En este ensayo, se empleó el mismo método antes mencionado, no registrándose efecto alguno sobre el desarrollo producido por NaCl y KCl (1%, 2% y 3%).

5. Interacción entre los aislamientos intestinales y bacterias lácticas de starters. Se empleó el método de Ensayo de Difusión en Agar (EDA). Como resultado, se encontró que ninguna de las bacterias lácticas de starters ejerció un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los primeros. Sin embargo, éstos inhibieron el desarrollo de las cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* empleadas, no así a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Finalmente, puede concluirse que los aislamientos intestinales obtenidos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus gasseri*), demostraron poseer variable capacidad de resistir a las barreras biológicas del tracto gastrointestinal, mientras que sus propiedades probióticas y tecnológicas más destacadas fueron el poder inhibitorio frente a bacterias patógenas, la resistencia a sales y al pH, y mantenimiento de la viabilidad en leche acidificada.

<b>1 INTRODUCCION</b>	1
<b>1.1 La microflora del tracto gastrointestinal</b>	2
<b>1.2 La microflora intestinal y su relación con el huésped</b>	6
<b>1.3 Las bacterias acidolácticas y las bifidobacterias. Aptitud probiótica</b>	7
1.3.1 Taxonomía y características generales de las principales bacterias probióticas	12
<b>1.4 Estimulación de los organismos probióticos: Prebióticos</b>	20
<b>1.5 Características probióticas de bacterias intestinales</b>	24
1.5.1 Resistencia bacteriana a la secreción gástrica y biliar	24
1.5.2 Deconjugación de ácidos biliares y efecto hipocolesterolémico	25
1.5.3 Estimulación de las respuestas inmunológicas y efecto antitumoral	27
1.5.3.1 Utilización de bacterias probióticas como inmunomoduladores	30
1.5.4 Propiedades antimicrobianas	34
1.5.4.1 Usos profilácticos y paliativos de las bacterias probióticas en diversas patologías	37
1.5.4.2 Importancia de las bacterias probióticas en la nutrición humana	45
<b>1.6 Participación de las bacterias probióticas en la formulación de productos lácteos</b>	49
1.6.1 Selección de cepas destinadas a la elaboración de productos probióticos	51
1.6.2 Supervivencia de las bacterias probióticas en los productos lácteos	54
1.6.3 Inocuidad de los microorganismos probióticos destinados al consumo humano	68

<b>2 OBJETIVOS</b>	74
<b>3 MATERIALES y METODOS</b>	77
<b>3.1 Muestras</b>	78
<b>3.2 Aislamiento y conservación de bacterias intestinales</b>	80
3.2.1 Aislamiento y purificación de cepas	80
3.2.2 Conservación de los aislamientos	82
<b>3.3 Identificación de las cepas</b>	84
3.3.1 Reactivación y mantenimiento de las cepas para su utilización	84
3.3.2 Características fenotípicas	85
3.3.3 Quimismo fermentativo: Homofermentación/Heterofermentación	86
3.3.4 Perfil de Fermentación de Carbohidratos	87
3.3.5 Desarrollo en medios selectivos (Método Ecométrico)	89
<b>3.4 Diversidad genética de los lactobacilos intestinales (perfiles RAPD)</b>	91
<b>3.5 Resistencia a las Barreras Biológicas</b>	93
3.5.1 Resistencia a la secreción gástrica	93
3.5.2 Cinética de muerte celular de los aislamientos en solución gástrica	95
3.5.3 Resistencia a la bilis	96
<b>3.6 Caracterización probiótica de los aislamientos</b>	98
3.6.1 Deconjugación de ácidos biliares	98
3.6.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa)	100
3.6.3 Hidrofobicidad	104
3.6.4 Inhibición de bacterias patógenas	106
<b>3.7 Caracterización tecnológica de los aislamientos</b>	109

---

3.7.1 Resistencia al pH	109
3.7.2 Resistencia a sales	111
3.7.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído)	112
3.7.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada y conservada a 5°C	113
3.7.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters	117
3.7.5.a Evaluación del efecto producido por SLC de lactobacilos intestinales sobre el desarrollo de bacterias lácticas de starter	117
3.7.5.b Evaluación del efecto producido por SLC de <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1, <i>Streptococcus thermophilus</i> 176 y <i>Lactococcus lactis</i> Mo12 sobre el desarrollo de lactobacilos intestinales	119
3.7.5.c Determinación de la naturaleza del agente inhibidor presente en SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> frente a <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> 176, <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 y <i>Lactococcus lactis</i> Mo12	120
3.7.5.d Efecto de SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>71</sub> frente a bacterias lácticas de starters (cinéticas de crecimiento)	123
<b>4 RESULTADOS</b>	127
<b>4.1 Aislamiento y Purificación de bacterias intestinales</b>	128
<b>4.2 Identificación de las cepas aisladas</b>	128
4.2.1 Características Fenotípicas	128

---

4.2.2 Quimismo Fermentativo: Homofermentación/Heterofermentación	129
4.2.3 Perfil de Fermentación de Carbohidratos	132
4.2.4 Desarrollo en medios selectivos. Método Ecométrico	135
<b>4.3 Diversidad genética de los lactobacilos intestinales (perfiles RAPD)</b>	138
<b>4.4 Resistencia a las Barreras Biológicas</b>	142
4.4.1 Resistencia a la secreción gástrica	142
4.4.2 Cinética de muerte celular de los aislamientos en solución gástrica	145
4.4.3 Resistencia a la bilis	149
<b>4.5 Caracterización probiótica de los aislamientos</b>	154
4.5.1 Deconjugación de ácidos biliares	154
4.5.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa)	157
4.5.3 Hidrofobicidad	157
4.5.4 Inhibición de bacterias patógenas	164
<b>4.6 Caracterización tecnológica de los aislamientos</b>	168
4.6.1 Resistencia al pH	168
4.6.2 Resistencia a sales	171
4.6.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído)	171
4.6.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada y conservada a 5°C	172
4.6.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters	172
4.6.5.a Evaluación del efecto producido por SLC de lactobacilos intestinales sobre el desarrollo de bacterias lácticas de starters	172
4.6.5.b Evaluación del efecto producido por SLC de <i>Lact. delbrueckii</i>	

subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1, <i>Strep. thermophilus</i> 176 y	
<i>L. lactis</i> Mo12 sobre el desarrollo de lactobacilos intestinales	174
4.6.5.c Determinación de la naturaleza del agente inhibidor de SLC de	
<i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>r</sup> frente a <i>Strep. thermophilus</i> 176, <i>Lact.</i>	
<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 y <i>Lactococcus lactis</i> Mo12.	176
4.6.5.d Efecto de SLC de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>r</sup> y <i>Lactobacillus</i>	
<i>rhamnosus</i> F <sub>71</sub> frente a bacterias lácticas de starters (cinéticas de	
crecimiento)	179
<b>5 DISCUSION</b>	184
<b>5.1 Identificación de las cepas aisladas</b>	185
<b>5.2 Resistencia a las Barreras Biológicas</b>	188
5.2.1 Resistencia a la secreción gástrica	188
5.2.2 Resistencia a la bilis	190
<b>5.3 Caracterización probiótica de los aislamientos</b>	193
5.3.1 Deconjugación de ácidos biliares	193
5.3.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa)	196
5.3.3 Hidrofobicidad	198
5.3.4 Inhibición de bacterias patógenas	199
<b>5.4 Caracterización tecnológica de los aislamientos</b>	201
5.4.1 Resistencia al pH	201
5.4.2 Resistencia a sales	203
5.4.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído)	204
5.4.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada	

y conservada a 5°C	205
5.4.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters	207
<b>6 CONCLUSIONES</b>	212
<b>7 BIBLIOGRAFIA</b>	216
<b>8 ANEXO</b>	225
<b>8.1 Medios de Cultivo</b>	226
8.1.1 Medios de cultivo no selectivos	226
8.1.2 Medios de cultivo selectivos	234
8.1.3 Medios de cultivo modificados	235
<b>8.2 Reactivos</b>	236
<b>8.3 Tablas</b>	237

**Tablas**

Tabla 1- Detección de bacterias acidolácticas y bifidobacterias utilizando técnicas de biología molecular.	14-15
Tabla 2- Sustratos de baja absorción (prebióticos) y sus efectos sobre la microflora intestinal.	22-23
Tabla 3- Adhesión de lactobacilos a células epiteliales escamosas.	43
Tabla 4- Microorganismos probióticos empleados actualmente y sus efectos sobre el status nutricional y la salud del huésped.	50
Tabla 5- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de bacterias probióticas disminuya 2 ordenes logarítmicos en leche fermentada.	57
Tabla 6- Efecto del pH del producto sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de bacterias probióticas disminuya 2 ordenes logarítmicos en leche fermentada.	57
Tabla 7- Efecto de jugos de frutas adicionados a leche fermentada sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de <i>Lact. acidophilus</i> CH5 (cepa Chr. Hansen) disminuya 2 ordenes logarítmicos.	58
Tabla 8- Productos probióticos comerciales.	65-67
Tabla 9- Clasificación de microorganismos probióticos en función de su bioseguridad para consumo humano.	69

---

Tabla 10- Características fenotípicas de los aislamientos intestinales estudiados.	130-131
Tabla 11- Perfil de Fermentación de carbohidratos de los aislamientos intestinales (Método API).	133-134
Tabla 12- Desarrollo de lactobacilos intestinales en medios selectivos (Método Ecométrico).	136-137
Tabla 13- Pérdida de viabilidad celular para los aislamientos intestinales en solución gástrica (pH3, 37°C, 3h), expresada como disminución en los recuentos (ordenes log.).	143-144
Tabla 14- Resistencia a la bilis de lactobacilos intestinales (Ensayo de Difusión en Agar-EDA).	152-153
Tabla 15- Deconjugación de ácidos biliares producida por lactobacilos intestinales.	155-156
Tabla 16- Actividad de $\beta$ -Galactosidasa para lactobacilos intestinales (Método de Miller modificado).	161-162
Tabla 17- Hidrofobicidad (%) de los aislamientos intestinales, medida luego de la partición de los mismos entre la fase polar (caldo MRS) y no polar (n-hexadecano).	63
Tabla 18- Poder inhibitorio de los aislamientos intestinales frente a <i>Salmonella</i> OMS-Ca, <i>Staphylococcus aureus</i> 76, <i>Escherichia coli</i> V517 y <i>Listeria monocytógenes</i> ATCC 15313 (Método EDA)	166-167
Tabla 19- Resistencia al pH, sales y compuestos de aroma de lactobacilos intestinales (Método Desarrollo en Medio Líquido-DML)	169-170

Tabla 20- Sobrevida de los lactobacilos intestinales en leche acidificada a 5°C (promedio de 2 determinaciones)	173
Tabla 21- Poder inhibitorio de SLC de los aislamientos intestinales sobre el crecimiento de <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1y Hb2, <i>Lactococcus lactis</i> A6 y Mo12 y <i>Streptococcus thermophilus</i> 176 y A4 (Método EDA)	175
Tabla 22- Patrón de fermentación de carbohidratos para el género <i>Lactobacillus</i>	238
Tabla 23- Patrón simplificado de fermentación de carbohidratos para el género <i>Lactobacillus</i>	239
Tabla 24- Sobrevida de lactobacilos intestinales en leche acidificada a 5 C° (promedio de 2 determinaciones)	240-241

## Figuras

Figura 1- Estrategia para la selección de cepas probióticas	53
Figura 2- Esquema utilizado para el aislamiento y purificación de bacilos intestinales a partir de muestras de materia fecal de bebés	83
Figura 3- Metodología para evaluar la naturaleza química de agentes inhibidores del crecimiento de la cepa <i>Lactobacillus rhamnosus</i> F <sub>37</sub>	122
Figura 4- Metodología para evaluar las interacciones entre las cepas de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>71</sub> frente a bacterias lácticas de starters ( <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1, <i>Streptococcus thermophilus</i> 176)	

---

y <i>Lactococcus lactis</i> Mo12)	126
Figura 5- Dendrograma obtenido por comparación (Programa Gel Compare, Applied Maths, Bélgica) y reagrupamiento (Método UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) de los perfiles RAPD de cepas de <i>Lact. rhamnosus</i> aisladas de bebés	139
Figura 6- Dendrograma obtenido por comparación (Programa Gel Compare, Applied Maths, Bélgica) y reagrupamiento (Método UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) de los perfiles RAPD de cepas de <i>Lact. rhamnosus</i> y <i>Lact. gasseri</i> aisladas de bebés	141
Figura 7- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	146
Figura 8- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	146
Figura 9- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37a</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	147
Figura 10- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37b</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	147
Figura 11- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> F <sub>64</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	148
Figura 12- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> F <sub>83</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	148
Figura 13- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	150

Figura 14- Cinética de muerte celular de <i>Lactobacillus casei</i> A13 en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●)	150
Figura 15- Características del crecimiento de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> , F <sub>37'</sub> , F <sub>37'a</sub> y F <sub>37''</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>44</sub> y F <sub>49</sub> en agar MRS-taurocolato de sodio 0.5%	158
Figura 16- Características del crecimiento de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37'</sub> y F <sub>37'a</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>44</sub> , F <sub>49</sub> , F <sub>50</sub> y F <sub>53</sub> en agar MRS-taurocolato de sodio 0.5%	158
Figura 17- Características del crecimiento de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> , F <sub>37'</sub> , F <sub>37'a</sub> y F <sub>37''</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>44</sub> y F <sub>49</sub> en agar MRS-taurodeoxicolato de sodio 0.5%	159
Figura 18- Características del crecimiento de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> , F <sub>37'</sub> , F <sub>37'a</sub> y F <sub>37''</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>44</sub> y F <sub>49</sub> (ausencia de desarrollo) en agar MRS-glicolato de sodio 0.5%	159
Figura 19- Características del crecimiento de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> , F <sub>37'</sub> , F <sub>37'a</sub> y F <sub>37''</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>44</sub> y F <sub>49</sub> (ausencia de desarrollo) en agar MRS-glicodeoxicolato de sodio 0.5%	160
Figura 20- Observación microscópica de la distribución de un lactobacilo intestinal entre las fases orgánica y acuosa (contraste de fases,1000x)	164
Figura 21- Capacidad inhibitoria de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37'</sub> , F <sub>37''</sub> y <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>3</sub> , F <sub>44</sub> y F <sub>64'</sub> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> 76 (Método EDA)	168
Figura 22- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37''</sub> sobre el crecimiento de <i>Streptococcus thermophilus</i> 176	177
Figura 23- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37''</sub> sobre el crecimiento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1	177

---

Figura 24- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> sobre el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> Mo12	178
Figura 25- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Streptococcus thermophilus</i> 176 control (●) y con adición de SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> (●) (37°C, 24h)	180
Figura 26- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> control (●) y con adición de SLC de <i>Streptococcus thermophilus</i> 176 (●) (37°C, 24h)	180
Figura 27- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 control (●) y con adición de SLC de <i>Lactobacillus gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> (●) (37°C, 24h)	181
Figura 28- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> control (●) y con adición de SLC de <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 (●) (37°C, 24h)	181
Figura 29- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 control (●) y con adición de SLC de <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>71</sub> (●) (37°C, 24h)	182
Figura 30- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>71</sub> control (●) y con adición de SLC de <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1 (●) (37°C, 24h)	182
Figura 31- Cinéticas de crecimiento correspondientes a <i>Lactococcus lactis</i> Mo12 control (●) y con adición de SLC de <i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> <sup>o</sup> (●) (37°C, 24h)	183

## **1.1 La microflora del tracto gastrointestinal.**

Durante su desarrollo gestacional, el ser humano se encuentra protegido por un ambiente fisiológicamente adecuado y estéril. Sin embargo, al nacer es invadido por una gran variedad de especies microbianas provenientes de las mucosas maternas, consecuencia inmediata del paso por el canal vaginal y el contacto con la piel, como también del medio ambiente que lo rodea y de la alimentación (1). A partir de ese momento se establece una residencia bacteriana en el tracto gastrointestinal, la cual va modificándose con la edad imponiéndose al mismo tiempo un patrón de distribución. Factores ambientales, interacciones fisiológicas hospedador-microorganismo y los componentes de la dieta gobiernan esta distribución, siendo dicha dieta el principal regulador de la frecuencia y concentración de especies individuales y grupos bacterianos que colonizan el intestino, como así también de la actividad metabólica de los mismos.

La flora intestinal humana como animal, que incluye tanto bacterias anaerobias facultativas como anaerobias estrictas, posee características de especificidad de especie como también especificidad individual (2). Éstas han sido demostradas por diversos autores, los cuales teniendo en cuenta los diferentes biotipos de bacterias de una especie a otra, han podido comprobar que no es posible la “normalización” de la microflora del tracto gastrointestinal cuando a animales libres de gérmenes se los inocula con una microflora intestinal proveniente de otra especie animal. En este aspecto, estudios experimentales “in vivo” en animales han sido indispensables para formular los conceptos básicos de la ecología microbiana del tracto gastrointestinal humano y animal. La utilidad de estos estudios, y el modelo experimental elegido dependerá de la respuesta que el investigador esté buscando. En

muchos casos, no puede establecerse una certera correlación entre estudios “in vivo” e “in vitro”. Un ejemplo de ello es la susceptibilidad de los lactobacilos o enterococos a la bacteriocina Lactacin F ensayada en el laboratorio, la cual no es necesariamente predictiva de su efecto antibacteriano “in vivo”. Queda claro entonces, la necesidad de seguir evaluando, para cada aspecto en particular, la metodología más adecuada (3).

Como se mencionó anteriormente, el tubo digestivo alberga en toda su extensión distintas agrupaciones bacterianas, estableciéndose de esta manera diversos nichos ecológicos. A continuación se hará una breve reseña de la flora que puede hallarse en los distintos sectores del mismo.

La saliva es la principal fuente de bacterias que ingresan al estómago. Éstas, provienen del medio externo así como de las mucosas y piel con las que el neonato toma contacto al nacer y alimentarse con la leche materna. El contenido de bacterias en la saliva está comprendido entre  $10^4$  y  $10^9$  UFC/ml.

En el estómago, el ácido clorhídrico secretado por las células parietales de la mucosa gástrica ejerce un efecto germicida atribuido al bajo pH que éste genera, que en condiciones fisiológicas normales alcanza valores inferiores a 3. A este factor se debe la escasa cantidad de microorganismos que en él se alojan (inferior a  $10^3$  UFC/ml de secreción gástrica), entre los que podemos mencionar enterococos, enterobacterias, bacteroides, bifidobacterias y lactobacilos provenientes de la flora bucal y de la ingesta de alimentos.

En el intestino delgado, la distribución bacteriana comienza con recuentos bajos a nivel de duodeno, aproximadamente  $10^4$  UFC/g de contenido intestinal, ya que en esta zona se vuelcan las secreciones gástricas (aún más intensas en el período post-prandial) que, junto a

los movimientos peristálticos de la musculatura, la convierten en la menos colonizada. A medida que nos acercamos al íleon, en su porción más distal, el número de microorganismos se incrementa notoriamente, alcanzando recuentos de  $10^7$  UFC/g, correspondientes a los siguientes tipos de bacterias: lactobacilos, estreptococos, bacteroides, enterobacterias, y bifidobacterias.

El colon es el mayor reservorio de microorganismos (fundamentalmente anaerobios), albergando entre  $10^{10}$ - $10^{12}$  UFC/g de contenido intestinal, pudiendo encontrarse *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Streptococcus faecalis*, clostridios, enterobacterias (*Escherichia coli*, por ejemplo), *Bifidobacterium* y en menor proporción, *Lactobacillus* (4).

Del mismo modo que se establece un patrón de distribución microbiana a lo largo de las distintas porciones del tracto gastrointestinal (TGI), el mismo se va modificando a lo largo de la vida del individuo.

La microflora intestinal a las 24 h del nacimiento está gobernada por enterococos, *Escherichia coli* y *Clostridium spp.* Al tercer día predominan las bifidobacterias, las cuales se mantienen en niveles de  $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC/g de contenido intestinal mientras que otras especies caen en número (5). Se ha observado en bebés alimentados por lactancia natural, en comparación a aquellos alimentados con fórmulas lácteas comerciales, que la concentración de bifidobacterias intestinales es similar en ambos casos, constituyendo el 99% de la población bacteriana total. Sin embargo, los neonatos alimentados con leche materna poseen menor número de bacterias productoras de toxinas tales como clostridios, enterococos, etc., probablemente como consecuencia del aporte protector de inmunoglobulinas, lactoglobulinas

lisozima en la leche materna, como así también de factores de crecimiento como la N-acetilglucosamina, presente exclusivamente en la secreción mamaria (2,5).

Cuando finaliza la lactancia y con el cambio hacia una dieta sólida en la infancia, bacterias anaerobias estrictas, como *Bacteroides*, *Eubacterium* y cocos anaerobios, se vuelven predominantes en la microflora. En adolescentes y jóvenes, las bifidobacterias caen en número apareciendo otras especies que formarán parte de la flora intestinal estable del adulto. Es conveniente mencionar que el hallazgo del género *Bifidobacterium* es siempre un signo de condiciones saludables del huésped (5). Con la edad también puede observarse un cambio en el pH de las heces hacia la neutralidad, favoreciendo de este modo fermentaciones bacterianas de mayor toxicidad para la salud (2).

En la vejez, se incrementan los géneros “putrefactivos” dentro de los cuales podemos citar *Clostridium perfringens*, junto a una disminución (en número) de bifidobacterias, cambio éste que explicaría la mayor incidencia de patologías entéricas y no entéricas (de tipo neoplásicas) relacionadas al envejecimiento de los órganos y al deterioro del sistema inmunológico que puede evidenciarse en este grupo etario (5).

La flora intestinal protege al individuo de la colonización por microorganismos patógenos u oportunistas foráneos debido a que se encuentra ocupando los sitios disponibles en la mucosa (inhibición competitiva) y a factores de regulación autogénica (síntesis de ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas etc.). Dicha flora se establece mediante autoselección, y es influenciada por factores tales como higiene excesiva, terapia antibiótica y stress. En las enfermedades que cursan con diarreas, la terapia antimicrobiana por vía oral está dirigida hacia el patógeno en cuestión pero también afecta a las demás bacterias intestinales

susceptibles, ocasionando gastroenteritis asociadas. El stress es otro factor que va en detrimento de la flora beneficiosa (bacterias acidolácticas y bifidobacterias) y favorece un incremento de bacterias coliformes. También juega un rol similar, la finalización temprana de la lactancia en el recién nacido (6).

## **1.2 La microflora intestinal y su relación con el huésped.**

Las actividades metabólicas de la flora intestinal pueden impactar de diversa manera sobre la salud del huésped, tanto en su detrimento como en su beneficio. Si el balance entre bacterias que sólo muestran un efecto benéfico y aquellas potencialmente toxicogénicas se pierde por alguna razón particular, y este desequilibrio determina un predominio de aquellas bacterias que sólo producen un efecto nocivo, puede verse incrementada la producción de sustancias putrefactivas, toxinas y carcinógenos, afectando el normal funcionamiento de los órganos depuradores y la actividad inmunológica del organismo, lo cual lleva inexorablemente hacia un estado patológico. Por otro lado, encontramos en la microbiota intestinal bacterias que sólo poseen acción benéfica para la salud, como las bacterias acidolácticas y bifidobacterias; y finalmente aquellas bacterias que ejercen tanto efectos benéficos como nocivos.

A continuación se resumen los principales efectos que produce la población bacteriana intestinal sobre la salud del hospedador (6):

- Producción de tóxicos, carcinógenos o mutágenos a partir de los constituyentes

de la dieta o secreciones endógenas, a través de actividades enzimáticas.

- Detoxificación de metabolitos tóxicos.
- Alteración de la susceptibilidad del huésped frente a la inducción de tumores.
- Modulación de la inmunidad celular en el intestino.
- Efecto protector al ofrecer resistencia a la colonización por microorganismos foráneos.

Es importante mencionar otra de las funciones que la flora intestinal posee en relación al metabolismo “depurativo” de nuestro organismo. Esta está relacionada con la circulación enterohepática (CEH) a través del sistema porta que comunica el intestino con el hígado. Esteroides endógenos o exógenos son conjugados con ácido glucurónico por este órgano (uno de los más importantes detoxificadores del organismo) y posteriormente secretados a la luz intestinal donde la actividad  $\beta$ -glucuronidasa bacteriana del colon puede hidrolizarlos, contribuyendo de este modo a su reabsorción y mayor retención de esteroides y xenobióticos dentro del organismo, potenciando su acción farmacológica (7).

### **1.3 Las bacterias acidolácticas y las bifidobacterias. Aptitud probiótica.**

Podemos definir a las bacterias acidolácticas (BAL) como bacterias gram (+), catalasa (-), no esporuladas, cocos o bacilos, que producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos. Un importante carácter es usado para la diferenciación

de las bacterias acidolácticas, y es el modo de fermentación de azúcares bajo condiciones estándares: concentración ilimitada de glucosa, factores de crecimiento (aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos) y una limitada disponibilidad de oxígeno en el medio. Bajo estas condiciones, las BAL se pueden dividir en dos grupos: aquellas que realizan Glicólisis –vía Embden Meyerhof- en la cual se genera como producto final exclusivamente ácido láctico, metabolismo que se denomina **Homofermentativo**. Las otras, llevan a cabo la vía del 6 fosfogluconato/fosfocetolasa, en la cual se genera además de ácido láctico, una importante cantidad de otros metabolitos como etanol, acetato y dióxido de carbono. Este metabolismo se denomina **Heterofermentativo**. Si bien se establece esta clasificación es posible una cierta versatilidad, en cuanto al metabolismo que una bacteria acidoláctica lleve a cabo, ya que las condiciones del medio tienen mucha influencia en la formación de productos finales de fermentación, pudiendo ser atribuidos tales cambios a alteraciones sobre el piruvato y/o el uso de distintos aceptores de electrones para la generación de energía, desde el oxígeno hasta compuestos orgánicos. A nivel enzimático, existen lactobacilos heterofermentadores que poseen la fosfocetolasa pero no aldolasa y los homofermentadores obligados tienen FDP aldolasa y no fosfocetolasa. Se incluyen como bacterias ácido lácticas a los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Glovicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. El género *Bifidobacterium* no está relacionado filogenéticamente y lleva a cabo de un modo exclusivo la fermentación de azúcares, razones por las cuales no está mencionado entre los anteriores (6,8,9).

Las BAL habitan en dos nichos ecológicos principales, ambos ricos en su contenido de

nutrientes: las mucosas del hombre y animales de sangre caliente, y el ambiente lácteo. Se sostiene que para que las BAL sean utilizadas como bacterias intestinales probióticas y por tanto ejerzan un rol benéfico en el ecosistema del tracto gastrointestinal humano, deben formar parte de la microflora del mismo (8).

La inmensa reserva de bacteria lácticas y de otros géneros relacionados (*Bifidobacterium*) del tracto intestinal no puede sino ejercer un efecto notable sobre la salud del individuo huésped, conocido como **rol probiótico**. Si bien el hombre convive desde siempre con estos microorganismos, sólo recientemente se han obtenido evidencias científicas demostradas (y otras en curso de demostrarse) sobre el mecanismo de sus acciones probióticas.

Son numerosos los estudios realizados para confirmar y ampliar aún más los conocimientos que se disponen acerca de las propiedades “saludables” que poseen estas bacterias en su aplicación, para compensar la sintomatología producida por diversas enfermedades como infecciones entéricas de distintas etiologías, la intolerancia a la lactosa (primaria de base genética o secundaria a otra patología), cuadros de inmunosupresión (pacientes tratados con citostáticos, antivirales, radioterápicos etc.) etc.

De sus investigaciones sobre microorganismos intestinales, Elías Metchnikoff (1845-1916) sacó a la luz la hipótesis de que la microflora intestinal produce toxinas que resultan en una toxemia crónica hacia el huésped, ocasionando ataques macrofágicos (autoinmunidad celular) hacia el tejido dañado acelerando de este modo el envejecimiento de los órganos. Fue el primero en sugerir que la implantación de bacterias acidolácticas (como lactobacilos provenientes de cultivos de yogur) puede reducir estas respuestas agresivas, prolongando la

expectativa de vida (6).

Actualmente, existe una categorización particular de los alimentos. Algunos de ellos se denominan **alimentos funcionales**, los cuales poseen efectos fisiológicos o psicológicos más allá de los conocidos efectos nutricionales. En Japón, un número cada vez mayor de productos lácteos fermentados son reconocidos como alimentos funcionales. El área más desarrollada, con respecto a estos alimentos, en la industria láctea es aquella relacionada con las funciones gastrointestinales, donde ha sido demostrado que varios de estos productos poseen las propiedades antes mencionadas (10).

Fuller define **Probiótico**, a un “monocultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos, los cuales administrados al hombre o animal como suplemento alimentario, ejercen un efecto beneficioso en el huésped, a través de un mejoramiento de las propiedades de la microflora indígena” (6).

Sin embargo, ha surgido recientemente una nueva definición la cual tiene en cuenta no sólo la presencia de microorganismos vivos, estableciendo que **Probióticos** son preparaciones celulares bacterianas viables o alimentos que contienen cultivos bacterianos viables o componentes de células bacterianas, que ejercen efectos benéficos sobre la salud del huésped (11).

Queda claro entonces, que el propósito específico que se busca al utilizar un probiótico dependerá de las propiedades específicas que éste ofrece. Los microorganismos probióticos, deben satisfacer requerimientos tales como (6):

✓ Sobrevivir a las condiciones ambientales, proliferar y colonizar el lugar donde deberá ser activo. En este aspecto, las especies microbianas específicas del huésped probablemente sean las únicas capaces de establecerse en esos nichos.

✓ No debe existir reacción inmunológica del hospedador frente a estas bacterias (inmunotolerancia).

✓ No deben causar reacciones patogénicas, tóxicas, alérgicas, mutagénicas o carcinogénicas por sí mismas, a través de sus metabolitos o de componentes celulares luego de su muerte y degradación.

✓ Ser genéticamente estables, no permitiendo transferencia de plásmidos.

✓ Permitir su cultivo en gran escala por métodos simples y reproducibles.

✓ Mantenerse viables durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.

Actualmente se reconoce el uso comercial (a nivel mundial) de las siguientes cepas como probióticas (11):

*Bifidobacterium breve*: cepa Yakult (Yakult, Japón).

*Bifidobacterium bifidum*: cepa YIT 4002 (Yakult, Japón), cepa A234-4 (Japan Bifidus Foundation).

*Bifidobacterium infantis*: cepa ATCC15697 (ATCC, Rockville, USA).

*Bifidobacterium lactis*: Chr. Hansen Ltd (Dinamarca).

*Bifidobacterium longum*: cepa F6-1-ES, cepa 69-2bs (Nikken Chemicals, Japón).

*Bifidobacterium thermophilum*: cepa P2-91.

*Lactobacillus acidophilus*: cepa NCDO1748 (National Collection of Dairy Organisms, UK), cepa SBT2062 (Snow Brand Milk Products, Japón), cepa NCFM (GPGurlock, USA).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: cepa FW148 (Unilever Research Laboratory, UK), cultivos starters comerciales de yogur (Chr. Hansen Ltd., USA), (Marshall Products, USA).

*Lactobacillus casei*: cepa Shirota (Yakult, Japón).

*Lactobacillus jhonsonii*: cepa LC1 (Nestlé Ltd., Suiza).

*Lactobacillus plantarum*: cepa ATCC14917 (ATCC, Rockville, USA).

*Lactobacillus rhamnosus*: cepa GG (Valio, Finlandia), cepa ATCC53103 (ATCC, Rockville, USA).

*Lactobacillus salivarius*: cepa WB1004 (Wakamoto Pharmaceutical, Japón).

*Enterococcus faecium*: cepa SF68:AB (Cernel, Engelholm, Suecia y Guiliani, Lugano, Suiza).

*Streptococcus thermophilus*: cepa ATCC19258 (ATCC, Rockville, USA), cultivos starters comerciales de yogur (Chr. Hansen Ltd., USA), (Marshall Products, USA).

### **1.3.1 Taxonomía y características generales de las principales bacterias probióticas.**

La caracterización microbiana sobre la base fenotípica aún trae inconvenientes, ya que pueden no estar compartidas por la misma unidad taxonómica, debido a mutaciones o bien debido a adaptaciones genéticas a distintas condiciones de desarrollo, conduciendo todo esto

a resultados conflictivos y posiciones taxonómicas no estables.

Actualmente se dispone de numerosos métodos de investigación molecular basados en estudios fenotípicos y genotípicos con distintos niveles resolutivos, reproducibilidad y facilidad para realizar la metodología en cuestión. La Tabla 1 muestra los principales métodos taxonómicos que emplean técnicas de biología molecular (11).

Vale recordar que para obtener resultados reproducibles se requiere de la standarización de la técnica empleada, como por ejemplo el uso de DNA correctamente purificado y no contaminado con DNA foráneo, enzimas y reactivos químicos de buena calidad y una idoneidad suficiente de quien lleva a cabo la metodología.

Una información de gran ayuda es la relación entre el grado de similitud y la relación evolutiva de varios grupos microbianos y aquella relación filogenética.

La técnica ampliamente utilizada para determinar dicha relación filogenética se basa en confrontar los RNA ribosomales y los genes por ellos codificados. El secuenciamiento del rRNA 16S resulta de particular importancia para la clasificación de las bacterias lácticas.

La taxonomía no es una ciencia estática, sino que está en continua evolución y es probable que en el futuro sufra numerosas modificaciones como consecuencia del advenimiento de modernas metodologías que ofrezcan datos más certeros y confiables.

En los últimos años han aparecido modificaciones taxonómicas en las bacterias lácticas. Por ejemplo, el género *Lactobacillus* está constituido por aproximadamente 70 especies; sin embargo, con la información que hoy se dispone podrían llegar a subdividirse en diversos géneros genéticamente más homogéneos.

Se considera que en la actualidad se está transitando un período de transición entre las metodologías tradicionales y la llegada de los nuevos métodos moleculares; sin embargo, aún

Tabla 1- Detección de bacterias acidolácticas y bifidobacterias utilizando técnicas de biología molecular.

Métodos	Gen blanco	Especies	Especificidad
<b>PCR (Polymerase Chain Reaction)</b>			
Primers específicos de especie sobre los respectivos rRNA de cada especie	16S rRNA	<i>Lact. casei</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> , <i>Lact. helveticus</i> , <i>Lact. acidophilus</i>	de especie
Primers específicos de especie designados a partir de 16S rRNA	16S rRNA	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>Lact. acidophilus</i>	de especie
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic acid)	16S rRNA	<i>Lact. acidophilus</i> , <i>Lact. helveticus</i> , <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. reuteri</i>	de cepa
RAPD con primer 10-mer		<i>Lact. plantarum</i> , <i>Ent. faecium</i> , <i>Strep. thermophilus</i>	
RAPD con primer 9-mer		<i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. pentosus</i>	50% esp. cepa
<b>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</b>			
Electroforesis en gel, de Hin dIII. Como sonda usa un fragmento de 420 bp o el gen DSM20016 de rRNA de <i>Lact. reuteri</i>	16S rRNA	<i>Lact. plantarum</i>	de especie. Reconoce 8 cepas
PFGE (Pulsed - Field Gel Electrophoresis) de Sma I, codificador Apa I	genoma completo	<i>Lact. acidophilus</i>	de cepa
Electroforesis en gel agarosa, de Eco RV, Hin dIII, Bgl II, Eco RV, codificador Bam HI.	genoma completo	<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	de especie, subespecie y cepa.
Electroforesis en gel agarosa, de Asp718 Cla I, codificador Eco RI	genoma completo	<i>Lact. reuteri</i> , <i>Lact. plantarum</i>	variada
<b>Hibridación (Southern Hybridization)</b>			
Regiones variables 23S rRNA de gen de <i>E. coli</i> amplificadas por PCR con primers gen-específicos, utilizadas como sonda	23S rRNA	<i>Lact. gasseri</i> , <i>Lact. jhonsonii</i> , <i>Lact. acidophilus</i>	de cepa
Plásmido pNST43 DNA aislado de <i>E. coli</i> JM109, usado como sonda	rRNA	<i>Lact. acidophilus</i>	de cepa

Tabla 1- Detección de bacterias acidolácticas y bifidobacterias utilizando técnicas de biología molecular (continuación).

Métodos	Gen blanco	Especies	Especificidad
16S+23S cDNA de <i>E. coli</i> MRE600. 16S rDNA de <i>E. coli</i> Hb101. 16S rDNA de <i>Lact. acidophilus</i> ATCC4356. Los tres, como sondas.	16S rRNA	<i>Lact. acidophilus</i> , <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lact. fermentum</i> , <i>Lact. gasseri</i> , <i>Lact. helveticus</i> , <i>Lact. murinus</i> , <i>Lact. plantarum</i> , <i>Lact. salivarius</i> , <i>Lact. reuteri</i> , <i>Lact. delbrueckii</i>	de cepa
Fragmento 2kb Eco RI DNA de plásmido de <i>Lact. helveticus</i> clonado en <i>E. coli</i> , como sonda	Codificador Eco RI de DNA total (RFLP)	<i>Lact. helveticus</i>	de especie
Fragmento de 50 kb de plásmido de lactobacilos, de perfil tipo B, usado como sonda en hibridización.	plásmido DNA	<i>Lact. fermentum</i> cepa tipo B	de cepa
Sondas derivadas de clonaciones al azar de fragmentos de DNA en plásmido vector pBR322 usado en hibridación.	DNA cromosomal o plásmido	<i>Lact. acidophilus</i> O	de cepa
<b>Hibridación (Dot Blot Hybridization)</b>			
Banda clonada de fragmentos Eco RI de DNA cromosomal, de cepa tipo de <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en el vector YRP17, usada como sonda	punto de lesión en gen Leu-921	<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	de especie
Hibridación Dot Blot Reversa con sondas de captura	16S, 23S rRNA	Específica para BAL	Ident. directa simultánea especie específica de poblaciones mixtas
Amplificaciones de los genes hdc A de <i>Lact. buchneri</i> y <i>Leuc. oenos</i> usados como sonda.	genes hdc A	BAL decarboxilantes de histidina: <i>Lact. buchneri</i>	para gen LdcA
<b>Comparación de las secuencias de DNA</b>			
Diagnóstico de regiones reveladas en análisis comparativos de secuencias lineales de rRNA, usadas como sitios target.	16S rRNA	<i>Lact. brevis</i> , <i>Lact. sanfrancisco</i> , <i>Lact. reuteri</i> , <i>Lact. farciminis</i> , <i>Lact. pontis</i>	de especie

se requiere de un consenso unánime por parte de los taxonomistas en el establecimiento de los requisitos mínimos necesarios para la proposición y descripción de una nueva especie bacteriana (12).

A continuación se citan las características más importantes de los géneros de interés.

### ***Bifidobacterium.***

Las bifidobacterias fueron aisladas inicialmente en 1899 por Frenchman Tissier, a partir de heces de niños sanos alimentados con leche materna. Fueron denominados originalmente *Bacillus bifidum*, y posteriormente, a partir de la 8ª edición del Manual de Bergey, se establece el género *Bifidobacterium*, dentro del cual se reconocen las siguientes especies: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. thermophilum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. suis*, *B. coryneforme*, *B. asteroides* y *B. indicum*. De éstos, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. breve* son bacterias residentes en infantes, mientras que *B. bifidum*, *B. longum* y *B. adolescentis* son bacterias residentes en adultos.

Las bifidobacterias han sido aisladas del tracto intestinal y heces de animales, como también del tracto gastrointestinal, heces, vagina y cavidad oral del hombre (5).

Sus principales características son las siguientes: bacilos gram(+), no esporulados, anaerobios estrictos, aunque en algunos casos, luego del aislamiento inicial puede observarse un crecimiento lento en presencia de oxígeno y dióxido de carbono. Dependiendo de las condiciones de cultivo, muestran agrupación y morfología celular diversa: en Y, V, bacilos curvos, con forma de clava, bacilos sueltos o en empalizada. Se tiñen irregularmente con azul

de metileno. En medios de cultivo sólidos (como agar MRS o agar MRS-litio propionato), forman colonias pequeñas, blanquecinas, de aspecto cremoso.

La mayoría no posee catalasa. Utilizan el amonio como fuente de nitrógeno. No producen indol ni reducen nitratos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 36°C-38°C. Son sacarolíticas, fermentan la glucosa característicamente por el ciclo de la fructosa 6 fosfato, por el cual a partir de 1 mol de glucosa producen 1.5 moles de ácido acético y 1 mol de ácido láctico, por lo que se consideran bacilos heterofermentadores. En cambio, no producen dióxido de carbono (excepto cuando fermentan gluconato), ácido butírico ni ácido propiónico. Generan pequeñas cantidades de etanol, ácido fórmico y ácido succínico (5,9).

### ***Lactobacillus.***

Dentro de las BAL, el género *Lactobacillus* es uno de los más heterogéneos en cuanto a sus características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas. Esta heterogeneidad se ve reflejada en el rango del porcentaje de guanina y citosina del DNA de las especies incluídas, que va de 32 a 53%. El género fué dividido en tres grupos: **grupo I-Homofermentantes obligados**, **grupo II-Heterofermentantes facultativos** y **grupo III-Heterofermentantes obligados**. Esta división se fundamenta en parámetros fisiológicos tales como la presencia o no de enzimas claves para el metabolismo hidrocarbonado (homo y heterofermentante) por ejemplo la F1 6 di P aldolasa y F cetolasa. Las metodologías más clásicas para identificar especies de lactobacilos ha sido el patrón de fermentación de carbohidratos, la configuración de ácido láctico producido, la hidrólisis de arginina y requerimientos de desarrollo a determinadas temperaturas. Si bien estas metodologías siguen utilizándose, actualmente se

requieren para una clasificación más estricta, otros estudios como el análisis del peptidoglicano, movilidad electroforética de la enzima Ldh, el porcentaje molar de guanina y citocina del DNA etc.

Los lactobacilos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha encontrado, para algunas especies, importantes aplicaciones en la industria alimentaria. Éstos pertenecen al grupo más ácidotolerantes dentro de las BAL y por consiguiente, finalizan ciertas fermentaciones lácticas espontáneas tales como las que se observan en vegetales y ensilajes (8).

En la actualidad, *Lact. acidophilus*, *Lact. salivarius*, *Lact. leichmanii* y *Lact. fermentum* son reconocidos como posibles especies propias del tracto gastrointestinal humano y fueron denominadas “especies residentes” para distinguirlos de aquellas “especies transitorias”. Estas últimas incluyen *Lact. brevis*, *Lact. plantarum* y *Lact. casei* (5). Otros están más especializados y se encuentran sólo en ciertos nichos como *Lactobacillus sanfrancisco* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, éste último asociado al yogur (8).

Son bacilos gram (+), no esporulados, no móviles. En medios de cultivos sólidos (agar MRS, agar MRS bilis) forman colonias pequeñas blancas pero más translúcidas que las bifidobacterias. Realizan un metabolismo fermentativo, obligadamente sacarolítico. No producen ácidos volátiles con más de dos átomos de carbono. Son microaerofílicos, en medio agarizado crecen mejor cuando la tensión de oxígeno está reducida por un 5%-10% de dióxido de carbono. Inusualmente reducen nitratos, no poseen catalasa ni citocromos. La patogenicidad es poco frecuente (9).

**a) *Lactobacillus acidophilus*.**

Reside en la porción inferior del intestino delgado y a lo largo del intestino grueso humano, mucosas de vagina y cavidad oral, encontrándose también en animales. Presenta las siguientes características: son bastones de longitud variables, rectos, se agrupan de a pares o en cadenas cortas. No crece a 15°C y excepcionalmente crece bien a 45°C. La mayoría de las cepas fermenta el almidón pero no la ribosa. Tienen requerimientos nutricionales complejos, característica ésta que permite diferenciarlo de otro lactobacilo del tracto gastrointestinal, *Lact. salivarius*. Su temperatura y pH óptimos de crecimiento son 35°C-38°C y 5.5-6.0, respectivamente. En leche vacuna produce entre 0.3% y 1.9% de DL ácido láctico, variando la capacidad acidificante entre las cepas. Es resistente a la acción de los ácidos biliares del organismo. Produce las enzimas treonina aldolasa y alcohol dehidrogenasa, ambas participantes en la generación de compuestos de aroma. No puede diferenciarse de manera confiable, fenotípicamente, de *Lact. gasseri*, *Lact. crispatus* y *Lact. amylovorus*, requiriendo análisis más complejos de su estructura molecular para tal fin (5,9).

**b) *Lactobacillus casei***

Este lactobacilo mesófilo heterofermentativo facultativo está ampliamente difundido en la naturaleza. Se encuentra dentro del grupo filogenético *Lact. casei-Pediococcus*. En el Manual de Bergey (9), la especie *Lact. casei* era subdividida, sobre la base fenotípica y de algunos resultados de homología de DNA, en 4 subespecies: *Lact. casei* subsp. *tolerans*, *Lact. casei* subsp. *rhamnosus*, *Lact. casei* subsp. *casei* y *Lact. casei* subsp. *pseudoplantarum*. Pero en 1989 estas cuatro subespecies fueron reclasificadas por Collins y col. (12) en tres especies: *Lact. casei*, *Lact. paracasei* y *Lact. rhamnosus*.

Dellaglio y col. (12) han informado que otros autores, comparando la secuencia de genes que codifican para el rRNA16S (rDNA 16S) de las especies del grupo *Lact. casei*, obtuvieron conclusiones a favor de la propuesta de eliminar la especie *Lact. paracasei*. No obstante, el grupo *Lact. casei* reúne cepas de gran interés ya sea para la preparación de derivados lácteos o como probiótico y es de suma importancia la correcta diferenciación de sus especies como puede obtenerse con reacciones de amplificación como es la RAPD-PCR, la cual permite discriminar *Lact. casei* de *Lact. zae* y del grupo de *Lact. plantarum*. También se han obtenido resultados (con distintos primers) reproducibles para la diferenciación de *Lact. paracasei* de *Lact. casei*, *Lact. plantarum* y *Lact. pentosus*.

En cuanto a sus características fenotípicas, son bacilos de gran variabilidad en forma, tamaño y agrupación. Se observa una gran tendencia a formar cadenas. No crecen a 45°C y tienen requerimientos nutricionales complejos. Se aíslan de mucosas intestinales, de vagina, cavidad oral humana, como así también de productos lácteos (9).

#### **1.4 Estimulación de los organismos probióticos: Prebióticos**

Gibson y Roberfroid (8) introducen el término **prebiótico**, y posteriormente **simbiosis**, siendo esta última definida como la combinación en el mismo producto alimenticio de **pro** y **prebióticos**. Un prebiótico es definido como un ingrediente de la dieta, no digerible, que afecta beneficiosamente al huésped a través de una estimulación selectiva del crecimiento y metabolismo de un limitado número de especies bacterianas ya establecidas en el colon, mejorando así la salud del mismo.

La simbiosis se pone de manifiesto cuando estas sustancias llegan a la mucosa del colon y sirven de sustrato para las bacterias indígenas del lugar (principalmente bifidobacterias y lactobacilos) abasteciendo al huésped de energía, sustratos metabólicos y micronutrientes esenciales.

Un ingrediente alimentario, para ser considerado como prebiótico, debe:

1. No ser hidrolizado ni absorbido en el tracto gastrointestinal.
2. Estimular selectivamente el crecimiento de bacterias colónicas potencialmente beneficiosas.
3. Reprimir el crecimiento de microorganismos patógenos y su virulencia.

La producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos por los microorganismos probióticos (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) depende del metabolismo de los sustratos hidrocarbonados que no han sido absorbidos o metabolizados en la porción superior del tubo digestivo. Algunos prebióticos son aislados de fuentes naturales mientras que otros son producidos industrialmente (Tabla 2).

Dentro de los prebióticos se encuentran algunos conocidos como “factores bifidus”, que actúan específicamente sobre las bifidobacterias. Ellos son: Factor bifidus I (oligosacáridos de la leche humana conteniendo N-acetilglucosamina), Factor bifidus II (producto de la digestión enzimática de la caseína), extracto ginseng, Lactulosa, Fructooligosacáridos (FOS) y Oligosacáridos transgalactosilados (TOS) (producidos durante la fermentación del yogur) (8,11).

Tabla 2- Sustratos de baja absorción (prebióticos) y sus efectos sobre la microflora intestinal.

<b>Prebiótico</b>	<b>Acción Sobre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dosis diaria (g/kg peso corp.)</b>	<b>Nivel de Seguridad</b>
Fructooligosacáridos	Bifidobacterias y Bacteroides	Alcauciles (síntesis química de sucrosa / inulina)	0.3	FOSHU (1991)
4' Galacto-oligosacáridos	Bifidobacterias y lactobacilos	Leche humana/vacuna (a partir de lactosa)	0.128	FOSHU (1991)
4' Galactosil-lactosa	Bifidobacterias	Leche humana	0.3	
Galactosil-oligosacáridos	Bifidobacterias		0.3	
Palatinosa	Bifidobacterias	Síntesis química de sucrosa. Condensación intermolecular de glucosa		FOSHU (1991)
Rafinosa	Bifidobacterias	Remolacha blanca	0.45	FOSHU (1991)
Oligosacáridos de Transgalactosil- oligosacáridos (TOS)	Bifidobacterias y lactobacilos	grano de soja, suero		
Xilo-oligosacáridos	Bifidobacterias	Hidrólisis enzimática controlada por endo-1,4- $\beta$ -xilanasas	0.12	FOSHU (1996)
Lactulosa	Bifidobacterias BAL	Hidrogenación catalítica de lactosa a altas temperaturas	0.15	FOSHU (1996)
Lactitol		Hidrogenación catalítica de lactosa/lactulosa a altas temperaturas.		IDA no especificada (OMS 1982)
Lactosucrosa	Bifidobacterias	Transfructosilación de lactosa y sucrosa por fructofuranosidasa		FOSHU (1996)
Manitol	Flora gram (-)	Algas, olivos, higos. Hidrogenación catalítica de manosa/fructosa	0.17	IDA no especificada (OMS 1982) GRAS (1973)
Sorbitol	Flora gram (-)	Cereza, sidra y pera Hidrogenación catalítica de glucosa de azúcar invertido	0.17	IDA no especificada (OMS 1982) GRAS (1973)

IDA: Ingesta Diaria Admitida, FOSHU: Food for Specified Health Use legislated in Japan.

Tabla 2- Sustratos de baja absorción (prebióticos) y sus efectos sobre la microflora intestinal (continuación).

<b>Prebiótico</b>	<b>Acción Sobre</b>	<b>Origen</b>	<b>Dosis diaria (g/kg peso corp.)</b>	<b>Nivel de Seguridad</b>
Xilitol	Flora gram (+) y acidificante	Frambuesa, hongos, algas Hidrogenación catalítica de xilasa	4.5	IDA no especificada (OMS 1982)

IDA: Ingesta Diaria Admitida, FOSHU: Food for Specified Health Use legislated in Japan.

## **1.5 Características probióticas de bacterias intestinales.**

Las bifidobacterias y lactobacilos, para ser utilizados satisfactoriamente como aditivos alimentarios y ejercer un rol probiótico deben principalmente sobrevivir en gran número en el alimento al cual fueron adicionadas, tolerar los pH extremos de la secreción gástrica y las concentraciones de bilis liberadas en duodeno, adquirir residencia y proliferar en la mucosa intestinal.

### **1.5.1 Resistencia bacteriana a la secreción gástrica y biliar.**

La acidez de la secreción gástrica producida en el estómago es la primera barrera de defensa y uno de los tantos factores de stress, junto a la bilis y la peristalsis intestinal, que el organismo posee frente al ingreso de gérmenes durante la ingesta de alimentos. De esta manera, se mantiene una población bacteriana reducida en el estómago y la porción inicial del duodeno y se la considera como “zona de transición” entre una escasa microflora hasta la abundante y compleja mezcla de especies bacterianas en la porción final del tubo digestivo.

La capacidad de sobrevivir al proceso enzimático de la digestión y la acidez del estómago y a las secreciones biliares intestinales, para poder llegar viables a la mucosa intestinal y residir en ella es una de las características de especial importancia de un microorganismo para ser utilizado como probiótico (2,7). En este aspecto, los trabajos experimentales no han demostrado aún resultados lo suficientemente claros, lo cual hace necesario continuar con futuras investigaciones (13).

### **1.5.2 Deconjugación de ácidos biliares y efecto hipocolesterolémico.**

La secreción biliar hepática aporta ácidos biliares e inmunoglobulinas, entre otros componentes, al intestino delgado. Los ácidos biliares participan en la nutrición, solubilizando los lípidos dietarios como el colesterol, grasas saturadas y vitaminas hidrofóbicas, promoviendo su absorción.

El colesterol de la dieta, una vez que llega al intestino delgado, es solubilizado formando parte de micelas mixtas estabilizadas por los ácidos biliares conjugados antes de ser absorbido por los enterocitos. Posteriormente, es llevado al hígado por el “sistema porta” para contribuir al pool de colesterol plasmático. Además de esta ruta metabólica, existe una secreción de colesterol por la pared intestinal, siendo ésta una de las más importantes formas de eliminación del colesterol endógeno. El colesterol contenido en los alimentos ingeridos generalmente es menor que el endógeno secretado por intestino. En el ser humano sano, de 500 a 2000 mg de colesterol endógeno y dietario no absorbido, y aproximadamente de 100 a 500 mg de ácidos biliares pasan a través del colon diariamente. Estos últimos son metabolizados por las bacterias colónicas y excretados como esteroides neutros y sus derivados.

Los ácidos biliares son un grupo de esteroides ácidos hidrosolubles con propiedades detergentes, que se sintetizan en el hígado a partir del colesterol endógeno. Dicha biosíntesis está bajo control por retroalimentación negativa, de manera que cuando la concentración de los ácidos biliares disminuye, como sucede en una malabsorción o en una marcada excreción intestinal de los mismos, aumenta hasta veinte veces su síntesis consumiendo mayor cantidad de colesterol hepático. Cuando se secretan los ácidos biliares se encuentran conjugados con

glicina o taurina. Los ácidos cólico y quenodeoxicólico son los denominados ácidos biliares primarios y participan de la circulación enterohepática, siendo de esta manera absorbidos en el intestino y secretados nuevamente en la bilis luego de cada ingesta. En el individuo sano, 8 nmol de ácidos biliares transitan continuamente por la circulación enterohepática, la cual se hace más lenta en el ayuno y se acelera durante y después de la comidas. Aquellos ácidos biliares primarios que escapan a la absorción ileal y por consiguiente pasan al colon, son modificados por las enzimas bacterianas  $\alpha$ -dehidroxilasas y convertidos en ácidos biliares secundarios: deoxicólico y litocólico (7).

La importancia de la capacidad de deconjugación de ácidos biliares conjugados por parte de ciertos microorganismos, entre ellos las BAL, reside en el potencial efecto reductor del colesterol plasmático ya que los ácidos biliares al ser deconjugados, no cumplen su función solubilizadora de lípidos y al cambiar su pKa no son absorbidos, precipitan y se eliminan junto con las heces. Esto podría conducir a un mayor consumo de colesterol endógeno para nueva síntesis de los ácidos; y/o a la menor absorción del colesterol dietario a nivel intestinal, lo que explica en parte el efecto hipocolesterolémico que se les adjudica a las bacterias acidolácticas probióticas.

Por otro lado, se han publicado datos de diversos trabajos experimentales que sugieren que las bacterias probióticas utilizarían una vía alternativa para contribuir al descenso del colesterol plasmático (diferente a las antes mencionadas), que sería la incorporación del mismo a la membrana celular o citoplasma para su posterior catabolismo, observándose “in vitro” la desaparición del colesterol del medio. A pesar de los diversos mecanismos propuestos para tratar de explicar el efecto hipocolesterolémico atribuido a las BAL utilizadas como probióticos humanos, son necesarios más estudios para llegar a

conclusiones claras sobre las BAL y su efecto sobre el colesterol (14).

La hidrolasa de sales biliares (BSH: Bile Salt Hidrolase), que como consecuencia de esta acción libera ácidos biliares y aminoácidos (taurina o glicina), se encuentra presente en varias especies bacterianas de origen intestinal como *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus sp*, *Bacteroides*, *Clostridium*, etc. (15,16).

Estudios epidemiológicos sugieren que la incorporación de una elevada cantidad de colesterol y grasas saturadas en la dieta junto a una escasa cantidad de fibra, es un factor de riesgo para la generación de cáncer de colon en el ser humano, donde los derivados del colesterol (producto de su metabolismo en el intestino) están mucho más relacionados como agentes etiológicos de la misma que el colesterol por sí mismo (7).

### **1.5.3 Estimulación de las respuestas inmunológicas y efecto antitumoral.**

Las propiedades antitumorales atribuidas a estas bacterias se basan en:

1. Inactivación o inhibición de componentes carcinógenos en el tracto gastrointestinal.
2. Estimulación o mejoramiento de las respuestas inmunológicas.
3. Reducción de actividades enzimáticas de bacterias intestinales como la

$\beta$ -glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa, que convierten procarcinógenos en carcinógenos activos.

Estudios experimentales han demostrado que la ingestión de *Lactobacillus* en productos lácteos fermentados o no, inhiben líneas tumorales trasplantables en animales.

Se observó que, alimentando ratas con cepas de *Lactobacillus*, se podía disminuir la formación de tumores de colon o bien prolongar su período de latencia, probablemente por supresión de la actividad metabólica de la microflora colónica.

Además de las bifidobacterias, las principales bacterias ácidolácticas que han sido estudiadas para evaluar su capacidad antitumoral fueron *Lactobacillus acidophilus* y *casei*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* y *Leuconostoc*.

Estudios epidemiológicos sobre el cáncer de colon en humanos han demostrado una baja incidencia de éste en áreas poblacionales donde se incorpora en la dieta diaria una elevada cantidad de productos lácteos fermentados con estas bacterias ácidolácticas.

Enzimas producidas por bacterias que residen fundamentalmente en el colon, tales como  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, nitroreductasa, azoreductasa y 7  $\alpha$ -dehidroxilasa están implicadas en la carcinogénesis generando mutágenos carcinógenos y factores promotores tumorales. La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza glucósidos a agliconas mutagénicas, la  $\beta$ -glucuronidasa las genera en el colon a partir de hidroxiderivados del glucurónido, la nitroreductasa y azoreductasa están relacionadas con la formación de aminas aromáticas que pueden convertirse en nitroso y N-hidroxicompuestos en diversos tejidos.

Se ha observado que, proveyendo a ratas o humanos voluntarios dietas ricas en carnes y grasas saturadas, se logra un significativo incremento en la actividad de estas enzimas.

Wood y col. (4) han informado que otros autores demostraron que la suplementación con *Lactobacillus acidophilus* en elevada cantidad ( $\geq 10^{10}$  bacterias viables/día) de una dieta carnívora para una determinada población en estudio, redujo significativamente las actividades de  $\beta$ -glucuronidasa, nitroreductasa y la 7  $\alpha$ -hidroxilasa.

La  $\beta$ -glucuronidasa ha sido relacionada frecuentemente con *Peptostreptococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides*. Wood y col (4) también informaron que un segundo grupo de investigadores han descrito como se promueve marcadamente la carcinogénesis ingiriendo *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium paraputrificum*, pero que puede suprimirse este efecto por la incorporación dietaria de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Eubacterium rectale*. Además estudiaron la incidencia de cáncer hepático cuando se modifica la composición de la microflora intestinal, observando que *Lact. acidophilus* o *Bifidobacterium longum* poseen un gran efecto anticancerígeno: en animales donde se incorporó *Lact. acidophilus* en la alimentación, adquiriendo residencia en el intestino, la incidencia de este tipo de neoplasia fue de un 65%, mientras que cuando se incorporó *Bifidobacterium longum* fue de un 46% comparándolos con el grupo de animales control para el cual la incidencia fue del 100%.

La estimulación antigénica que desencadenan los polisacáridos asociados a la pared celular y los excretados por las BAL, cuando éstas son incorporadas oral o intraperitonealmente, se cree que es importante en la inducción de inmunidad hacia tumores malignos en el huésped (4).

Son conocidos los efectos producidos por *Lact. casei* Shirota sobre el crecimiento de tumores de colon y el mejoramiento de la respuesta inmunológica “in vivo”. Está demostrado que su ingesta prolongada detiene el crecimiento de la masa tumoral, potencia al sistema

inmunológico por modificación de las funciones de los linfocitos T e incrementa la actividad de las células NK (Natural Killer) (8).

### **1.5.3.1 Utilización de Bacterias Probióticas como inmunomoduladores.**

Las bacterias probióticas ofrecen una nueva alternativa alimentaria para contrarrestar las disfunciones inmunológicas locales y estabilizar los mecanismos de defensa de la mucosa intestinal.

El Tejido Linfoideo Asociado a Mucosas (TLAM) se encuentra ampliamente distribuido en todo el cuerpo y está verdaderamente “conectado” con las distintas células inmunológicas de las mucosas como así también con las de origen sistémico. Aquellas que se encuentran en la mucosa intestinal, representan el primer punto de contacto con los constituyentes dietarios como antígenos, alérgenos y bacterias de diverso tipo. Se sabe que la presencia de antígenos en el intestino está asociada a una adquisición de tolerancia oral a los mismos.

Una de las actividades principales del sistema inmunológico en el intestino es asegurar y mantener una baja sensibilidad hacia el gran número y variabilidad de antígenos y bacterias que potencialmente pueden llegar junto con los alimentos lográndose adquirir de esta manera la tolerancia antes mencionada. Esta inmunomodulación también es provocada particularmente por las BAL en el ser humano y en los animales, lo cual llevó a utilizar estos microorganismos como vacunas, adyuvantes, agentes supresores de tumores y antiinflamatorios. Dichos efectos fueron observados únicamente con la incorporación en la ingesta de bacterias viables y no cuando se utilizan bacterias inactivadas por tratamiento

térmico.

En diversos desordenes intestinales, se produce la alteración del balance microbiano y se incrementa marcadamente la permeabilidad a nivel de mucosas, lo cual aparece acompañado de un proceso inflamatorio que determina el cuadro clínico en el individuo. Todos estos cambios, en condiciones normales, son impedidos por el correcto funcionamiento de las barreras de defensa de la mucosa intestinal histológicamente intacta como así también por el rol que cumple el TLAM. Sin embargo, cuando agentes como virus, bacterias patógenas, químicos tóxicos o radiaciones alteran la integridad del epitelio y sus funciones, los defectos en los mecanismos de defensa se vuelven evidentes con lo cual aparece la sintomatología característica de este tipo de desordenes (8).

Los mecanismos a través de los cuales las BAL contribuyen a la reparación de las barreras de defensa son:

- ✓ Estabilización de la microflora intestinal normal.
- ✓ Adherencia a la mucosa, permanencia y prevención de adherencia y/o activación de microorganismos patógenos.
- ✓ Modificación por parte de la microflora intestinal de las proteínas dietarias.
- ✓ Modificación de la actividad enzimática de las bacterias colónicas.
- ✓ Modificación y/o control de la absorción de antígenos presentes en el intestino.

Uno de los mecanismos de defensa mencionados es la captación y absorción de antígenos los cuales alcanzan, por procesos de transporte especializados, a las células de las Placas de Peyer, lográndose de esta manera disminuir el impacto antigénico en la luz

intestinal. Esto desencadena una respuesta inmunológica específica hacia el antígeno que incluye no sólo su exclusión por vía entérica, sino también su metabolización y una hiposensibilidad hacia la noxa, logrando en conjunto la transformación de los antígenos y alergenicos en sus formas tolerogénicas. En neonatos, especialmente prematuros y aquellos que han interrumpido tempranamente la lactancia materna, estas funciones normales de la mucosa intestinal se encuentran alteradas debido al grado de inmadurez de las membranas de las microvellosidades intestinales y puede llevar a consecuencias severas para su salud. En estas situaciones, se vuelve relevante el uso de BAL probióticas para mejorar la tolerancia a estas sustancias nocivas, evitando de esta manera reacciones de hipersensibilidad.

Recientes estudios indicaron que la administración vía oral de determinadas cepas de BAL como *Lact. rhamnosus* (ATCC 53103), *Lact. plantarum* (VTT), *Lactococcus lactis* (ARH74) y *Bifidobacterium animalis* en sus formas viables, indujeron la síntesis del Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  e Interleuquina 6 en humanos (5,8).

Exitosos resultados se han logrado en la complementación con *Lact. rhamnosus* GG de tratamientos de diarreas provocadas por rotavirus en la población infantil afectada. Este lactobacilo estimula la producción de anticuerpos como la IgA sistémica y asociada a mucosas (entre otros), la cual podría conferir una importante “memoria inmunológica” que protege al individuo de futuras reinfecciones. Comparando los efectos producidos cuando se emplean estos lactobacilos viables e inactivados por tratamientos térmicos, se concluye que la viabilidad de las células es el factor determinante para inducir la inmunoestimulación. Sin embargo, el Instituto Central de Investigaciones Microbiológicas de Yakult, en Japón, ha iniciado estudios sobre los efectos protectores de *Lact. casei* LC 9018 tratado con calor (muerte térmica), para la identificación de compuestos denominados “inmunomoduladores

pro-activos” en los extractos celulares de las BAL. Se han identificado sustancias extraídas de la pared celular de LC9018 o *Lact. fermentum* YIT0159, como el ácido teicoico, que mejoran la actividad macrofágica frente a infecciones por *Pseudomona aeruginosa*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Listeria monocytógenes*, etc. Se han realizado trabajos donde se examinaron fracciones celulares provenientes del citoplasma, pared, polisacáridos y peptidoglicano no sólo de *Lact. casei* sino también de *Lact. acidophilus* y *Lact. plantarum* en busca de estas sustancias “pro-activas” antimicrobianas. Estas sustancias administradas intraperitonealmente, provocan la llegada al lugar de células inflamatorias como los macrófagos los que, inducidos por las paredes celulares de *Lact. casei* y *Lact. acidophilus* mejoran la producción de radicales oxígeno en respuesta al ácido PMA (phorbol myristate acid) que ellos mismos producen. Sin embargo, *Lact. plantarum* no muestra la misma capacidad. Cuando la administración es intravenosa, *Lact. casei* demostró ser el de mayor actividad protectora (en comparación a los demás microorganismos) y esto se asoció a las características composicionales de su pared celular (capa de peptidoglicano) (5).

Si bien más adelante se hará mención al efecto de las BAL frente a rotavirus, debemos mencionar que también las células muertas de *Lact. casei* LC9018 poseen actividad antiviral como se observa frente a Herpes Simplex tipo I (HSV-1) y Citomegalovirus (MCMV). La administración de este lactobacilo, en combinación con el antígeno inactivado HSV-1, mejora marcadamente los mecanismos de defensa frente a la infección en comparación a la administración única del lactobacilo. En la protección atribuida también a este probiótico frente al MCMV, se cree que existe un mejoramiento en la actividad de las células Natural Killer (NK) y que la resistencia frente a la noxa estaría inducida por glicoproteínas de la pared celular.

En otros estudios comparativos, donde se administró por un lado *Lactobacillus rhamnosus* GG y por otro una mezcla de cultivos de *Streptococcus thermophilus* y *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se observó que esta última mezcla de bacterias fue mucho menos efectiva y no modificó la duración de diarreas por rotavirus (8).

Trabajos similares, pero en este caso para evaluar el efecto producido por la administración de *Lact. acidophilus* viables e inactivados térmicamente sobre la prevención de la enteropatía radioterápica, se han llevado a cabo con resultados satisfactorios (5).

Entre las cepas reportadas como efectivas tanto en la profilaxis como en tratamientos sintomáticos de diversos desordenes, podemos citar a *Lact. acidophilus* NCFB1478, *Lact. casei* Shirota, *Lact. rhamnosus* GG y *Lact. acidophilus* LA1 (8).

#### **1.5.4 Propiedades antimicrobianas.**

Las propiedades de estas bacterias de prevenir y mejorar la sintomatología de las infecciones entéricas, obedecen a su capacidad de suprimir el desarrollo de microorganismos patógenos probablemente a través de la producción de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, peróxidos y bacteriocinas. Sin embargo, la sola capacidad de producir este tipo de sustancias no sería suficiente y dicha producción “in situ” en el intestino podría ser mejorada por la mayor adhesión de la bacteria probiótica a la mucosa intestinal. A continuación se hace una breve reseña sobre los aspectos más importantes de estas propiedades.

La fermentación microbiana reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y genera una serie de pequeñas moléculas con actividad antimicrobiana como son los **ácidos orgánicos**. Como consecuencia de la producción de los mismos, de la toxicidad inherente a éstos y de la acidificación propia de la fermentación, se generan cambios en el medio que llevan a que ciertos microorganismos ganen ventaja sobre otros volviéndose predominantes dentro de una misma población microbiana (Amensalismo).

Los **ácidos orgánicos** resultan ser inhibidores más poderosos a valores de pH bajos que cercanos a la neutralidad. Además, el **ácido acético** es mucho más activo que el **ácido láctico** frente a los microorganismos. El primero posee un espectro de inhibición mucho más amplio ya que actúa frente a levaduras, hongos y bacterias. Al parecer, esta diferencia se debería al elevado valor del pKa de **ácido acético** en comparación al del **ácido láctico** (4.75 y 3.08 respectivamente).

La forma no disociada del ácido sería la que determina el efecto inhibitorio, la cual puede difundir a través de la membrana celular por su carácter hidrofóbico y una vez que llega al interior celular, se disocia. Esto ocasiona en dicho medio (que en condiciones normales mantiene un pH constante cercano a la neutralidad) la acumulación del anión y por consiguiente la alteración de la síntesis de moléculas vitales para el microorganismo, además de afectar severamente los procesos de transporte a través de las membranas. Una característica típica de las BAL es su capacidad de contrarrestar este efecto nocivo, por reducción del pH citosólico adquiriendo, de esta manera, ácidotolerancia. Del mismo modo, también han adquirido resistencia a la liberación de peróxido de hidrógeno por la célula en presencia de oxígeno, ya que son capaces de descomponerlo a través de catalasas, peroxidasas o pseudocatalasas, según el microorganismo en cuestión. El efecto bactericida del **peróxido de**

**hidrógeno** es atribuido a su fuerte poder oxidante sobre los grupos sulfidrilos de proteínas y lípidos de la membrana celular. Algunas de las reacciones productoras de peróxido de hidrógeno crean un ambiente anaeróbico desfavorable para ciertos microorganismos. Sin embargo, algunos investigadores han cuestionado si el peróxido producido es, por sí mismo, el causante del efecto bactericida. En condiciones normales, este efecto letal puede ser potenciado por la presencia de la peroxidasa y tiocianatos. La enzima glicoproteinlactoperoxidasa, presente en diversos fluidos biológicos (tal como la leche) cataliza la reacción entre el tiocianato y el peróxido de hidrógeno generando el anión hipocianato. En presencia de un exceso de peróxido se suman otros productos de reacción, los cuales junto al anión hipocianato generan lesiones y cambios estructurales sobre las membranas bacterianas, responsables del efecto letal. En realidad, el principal efecto bactericida atribuido al peróxido se observa en el bloqueo de la glicólisis, más puntualmente en la inactivación de la gliceraldehído-3P-dehidrogenasa (entre otros cambios) lo cual interfiere en el metabolismo normal bacteriano (8).

El **dióxido de carbono** y el **diacetilo** también se encuentran dentro de los productos que se liberan del metabolismo de las BAL y a los que se les atribuyen ciertos efectos antibacterianos. El primero, crea un ambiente aneróbico y baja el potencial de oxidoreducción en el medio, características éstas desfavorables para determinadas bacterias. Si bien no se conoce con certeza el mecanismo de acción, se cree que además afecta las decarboxilaciones enzimáticas y los transportes a través de las membranas en las células.

Se sabe que el **diacetilo** por su parte, actúa más efectivamente a valores de pH por debajo de 7, además de ser mucho más activo frente a bacterias gram(-), levaduras y hongos que hacia bacterias gram (+) dentro de las cuales las BAL, a su vez, son las menos susceptibles (8).

Dentro de los compuestos antimicrobianos relacionados a las BAL, las **bacteriocinas** probablemente han sido los que más han atrapado la atención de muchos investigadores. El término **bacteriocina** se asigna a moléculas de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana, de peso molecular relativamente alto y cuyo espectro de acción involucra tanto a microorganismos de la misma especie como así también a microorganismos pertenecientes a especies estrechamente relacionadas. Para ejercer su acción, son absorbidas por la célula blanco, previo reconocimiento y unión a receptores dispuestos en la membrana celular (8).

#### **1.5.4.1 Usos profilácticos y paliativos de las bacterias probióticas en diversas patologías.**

##### **Diarrea Infantil.**

Entre los principales agentes etiológicos reponsables de las diarreas que afectan la población infantil a nivel mundial, se encuentran los rotavirus, los cuales producen una disrupción de la mucosa intestinal incrementando la permeabilidad hacia proteínas como alergenos o antígenos sin “procesar”, lo cual ocasiona una agresiva reacción inmune.

Desde el punto de vista preventivo se ha encontrado que una cantidad significativamente baja de niños que reciben fórmulas alimentarias suplementadas con *Bifidobacterium animalis* y *Streptococcus thermophilus* (dosis de  $1.9 \times 10^8$  UFC/g y  $0.14 \times 10^8$  UFC/g, respectivamente) han desarrollado diarreas (fundamentalmente a rotavirus) en comparación con aquellos del grupo control.

Combinaciones probióticas de *Bifidobacterium animalis*, *Lact. acidophilus* y *Lact.*

*reuteri* podrían también ser de gran utilidad en la prevención de este tipo de diarreas.

Ciertas cepas de BAL, particularmente *Lactobacillus rhamnosus* GG, promueven respuestas inmunológicas sistémicas y locales hacia el virus, lo cual podría ser de gran importancia en la protección frente a posibles reinfecciones (8). La administración de células viables de *Lact. rhamnosus* GG durante la etapa aguda de una gastroenteritis por rotavirus genera la secreción de IgA específica, pero en la etapa de convalecencia de la misma (5,8).

También se supone que el mejoramiento en la respuesta inmunológica responde a la contribución que hace este microorganismo a la restauración del normal funcionamiento de las barreras de defensa de la mucosa intestinal. También demuestra mejores aptitudes *Lact. rhamnosus* GG como terapéico para el tratamiento de la diarrea, en comparación con mezclas de *Streptococcus thermophilus*, y *Lact. bulgaricus* o *Lact. rhamnosus*.

Se ha sugerido que las leches fermentadas que poseen microorganismos probióticos tienen una función de “adyuvantes” en el mejoramiento de las infecciones entéricas, basada esta sugerencia en estudios experimentales donde se han administrado células atenuadas de *Salmonella typhi* junto a leches fermentadas con *Lact. acidophilus* LA1 y *Bifidobacterium* BB12 en dosis diarias superiores a  $10^7$  células (8).

### **Diarrea asociada a antibióticoterapia.**

*Clostridium difficile* es el agente etiológico más importante de este tipo de diarreas, sobre todo en las intrahospitalarias. La terapia con antibióticos altera las funciones de la mucosa intestinal a través del desequilibrio que ocasiona sobre su microflora lo cual da posibilidades que el clostridio se vuelva dominante y produzca su toxina.

En estudios realizados con individuos voluntarios sanos, a los cuales se les

suministraba simultáneamente un producto lácteo con bacterias probióticas y un antibiótico (especialmente aquellos reconocidos como causantes de este tipo de infecciones) se ha observado un efecto preventivo importante cuando se emplearon los siguientes microorganismos: *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus faecium*, *Lact. rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii* (8).

### **Diarrea del viajero.**

Este tipo de infecciones, si bien pueden ser causadas por virus y parásitos, en la mayoría de los casos se asocia a bacterias y en particular a *Escherichia coli* enterotoxicogénica.

La incidencia de este tipo de diarreas es muy irregular debido a que se relaciona con los distintos destinos geográficos, lo cual pone de manifiesto diferentes agentes etiológicos y su consecuente incidencia.

Se emplean con fines profilácticos cultivos de bacterias probióticas como es el caso de preparados liofilizados de *Lact. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* junto a *Lact. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una dosis diaria de  $10^9$  bacterias, sin dejar de mencionar a *Lact. rhamnosus* GG. Se han observado buenos resultados con el uso de las mezclas antes mencionadas, en la disminución del riesgo de ocurrencia de las infecciones; sin embargo no se lograron los mismos resultados cuando se administran aisladamente *Lact. acidophilus*, *Streptococcus faecium*, y *Lact. fermentum* asociado a *Lact. acidophilus* (8).

### **Otras infecciones y patologías relacionadas.**

La propiedad probiótica de las BAL, especialmente de *Lactobacillus rhamnosus* GG,

de normalizar rápidamente el equilibrio microbiano intestinal, justifica el uso de estas bacterias para desplazar agentes etiológicos de gastroenteritis como *Salmonella* y *Shigella*. Las bacterias del yogur también son capaces de revertir favorablemente el curso de las infecciones por *Salmonella enteritidis*, como así también *Lact. acidophilus* LA1 y *Lact. rhamnosus* GG que inhiben el crecimiento de esta bacteria patógena, abriendo nuevas perspectivas en su uso como bioterápicos.

Un microorganismo que actualmente ha adquirido gran relevancia es el *Helicobacter pylori*, reconocido definitivamente como causante de gastritis en adultos. Este patógeno actual no está fuera del espectro de acción antimicrobiana que poseen las BAL probióticas. Sin embargo, es importante aclarar algunos aspectos inherentes al proceso infeccioso en sí. La gastritis es una inflamación e irritación de la mucosa gástrica que en este caso es producida por una bacteria. La porción del tracto gastrointestinal involucrada se caracteriza por poseer una elevada acidez que no afecta el desarrollo del *Helicobacter pylori*, lo cual hace necesario emplear para el tratamiento de esta afección bacterias probióticas que tengan la capacidad de resistir las condiciones fuertemente ácidas encontradas en el estómago. *Lact. acidophilus* LA1 y *Lact. rhamnosus* cumplen con estas expectativas, demostrando una mayor efectividad en comparación al uso de *Bifidobacterium bifidus*, *Pediococcus pentosaccus* y *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (8).

En experiencias con ratas, se logró una sobrevida del 100% cuando éstas se pretrataron suplementando su alimentación en forma continua con *Lact. casei* y *Lact. acidophilus*, inoculando luego (vía oral), *Salmonella typhimurium*. En suero y secreciones intestinales de los animales se encontraron elevados niveles de anticuerpos específicos hacia la noxa. Por tanto, se sugiere que la protección inmunológica hacia estas infecciones entéricas se alcanza

cuando, previo a la llegada del patógeno, se ingieren mezclas de estas BAL y no después (5,8).

También se han reportado actividades antifúngicas por parte de las bacterias probióticas. *Lact. acidophilus*, *Lact. reuteri*, *Lact. rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* muestran tener un importante efecto inhibitorio de infecciones sistémicas por *Cándida albicans* como así también frente a candidiasis de mucosas. El fundamento es también, en este caso, la inmunomodulación de la que participan estas bacterias, a nivel local como sistémico, aunque también se reconocen mecanismos no inmunológicos (2).

Hasta aquí se han mencionado los usos profilácticos y sintomáticos de las BAL en los distintos desórdenes gastrointestinales de etiología microbiana. Sin embargo, no debemos dejar de mencionar los resultados satisfactorios que se han logrado con éstas en el tratamiento de otros tipos de afecciones como el mejoramiento sintomático de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable, tratados con radiaciones, y aquellos que padecen de Encefalopatía Hepática y de constipación (fundamentalmente a consecuencia del tipo de alimentación). Ésta última afecta a un gran número de pacientes geriátricos hospitalizados como consecuencia de la inmovilidad a la que están sujetos. En estos casos, se han evaluado los efectos producidos al administrarles leches formuladas con bifidobacterias y leches acidófilas, resultando esta medida muy satisfactoria para el mejoramiento de la motilidad intestinal que hizo, en muchos casos, innecesario el uso de laxantes (8).

Todas las propiedades probióticas hasta aquí descriptas requieren de una estrecha relación de la bacteria probiótica con las células del huésped y su población microbiana.

La gran variedad de metabolitos inhibidores producidos por las BAL encuentra su

blanco de ataque tanto en aquellas bacterias que reconocemos como “nocivas” hacia nuestra salud como también hacia otras BAL de especies más o menos relacionadas. Esto último determina su aptitud para ser usadas, por ejemplo, en la elaboración de productos lácteos fermentados donde se emplean mezclas de bacterias del starter y bacterias probióticas.

La capacidad de adhesión que poseen estas bacterias probióticas juega un rol de gran importancia en el proceso de colonización, la cual asegura que éstas lleven a cabo sus acciones benéficas por las cuales fueron seleccionadas.

Luego de alcanzar la porción inicial del intestino delgado, las bacterias probióticas son capaces de vivir por un período corto de tiempo en estado no proliferativo. Para establecerse como habitantes permanentes de la mucosa deberían tener la capacidad de adherirse a las células epiteliales para evitar, de esta manera, ser removidas y eliminadas por los mecanismos de “limpieza” que posee el intestino (peristalsis, movimientos de fluidos, funciones del TLAM, etc.).

La adhesión bacteriana involucra una fase inicial no específica e irreversible de interacción física entre ambas superficies seguida de una fase específica también irreversible mediada por elementos de adhesión, generalmente proteínas sobre la superficie bacteriana y por receptores específicos sobre la célula eucariota. Las interacciones se encuentran regidas por la especificidad entre la bacteria y las propiedades del huésped. Algunos microorganismos son huésped-específicos pero otros pueden ser capaces de colonizar más de una especie de mamíferos.

La Tabla 3 aporta datos, obtenidos en diversas experiencias, en cuanto a la especificidad de adhesión de lactobacilos de diferentes orígenes (11).

Tabla 3- Adhesión de lactobacilos a células epiteliales escamosas.

Origen animal de los lactobacilos	Adhesión a células epiteliales de*			
	Ratón	Rata	Pollos	Cerdos
Estómago de ratón	9/9	1/1	0/5	**
Estómago de rata	4/4	2/2	0/5	0/1
Estómago de rata	0/4	0/1	**	**
Estómago de rata	0/4	0/2	**	**
Estómago de pollo	0/8	0/4	7/7	0/1
Estómago de pollo	0/5	0/1	0/7	**
Estómago de pollo	0/4	0/1	0/5	**
Estómago de pollo	**	**	5/5	**
Estómago de pollo	**	**	**	4/6
Estómago de cerdo	0/5	0/1	0/5	0/1
Intestino de cerdo	**	**	**	15/17

\* número de bacilos adheridos/ número total de bacilos. \*\* datos no suministrados.

Es ya una aceptación generalizada que se prefiera el uso de bacterias de origen humano para la elaboración de alimentos probióticos destinados al consumo humano. Sin embargo, algunas cepas de origen no humano (como por ejemplo el ambiente lácteo) han demostrado tener buenas propiedades de adhesión hacia líneas celulares humanas, al menos en estudios “in vitro”. Se han encontrado cepas adherentes a células tipo Caco-2 (entre otras líneas celulares) tales como *Lact. acidophilus* NCD 1748, *Lact. acidophilus* LB, *Lact. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lact. reuteri*, *Lact. rhamnosus* (LA 750) y *Lact. acidophilus* BG2F04. La aptitud de colonización temporaria de las mismas se ha podido determinar a través de la realización de recuentos de células viables en la materia fecal posterior a su

ingesta. Con respecto al género *Bifidobacterium*, no todas las cepas son capaces de adherir a líneas celulares Caco-2 humanas sin causar algún daño sobre las mismas. De los lactobacilos antes mencionados, *Lact. rhamnosus* GG ha demostrado tener mayor permanencia en el tracto intestinal humano lo cual determina una propiedad de colonizar por períodos de tiempo más prolongados.

En la interacción de las BAL probióticas con la mucosa intestinal, no sólo debe investigarse los mecanismos de unión a las células, sino también con aquellos constituyentes orgánicos normalmente presentes en dichas secreciones. Es así que han sido numerosos los estudios comparativos sobre las propiedades adhesivas de los cultivos probióticos y starters lácticos empleando como soporte de adhesión líneas celulares tipo Caco-2, material proveniente de la matriz extracelular (distintos tipos de fibronectinas y colágenos) y material de la membrana basal intestinal (lamininas y colágeno tipo IV).

Es evidente que estas aptitudes de adhesión, permanencia y colonización de las BAL probióticas, están en directa relación con su capacidad de competir por nutrientes disponibles y de eliminar o impedir que microorganismos patógenos puedan ganar una ubicación sobre la mucosa intestinal, o bien que la flora oportunista se vuelva dominante en la población microbiana local manifestando su potencial patogenicidad. Existen evidencias de estudios efectuados para evaluar la capacidad de estas bacterias de inhibir la invasión y adherencia de *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica* hacia líneas celulares Caco-2 de origen intestinal (8).

De la misma manera que la adherencia es un factor fundamental en la colonización, el mucus lo es también para asegurar la estabilidad y permanencia de la lactoflora en el

intestino. Éste, se compone de sustancias glicoproteicas como la mucina y se distribuye sobre la superficie celular en capas viscosas de espesor variable. La mucina es degradada por miembros de la microflora, fenómeno éste que se manifiesta desde los primeros meses de vida. Uno de los integrantes de la flora degradativa es *Lactobacillus*, con capacidad de fermentar monosacáridos como L-fructosa y D-glucosaminas que forman parte de la mucina. También participan en dicho proceso enzimas como  $\alpha$  y  $\beta$  glicosidasas, y proteasas sustrato específicas.

Los lactobacilos, a lo largo de la vida del individuo, se mantienen en una población más o menos estable gracias a su capacidad de utilizar los nutrientes endógenos del lugar. Si bien se producen cambios en la composición de la mucina con el tiempo, este último no afecta tan drásticamente la flora residente como lo hace el cambio de la lactancia materna a la incorporación de una dieta sólida. Cepas metabólicamente activas capaces de degradar la mucina, como son los lactobacilos, alcanzan la aptitud de residencia como población microbiana estable en función de la estructura y características composicionales de estos “nichos microbianos” determinadas entre otros por la competitividad hacia los nutrientes disponibles (2,8).

#### **1.5.4.2 Importancia de las bacterias probióticas en la nutrición humana.**

El rol nutracéutico de las bacterias probióticas ha sido extensamente estudiado.

Los ácidos grasos libres de cadena corta (AGLCC), productos del metabolismo de las BAL (como ácido láctico, propiónico y butírico) pueden acumularse y manifestar una

importante actividad biológica en el intestino. También, a partir del metabolismo fermentativo de las proteínas se liberan AGLCC, los cuales rápidamente son absorbidos (particularmente ácido propiónico y acético) contribuyendo al “pool” de energía en el huésped. Debido a que la concentración de AGLCC es un factor determinante del pH en el lumen colónico y varias enzimas manifiestan sus actividades en función del mismo, cambios en el nivel de AGLCC podrían tener una importante implicancia sobre compuestos exógenos y carcinógenos en el intestino.

Existen numerosos estudios que indican que la fermentación de ciertos alimentos con BAL incrementa la cantidad, biodisponibilidad y digestibilidad de los nutrientes en ellos presentes. La fermentación bacteriana produce un incremento en el contenido de niacina y riboflavina en yogur, vitamina B<sub>12</sub> en queso cottage y vitamina B<sub>6</sub> en queso Cheddar. También se les ha adjudicado a las BAL la capacidad de producir vitamina B<sub>12</sub> ya sea en monocultivos como en asociación con hongos (en ciertos productos fermentados de soja).

*Lact. casei* y *Strep. faecalis* producen y degradan ácido fólico hacia poligamaglutamatos en la mucosa intestinal. El ácido orótico, si bien es necesario para el desarrollo de la microflora entérica, se encuentra disminuído en un 18 a 48% en las leches fermentadas, y en cierto modo sería beneficioso ya que se sabe que en ratas este ácido en elevada cantidad induce la transformación a hígado graso (2).

Una de las propiedades “saludables” más importantes de los probióticos que ha determinado su utilidad como “alimento terapéutico” para individuos intolerantes a la lactosa, es el aporte de la enzima β-galactosidasa (lactasa) en el ambiente intestinal. Esta patología se caracteriza por la incapacidad en los individuos que la padecen, de producir la enzima

(normalmente presente en la superficie apical de los enterocitos) lo cual lleva a que no puedan digerir la lactosa presente en los alimentos y a que el disacárido sea degradado por enzimas bacterianas intestinales causando diarrea osmótica. Esta enfermedad tiene una alta incidencia en Japón, China, Africa y en la población indígena australiana (8,10).

Es importante aclarar que la intolerancia a la lactosa puede ser de causa genética o bien aparecer como consecuencia de una radioterapia, infecciones virales, de patologías como la Esprúe celíaca, donde el común denominador en todos estos casos es la lesión del enterocito que sintetiza la beta-galactosidasa. También es importante no confundir la sintomatología que presenta esta enfermedad con la de otros desordenes de localización intestinal muy similares.

Los individuos intolerantes a la lactosa inmediatamente después de ingerir leche o algún alimento que contenga lactosa, desarrollan diarreas acompañadas de flatulencia y dolores abdominales. La severidad del cuadro clínico es muy variable y depende de cada individuo. Cuando se reemplaza en la dieta la leche por productos lácteos fermentados, estos individuos mejoran notoriamente la tolerancia al alimento y los síntomas son mucho más leves.

Más específicamente son las BAL (entre las cuales consideramos con especial atención a las probióticas) empleadas en sus formulaciones las responsables de mejorar la digestibilidad de este tipo de alimentos a través de:

- ✓ Menor concentración de lactosa en el producto fermentado, por hidrólisis parcial efectuada por el fermento en la leche.

✓ Elevada actividad de  $\beta$ -galactosidasa presente en las bacterias empleadas para fermentar el producto (bifidobacterias y *Lact. acidophilus*, entre otras de menor actividad).

✓ Progresivo aumento en la actividad de la enzima con el consumo permanente de este tipo de productos una vez que el probiótico sobrevivió a las condiciones agresivas de la secreción gástrica y biliar y alcanza la residencia intestinal. Al parecer, la presencia de bilis generaría en estas bacterias una mayor actividad de lactasa.

✓ Otro factor que se sugiere contribuye a la digestibilidad de la lactosa es la menor velocidad de vaciado gástrico cuando se ingiere yogur u otro lácteo fermentado semisólido, en comparación con la leche fluída.

La metodología más difundida para estudiar la metabolización de los carbohidratos en el ser humano, es la medición de hidrógeno en el aire expirado.

Si el azúcar es completamente digerido en el intestino no se detectará hidrógeno en el aire expirado, pero si no se produce dicha digestión los azúcares pasan al colon donde las bacterias del lugar los metabolizan con producción de hidrógeno el cual es llevado a los pulmones y eliminado con el aire.

Experiencias con voluntarios sanos han demostrado que realmente el aporte de bacterias que poseen actividad de lactasa en los alimentos mejora la digestión de los mismos. Cuando se suministró a éstos leche, yogur, yogur pasteurizado y una solución acuosa de lactosa, luego de su ingestión la menor cantidad de hidrógeno medido en el aire expirado correspondió al consumo de yogur en comparación a los otros preparados. Estos resultados avalan las conclusiones extensamente difundidas sobre el aporte que hacen las BAL

probióticas de  $\beta$ -galactosidasa y P $\beta$ -galactosidasa a los individuos carentes de las mismas (5,8).

La Tabla 4 resume los principales efectos reportados de los organismos probióticos sobre la salud humana (8).

## **1.6 Participación de las bacterias probióticas en la formulación de productos lácteos.**

Los alimentos fermentados poseen una larga trayectoria como parte integrante de la dieta del ser humano en distintos lugares del mundo, debido a su inocuidad y a que la fermentación es una de las alternativas más antiguas de preservación de alimentos.

Con el advenimiento de las modernas tecnologías en el procesamiento de alimentos, la producción en gran escala de productos lácteos fermentados ha sido consumada con el uso de controles precisos sobre la manipulación de microorganismos y enzimas específicas para el proceso de fermentación.

En Oriente e India se fermenta la leche para elaborar yogur y otros tipos de productos lácteos desde hace ya mucho tiempo. Más de 1000 tipos diferentes de quesos han sido elaborados utilizando BAL tanto en Europa como en varios países del Este. En todo el mundo, los alimentos fermentados continúan siendo hoy día uno de los componentes más importantes de la dieta. Tradicionalmente, las bacterias probióticas han sido empleadas en la elaboración de este tipo de productos, y entre ellas podemos mencionar especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* además de *Streptococcus thermophilus*.

Tabla 4- Microorganismos probióticos empleados actualmente y sus efectos sobre el status nutricional y la salud del huésped.

Microorganismo	Efectos reportados en estudios clínicos
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1	Adherencia hacia células intestinales humanas, balancea la microflora intestinal, mejoramiento inmunológico, adjuvante en el tratamiento de <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Descenso de actividades enzimáticas y mutagénesis en intestino, prevención de diarrea asociada a radioterapia, mejoramiento de la constipación.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	Prevención de diarrea asociada a antibióticos, tratamiento y prevención de diarrea por rotavirus, tratamiento de recaídas de diarreas por <i>Clostridium difficile</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Descenso de actividades enzimáticas intestinales, tratamiento de la intolerancia a la lactosa, producción de bacteriocinas.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Prevención de desordenes intestinales, balance microbiano, descenso de actividades enzimáticas intestinales, efectos positivos sobre cáncer de vesícula.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	Balance de la microflora intestinal, protección frente a diarrea del viajero, mejoramiento inmunológico.
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Descenso de actividades enzimáticas intestinales, sobrevive en el tracto intestinal.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Colonización del tracto intestinal, acortamiento de duración de diarreas por rotavirus.
<i>Strep. thermophilus</i> , <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	No posee efectos sobre diarrea por rotavirus, mejoramiento inmunológico pero no durante la diarrea por rotavirus, no afecta las actividades enzimáticas intestinales, paliativo para los síntomas por intolerancia a la lactosa (dependiente de cada cepa)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Tratamiento de diarreas virales incluyendo rotavirus, balance de la microflora intestinal.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prevención de diarrea asociada a antibióticos, tratamiento de colitis por <i>Clostridium difficile</i> .

Probablemente todo comenzó como un proceso natural donde la disponibilidad de nutrientes y las condiciones del medio circundante llevaron a la selección de microorganismos particulares, los cuales modificaron y preservaron de esta manera el alimento.

Actualmente, se cree que existen en el mercado aproximadamente 80 productos formulados con bifidobacterias, en su mayoría lácteos como yogur, cremas ácidas, suero de manteca, leches fortificadas y una considerable variedad de postres.

Una especial atención han generado los alimentos considerados “saludables” o “beneficiosos” para la salud del consumidor y son los hoy conocidos “alimentos probióticos”, formulados con una variada gama de bacterias: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Bifidobacterium* sp. Estos microorganismos pueden encontrarse bajo distintas formas de formulación, tales como comprimidos o en polvo, y también ser incorporados a diversos alimentos como leche y sus derivados fermentados, gomas masticables, dulces, postres, bebidas, preparaciones a base de soja etc. (2,8).

### **1.6.1 Selección de cepas destinadas a la elaboración de productos probióticos.**

Para ser usadas en la formulación de este tipo de alimentos, las cepas deben pertenecer a los microorganismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS). En este aspecto, nuevas cepas para las cuales no se ha probado su bioseguridad, deben ser testeadas en cuanto

a su toxicidad y tolerancia antes de ser aceptadas para la elaboración de alimentos probióticos.

En la Figura 1 se muestra un diagrama de flujo que puede ser de gran utilidad para seleccionar microorganismos con capacidad probiótica (3).

La selección bacteriana está principalmente determinada por el uso específico que se le quiere dar al probiótico. Las características más buscadas en bacterias para su uso como probióticos destinado al consumo humano son:

- ✓ Ser de origen humano. Su tolerancia y seguridad deben estar testeadas y aprobadas.
- ✓ Ser capaces de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal.
- ✓ Contribuir a la regulación favorable de las funciones de la mucosa y a la recuperación frente a desordenes intestinales.
- ✓ Producir vitaminas (ácido fólico y complejo vitamínico B) y enzimas beneficiosas que facilitan la digestión de los alimentos, la absorción de los nutrientes esenciales y la inactivación de carcinógenos y compuestos tóxicos.
- ✓ Mejorar la biodisponibilidad en el intestino de minerales y oligoelementos.
- ✓ Poseer capacidad de adhesión al epitelio intestinal, colonizar la mucosa y proliferar en dicho sistema microbiano.
- ✓ Producir sustancias antimicrobianas y tener un amplio espectro de actividad inhibitoria frente a los principales microorganismos patógenos humanos.
- ✓ Poseer componentes celulares probio-activos que estimulen las funciones de defensa en el huésped (sistema inmunológico).

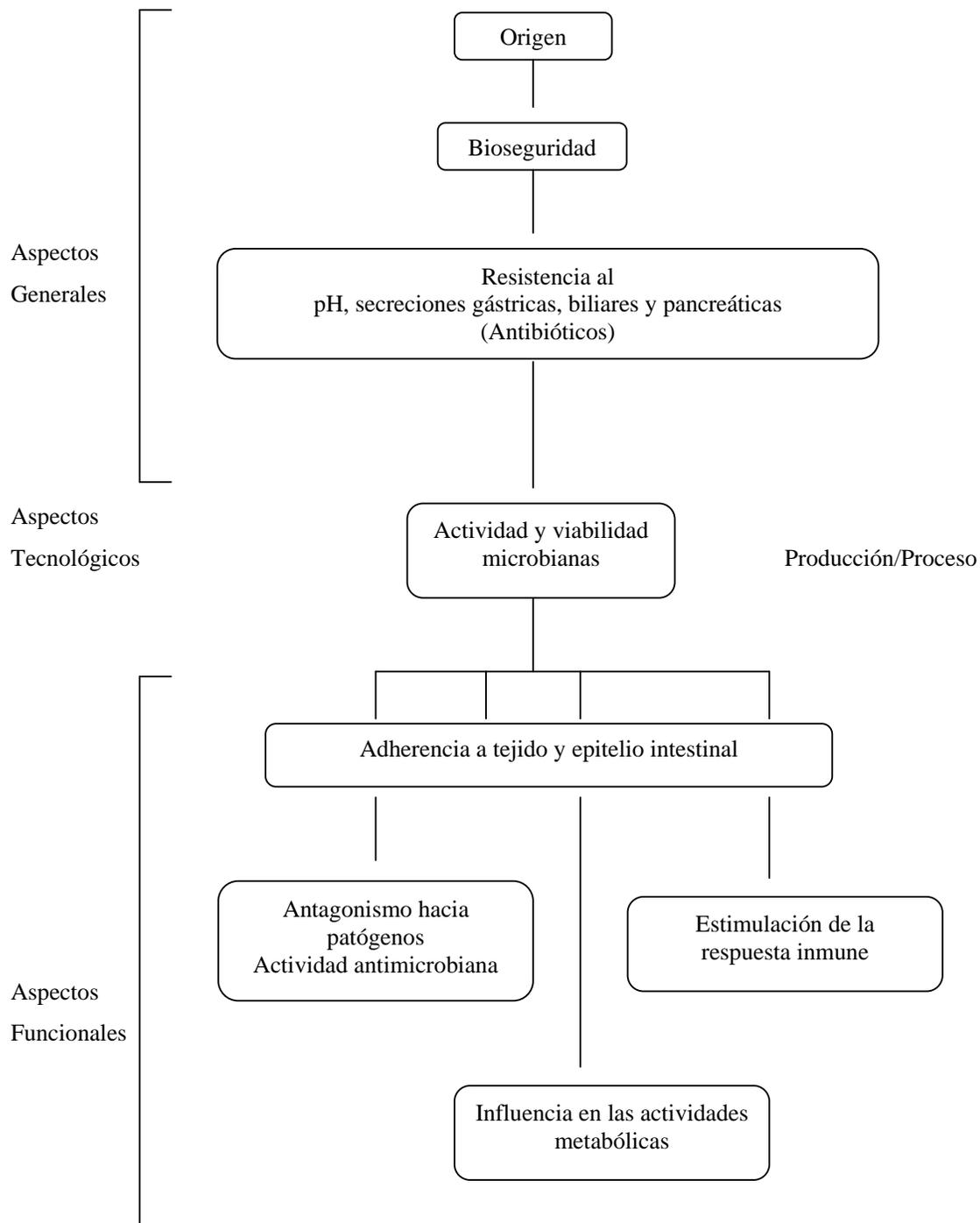


Fig. 1- Estrategia para la selección de cepas probióticas.

Hoy día, el consumidor tiene acceso a mayor información, transformándolo en un verdadero conocedor de los productos que incorpora en su alimentación y en particular de los beneficios que pueden ofrecerles los probióticos. Se ha sugerido una dosis terapéutica mínima de  $10^6$  a  $10^9$  UFC/ g o ml de producto a incorporar diariamente.

### **1.6.2 Supervivencia de las bacterias probióticas en los productos**

#### **lácteos.**

La mayoría de las bacterias probióticas poseen una fase estacionaria muy corta en su desarrollo, seguida de una rápida pérdida de viabilidad incluso en el almacenamiento a bajas temperaturas. Esta vida útil tan limitada ha llevado tanto a investigadores como a las industrias a la búsqueda de nuevas cepas más aptas para su aplicación tecnológica. Es de suma importancia evaluar la resistencia y viabilidad de estos microorganismos durante el procesamiento y almacenamiento del producto. Los primeros pasos en la elaboración de probióticos son el cultivo en gran escala, lavados y deshidratado o secado de los microorganismos. En general, estos organismos pueden soportar manipulaciones bajo condiciones rigurosas como el congelamiento y almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos; sin embargo, son mucho más susceptibles a la deshidratación por congelamiento y en particular al secado spray.

Cuando se requieren períodos de almacenamiento muy prolongados o bien cuando el producto va a quedar expuesto a condiciones desfavorables para su conservabilidad, surge como una alternativa a tener en cuenta la encapsulación de estos microorganismos.

Exigentes controles de calidad se hacen necesarios para evitar contaminación de estos productos con microorganismos alterantes y/o patógenos que pueden llevar a fermentaciones indeseadas, conduciendo a una baja calidad, además de una posible falta de inocuidad del mismo. El control de calidad debe asegurar el mantenimiento de las propiedades tecnológicas y la estabilidad de las bacterias probióticas en el producto. A continuación se citan algunas de ellas (2):

- ✓ Mantener viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento.
- ✓ No alterar el flavor y demás cualidades organolépticas.
- ✓ No provocar sobreacidificación en el producto durante el almacenamiento.
- ✓ Conservar las propiedades de colonización intestinal durante el procesamiento y almacenamiento.
- ✓ Mantener estabilidad y funcionalidad después del proceso de deshidratación o congelamiento, entre otros.
- ✓ Identificación segura de la cepa y eliminación de contaminantes indeseados.
- ✓ Conocer la relación dosis-respuesta para lograr el efecto deseado.

Como se mencionó anteriormente, cuando estas bacterias alcanzan la fase estacionaria, comienza a hacerse más notoria la muerte celular (fase de muerte celular) lo cual puede evidenciarse con una caída en los recuentos de células viables de acuerdo a una cinética exponencial, donde

$$X_t = X_0^{-kt}$$

$X_t$  es la concentración de células vivas luego de un tiempo  $t$ .

$X_0$  es la concentración de células vivas iniciales.

$k$  es la constante específica de muerte celular.

Dicha constante de muerte celular depende de cada cepa y de las características físicoquímicas del medio en el que desarrolla.

➤ Efecto de la temperatura de almacenamiento.

Cuando el producto es almacenado a temperatura ambiente (25°C), la viabilidad de *Lact. casei* en leche fermentada disminuye 2 ordenes log. en aproximadamente 2 semanas en comparación con *Lact. plantarum*, *Lact. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, los cuales poseen una mayor tasa de muerte celular a la misma temperatura. Sin embargo, la viabilidad de los lactobacilos en leche fermentada puede prolongarse cuando se almacenan a 5°C (Tabla 5).

Una ventaja adicional del almacenamiento a bajas temperaturas es que, si bien la fermentación y consiguiente acidificación en el producto continúa aún en esas condiciones, ésta se lleva a cabo muy lentamente evitando de esta manera la sobreacidificación del producto (8).

➤ Efecto del pH.

Valores de pH cercanos a la neutralidad en cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, prolongan marcadamente su sobrevivencia (8). La Tabla 6 (8) muestra este tipo de resultados.

Tabla.5- Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de bacterias probióticas disminuya 2 ordenes logarítmicos en leche fermentada.

Especie / cepa	pH del producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Recuento inicial (UFC/ml)	Tiempo (días)
<i>Lact. casei</i> YIT 9018 (cepa Yakult)	3.5 <b>3.8</b>	25 <b>5</b>	$5 \times 10^9$ <b><math>1 \times 10^9</math></b>	13 <b>&gt;30</b>
<i>Lact. plantarum</i> MDI 133 (cepa Malaysia Dairy)	3.4 <b>3.8</b>	25 <b>5</b>	$3 \times 10^9$ <b><math>2 \times 10^9</math></b>	4 <b>&gt;30</b>
<i>Lact. acidophilus</i> CH5 (cepa Chr. Hansen)	4.0 <b>3.6</b>	25 <b>5</b>	$3 \times 10^8$ <b><math>1 \times 10^8</math></b>	3 <b>15</b>
<i>Bif. bifidum</i> BB12 (cepa Chr. Hansen)	4.3 <b>4.3</b>	25 <b>5</b>	$2 \times 10^9$ <b><math>2 \times 10^9</math></b>	4 <b>15</b>

Tabla 6- Efecto del pH del producto sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de bacterias probióticas disminuya 2 ordenes logarítmicos en leche fermentada.

Especie /cepa	pH del producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Recuento inicial (UFC/ml)	Tiempo (días)
<i>Lact. casei</i> YIT 9018 (cepa Yakult)	3.8 <b>6.5</b>	25 <b>25</b>	$5 \times 10^9$ <b><math>1 \times 10^9</math></b>	13 <b>&gt;30</b>
<i>Lact. plantarum</i> MDI 133 (cepa Malaysia Dairy)	3.4 <b>6.5</b>	25 <b>25</b>	$3 \times 10^9$ <b><math>3 \times 10^9</math></b>	4 <b>&gt;30</b>
<i>Lact. acidophilus</i> CH5 (cepa Chr. Hansen)	4.0 <b>6.6</b>	25 <b>25</b>	$3 \times 10^8$ <b><math>1 \times 10^8</math></b>	3 <b>&gt;30</b>
<i>Bif. bifidum</i> BB12 (cepa Chr. Hansen)	4.3 <b>6.6</b>	25 <b>25</b>	$3 \times 10^9$ <b><math>1 \times 10^9</math></b>	4 <b>&gt;15</b>

➤ Efecto de los compuestos de aroma.

Algunas bacterias probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, si bien han demostrado propiedades probióticas destacables, no generan acetaldehído como producto final del metabolismo y por lo tanto, cuando se elabora leche acidófila, ésta resulta un producto muy pobre en cuanto a su flavor. Para mejorar su aceptabilidad por parte del consumidor, se suelen adicionar diversos aditivos mejoradores del flavor como jugos de frutas y frutas en trozos previamente pasteurizados.

Al parecer, no todos los jugos de frutas afectan de igual manera la viabilidad de *Lact. acidophilus* en el producto. La Tabla 7 ejemplifica los efectos observados con distintos tipos de jugos (8).

Tabla 7- Efecto de jugos de frutas adicionados a leche fermentada sobre el tiempo requerido para que el recuento de células viables de *Lact. acidophilus* CH5 (cepa Chr. Hansen) disminuya 2 ordenes logarítmicos.

Leche Fermentada	pH del producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Recuento inicial (UFC/ml)	Tiempo (días)
Leche	3.8	5	1x10 <sup>9</sup>	15
<b>Leche +3%(v/v) jugo frutilla</b>	<b>3.8</b>	<b>5</b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>	<b>5</b>
Leche +3% (v/v) jugo naranja	3.8	5	8x10 <sup>8</sup>	15
Leche +3% (v/v) jugo uva	3.8	5	1x10 <sup>9</sup>	15
Leche +3% (v/v) jugo manzana	3.8	5	9x10 <sup>8</sup>	15
Leche + 3% (v/v) jugo mango	3.8	5	1x10 <sup>9</sup>	15
Leche +3% (v/v) jugo ananá	3.8	5	9x10 <sup>9</sup>	15

La respuesta a la mayor pérdida de viabilidad que sufre *Lact. acidophilus* cuando se adiciona jugo de frutillas a estos productos, tiene que ver con la exposición de los productos a la luz diurna. Se supone que ésto desencadena fotorreacciones que inducirían a la formación de sustancias aparentemente tóxicas hacia las células bacterianas.

Existen también factores bioquímicos que pueden afectar la estabilidad celular. A continuación haremos un breve comentario de cada uno de ellos.

➤ Provisión de energía.

Un metabolismo activo y la consecuente generación de energía son prerequisites fundamentales para el mantenimiento de la integridad celular y la estabilización citosólica de proteínas en los lactobacilos. Sin embargo, una excesiva generación de energía (ATP) puede conducir a la inestabilidad celular y favorecer la muerte.

➤ Oligoelementos.

Existen evidencias certeras del efecto del magnesio sobre la estabilidad de los lactobacilos, como sucede con *Lactobacillus delbrueckii*. Al parecer, este catión es requerido para el normal funcionamiento de las kinasas de la vía glicolítica, además de estabilizar esta vía metabólica en presencia de glucosa.

➤ Tolerancia al oxígeno.

El peróxido de hidrógeno producido por los startes del yogur, compromete la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus*, cuando se adiciona a este tipo de producto

fermentado. En realidad, *Lact. acidophilus* también produce peróxido de hidrógeno cuando desarrolla en presencia de oxígeno. Sin embargo, la célula posee mecanismos para evitar su acúmulo en el interior autoprotegiéndose del efecto oxidativo del mismo. Otro de los mecanismos de los que se valen las bacterias para evitar ser dañadas por este agente, es el uso de enzimas propias que desdoblen el peróxido de hidrógeno como la pseudocatalasa y peroxidasa.

➤ Otros factores.

La menor disponibilidad de fuentes de energía y carbohidratos fermentables que se observa a medida que las bacterias probióticas desarrollan en el producto, inevitablemente lleva a un descenso en la tasa de crecimiento en el mismo y el hecho de recurrir a fuentes de energía alternativas no afecta la viabilidad de *Lact. acidophilus* durante el almacenamiento.

Otra de las causas que puede llevar a un menor desarrollo de estos microorganismos en el producto, es la acidificación que se produce durante el almacenamiento, pero ésta no llega a ser importante cuando las condiciones de conservación son las adecuadas.

La acidofilia y ácidoestabilidad de las bacterias probióticas dependen del funcionamiento de las membranas y su permeabilidad hacia las formas no disociadas de los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo bacteriano.

Complejos mecanismos que involucran el mantenimiento de gradientes de protones y moléculas cargadas a través de las membranas mitocondriales, la exclusión extracelular de los ácidos orgánicos producidos, la eliminación de aquellos que ingresan en su forma no disociada al citoplasma (los cuales ocasionan una serie de cambios en la concentración

intracelular de protones) y el efecto amortiguador de la ATPasa para mantener dicha concentración y pH en los valores normales citoplasmáticos, determinan en conjunto que la célula bacteriana pueda adaptarse y sobrevivir a su propia capacidad acidificante.

Es interesante notar que *Lactobacillus casei*, el cual fermenta numerosos carbohidratos, puede sobrevivir por más tiempo en productos lácteos fermentados frente a *Lactobacillus acidophilus*, cuyo espectro de fermentación es mucho más limitado. Probablemente, la diferente composición bioquímica de las membranas celulares sea la razón por la cual algunas bacterias tengan distinto grado de ácidoestabilidad y, por tanto, distinta capacidad de sobrevivir en productos lácteos fermentados.

Como se mencionó previamente, la ácidotolerancia es el reflejo de la ácidoestabilidad, por lo que sería posible seleccionar cepas que sobrevivan largos períodos de tiempo en ambientes ácidos. Una estrategia simple de selección podría ser el subcultivo de mutantes de estas bacterias, o el uso de un sistema continuo de cultivos que por adaptación al medio, condujera a una autoselección de las cepas más ácidotolerantes. Salminen y col. (8) han informado que otros investigadores propusieron un proceso de selección donde se toma la producción de ácido como el factor determinante del aislamiento de cepas de lactobacilos. El procedimiento se basa en dos hechos fundamentales:

1. El pH en el medio (leche) sólo descenderá, en la fermentación, como consecuencia de la producción de ácido.
2. A valores de pH bajos sólo las variantes ácidotolerantes continuarán con su desarrollo.

Internacionalmente, se han establecido estándares para la elaboración de la gran diversidad de productos lácteos fermentados. En Japón existen estándares especificados (sujetos a ordenanzas y regulaciones ministeriales de ese país) para cuatro tipos de productos: leches fermentadas, bebidas lácteas conteniendo células vivas o pasteurizadas y bebidas de base fundamentalmente láctea.

Fuera de Japón, los estándares internacionales pueden encontrarse en la Comisión del Codex Alimentarius de la FAO/WHO, que los especifica también para cuatro tipos de productos: yogur, yogur endulzado, yogur aromatizado y productos que son pasteurizados post-fermentación.

En diversos países, el uso de *Lact. acidophilus* en la industria láctea fue anterior al uso de bifidobacterias, particularmente para la elaboración de las conocidas leches acidófilas, debido a las ventajas del mismo ya que permite su manipulación de la misma manera que las BAL normales, además de no presentar generalmente problemas de taxonomía.

Productos que incluyen únicamente *Lactobacillus acidophilus* son, por ejemplo, Biolak (Unión Soviética), Arla acidophilus milk (Suecia) y Sweet acidophilus milk (USA). Aco-yoghurt (Suiza) y Bioghurt (Alemania) contienen *Lact. acidophilus* en combinación con BAL termofílicas y Acidophilus cultured milk (Yugoslavia) y Acidophilin (Unión Soviética) poseen *Lactobacillus acidophilus* junto a BAL mesofílicas y levaduras.

Cuando se emplean bifidobacterias para la elaboración de leches fermentadas, es necesario recurrir a complejas técnicas para asegurar la viabilidad durante el almacenamiento, ya que este microorganismo muere rápidamente cuando el pH alcanza valores por debajo de 5 y cuando queda expuesto al oxígeno del aire. Respecto al uso de este género, existen dos tipos de productos:

- Aquellos en los cuales la fermentación de la leche se realiza directamente con las bifidobacterias y
- Aquellos en los que se adiciona un cultivo concentrado de bifidobacterias a la leche previamente fermentada.

Cuando se fermenta la leche con bifidobacterias, es necesario adicionar al producto sustancias que contribuyan al flavor ya que este microorganismo al ser heterofermentativo no confiere al mismo el flavor deseado. En el segundo tipo de producto, no se presentan inconvenientes en lo que respecta al flavor obtenido. Sin embargo, serían necesarios nuevos estudios sobre la preparación y almacenamiento de los cultivos concentrados que se emplean, lo cual lleva a utilizar equipamientos especiales.

En las bebidas lácteas, *Lactobacillus acidophilus* es el más comunmente utilizado para su formulación, y entre las leches fermentadas hay productos que contienen distintas combinaciones tales como bifidobacterias con *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Strep. thermophilus*, *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reemplazado por *Lact. acidophilus* y *Lact. acidophilus* con *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Strep. thermophilus* (8).

La legislación vigente para el Mercosur, sugiere un nivel mínimo en el recuento de bacterias probióticas viables (presente en productos comerciales) de  $10^6$  CFU/g de producto, cuando se trate de bifidobacterias (17). Se ha debatido mucho acerca del control legislativo existente y si éste es suficiente para la regulación de los alimentos funcionales. También se plantea si debe ser introducido un registro específico para éstos. En estos momentos, la definición legal de un alimento funcional ha sido estipulada bajo el sistema FOSHU (Food for Specific Health Use) perteneciente a la regulación alimentaria japonesa. Dicha definición

establece que un alimento funcional es aquel que satisface los efectos benéficos hacia la salud que son exigidos (11).

En la Unión Soviética se han dirigido los estudios hacia el kefir, una interesante leche fermentada a la cual se le ha dado más bien una importancia “artesanal”. Este tipo de alimento se elabora con un único starter: los gránulos de kefir. En ellos podemos encontrar, en relación simbiótica sobre una matriz de polisacáridos, BAL homo y heterofermentantes (*Lactococcus*, *Leuconostoc*), *Acetobacter* y levaduras. El kefir también es elaborado en otras partes del mundo como Alemania y Suiza donde existen variantes fluída, set y batida. El kefir europeo es envasado en recipientes que contienen en sus capas de aluminio pequeños orificios para eliminar el dióxido de carbono generado por el metabolismo heterofermentativo y así evitar el hinchado de los envases y la ruptura del sellado de seguridad que identifica la integridad del producto. Este tipo de packaging no está permitido en otros países y se están desarrollando numerosos estudios sobre la manufactura y envasado del kefir para lograr una calidad uniforme y asegurar la inocuidad del mismo. Al kefir se le han atribuido varios efectos benéficos: aumenta el apetito, colabora en el proceso de digestión de los alimentos y mejora el funcionamiento renal.

Otra alternativa atrayente, de este tipo de “alimentos saludables” es la formulación de leches que contienen bacterias probióticas y a las cuales se les ha eliminado el contenido de colesterol o bien se han fortificado con vitaminas, modificado la composición en proteínas y grasas con adición de leches de soja y proteínas de lactosuero (5). La Tabla 8 (11) detalla algunos de los numerosos productos probióticos comerciales que existen en el mercado mundial.

Tabla 8- Productos probióticos comerciales.

**Japón**

Producto	Empresa	Bacterias probióticas		
		presentes	Propiedades funcionales	Categoría
Yakult 65	Yakult Honsa	<i>Lact. casei</i> Shirota	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada
Yakult 80 Ace	Yakult Honsa	<i>Lact. casei</i> Shirota	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada
Morinaga Caldu y Bifidus	Morinaga Milk Industry	<i>B. longum</i> <i>Lact. acidophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea y leche fermentadas
Sofuhl	Yakult Honsa	<i>Lact. casei</i> Shirota <i>Strep. thermophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Leche fermentada
Joie	Yakult Honsa	<i>Lact. casei</i> Shirota <i>Strep. thermophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Leche fermentada
Mil-Mil	Yakult Honsa	<i>B. breve</i> cepa Yakult <i>B. bifidum</i> cepa Yakult <i>Lact. acidophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Leche fermentada
Mil-Mil E	Yakult Honsa	<i>B. breve</i> cepa Yakult <i>Lact. acidophilus</i> <i>Strep. thermophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Leche fermentada
Bifiel	Yakult Honsa	<i>B. breve</i> cepa Yakult <i>Strep. thermophilus</i> <i>L. lactis</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Leche fermentada
Levenin	Wakamoto Pharmaceutical	<i>Lact. acidophilus</i> <i>B. infantis</i> , <i>Ent. faecalis</i> <i>Strep. thermophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Polvo deshidratado congelado
Onaka He GG	Takanashi Milk Products Co.	<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lact. rhamnosus</i> GG	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada

**Asia, Oceanía y Brasil**

Yakult	Yakult	<i>Lact. casei</i> Shirota	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada
CHAMYTO	Nestlé	<i>Lact. johnsonii</i> <i>Lact. helveticus</i>		Bebida láctea fermentada

Tabla 8- Productos probióticos comerciales (continuación).

Producto	Empresa	Bacterias probióticas		
		presentes	Propiedades funcionales	Categoría
Vitagen	Malasya Dairy	<i>Lact. acidophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada
	Industry			
Bio-Garde	JALNA Dairy	<i>Lact. acidophilus</i>		Leche fermentada
	Food	<i>B. bifidum, Lact. casei</i>		
Yoplait	National Dairies	<i>Lact. acidophilus</i>		Leche fermentada
VITA CHARM	P.T. Pola	<i>Lactobacillus sp.</i>	Promotor de salud	Leche fermentada
VAALIA	QUF Industries	<i>Lact. acidophilus</i>	Balance de la flora inestinal Promotor de salud	Yogurt Leche fermentada
	Pauls	<i>B. lactis</i> <i>Lact. rhamnosus</i> GG		
Classic Flavor	Danone	<i>Lact. acidophilus</i>	Promotor de salud	Leche fermentada
Ski	Australia	<i>Lact. acidophilus</i>	Promotor de salud	Leche fermentada
	Cooperation	<i>Bifidobacterium</i>		
<b>Europa.</b>				
Yakult	Yakult	<i>Lact. casei</i> Shirota	Normaliza el balance de la flora intestinal humana	Bebida láctea fermentada
LC1	Nestlé	<i>Strep. thermophilus</i> <i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Estimulación del sistema inmunológico	Leche fermentada
		<i>Lact. johnsonii</i>		
GEFILUS	Valio Ltd.	<i>Strep. thermophilus, Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus, Lact. acidophilus, B. bifidum,</i>	Mantiene equilibrada la flora intestinal.	Leche fermentada
		<i>Lact. rhamnosus</i> GG	Mejoramiento de la respuesta inmunológica	
Actimel	Danone	<i>Strep. thermophilus, Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus, Lact. casei</i> Imuntass	Mejoramiento de la resistencia a infecciones por bacterias patógenas.	Leche fermentada
VentruX Acido	AB Cernelle	<i>Strep. faecium</i> SF68	Suplemento nutricional	Cápsulas
Bra-Mjoelk	Arla	<i>Lact. reuteri</i>	Sistema de defensa del intestino	Leche fermentada

Tabla 8- Productos probióticos comerciales (continuación).

**Estados Unidos de América**

<b>Producto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Bacterias probióticas</b>		<b>Categoría</b>
		<b>presentes</b>	<b>Propiedades funcionales</b>	
Classic Flavor	Danone	<i>Lact. acidophilus</i>	Promotor de salud	Leche fermentada
Lactinex	Hynson,	<i>Lact. acidophilus</i>		Polvo
	Westcott and Dunnig	<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Promotor de salud	
LGG	ConAgra	<i>Lact. rhamnosus</i> GG	Promotor de salud	Cápsulas

### **1.6.3 Inocuidad de los microorganismos probióticos destinados al consumo humano.**

Existe un interés considerable en extender el uso de los microorganismos probióticos desde las conocidas fórmulas para los productos lácteos hacia otro tipo de productos tales como fórmulas para infantes, alimentos a base de jugo de fruta y cereales e incluso productos farmacéuticos (11).

El uso de las bacterias probióticas en la formulación de alimentos tiene ya una extensa trayectoria, y la mayoría de las cepas empleadas se consideran microorganismos comensales en el ser humano, sin que se haya demostrado potencial patogénico alguno. La seguridad en la manipulación de estas bacterias está avalada por el hecho de que vienen siendo empleadas en la industria desde hace mucho tiempo, no habiéndose informado inconvenientes.

Al género *Lactobacillus* se lo considera GRAS, mientras que los géneros de *Streptococcus* y *Enterococcus* contienen algunas especies oportunistas y patógenas (Tabla 9) (8).

Factores inherentes al huésped como el funcionamiento normal de las barreras de defensa y la integridad de la mucosa intestinal, junto a los microorganismos que constituyen la microbiota presente en el lugar, conforman un habitat equilibrado. La llegada de microorganismos foráneos no debe encontrar, en el lugar, oportunidad de manifestar efecto virulento alguno. La dosis o concentración de estos microorganismos en la mucosa, y el nivel inmunológico del huésped pueden transformar, por ejemplo, a enterococos de simples comensales a patógenos oportunistas (11).

Tabla 9- Clasificación de microorganismos probióticos en función de su bioseguridad para consumo humano.

<b>Género</b>	<b>Potencial infeccioso</b>
<i>Lactobacillus</i>	Principalmente no patógenos, algunos oportunistas (especialmente en inmunocomprometidos)
<i>Lactococcus</i>	Principalmente no patógenos
<i>Leuconoctoc</i>	Principalmente no patógenos, algunas cepas aisladas de infecciones.
<i>Streptococcus</i>	Estreptococos orales principalmente no patógenos, algunos pueden provocar infecciones como oportunistas
<i>Enterococcus</i>	Algunas cepas patógenas oportunistas con actividad hemolítica y resistencia a ciertos antibióticos.
<i>Bifidobacterium</i>	Principalmente no patógenos, algunas cepas aisladas de infecciones.
<i>Saccharomyces</i>	Principalmente no patógenos, algunas cepas aisladas de infecciones.

El cuestionamiento del uso de las BAL como probióticos ha surgido como consecuencia de recientes informes clínicos de bacteremias asociadas a estas bacterias. Cepas de *Lactobacillus* (de las especies *Lact. rhamnosus*, *Lact. casei*, *Lact. paracasei* y *Lact. plantarum*) se han aislado de casos clínicos. *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* están mucho más comprometidos en este aspecto, ya que se los ha encontrado más frecuentemente asociados a infecciones, y debido también a recientes apariciones de cepas resistentes a la vancomicina (8).

Para evaluar la bioseguridad del empleo de estos microorganismos probióticos se proponen tres metodologías:

1. Estudios sobre las propiedades intrínsecas de las cepas.
2. Estudios sobre la farmacocinética de las cepas
3. Estudios para conocer las interacciones cepa-huésped

#### 1. Estudios sobre propiedades intrínsecas

Ciertas actividades enzimáticas de los microorganismos pueden resultar en un daño hacia el individuo. La intensa deconjugación de sales biliares, la degradación del mucus intestinal, la agregación plaquetaria y la colonización de válvulas cardíacas son algunos ejemplos que podemos citar, los cuales pueden ser evaluados por estudios “in vitro” (8). Con respecto a la degradación del mucus, una microflora estable con un patrón normal de fermentación, residencia constante y bajo pH son importantes para la protección del mucus frente a diversas injurias. Aquellas cepas incapaces de degradarlo, o a sus glicoproteínas, se consideran no invasivas; sin embargo, es importante aclarar que ciertas cepas comerciales (*Lact. rhamnosus* GG, *Lact. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*) no poseen la capacidad de degradar el mismo, pero tienen muy buena capacidad de adherencia a mucosas, propiedad importante para su uso como probióticos (11). Por otro lado, no se puede asegurar que la aparición de los efectos indeseados mencionados anteriormente, sea consecuencia del consumo de alimentos formulados con bacterias probióticas ya que hasta el momento no existen estudios que confirmen esta relación causa-efecto (8).

#### 2. Estudios sobre la farmacocinética.

La farmacocinética de las bacterias probióticas puede ser medida en estudios “in vivo” empleando técnicas de entubación o biopsia intestinal que permiten la recolección de material

del lugar y estudiar la presencia y/o permanencia del probiótico.

La sobrevivencia de estas bacterias a lo largo de las distintas porciones del TGI humano no es la misma para todas las cepas, ya que algunas mueren rápidamente al llegar al estómago mientras que otras, como las bifidobacterias, logran arribar al intestino con mayor éxito.

El uso de marcadores de tránsito gastrointestinal es muy útil para determinar las propiedades de colonización comparando la cinética de la misma con la del marcador. Estudios “in vitro” de la resistencia a las secreciones gástrica y biliar (entre otros) nos permiten predecir el destino de estos microorganismos y su tránsito a través del TGI humano.

### 3. Estudios sobre interacción cepa-huésped.

Valiéndonos de estudios “in vitro” como “in vivo”, pueden evaluarse propiedades bacterianas como la invasión a la mucosa y sus interacciones con la célula huésped. En este aspecto, ha demostrado ser de gran utilidad recurrir a trabajos de investigación epidemiológica con grupos poblacionales como así también con grupos de individuos voluntarios sanos o enfermos con distintos tipos de desordenes de origen intestinal y no intestinal (8).

Hasta el momento son escasos los lineamientos sobre cómo llevar a cabo estudios acerca de la seguridad en el uso de las bacterias probióticas. Sólo se manejan recomendaciones de organismos oficiales internacionales y de grupos de investigadores de reconocida trayectoria en esta área de la microbiología de productos lácteos (3).

Existen actualmente unos pocos estudios en humanos (relativamente bien diseñados y conducidos) para evaluar el efecto producido por la ingesta de probióticos. También es

sabido, que los efectos reportados en dichos estudios son cepa dependientes, y aún existiendo leves diferencias entre las propiedades de las cepas, éstas influyen marcadamente en los efectos nutricionales y clínicos. Esto hace que sea de gran importancia el chequeo de las cepas, individualmente o incorporadas a los productos formulados, para lograr las propiedades funcionales deseadas (11).

A pesar de las continuas y numerosas promesas, existen ciertos principios claves en el desarrollo y el marketing de los productos probióticos que necesitan ser tratados, como los que se detallan a continuación:

- ✓ Identificación de biomarcadores fisiológicamente relevantes, los cuales pueden ser usados para evaluar parámetros de efectividad probiótica en humanos (cepas, dosis, crecimiento bacteriano, condiciones de producción etc.).
- ✓ Definición de principios activos.
- ✓ Parámetros de estabilidad para dichos principios activos.
- ✓ Resolución de la taxonomía de las especies probióticas y el desarrollo de métodos confiables y prácticos para evaluar la especiación.
- ✓ Aporte científico en la formulación de nuevos productos.
- ✓ Estudios humanos epidemiológicos convenientemente controlados para confirmar la eficacia probiótica.

Los principios microbiológicos y regulatorios involucrados en el surgimiento de productos probióticos al mercado son vastos y diversos. Futuros descubrimientos ayudarán a

clarificar cómo y de qué manera cepas específicas probióticas influyen la salud humana. Una mayor dedicación por parte de los organismos gubernamentales en conjunto con la industria y las instituciones académicas simplificarán y darán los principios regulatorios de denominación y del marketing, a nivel mundial, de los productos probióticos. El consumidor se beneficiará a partir de estos desarrollos con productos más eficaces y mejor categorizados (3).



Debido a la importancia cada vez mayor que se está atribuyendo a los **Alimentos Funcionales**, y especialmente a los **Probióticos**, en la dieta del ser humano y como consecuencia de la emergente necesidad de contar con nuevas cepas de microorganismos capaces de ofrecer adecuadas propiedades probióticas - tecnológicas, en el presente estudio se propuso:

- Aislar e identificar (fenotípica y genotípicamente) lactobacilos de origen intestinal humano para ser utilizados como potenciales probióticos.

En base a este propósito general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Actualización bibliográfica
- Selección y puesta a punto de métodos analíticos para la identificación y el estudio de propiedades probióticas y tecnológicas. Proponer un esquema analítico que permita una valoración integral de cepas para aplicaciones comerciales.
- Estudio de la resistencia de los aislamientos a las barreras biológicas del tracto gastrointestinal humano (secreción gástrica y bilis).
- Estudio del potencial probiótico de los aislamientos: deconjugación de ácidos biliares, actividad de  $\beta$ -galactosidasa (lactasa), hidrofobicidad, inhibición del desarrollo de bacterias patógenas (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytógenes* y *Staphylococcus aureus*).
- Caracterización tecnológica de los aislamientos: resistencia al pH, sobrevivencia en leche acidificada a 5°C, resistencia a compuestos de aroma y sales, interacciones entre los

aislamientos intestinales y bacterias lácticas de starters (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis*).

Los resultados obtenidos significarán un importante aporte de conocimientos sobre el tema, brindando nuevas cepas, caracterizadas probiótica y tecnológicamente.

### 3.1 Muestras.

Se programó la búsqueda de muestras de materia fecal provenientes de bebés, sobre la base de los siguientes requisitos:

- ✓ Nacimiento: parto natural
- ✓ Alimentación: lactancia materna
- ✓ Tiempo de vida: 30-90 días.

La finalidad de fijar estos requisitos, fue obtener la mayor recuperación posible de aislamientos de géneros de interés (*Lactobacillus* y eventualmente *Bifidobacterium*) (4,8).

Bajo este esquema de trabajo, se muestrearon ocho bebés de la ciudad de Santa Fe, para lo cual se entregó a las madres de éstos el siguiente material:

- 1 frasco colector estéril conteniendo aproximadamente 30 ml de medio de transporte Stuart estéril (ver Anexo) y rotulado:

Individuo N° - Fecha

- 1 cucharita descartable esterilizada con una solución de alcohol éflico 90°, colocada en una bolsa plástica para su uso y posterior descarte.

Se indicó a cada madre el procedimiento correcto de muestreo, entregándoles el siguiente instructivo:

1. Tomar el pañal del bebé con deposición espontánea de materia fecal.

2. Aflojar la tapa del frasco colector, retirar la cucharita descartable de la bolsa y tomar con ella dos cucharaditas de la materia fecal y depositarlas en el frasco colector.

3. Cerrar bien el frasco colector, dejar a temperatura ambiente hasta su envío a laboratorio (lo antes posible).

El frasco colector fue previamente tarado, luego de colocarle el medio de transporte fue nuevamente tarado y por diferencia de peso se calculó la masa en g de medio de transporte mediante el siguiente cálculo:

$$P_t - P_v = \mathbf{g \text{ de medio de transporte}}$$

Donde:

$P_t$ : peso en g del colector con medio de transporte Stuart

$P_v$ : peso en g del colector estéril vacío

A su arribo al laboratorio, el colector conteniendo el medio de transporte y la materia fecal fue nuevamente pesado. Por diferencia de peso se calcularon los gramos de materia fecal recolectados:

$$P_{mf} - P_t = \mathbf{g \text{ de materia fecal}}$$

Donde:

$P_{mf}$ : peso en g del colector con medio de transporte y materia fecal.

## **3.2 Aislamiento y conservación de bacterias intestinales.**

### **3.2.1 Aislamiento y purificación de cepas.**

Partiendo del peso de materia fecal y del medio de transporte, y por cálculo de su cociente (**g de materia fecal/g de medio de transporte**), se pudo estimar la dilución de la muestra en el medio a la que llamamos “**dilución madre**”. A partir de la misma, se hicieron sucesivas diluciones decimales con agua de peptona 0.1% (p/v) (ver Anexo) hasta alcanzar la dilución  $10^{-8}$ .

Para el aislamiento y purificación de bacterias, se empleó la técnica de siembra en superficie en medio sólido.

Debido a que la materia fecal es una muestra con un gran número y diversidad de microorganismos, se utilizó un medio recomendado por el Manual de Bergey (9), que permite la recuperación de las bacterias de interés (entre otras) respondiendo a sus complejos requerimientos nutricionales.

El medio de cultivo seleccionado para el aislamiento fue el agar MRS (ver Anexo).

Una vez esterilizado, fue distribuido en placas de Petri estériles, y éstas fueron llevadas a gabinete de aire estéril donde se dejaron solidificar y secar antes de su uso.

Posteriormente se rotularon las placas con los siguientes datos:

Individuo N° - Dilución - Fecha

Se procedió a la siembra en superficie y por duplicado, descargando 0.1 ml de las

diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  de las muestras sobre el medio agarizado. Trabajando entre mecheros, se espatuló con espátula de vidrio esterilizada a la llama, hasta lograr la absorción completa en el medio.

Las placas se incubaron a 37°C durante 48-72 h, una serie en aerobiosis y la otra, en anaerobiosis (sistema anaeróbico Gas Pack).

Transcurrido el período de incubación, se seleccionaron aquellas placas de la dilución que permitió aislar entre 10 y 20 colonias por placa. Se tomaron con ansa hojal esterilizada a la llama, de 4 a 8 colonias por placa (dependiendo del número total de colonias en la placa, de manera de que sea representativo), se les asignó un número a cada una de ellas para su identificación y se realizó la observación microscópica directa de las mismas (preparados de gota fresca) en inmersión, contraste de fases y aumento de 1000 x.

En función de las observaciones microscópicas, se dejaron para su posterior estudio aquellas colonias integradas por bacilos, y se descartaron las formadas por cocos, bacilos esporulados o cualquier otro tipo de microorganismo que no respondiera a la morfología de los géneros de interés.

Las colonias seleccionadas fueron suspendidas con palillos de madera estériles en tubos con 5 ml de caldo MRS estéril (ver Anexo).

Se le asignó una denominación a cada colonia estudiada y su posterior repique a caldo, con la letra “**F**” y un **número** siguiendo el orden cronológico de hallazgo.

El procedimiento fue el mismo tanto para las colonias desarrolladas en aerobiosis como anaerobiosis.

Se incubaron los repiques en caldo a 37 °C durante 24-48h respetando las mismas atmósferas de las que provenían.

La incubación en anaerobiosis se realizó con la finalidad de recuperar eventuales microorganismos anaerobios estrictos (*Bifidobacterium*).

Una vez desarrollados los caldos, se realizaron las observaciones microscópicas directas para constatar la presencia de bacilos regulares o irregulares (solos o acompañados de otro tipo de células), y se procedió a estriar en la superficie de placas de agar MRS. Se incubaron las placas sembradas a 37°C durante 48 h, en aerobiosis o anaerobiosis, según correspondiera.

Todo el procedimiento aplicado desde la siembra en placa y su paso a caldo fue repetido dos veces, con la finalidad de obtener aislamientos puros.

El esquema de aislamiento y purificación de cepas que se aplicó a las muestras se detalla en la Figura 2.

### **3.2.2 Conservación de los aislamientos.**

Los aislamientos fueron conservados por congelamiento a -20°C y a -80°C, utilizando como medio crioprotector caldo MRS adicionado de glicerol (15% v/v) (ver Anexo), el cual permite mantener fluidas las membranas celulares bajo dichas condiciones.

En función del número total de aislamientos obtenidos, se preparó un volumen adecuado de caldo MRS-glicerol, se esterilizó y se fraccionó (1 ml) en crioviales estériles.

Partiendo del cultivo de la cepa en caldo MRS (over night), se inoculó con 100 µl de éste, 1 ml de medio crioprotector, por duplicado y para ambas temperaturas de congelamiento, rotulando en cada criovial la denominación de la cepa, la fecha y la temperatura a la cual fue conservada.

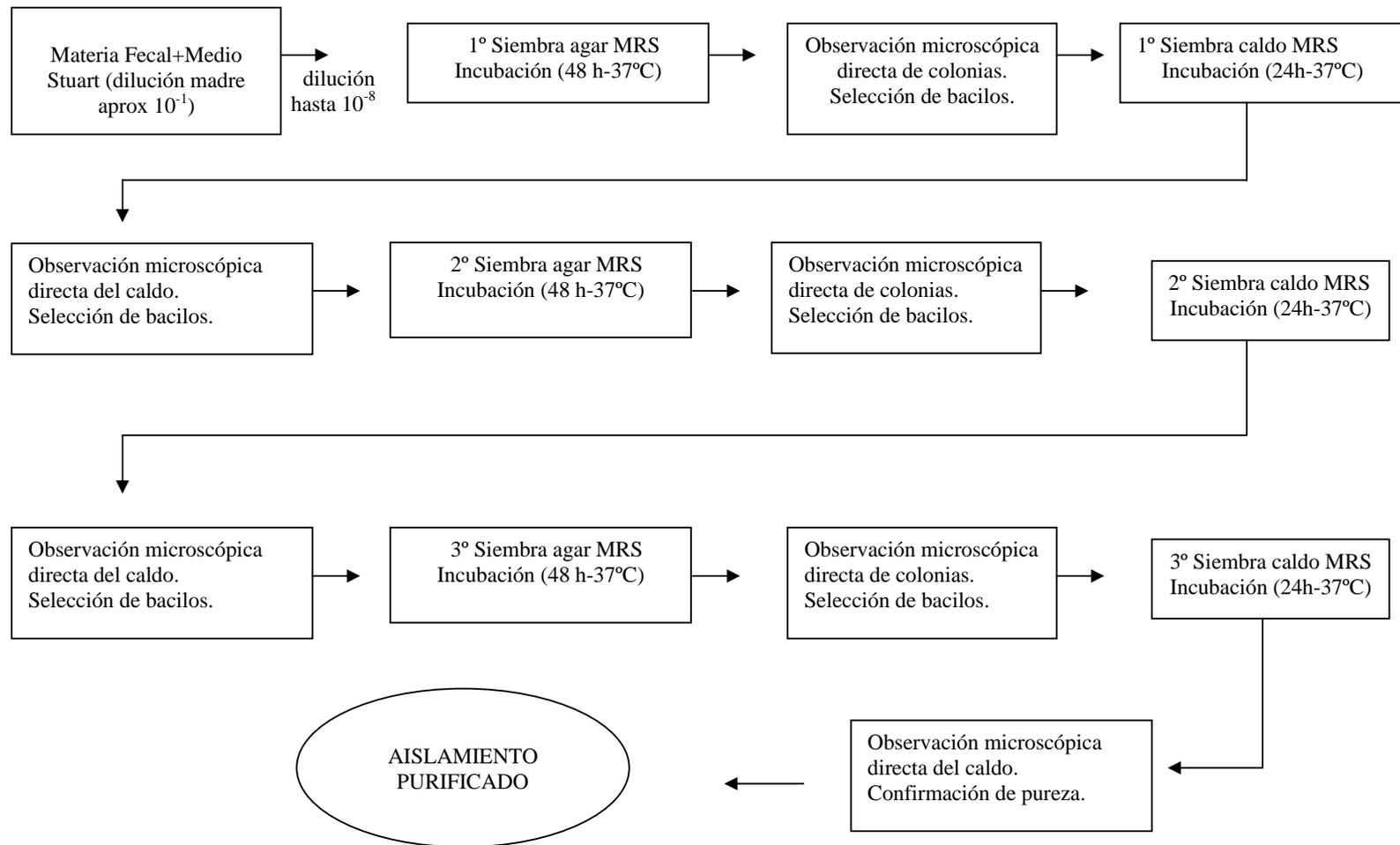


Fig. 2- Esquema utilizado para el aislamiento y purificación de bacilos intestinales a partir de muestras de materia fecal de bebés.

De esta manera, las bacterias intestinales aisladas y purificadas en el presente trabajo quedaron integradas al cepario de microorganismos existente en el PROLAIN.

### **3.3 Identificación de las cepas.**

#### **3.3.1 Reactivación y mantenimiento de las cepas para su utilización.**

Uno de los duplicados de cada cepa conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  (cepario PROLAIN) fue reactivada adicionando la totalidad del contenido del criovial a 5 ml de caldo MRS estéril e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h en aerobiosis. A partir de este momento, se manipularon las cepas siempre bajo condiciones de aerobiosis debido a que no se detectaron bacilos anaerobios estrictos.

Una vez desarrollado el caldo, se inoculó con éste otros 5 ml de caldo MRS estéril y se incubó respetando las mismas condiciones antes mencionadas.

Al realizar estos dos repiques sucesivos, se obtuvo un cultivo en fase de crecimiento exponencial (over night) apropiado para proceder con los distintos estudios que se plantearon para su identificación, resistencia a barreras biológicas, capacidad probiótica y caracterización tecnológica.

### 3.3.2 Características fenotípicas.

**Movilidad, morfología y agrupación celular:** a partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se realizó la observación microscópica directa con inmersión, usando contraste de fases y aumento 1000 x, registrando los siguientes datos: presencia o ausencia de movilidad, morfología celular (bacilos o cocobacilos), tamaño celular (cortos, medianos o largos) y agrupación celular (sueltos, de a pares, en cadenas largas o cortas, en cadenas lineales o curvadas).

**Coloración de Gram:** a partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se tomaron varias ansadas (con ansa hojal previamente esterilizada) y se distribuyó el material sobre un porta objetos bien limpio para hacer un extendido celular. Se dejó secar al aire y se fijó pasándolo tres veces por la llama. Luego se realizó la tinción de Gram según el instructivo que se adjunta en el kit comercial (Britania).

**Catalasa:** para determinar la presencia de la enzima catalasa, se colocó una gota del cultivo líquido de la cepa sobre un porta objetos bien limpio, se adicionó una gota de agua oxigenada al 3% (Anedra) y se cubrió con un porta objetos. Se observó macroscópicamente el desprendimiento de burbujas como consecuencia de la reacción química catalizada por la catalasa:



Se utilizó como control positivo de catalasa, un cultivo de *Escherichia coli* V517 (cepario del PROLAIN).

**Crecimiento en leche:** para evaluar la capacidad de desarrollo en leche, se partió de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night) y se inocularon al 2% (v/v) 10 ml de leche descremada reconstituida estéril al 10%(p/v)(ver Anexo).

Se incubaron los tubos de leche inoculados a 37°C en aerobiosis. Se realizaron observaciones a las 24, 48 h y hasta 14 días de incubación. La capacidad de desarrollo en leche se manifestó como coagulación de la misma bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

### **3.3.3 Quimismo fermentativo: Homofermentación/Heterofermentación.**

Se preparó y esterilizó el medio semisólido de Gibson (18) a partir de sus componentes individuales (ver Anexo). El medio se conservó a temperatura de refrigeración hasta su uso.

Para su utilización los tubos se fundieron a baño maría y se mantuvieron a 45°C hasta su inoculación. A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se sembraron (0.5 ml) 10 ml de medio Gibson. Como control positivo de heterofermentación se utilizó un cultivo de *Escherichia coli* V517.

Los tubos inoculados se enfriaron rápidamente dejándolos en un baño de agua-hielo hasta que solidificara el medio. Se incubaron a 37°C por un período máximo de 14 días.

Interpretación de los resultados:

Se realizaron observaciones cada 24 h interpretándose los resultados de la siguiente manera:

**Metabolismo Heterofermentante:** la producción de CO<sub>2</sub> (a partir de la glucosa) por la bacteria produce “rajaduras” o rotura del medio.

**Metabolismo Homofermentante:** no se producen cambios en el medio.

### **3.3.4 Perfil de Fermentación de Carbohidratos.**

Se empleó el medio líquido API 50 CHL preparándolo a partir de sus componentes individuales (ver Anexo). Se fraccionó en quince erlenmeyers colocando 90 ml en cada uno de ellos y luego se esterilizó (15 min. a 121°C).

Paralelamente, se prepararon soluciones al 10%(p/v) de los siguientes carbohidratos: Arabinosa, Celobiosa, Glucosa, Gluconato, Maltosa, Manitol, Manosa, Melezitosa, Melibiosa, Rafinosa, Ribosa, Trehalosa, Almidón y Xilosa. Estas soluciones se esterizaron por filtración (filtros Millipore de 0.45 µm).

Se adicionó a cada fracción de 90 ml de medio API, 10 ml de la solución de azúcar de manera de obtener una concentración de azúcar en el medio del 1%(p/v), rotulando cada erlenmeyer con el nombre del azúcar que contenía. Luego se distribuyeron las quince soluciones de API-azúcar resultantes en tubos de hemólisis estériles, colocando 3 ml en cada uno de ellos, rotulándolos según el azúcar correspondiente.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se inoculó al 2% una batería de tubos conteniendo los quince azúcares a ensayar. A todos los tubos se les adicionó

una pequeña capa de vaselina estéril para provocar un ambiente microaerofílico en el medio líquido. Se incubó a 37°C durante 72 h en aerobiosis. En estas condiciones, si no se lleva a cabo la fermentación del azúcar por parte de la cepa, no se produce acidificación del medio y por tanto éste conserva su color violeta típico. Como consecuencia de la fermentación del azúcar se producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo cual lleva al descenso del pH con lo que el púrpura de bromocresol vira de violeta a amarillo pasando por diferentes tonos, según el grado de acidificación del medio.

Para informar el resultado del Perfil de Fermentación de Carbohidratos se fijaron los siguientes criterios:

<b>Color</b>		<b>Fermentación</b>	<b>Resultados</b>
Violeta a las 72 h		Ausencia	-
Verde-amarillento a las 72 h		Fermentación débil	+/-
Amarillo a las 48h		Fermentación moderada	+
Amarillo a las 24 h		Fermentación intensa	++

La Glucosa se empleó como control positivo de fermentación (++)

Los resultados obtenidos, se compararon con los correspondientes patrones de fermentación según el Manual de Bergey (8<sup>va</sup> edición) para las distintas especies de lactobacilos y bifidobacterias y con un patrón simplificado realizado en base al mismo (ver Anexo Tabla 22 y 23). De esta manera se asignó a cada cepa género y especie.

### **3.3.5 Desarrollo en medios selectivos (Método Ecométrico).**

Para confirmar la identificación previa, se aplicó el Método Ecométrico (19) evaluando la capacidad de desarrollo de las cepas en tres medios de cultivo selectivos, previamente testeados para lactobacilos intestinales (17). Es un método semicuantitativo que evalúa la selectividad y productividad de medios de cultivo sólidos.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar MRS (medio no selectivo) el cual se tomó como control de crecimiento ya que todos los lactobacilos crecen en él; agar MRS-Bilis (medio selectivo) (ver Anexo) donde desarrollan los del grupo *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, y agar MRS-LP (medio selectivo) (ver Anexo) donde desarrolla *Lactobacillus casei* pero se inhibe *Lactobacillus acidophilus*.

Una vez esterilizados los tres medios de cultivo, se distribuyeron en placas de Petri estériles, se dejaron solidificar y se secaron en gabinete de aire estéril durante 30 min. Luego se marcó sobre la base de cada placa cuatro cuadrantes enumerándolos de 1a 4, rotulando el nombre del medio de cultivo.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se efectuó con ansa

ojal calibrada estéril cinco estrías en cada uno de los cuadrantes (siguiendo el orden numérico de los mismos) y una estría central final, sin recargar ni flamear el ansa entre estría y estría. Se procedió con la misma operatoria para los tres medios de cultivo empleados. Se incubaron las placas a 37°C durante 48 a 72h. Para favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas se incubaron en anaerobiosis por combustión.

Al cabo de dicha incubación, se realizó la observación del desarrollo de las estrías y se calculó el índice de crecimiento para cada uno de ellos.

Cálculo del índice de crecimiento absoluto (ICA):

A cada estría desarrollada se le asignó un valor de 0.2 (precisión del método). Este valor se multiplica por el número de estrías en las que se observó crecimiento; por ejemplo si presentan desarrollo completo las cinco estrías del mismo cuadrante, el valor es 1. Cuando se presenta desarrollo completo en las cinco estrías y en la central, el ICA es igual a 5.

Así, el ICA será igual a  $n$  (número del cuadrante) cuando todas las estrías del cuadrante  $n$  y de los cuadrantes anteriores muestran un crecimiento completo, mientras virtualmente no se observa desarrollo en ninguna de las estrías del cuadrante  $n+1$ .

Cuando aproximadamente la mitad de las estrías del cuadrante  $n$  muestran desarrollo, mientras virtualmente no hay desarrollo en el cuadrante  $n+1$  y en el cuadrante  $n-1$  se obtiene un desarrollo completo o casi completo, el ICA es igual a  $n-0.5$ .

Interpretación de resultados:

Cuando un microorganismo no desarrolla en un medio de cultivo (medio selectivo) el ICA en el medio debe ser  $\leq 2$  y cuando el microorganismo desarrolla en el medio de cultivo

(medio no selectivo) el ICA debe ser  $\geq 2.5$ . Los resultados se expresan como + o - estableciendo el siguiente criterio de equivalencia:

- ✓ cuando el ICA es  $\geq 2.5$  se considera +
- ✓ cuando el ICA es  $\leq 2.0$  se considera -

### **3.4 Diversidad genética de los lactobacilos intestinales (perfiles RAPD).**

Para estudiar el polimorfismo genético de los aislamientos, se estudiaron 19 aislamientos de lactobacilos intestinales por la técnica RAPD-PCR en la Unité de Recherches Laitières et Genétique Appliquée del INRA Jouy en Josas (Francia), según el siguiente esquema:

#### **Extracción del ADN total:**

Se centrifugó un cultivo en fase estacionaria de la cepa y el pellet de células se resuspendió en buffer TS (Tris-CIH 50 mM pH 8, sacarosa 0.25M), conteniendo lisozima (20mg/ml) para lisar la pared celular. Se incubó 1 h en baño termostático a 37°C y se adicionó SDS 0.1% (v/v) a partir de una solución al 20%, agitando la mezcla. Se hicieron extracciones con fenol-cloroformo y cloroformo-álcool isoamílico recuperando el sobrenadante de cada extracción. El ADN se precipitó con isopropanol a -20°C durante 20- 30 min. y el precipitado se lavó con etanol 70% y se separó por centrifugación. El ADN se secó y

resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1 mM) conteniendo RNAsa (2ug/ml) y se incubó a 37°C durante 10 a 15 min. para eliminar restos de RNA.

La preparación de ADN se examinó sobre geles de agarosa 0.7% a 0.8% en buffer TAE (Tris-acetato 0.04 M, pH 8 y EDTA 1mM) conteniendo bromuro de etidio. Los geles fueron observados y fotografiados en un transiluminador de luz UV para controlar su calidad y concentración (20,21).

### **RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA Fingerprinting):**

De 20 a 100 µg de ADN se suspendieron en 100 µl de buffer Tris HCl 10 mM (pH 9 a 25°C), conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.5 µM del primer (Bioprobe), 2.5 unidades Taq Polimerasa (Ampli Taq, Apligène) y 200 µM de cada uno de los nucleótidos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Boehringer Mannheim). Se usaron secuencialmente los siguientes primers: B06 (5'-TGCTCTGCCC-3'), B08 (5'-GTGACGCAG-3') y B10 (5'-CTGCTGGGAC-3') (Eurogentec, France) en tres amplificaciones PCR diferentes. Dichas amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer, modelo 9600, siguiendo 30 ciclos de amplificación (94°C-1 min.;36°C- 2 min. y 72°C-2 min.). Después de la amplificación, 20 µl del producto se sometieron a electroforesis en gel de agarosa SEAKEM GTG 1%. Los fragmentos amplificados fueron detectados después de la coloración de los geles en una solución de bromuro de etidio. En cada gel se incluyó un marker de tamaño: 123bp DNA-Ladder (Gibco-BRL). Los geles se fotografiaron en un transiluminador de luz UV y los negativos se procesaron con un "scanner". Las imágenes fueron tratadas utilizando el programa Gel Compare (Applied Maths, Belgique) y los perfiles de las cepas fueron

reagrupados a través del método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) originando el dendrograma correspondiente (20).

### **3.5 Resistencia a las Barreras Biológicas.**

#### **3.5.1 Resistencia a la secreción gástrica.**

Para determinar la tolerancia a la exposición de una simulación de jugos gástricos, se empleó el método de Charteris y col. (13).

Fundamento:

Al exponer las cepas aisladas a una solución gástrica constituida de ClH/NaCl – pepsina a pH 3 a una temperatura de 37°C, se pretende “simular” el arribo de estos microorganismos al estómago luego de la ingesta y su exposición con los jugos gástricos secretados en el proceso de la digestión. Se busca de esta manera, evaluar durante y al cabo de tres horas de tratamiento como afecta esta solución la viabilidad de los bacilos y así estimar qué proporción de ellos arribarán viables al intestino.

Se preparó una solución “gástrica” a partir de una solución de pepsina 3g% (p/v) y de una solución de NaCl 0.5g% (p/v) en agua acidulada con ácido HCl a pH 3. Por un lado se esterilizó la solución HCl/NaCl (pH3) y, por otro lado, se preparó la solución de pepsina 3g% (p/v) y se ajustó el pH a 3. Ésta última se esterilizó por filtración.

En un erlenmeyer de adecuada capacidad se mezclaron nueve partes de la solución HCl/NaCl y una parte de la solución de pepsina. De esta manera quedó preparada la solución gástrica, que se conservó en refrigeración hasta su uso.

Se preparó buffer fosfato de potasio pH 6.5 (ver Anexo), el cual una vez esterilizado también se conservó en refrigeración hasta su posterior uso.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), previa homogeneización en vortex, se tomó 1 ml (procediendo por duplicado para cada cepa) y se colocó, trabajando bajo condiciones de esterilidad, en tubos eppendorf estériles rotulados. Se centrifugaron los tubos a 10.000 rpm durante 3 min a 5°C. Se resuspendieron y lavaron los “pellets” celulares obtenidos dos veces con el buffer estéril.

Finalmente se obtuvieron dos “pellets” celulares por cepa (duplicados): a uno de ellos se le adicionó 1 ml de buffer, y se resuspendió y homogeneizó en vortex. Al otro, se le adicionó 1 ml de la solución gástrica procediendo igual que para la suspensión en buffer. Luego, se adicionaron 9 ml de buffer y 9 ml de solución gástrica, respectivamente.

Quedaron así, establecidas las diluciones madres (o iniciales) de las cepas en buffer y solución gástrica. A partir de las mismas, se realizaron diluciones decimales empleando el mismo buffer.

Ambos tubos por cepa, rotulados con la denominación de la misma y **SG** o **C** (**SG**, solución gástrica y **C**, control en buffer) se incubaron en baño de agua termostatzado a 37°C durante 3 h.

Se preparó, esterilizó y fraccionó en placas de Petri estériles agar Plate Count (PCA) (ver Anexo) dejándolas solidificar y secar aproximadamente durante 1 h bajo gabinete de aire estéril.

Se realizaron siembras en superficie, espatulando 0.1 ml de las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  para los controles (C) y para las cepas tratadas con la solución gástrica (SG) se fueron probando varias diluciones, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , ya que no se podía estimar la resistencia de las cepas al “stress” provocado por el tratamiento.

Se sembró a tiempo cero y al cabo de las 3h, tanto para las cepas C como para SG. Se incubaron las placas a 37°C durante 72h en anaerobiosis por combustión.

Interpretación de resultados:

Comparando los valores de recuento de células viables (SG) al cabo de tres horas de tratamiento con los valores iniciales (SG  $t_0$ ) y calculando la diferencia entre ambos, fue obtenida la pérdida de viabilidad de las bacterias, la cual es inversamente proporcional a la resistencia de las mismas a la secreción gástrica. Los controles se realizaron con la finalidad de descartar otra causa de muerte celular que no fuera por la acidez gástrica. Los resultados se expresaron como la reducción de ordenes logarítmicos de los recuentos celulares (SG) para cada cepa con respecto a su control.

### **3.5.2 Cinética de muerte celular de los aislamientos en solución gástrica.**

Aplicando la metodología antes descripta, se determinó la cinética de muerte celular durante el tratamiento de las cepas con la solución gástrica.

Se seleccionaron para estos experimentos, las cepas F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub>, F<sub>37'a</sub>, F<sub>64</sub> y F<sub>83</sub>, en

función de los resultados obtenidos en 3.5.1.

Paralelamente se emplearon cepas de origen comercial de *Lactobacillus acidophilus* (La5) y *Lactobacillus casei* (A13) (pertenecientes al cepario del PROLAIN). Para estas cepas, se realizaron los recuentos de células viables a los siguientes tiempos de tratamiento:

- ✓ T<sub>0</sub> (0 min. de tratamiento)
- ✓ T<sub>0.5</sub> (30 min.)
- ✓ T<sub>1</sub> (1h)
- ✓ T<sub>2</sub> (2h)
- ✓ T<sub>3</sub> (3h)

Interpretación de resultados:

Con los resultados obtenidos de los recuentos de células viables a los distintos tiempos de tratamiento, se graficaron las cinéticas de muerte celular (log UFC/ml vs T) para cada una de las cepas ensayadas. De esta manera se pudo estimar la velocidad con que se produce la muerte celular al exponerse al medio ácido simulado del estómago.

### **3.5.3 Resistencia a la bilis.**

Para este tipo de ensayo se empleó el Ensayo de Difusión en Agar (EDA) (22).

**Fundamento:**

El EDA permite detectar la presencia de agentes inhibidores del crecimiento de un microorganismo que se encuentra inmerso en una pátina agarizada. En este caso se evaluó el efecto de distintas concentraciones de bilis (contempladas dentro del rango normal fisiológico en el ser humano) sobre el crecimiento de los lactobacilos intestinales. De esta manera se pretendió simular el efecto producido por la secreción de bilis hacia el duodeno (que ocurre seguidamente a la llegada del bolo alimenticio a esta porción del intestino) y evaluar la viabilidad de estos microorganismos luego de su paso estresante por el estómago.

Se preparó agar MRS, se fraccionó en porciones de 20 ml, se esterilizó y se mantuvo el medio de cultivo a 45°C hasta su posterior uso.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se inoculó con 0.2 ml del mismo el agar MRS acondicionado, se homogeneizó rápidamente la mezcla en vortex y se volcó en una placa de Petri estéril, previamente rotulada. Una vez solidificado el medio, se llevaron las placas a gabinete de aire estéril y se dejó secar durante 20 min. Procediendo de esta manera, luego de la incubación desarrolla una “pátina” de crecimiento.

Una vez que se secó bien el medio, se realizaron en éste hoyos (10 mm de diámetro) utilizando un sacabocados estéril. Sobre el fondo de cada placa se rotuló la denominación de la cepa testeada y en cada hoyo, la concentración de bilis a ensayar.

A partir de soluciones de bilis estériles al 0.15%, 0.3%, 0.6% y 1.0%, se colocaron 180 µl de cada una de ellas en los correspondientes hoyos. Se dejaron unos minutos las placas en el gabinete de aire estéril para que la solución de bilis difundiera en el medio y así evitar derrames. Luego se taparon las placas y se incubaron a 37°C durante 24h en aerobiosis.

Interpretación de resultados:

Una vez finalizado el período de incubación, se observó presencia o ausencia de halos de inhibición del crecimiento en el medio agarizado y en el caso de que los hubiere, se midieron sus diámetros utilizando un calibre adecuado a tal fin.

Se clasificaron los halos en:

- ✓ Halos de inhibición total: zona totalmente translúcida en torno al hoyo (ausencia de crecimiento).
- ✓ Halos de inhibición parcial: zona con una turbidez en torno al hoyo menos intensa que la del resto de la pátina (débil crecimiento).

### **3.6 Caracterización probiótica de los aislamientos.**

#### **3.6.1 Deconjugación de ácidos biliares.**

La capacidad de los lactobacilos de deconjugar sales biliares fue determinada de acuerdo al método de Taranto y col. (23).

Fundamento:

Al hacer desarrollar los lactobacilos en agar MRS conteniendo un ácido biliar que se encuentra soluble como sal sódica de conjugados de glicina o taurina, se producen ácidos orgánicos como consecuencia de la fermentación de carbohidratos, los cuales descienden el

pH del medio. Paralelamente, si los lactobacilos poseen la enzima hidrolasa de sales biliares, ésta deconjuga el ácido, el cual posee un pKa distinto y al encontrar un medio acidificado con un pH que se aproxima al de su pKa se vuelve insoluble y precipita en el medio. La actividad de deconjugación de ácidos biliares puede manifestarse de dos formas: como zonas blancas, opacas, de precipitación en torno a las colonias del lactobacilo, o bien produciendo cambios en el aspecto de las colonias (blancas y más opacas) sin halos de precipitación a su alrededor. Esto último, sólo se observa con determinados ácidos biliares.

Se prepararon los siguientes medios de cultivo (ver Anexo):

Agar MRS-taurocolato de sodio (**MRS-TC**)

Agar MRS-taurodeoxicolato de sodio (**MRS-TDC**)

Agar MRS-glicolato de sodio (**MRS-GC**)

Agar MRS-glicodeoxicolato de sodio (**MRS-GDC**)

Los medios fueron formulados de manera tal que los ácidos biliares quedaron en una concentración final de 0.5%.

Una vez esterilizados, se distribuyeron en cajas de Petri estériles dejándolas solidificar y secar bajo gabinete de aire estéril. Hasta su posterior uso, las placas fueron conservadas en anaerobiosis y refrigeración evitando de esta manera la oxidación de los ácidos biliares por contacto con el oxígeno del aire.

Al momento de utilizarse, se realizaron radialmente en las placas 6 divisiones y se rotuló cada una de ellas con la identificación de la cepa a inocular, además del ácido biliar contenido en el medio.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se estriaron los medios adicionados de ácido biliar. Se estrió desde el borde de la placa hacia el centro en cada división marcada (en cada división se inoculó una cepa distinta), descargando la mayor parte del inóculo al principio y abriendo la estría hacia el centro y de manera de evitar superposición de zonas de precipitación del ácido biliar en el medio entre una estría y la adyacente. Se procedió de la misma manera para los restantes cuatro medios de cultivo.

Finalmente las placas fueron incubadas a 37°C durante 48h en anaerobiosis.

Interpretación de resultados:

La actividad de deconjugación de sales biliares, adjudicada a la enzima hidrolasa de ácidos biliares conjugados provoca, como ya se dijo, la precipitación en el medio de los ácidos biliares deconjugados que se observa como zonas blancas de distinta intensidad en torno a las colonias formadas. Además de observar precipitación del ácido biliar en el medio, también se tuvo en cuenta si dicho ácido afectaba de alguna manera el crecimiento de la cepa.

### **3.6.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa).**

Para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las células íntegras de los lactobacilos se empleó el método de Miller (24) con algunas modificaciones, que se detallan a continuación.

**Fundamento:**

Si se emplea como medio de cultivo un caldo donde la lactosa es el único sustrato limitante de carbono y energía para el crecimiento celular y para la producción de ácido, la enzima  $\beta$ -galactosidasa debe estar presente para asegurar el crecimiento del microorganismo. Esta enzima hidroliza la lactosa en dos monosacáridos: glucosa y galactosa. El método de Miller se basa en una técnica colorimétrica que emplea el ONPG (orto-nitro fenil galactopiranosido) como único sustrato para la enzima, la cual lo hidroliza y libera ONP (orto-nitro fenilo) de color amarillo, que se mide a través de la absorbancia (A) a 420 nm. Como la reacción enzimática es estequiométricamente proporcional sustrato a producto, la cantidad de ONP liberado nos permite calcular la cantidad de enzima presente en el medio de reacción (en este caso, de las células).

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se trasvasaron 5 ml del mismo a tubos de centrifuga estériles y rotulados convenientemente, que se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió y lavó dos veces con buffer fosfato de potasio estéril. Finalmente, se obtuvo una suspensión de la cepa en buffer (volumen final de 5 ml). A partir del mismo, se hizo un inóculo al 2% en tubos conteniendo 3 ml de caldo MRS base-lactosa (ver Anexo). Se dejó un caldo sin inocular para ser utilizado posteriormente como blanco de lectura.

Todos los tubos inoculados y rotulados con la cepa correspondiente, fueron incubados a 37°C durante 24h en aerobiosis.

Posteriormente, se midió la densidad óptica (D.O.) de los cultivos crecidos a 550 nm frente a blanco de medio (valor A), utilizando para tal fin un Espectrofotómetro UV-Visible (Metrolab 1700).

Se obtuvo un extracto celular para cada cepa, colocando 1ml de cada cultivo crecido en caldo lactosado, en tubos eppendorf plásticos y centrifugándolos a 12.000 rpm durante 2 min. a 5°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de células se resuspendió y lavó dos veces con buffer fosfato de potasio estéril.

Se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer y se permeabilizaron las membranas celulares mediante el agregado de 50 µl de una mezcla de tolueno:acetona (ver Anexo).

Inmediatamente, se agitó a máxima velocidad en vortex durante 7 min. a temperatura ambiente para facilitar la acción de la mezcla previamente adicionada, la cual produce “poros” en las membranas, sin llegar a lisarlas.

La reacción de color que pone de manifiesto la presencia de la enzima lactasa se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron en tubos de hemólisis bien limpios y rotulados con la identificación de la cepa:

→ 100 µl del extracto celular permeabilizado + 900 µl de buffer fosfato de potasio pH 6.5 (valor B)

→ 200 µl de una solución de ONPG (ver Anexo)

La mezcla fue inmediatamente incubada a 37°C en baño de agua termostaticado, hasta desarrollo de color amarillo (en nuestro caso se estandarizó dicho tiempo en 15 min., valor C).

Al cabo de dicho tiempo, se detuvo la reacción de color mediante el agregado de 0.5ml de la solución stop de NaCO<sub>3</sub> (106 g/l). Se homogeneizó y se dejó en baño de agua-hielo hasta su lectura de A.

Paralelamente, se procesó el blanco de lectura de la misma manera que las muestras, con la única diferencia de que no se adicionaron los 200 µl de ONPG.

Se midieron los valores de A y D.O. para cada una de las muestras correspondientes a las cepas ensayadas frente a blanco a 420 nm (valor D) y a 550 nm (valor E).

Se expresó la actividad de **β-galactosidasa** en Unidades Miller (**UM**) mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (UM)} = \{ [D - (1.75 \times E)] / (C \times B \times A) \} \times 1000$$

Donde:

**A** es la D.O. del cultivo crecido inicial a 550 nm.

**B** es el volumen inicial del cultivo en la mezcla de reacción.

**C** es el tiempo de reacción en minutos.

**D** es la A correspondiente a la cantidad de ONP liberado a 420 nm.

**E** es la D.O. correspondiente a los desechos celulares, que dan fondo a 550 nm.

Interpretación de resultados:

A partir de los valores obtenidos de A a 420 nm y D.O. a 550 nm y su aplicación en la fórmula antes descrita, se pudo obtener la actividad enzimática total de β-galactosidasa expresada en UM para la totalidad de los bacilos intestinales. De esta manera, la determinación de la actividad enzimática incluyó tanto a la enzima presente en el citoplasma

como así también aquella asociada a la pared celular. Además, este ensayo sólo puede revelar la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa pero no la  $P\beta$ -galactosidasa, la cual hidroliza la lactosa 6-P (fosforilada por el sistema PEP-PTS asociado a la membrana celular) ya que el sustrato de reacción no es en este caso el adecuado para la misma.

Lo expuesto anteriormente es importante para comprender que pueden existir cepas de lactobacilos que pueden tener una u otra enzima y que se podría establecer una correlación entre los lactobacilos que desarrollan y coagulan la leche cuando se los hace crecer en ésta, independientemente de que posean o no la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

### **3.6.3 Hidrofobicidad.**

Se empleó la metodología descrita por Kociubinski y col. (6) con ciertas modificaciones, que se detallan a continuación.

Fundamento:

Se busca cuantificar la tendencia que poseen los bacilos intestinales de pasar de una fase polar (buffer fosfato de potasio) a otra hidrofóbica (n-hexadecano u otro hidrocarburo) en función de la hidrofobicidad superficial, asegurando un íntimo contacto entre ambas. Cuanto mayor sea dicha hidrofobicidad, mayor cantidad de células pasarán a la fase orgánica.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), y trabajando en gabinete de aire estéril, se trasvasaron los 5 ml de caldo a un tubo de centrífuga estéril y se

centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente.

Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido y lavado dos veces con buffer estéril. La suspensión celular así obtenida se diluyó con la misma solución tampón hasta alcanzar una D.O. de 1 leída a 560 nm (D.O. inicial). A cada una de estas suspensiones celulares, correspondientes a las distintas cepas, se les adicionó 600 µl de n-hexadecano (Merck). Seguidamente, se agitó vigorosamente en vortex durante 4 min. para asegurar un íntimo contacto entre ambas fases y así favorecer el pasaje de células de una a otra. Posteriormente, la mezcla se trasvasó a pequeños vasos de precipitado de boca ancha de manera de facilitar la separación de las fases. Se dejó reposar durante 2h a temperatura ambiente y luego con agujas y jeringas se tomó un volumen mínimo de 2 ml de la fase polar (solución de buffer fosfato), realizándose 3 lecturas de D.O. a 560 nm (para promediar sus valores) (D.O. final).

El porcentaje de Hidrofobicidad se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = [(\text{DO final} - \text{DO inicial}) / \text{DO inicial}] \times 100$$

Se confirmó el pasaje de los bacilos a la fase orgánica mediante la observación microscópica de un preparado de gota fresca con el agregado del colorante orgánico Negro Sudán para identificar mejor la fase no polar.

Interpretación de resultados:

Esta determinación permitió “predecir” la capacidad de los bacilos estudiados para adherirse a las microvellosidades que forman histológicamente la mucosa intestinal, la cual es naturalmente hidrofóbica.

Debido a los escasos antecedentes bibliográficos en el tema, no se hallaron valores de referencia de hidrofobicidad para *Lactobacillus* que permitieran clasificar las cepas en función de este parámetro.

#### **3.6.4 Inhibición de bacterias patógenas.**

Se empleó el Ensayo de Difusión en Agar (EDA), anteriormente descrito.

Fundamento:

El fundamento del EDA fue previamente descrito para determinar la resistencia de los lactobacilos a las secreciones biliares (ver 3.5.3). Pero en este caso, se buscó determinar la presencia de agentes antimicrobianos en el sobrenadante libre de células (SLC) de los lactobacilos que manifiesten algún efecto sobre el crecimiento de las bacterias patógenas más relevantes como causantes de infecciones intestinales.

Las “pátinas”, en este caso, se realizaron con las bacterias patógenas (una por pátina), todas ellas provenientes del cepario del PROLAIN, y fueron las siguientes:

- ✓ *Staphylococcus aureus* 76, coag. (+)
- ✓ *Salmonella* OMS-Ca
- ✓ *Listeria monocytógenes* ATCC 15313
- ✓ *Escherichia coli* V517

Las cepas se obtuvieron de stocks congelados ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), del cepario antes mencionado. Por tanto, para su utilización fueron reactivadas en diferentes medios de cultivo ya que no todas tienen los mismos requerimientos nutricionales.

La totalidad del contenido del criovial fue adicionado a 5 ml de caldo Triptona Soja (TS) estéril (ver Anexo) para la reactivación de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella*. En el caso de *Listeria monocytógenes*, por ser una bacteria nutricionalmente más exigente, se emplearon 5 ml de caldo BHI estéril (ver Anexo).

Una vez inoculados, los caldos fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h a 48h en aerobiosis hasta observar un desarrollo evidente.

Para encontrar la proporción adecuada de volúmenes a mezclar para realizar las pátinas, se ensayaron distintas alícuotas del cultivo over-nigth de las bacterias patógenas, decidiéndose adoptar el siguiente procedimiento:

<i>Escherichia coli</i>		0.2 ml de cultivo (caldo TS) + 20 ml de agar Nutritivo \ <b>PÁTINA</b> (ver Anexo)
<i>Salmonella</i>		
<i>Satphylococcus aureus</i>		
<i>Listeria monocytógenes</i> :		0.2 ml de cultivo (caldo BHI) + 20 ml de agar BHI \ <b>PATINA</b> (ver Anexo)

Posteriormente, se procedió de la misma manera como previamente fue descrito para el EDA en cuanto a manipulación, secado, realización de hoyos etc.

En este caso, como se quiso evaluar el poder inhibitorio adjudicado a algún agente o sustancia activa presente en el SLC de cultivos de los bacilos intestinales, en los hoyos se colocaron dichos sobrenadantes.

Para la obtención de los sobrenadantes, se partió de cultivos de las cepas en 5 ml de caldo MRS (over night) que fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 3 min. a 5°C. De esta manera, los sobrenadantes obtenidos se distribuyeron en tubos eppendorf plásticos estériles (de capacidad volumétrica de 2 ml aproximadamente), previamente rotulados con la identificación de las cepas.

Se obtuvieron unos 2 ml de SLC por cada cepa, que se conservaron congelados a -20°C hasta su uso. Por cada pátina se practicaron siete hoyos solamente, para evitar superposición de zonas de inhibición adyacentes en caso de que éstas fueran de considerable tamaño.

Cada placa se rotuló sobre su fondo con la identificación de la bacteria patógena y en cada hoyo, la del lactobacilo del cual se obtuvo el SLC. Se dejaron descongelar los SLC, a temperatura ambiente, y luego se tomaron 180µl, trabajando siempre bajo gabinete de aire estéril, que se colocaron en el hoyo correspondiente a la cepa, en las placas sembradas con las cuatro bacterias patógenas empleadas.

Se taparon las placas y después de dejarlas unos minutos en reposo para permitir que el SLC difundiera en el medio agarizado, se llevaron a incubar a 37°C durante 24h a 48h en aerobiosis.

Interpretación de resultados:

Finalizado el período de incubación, se observó presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento en la pátina. Se midieron los diámetros de los halos formados y éstos se clasificaron de la siguiente manera:

- ✓ Halos de inhibición total: zona totalmente translúcida en torno al hoyo (ausencia de crecimiento).
- ✓ Halos de inhibición parcial: zona con una turbidez en torno al hoyo menos intensa que la del resto de la pátina (débil crecimiento).

### **3.7 Caracterización tecnológica de los aislamientos.**

#### **3.7.1 Resistencia al pH.**

Para este estudio, se empleó el método cualitativo de Desarrollo en Medio Líquido (DML).

Fundamento:

Aplicando el método de DML se pretende determinar si el pH del medio es un agente inhibidor del desarrollo de los lactobacilos intestinales. Es una técnica análoga al EDA sólo que en este caso se emplea un medio de cultivo líquido en lugar de un medio sólido. Los valores de pH seleccionados corresponden al rango de pH que posee la mayoría de los

productos lácteos fermentados (4.5 a 5.5).

Se preparó y fraccionó caldo MRS en 3 erlenmeyers colocando 150 ml en cada uno de ellos, que se rotularon de la siguiente manera: MRS pH 4.5, MRS pH 5.0, MRS pH 5.5.

Por otro lado se prepararon 100 ml de caldo MRS el cual se rotuló MRS Control.

Todos los caldos fueron esterilizados y en el caso del caldo Control, éste fue fraccionado en tubos de hemólisis estériles que luego fueron utilizados como control (+) de crecimiento. A los demás caldos, y trabajando siempre en gabinete de aire estéril, se les adicionó ácido láctico concentrado (Anedra) hasta alcanzar los pH 4.5, 5.0 y 5.5 para cada erlenmeyer, previamente rotulado. Se utilizó para esto un pHmetro Orion SA720. Los caldos con diferentes pH se fraccionaron en porciones de 2.5 ml en tubos de hemólisis estériles, rotulando los tubos con los valores de pH correspondientes y conservándolos a temperatura de refrigeración hasta su uso.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se inocularon al 2% con cada cepa los tubos conteniendo el caldo MRS pH 4.5, pH 5.0 y pH 5.5 (previamente rotulados con la identificación de la cepa). Se dejó un tubo con caldo MRS sin inocular como control (-) de desarrollo y como control (+) se utilizó un tubo con caldo MRS sin ajuste de pH e inoculado con la cepa en cuestión.

Se incubaron todos los tubos a 37°C durante 24 h y posteriormente se los observó para determinar ausencia o presencia de crecimiento (turbidez del caldo) comparando con los tubos controles.

Interpretación de resultados:

A partir de la observación macroscópica, se realizó la siguiente clasificación semicuantitativa:

<b>Desarrollo</b>	<b>Resultado</b>
Ausencia de crecimiento (comparable al C (-))	Negativo (-)
Desarrollo débil (turbidez menor al C (+))	Débil (d)
Desarrollo abundante (turbidez comparable al C (+))	Positivo (+)

### **3.7.2 Resistencia a sales.**

Se empleó el método cualitativo de Desarrollo en Medio Líquido (DML).

Fundamento: ver 3.7.1.

Se preparó caldo MRS adicionado de sales: NaCl y KCl, pesando el medio junto a las sales de manera tal que la concentración de las mismas sea del 1%, 2% y 3% (p/v) para cada una de ellas.

Una vez esterilizados, los caldos fueron distribuidos en tubos de hemólisis estériles y rotulados convenientemente.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se inoculó en una proporción del 2% los cuatro tubos conteniendo caldo MRS-NaCl 1%, MRS-NaCl 2%, MRS-NaCl 3%, MRS-KCl 1%, MRS-KCl 2% y MRS-KCl 3%. Se rotularon los tubos con la

denominación de la cepa correspondiente y posteriormente se empleó la misma metodología que se explicó para determinar la resistencia de los lactobacilos a distintos pH (ver 3.7.1) con respecto a las condiciones de incubación, controles (+) y (-) e interpretación de resultados.

### **3.7.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído).**

Se empleó el método cualitativo de Desarrollo en Medio Líquido (DML).

Fundamento: ver 3.7.1.

Se preparó caldo MRS, distribuyéndolo en cuatro erlenmeyers y rotulándolo de la siguiente manera:

- ✓ MRS-acetaldehído 1000 ppm
- ✓ MRS-acetaldehído 2500 ppm
- ✓ MRS-diacetilo 1000 ppm
- ✓ MRS-diacetilo 2500 ppm

Se adicionó al erlenmeyer correspondiente 102  $\mu$ l y 255  $\mu$ l de una solución de diacetilo (Sigma) de manera de obtener una concentración de éste en el caldo de 1000 ppm y 2500 ppm en el caldo respectivamente. A los otros erlenmeyer se les adicionó 128  $\mu$ l y 319  $\mu$ l de una solución de acetaldehído (Sigma) de manera de obtener una concentración de éste en el

caldo de 1000 ppm y 2500 ppm respectivamente.

Los cuatro caldos con sus correspondientes compuestos de aroma fueron distribuidos en tubos de hemólisis estériles colocando en cada uno de ellos 2.5 ml y se rotuló cada tubo con el compuesto de aroma que contenía y su concentración. No se conservaron en refrigeración los caldos adicionados de estos compuestos ya que tanto el acetaldehído como el diacetilo son muy inestables bajo estas condiciones y por este motivo se prepararon en el momento de usar.

A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se inocularon los cuatro caldos en una proporción del 2%. Posteriormente, se empleó la misma metodología que se utilizó para determinar la resistencia de los lactobacilos a distintos pH (ver 3.7.1), con respecto a las condiciones de incubación, controles positivos y negativos e interpretación de resultados.

#### **3.7.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada y conservada a 5°C.**

Para determinar la viabilidad de los lactobacilos en leche acidificada y conservada a temperatura de refrigeración se empleó la técnica de recuento en placa de células viables (25) luego de un período determinado de almacenamiento, comparándolo con el recuento de partida.

**Fundamento:**

Al adicionar los lactobacilos en elevada concentración ( $10^8$  UFC/ml) a leche acidificada a pH 4 y 5 y evaluar al cabo de 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración la pérdida o no de viabilidad, se pretendió reproducir las condiciones tecnológicas en las que estos microorganismos se encuentran en los productos lácteos fermentados. A diferencia del estudio de la resistencia al pH (evaluación del desarrollo de los lactobacilos en dichas condiciones), en este caso se pretende evaluar la sobrevivencia de los lactobacilos a valores de pH similares a los de productos lácteos fermentados. Visto que los resultados obtenidos para el estudio 3.7.1 indicaron que  $\text{pH} \geq 5$  no afectan el desarrollo de los lactobacilos intestinales, la viabilidad en leche acidificada fue adicionalmente estudiada a pH 4.

Para conocer aproximadamente el volumen de ácido láctico que debería adicionarse a la leche descremada estéril reconstituida al 10% para llevar su pH a valores de 4 y 5, se realizó una experiencia previa con 200 ml de leche estéril a la cual se le fue adicionando ácido láctico concentrado (Anedra), monitoreando el pH luego de cada adición. Así se obtuvo la siguiente relación:

- ✓ Para alcanzar un pH 4 (en 200 ml de leche) se requirieron 0.64 ml de ácido láctico.
- ✓ Para alcanzar un pH 5 (en 200 ml de leche) se requirieron 1.26 ml de ácido láctico.

Teniendo en cuenta esta relación de volúmenes se ajustó el pH de 3 erlenmeyers

conteniendo leche estéril de la siguiente manera: a uno de ellos no se le practicó ajuste de pH y se rotuló como leche control (**C**); al segundo se le adicionó un volumen algo inferior al previamente calculado y monitoreando el pH en pHmetro se fue adicionando de a 100 µl de ácido láctico hasta ajustar el pH al valor de 5, agitando vigorosamente entre agregado y agregado y trabajando bajo gabinete de aire estéril, rotulándolo como leche **pH 5**. Finalmente, se procedió de la misma manera para el tercer erlenmeyer pero en este caso hasta alcanzar el pH de 4 y se rotuló como leche **pH 4**. La leche control y acidificada se fraccionó en tubos con tapa a rosca estériles de 12 ml de capacidad, colocando en cada uno de ellos 10 ml de manera de dejar un espacio de cabeza reducido. Todos los tubos fueron rotulados (**C**, **pH 4** y **pH 5**) y se conservaron a 5°C hasta su uso.

La suspensión de bacilos que se empleó para inocular las leches se preparó de la siguiente manera: a partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (over night), se realizó un segundo repique en 5 ml del mismo caldo pero en tubos de centrífuga, que se incubaron a 37°C durante 24h. Una vez desarrollados los caldos, se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente con la finalidad de cosechar las células. Trabajando siempre bajo condiciones de esterilidad, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular obtenido se resuspendió y lavó dos veces con 5 ml de buffer fosfato de potasio estéril. La operación se repitió dos veces. Finalmente, se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer de manera de concentrar diez veces la población celular inicial (aproximadamente  $10^8$  UFC/ ml). Se homogeneizó en vortex y con esta suspensión celular se inocularon tres tubos de leche (**C**, **pH 4** y **pH 5**) por cada cepa, adicionando a cada uno de ellos 150 µl de suspensión, para lograr en la leche una concentración celular aproximada de  $10^8$  CFU/ ml. Una vez inoculados, se almacenaron los tubos a temperatura de refrigeración durante 30 días.

Al momento de la inoculación (tiempo cero) se determinó:

- ✓ Recuento de lactobacilos viables (técnica de recuento en placa)
- ✓ Valor de pH a leche control (C)

Para el recuento de lactobacilos se realizaron diluciones decimales con agua de peptona al 0.1%(p/v) a partir de los tubos de leche inoculados **C** (para cada cepa) y se sembró en superficie con 0.1 ml de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  empleando Agar para recuento en placa (APC).

Al cabo de los 30 días de almacenamiento, se retiraron los tubos de leche del refrigerador y se procedió a realizar nuevamente el recuento de lactobacilos y la medida de pH. Se empleó la metodología antes descrita (sembrando las mismas diluciones) pero en este caso se sembraron tanto los controles como los tubos de leche de pH 4 y 5 por cada cepa.

Las placas, una vez sembradas fueron incubadas a 37°C durante 48 a 72 h en anaerobiosis por combustión. Transcurrido el período de incubación se realizaron los correspondientes recuentos celulares en un Cuenta colonias (JP Selecta SA, Comecta SA DigitalS).

Interpretación de resultados:

Comparando los valores de pH inicial y final para cada una de las tres leches inoculadas por cepa, se determinó si hubo acidificación del medio como consecuencia de la fermentación de carbohidratos llevada a cabo por la bacteria o si permaneció sin cambios. Con respecto al recuento de células viables se determinó si la conservación a temperatura de

refrigeración de los lactobacilos en leche estéril acidificada afectaba la viabilidad de los mismos, lo cual se ve reflejado como una caída en los ordenes logarítmicos entre los recuentos a tiempo cero y a 30 días, comparando esos valores con los del control.

### **3.7.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters.**

Fundamento general:

Ver 3.5.3. En este ensayo se pretendió determinar la presencia o no de agentes antimicrobianos en el SLC de los lactobacilos intestinales frente a las bacterias lácticas ensayadas (utilizadas como starters en la industria láctea fermentativa) y viceversa (3.7.5.a y 3.7.5. b)

#### **3.7.5.a Evaluación del efecto producido por SLC de lactobacilos intestinales sobre el desarrollo de bacterias lácticas de starter.**

Para conocer dicho comportamiento, se empleó el método semicuantitativo de Ensayo de Difusión en Agar (EDA), previamente descrito.

Las bacterias lácticas usadas (pertenecientes al cepario del PROLAIN) fueron las siguientes: dos cepas de *Streptococcus thermophilus* (176 y A4), dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ab1 y Hb2) y dos cepas de *Lactococcus lactis* (A6 y Mo12).

Las pátinas fueron realizadas con las bacterias lácticas, pero en este caso empleando como medios agarizados, los siguientes: para el género *Lactobacillus*, agar MRS y para *Lactococcus* y *Streptococcus*, agar Elliker (ver Anexo). Estos medios fraccionados en porciones de 20 ml y esterilizados se dejaron enfriar hasta 45°C.

Partiendo de cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en caldo MRS (over night) y de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* en caldo Elliker (over night), se procedió a adicionar 0.3 ml de dichos cultivos a los 20 ml del medio agarizado correspondiente, homogeneizando rápidamente con vortex de manera de lograr una distribución del microorganismo en el medio lo más uniforme posible. Se volcó la mezcla en placas de Petri estériles, previamente rotuladas con la identificación de la bacteria láctica contenida. Una vez solidificadas se llevaron las placas a gabinete de aire estéril donde se dejaron secar por un tiempo aproximado de 1 h. Luego se hicieron, con sacabocados estériles, ocho hoyos (diámetro, 10 mm) por cada placa y rotulando en el fondo de la misma y en cada hoyo la denominación del SLC del lactobacilo correspondiente (ej. SLC F<sub>3</sub>). De este modo, se testearon ocho cepas de lactobacilos por cada pátina de bacteria láctica de starters.

Para obtener los SLC de los lactobacilos intestinales se procedió de la siguiente manera:

Cultivos de cada cepa en 5 ml de caldo MRS (over night) se fraccionaron (1ml) en cinco tubos eppendorf plásticos estériles previamente rotulados y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min. a 5°C. Se tomaron los SLC obtenidos y se colocaron en frascos plásticos previamente esterilizados (bajo gabinete de aire estéril) con una mezcla alcohol-agua, conservándolos por congelamiento a -20°C hasta su uso.

Se depositaron en el hoyo correspondiente 180 µl del SLC del lactobacilo,

procediendo de la misma manera para los restantes siete SLC, de manera tal que en las seis pátinas de bacterias lácticas se colocó el mismo juego de SLC de lactobacilos intestinales. Se dejaron las placas en reposo unos minutos para evitar derrames de sobrenadante en el agar y luego se incubaron a 37°C durante 48 h en aerobiosis para las pátinas conteniendo *Lactobacillus* y *Streptococcus* mientras que aquellas formuladas con *Lactococcus* se incubaron a 25°C durante 48h en aerobiosis.

#### Interpretación de resultados:

Se registró presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento de las bacterias por parte de los SLC de los lactobacilos intestinales. En aquellos casos en que se encontró inhibición, se midió el diámetro de los halos utilizando un calibre adecuado a tal fin.

**3.7.5. b** Evaluación del efecto producido por SLC de *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1, *Streptococcus thermophilus* 176 y *Lactococcus lactis* Mo12 sobre el desarrollo de lactobacilos intestinales.

En este caso, se aplicó la misma metodología y criterio de interpretación de resultados que en el punto anterior (ver 3.7.5.a) sólo que en este caso las pátinas estaban formuladas con los lactobacilos y se adicionaron SLC en los hoyos provenientes de las mismas bacterias lácticas antes empleadas.

**3.7.5.c** Determinación de la naturaleza del agente inhibidor presente en SLC de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub> frente a *Streptococcus thermophilus* 176, *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 y *Lactococcus lactis* Mo12.

Para este ensayo, se empleó nuevamente el método cualitativo de Desarrollo en Medio Líquido (DML).

Fundamento:

Ver 3.7.1. En este caso, no sólo se pretendió determinar la presencia de un agente inhibidor del crecimiento microbiano sino realizar distintos tratamientos (químicos y físicos) en los SLC para determinar la naturaleza química del mismo. La neutralización pone de manifiesto que la acción inhibitoria se basa en la producción de ácido, la esterilización manifiesta la naturaleza química termoestable o no del inhibidor (proteínas, glicoproteínas o carbohidratos) y el tratamiento con pepsina manifiesta la naturaleza proteica del mismo.

A partir de un cultivo de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> en caldo MRS (over night), se repicó en 45 ml del mismo caldo colocados en un tubo de centrifuga tapa a rosca estéril de 50 ml de capacidad. El inóculo se hizo al 2% y se incubó a 37°C durante 24h en aerobiosis. Una vez desarrollado el cultivo, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Bajo gabinete de aire estéril, se separaron aproximadamente unos 40 ml de SLC los que se guardaron en frascos plásticos tapa a rosca esterilizados como se mencionó en el punto 3.7.5.a.

A partir del SLC, se tomaron varias alícuotas y se sometieron a los tratamientos

descriptos a continuación:

- ✓ A una porción de 10 ml colocada en un vaso de precipitado, se le neutralizó el pH por agregado de pequeñas granallas de Na(OH) (para evitar diluir el sobrenadante) y se esterilizó por filtración.
- ✓ A una porción de 10 ml colocada en un tubo tapa a rosca se la sometió a un tratamiento térmico de 15 min. a 121°C.
- ✓ A una porción de 10 ml colocada en un tubo estéril, se le adicionó 1ml de una solución de pepsina 100g/ml. Se incubó la mezcla a 37°C durante 3h en baño de agua termostatzado.
- ✓ A una porción de 10 ml se la dejó tal cual (Control).

Las cuatro alícuotas de SLC se colocaron en tubos eppendorf plásticos estériles de 2 ml de capacidad y se rotularon: **SLC-N** (SLC neutralizado), **SLC-E** (SLC esterilizado), **SLC-P** (SLC tratado con pepsina) y **SLC-C** (SLC control). Se concentraron los SLC durante cuatro horas y media a 45°C bajo vacío en equipo Speed Vac (Savant, DNA 120).

Se calculó el factor de concentración **F** para los sobrenadantes y con éste se determinó el volumen a agregar de **SLC-N**, **SLC-E**, **SLC-P** y **SLC-C** a los cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1, *Streptococcus thermophilus* 176 y *Lactococcus lactis* Mo12.

A partir del cultivo en caldo MRS de *Lact. bulgaricus* Ab1 y en caldo Elliker para *Strep. thermophilus* 176 y *L. lactis* Mo12 (over night) se inoculó al 2% en 60 ml del caldo correspondiente y se fraccionó (3 ml) en tubos de hemólisis estériles, los cuales se rotularon

como: **C** (control), **E** (esterilizado), **P** (tratamiento con pepsina), **N** (neutralizado) y **CL** (Control cultivo bacteria láctica sin agregado de SLC).

A continuación, la Figura 3 muestra el esquema de la metodología que se siguió para este ensayo.

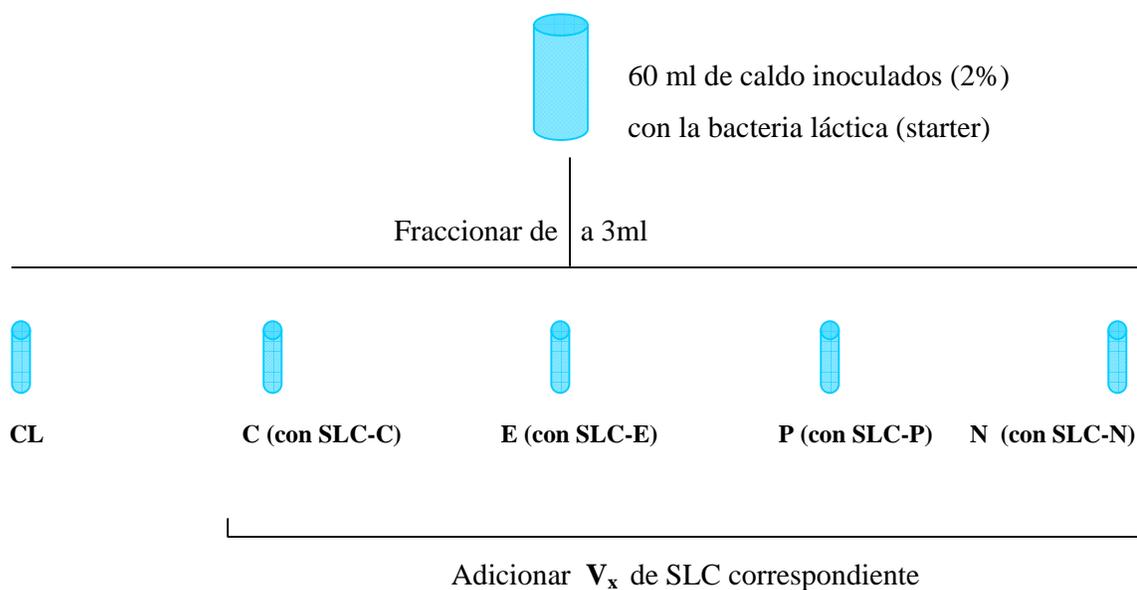


Fig. 3- Metodología para evaluar la naturaleza química de agentes inhibidores del crecimiento de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>37</sub>.

Como se mencionó anteriormente con el factor **F**, se calculó un volumen de SLC a agregar, que llamamos  $V_x$ .

Una vez adicionados la totalidad de los tubos con los SLC correspondientes, se incubaron a 37°C durante 24h en aerobiosis. Al cabo de dicho tiempo se leyeron las D.O. a 560 nm, cuyos valores se graficaron (diagrama de barras).

Interpretación de resultados:

El valor de D.O. del Control (cultivo láctico con SLC-C) permite conocer sólo la magnitud de la inhibición que se produce sobre el desarrollo de la bacteria láctica, en cambio al comparar los valores de D.O. obtenidos para los SLC con los tratamientos antes mencionados, se puede concluir a qué tipo de sustancia/s (proteínas, ácidos orgánicos, sustancias termosensibles, o una mezcla de éstos) obedece dicha inhibición.

**3.7.5.d.** Efecto de SLC de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>71</sub> frente a bacterias lácticas de starters (cinéticas de crecimiento).

Fundamento:

A partir de los resultados obtenidos en condiciones de desarrollo normal (cultivo sin adición de SLC) puede graficarse la cinética de crecimiento control: D.O. vs Tiempo (horas). Si se desea evaluar qué tipo de efecto produce el agregado de un SLC de una bacteria sobre el desarrollo de otra, se procede a determinar la curva de crecimiento correspondiente a la combinación cultivo-SLC. Comparando esta última con la correspondiente cinética de crecimiento control de la cepa en estudio, puede concluirse:

- ✓ Cuando no existe efecto inhibitor del desarrollo, ambas curvas de crecimiento

(control y con agregado de SLC) se superponen.

✓ Cuando hay inhibición total, no hay desarrollo de la bacteria en el cultivo y por tanto la curva de crecimiento para el agregado de SLC mostrará un valor constante de D.O. y, naturalmente, estará ubicada debajo de la curva de crecimiento control del cultivo microbiano.

✓ Cuando hay inhibición parcial, la curva de crecimiento para el agregado de SLC mostrará una evolución similar a la curva control pero con valores de D.O. menores.

Para obtener el SLC de ambos lactobacilos intestinales se procedió de la siguiente manera: a partir de un cultivo de cada uno de ellos en caldo MRS (over night) se hizo un inóculo al 2% en 45 ml de caldo MRS estéril dispuestos en un tubo de centrifuga plástico estéril de 50 ml de capacidad. Se incubó a 37°C durante 24h en aerobiosis y una vez desarrollado el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. Bajo gabinete de aire estéril, se separaron aproximadamente unos 40 ml de SLC los que se guardaron en frascos plásticos esterilizados como se mencionó en el punto 3.7.5.a, los cuales fueron conservados por congelamiento a -20°C hasta su uso.

Para poner de manifiesto las interacciones entre cepas, se eligieron las siguientes combinaciones, teniendo en cuenta los tres tipos de comportamientos (inhibición total o parcial, y ausencia de inhibición) observados (ver 3.7.5.a):

---

<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1	vs	<i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> "
<i>Streptococcus thermophilus</i> 176	vs	<i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> "
<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1	vs	<i>Lact. rhamnosus</i> F <sub>71</sub>
<i>Lactococcus lactis</i> Mo12	vs	<i>Lact. gasseri</i> F <sub>37</sub> "

Se descongelaron los SLC a utilizar, se concentraron (según 3.7.5.a) y se calculó el factor de concentración **F** para determinar el volumen de SLC de F<sub>37</sub>" y F<sub>71</sub> o caldo estéril a agregar a los cultivos de las bacterias lácticas. La Figura 4 muestra el esquema de la metodología que se siguió para este ensayo.

La totalidad de los tubos adicionados de los correspondientes SLC y sus controles, fueron incubados a 37°C en baño de agua termostatzado, realizándose las lecturas de D.O. a 560 nm a los intervalos de tiempo predeterminados.

A t =0 se midió la D.O. en un excedente de aproximadamente 1 ml que quedó luego de fraccionar en 18 tubos cada medio.

Como puede apreciarse, cada dos horas se retiraron del baño los tubos correspondientes a las muestras y sus controles, efectuándose dos lecturas en cada uno de los tres tubos rotulados para una misma combinación (ver triplicados Fig. 4). De esta manera se obtuvieron, en cada caso, seis valores para promediar.

#### Interpretación de resultados:

Con los valores de D.O. promedio determinados para las combinaciones microbianas ensayadas se obtuvieron las cinéticas de crecimiento correspondientes. Comparando con las de los controles, se evaluó el tipo de inhibición que el SLC producía sobre el crecimiento de las bacterias lácticas usadas.

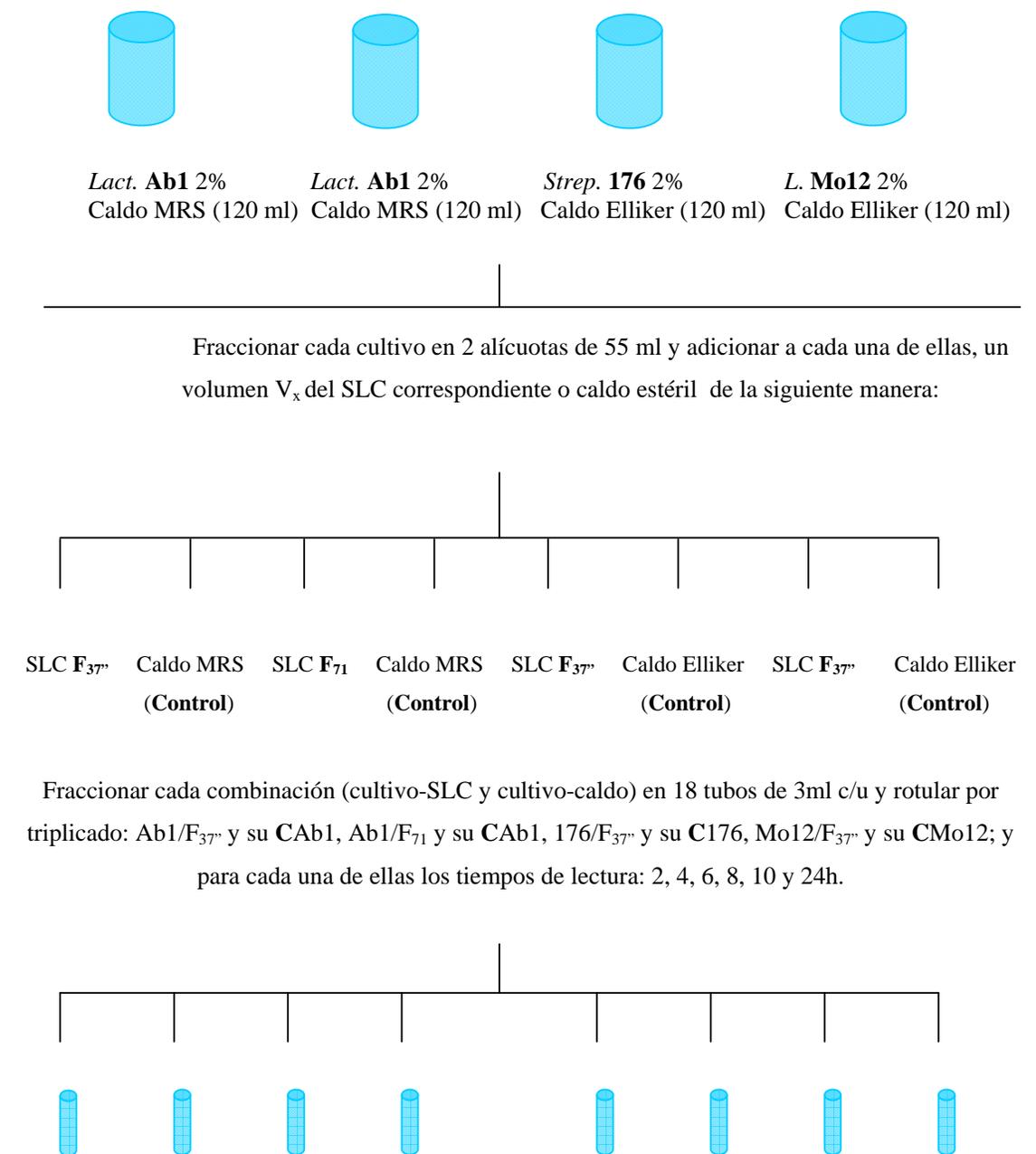


Fig. 4- Metodología para evaluar las interacciones entre las cepas de *Lact. gasseri*  $F_{37}$  y *Lact. rhamnosus*  $F_{71}$  frente a bacterias lácticas de starters (*Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1, *Streptococcus thermophilus* 176 y *Lactococcus lactis* Mo12).

#### **4.1 Aislamiento y Purificación de bacterias intestinales.**

Se procesaron ocho muestras de materia fecal provenientes de bebés lactantes, una por cada uno, de las cuales las dos primeras permitieron recuperar únicamente bacilos esporulados, microorganismos que no eran de interés para los objetivos propuestos en el presente trabajo. Por tanto, dichas muestras no fueron tenidas en cuenta y, por esto, en el presente estudio sólo se mencionan 6 individuos para identificar el origen de los aislamientos obtenido, cuyo número se detalla a continuación:

- ✓ Individuo **1**: 7 aislamientos
- ✓ Individuo **2**: 1 aislamiento
- ✓ Individuo **3**: 4 aislamientos
- ✓ Individuo **4**: 17 aislamientos
- ✓ Individuo **5**: 18 aislamientos
- ✓ Individuo **6**: 7 aislamientos

#### **4.2 Identificación de las cepas aisladas.**

##### **4.2.1 Características Fenotípicas.**

La totalidad de los aislamientos resultaron ser bacilos no móviles, gram (+) y catalasa (-). Aquellos provenientes de los individuos **1**, **4** y **6** coagularon la leche en 24h, los

provenientes de los individuos **2** y **3** lo hicieron en 48 h y finalmente 4 aislamientos del individuo **5** no coagularon la misma, 2 lo hicieron muy lentamente (luego de 14 días de incubación) y el resto se comportó de manera similar a los provenientes del individuo **1**.

En cuanto a la morfología, a excepción de los aislamientos del individuo **3**, los restantes se mostraron similares en cuanto a tamaño y forma (bacilos irregulares, en su mayoría medianos), y longitud y disposición de las cadenas (generalmente irregulares, en forma de rulos). Los bacilos aislados del individuo **3** mostraron una morfología bastante diferente a los demás, ya que resultaron más largos y rectos, con menor tendencia a formar cadenas y cuando lo hacían éstas eran menos enroscadas sobre sí mismas y más lineales. La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de los bacilos intestinales.

Como puede observarse en dicha Tabla, la denominación de los aislamientos no es correlativa, lo cual fue debido a la pérdida que se produjo de algunos de ellos durante el aislamiento y purificación.

#### **4.2.2 Quimismo Fermentativo: Homofermentación/Heterofermentación**

De los resultados obtenidos en la determinación del Quimismo Fermentativo, a través del Ensayo de Gibson, pudo concluirse que todos los aislamientos llevaron a cabo un metabolismo homofermentante (Tabla 10).

Tabla 10- Características fenotípicas de los aislamientos intestinales estudiados.

Individuo	Aislamiento	Movilidad	Gram	Catalasa	Tipo de fermentación	Coag. Leche	Observaciones Morfológicas
1	F <sub>3</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos, sueltos y en cadenas cortas irreg.
	F <sub>16</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos, medianos y gruesos en cadenas más largas.
	F <sub>18</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos muy cortos y gruesos en cadenas enroscadas.
	F <sub>19</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos, algo rectos en cadenas enroscadas.
	F <sub>20</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos, algo rectos en cadenas más abiertas.
	F <sub>21</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos, sueltos y en cadenas cortas irreg.
	F <sub>22</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos, algo rectos en cadenas abiertas.
2	F <sub>30</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos cortos, medianos y algunos largos en cadenas irregulares.
3	F <sub>37</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos más rectos, cortos y medianos en cadenas cortas.
	F <sub>37'</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos más rectos, en V, empalizada, sueltos o en cadenas cortas.
	F <sub>37'a</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos más rectos, medianos en cadenas cortas.
	F <sub>37''</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos más rectos, cortos en cadenas cortas e irregulares.
4	F <sub>44</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos gruesos en cadenas cortas enroscadas.
	F <sub>45</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos y largos en cadenas enroscadas.
	F <sub>46</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos gruesos en cadenas cortas enroscadas.
	F <sub>49</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos muy cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>50</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos en cadenas más lineales.
	F <sub>53</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas irregulares.
	F <sub>56</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos muy cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>57</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas irregulares.
	F <sub>57'</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas irregulares.
	F <sub>57''</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos gruesos en cadenas irregulares.
	F <sub>57*</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos gruesos en cadenas irregulares.
	F <sub>58g</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos gruesos en cadenas irregulares.
	F <sub>58ch</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas cortas y enroscadas.
	F <sub>62</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas cortas y enroscadas.
	F <sub>63</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas cortas y enroscadas.
F <sub>64</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas cortas y enroscadas.	
F <sub>64'</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas cortas y más lineales.	

+24h/+48h/+14d: coagula la leche en 24h /48h/14 días, respectivamente.

Hom: Homofermentante

Tabla 10- Características fenotípicas de los aislamientos intestinales estudiados (continuación).

Individuo	Aislamiento	Movilidad	Gram	Catalasa	Tipo de fermentación	Coag. leche	Observaciones Morfológicas
<b>5</b>	F <sub>65</sub>	-	+	-	Hom	+14d	Bacilos medianos en cadenas lineales y enroscadas.
	F <sub>66</sub>	-	+	-	Hom	+14d	Bacilos medianos en cadenas lineales y muy poco enroscadas.
	F <sub>67</sub>	-	+	-	Hom	-	Bacilos medianos en cadenas lineales y muy enroscadas.
	F <sub>68</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos gruesos en cadenas levemente curvas.
	F <sub>69</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas irregulares.
	F <sub>70</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>71</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>72</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>73</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>74</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos medianos y largos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>75</sub>	-	+	-	Hom	-	Bacilos cortos y medianos en cadenas más lineales.
	F <sub>76</sub>	-	+	-	Hom	-	Bacilos medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>77</sub>	-	+	-	Hom	-	Bacilos cortos y medianos en cadenas cortas enroscadas.
	F <sub>78</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos cortos y medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>79</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas cortas irregulares.
	F <sub>80</sub>	-	+	-	Hom	+48h	Bacilos cortos y gruesos en cadenas cortas enroscadas.
F <sub>81</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas enroscadas.	
F <sub>83</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas enroscadas.	
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas enroscadas.
	F <sub>85</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas enroscadas.
	F <sub>86</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>90</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>93</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>94</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos en cadenas enroscadas.
	F <sub>95</sub>	-	+	-	Hom	+24h	Bacilos cortos y medianos en cadenas enroscadas.

+24h/+48h/+14d: coagula la leche en 24h /48h/14 días, respectivamente.

Hom: Homofermentante

#### 4.2.3 Perfil de Fermentación de Carbohidratos.

Como se mencionó en el punto 3.3.4 de la sección Materiales y Métodos, los resultados obtenidos en la determinación del Perfil de Fermentación de Carbohidratos se compararon inicialmente con un patrón general que contempla no sólo la totalidad de los grupos de bacilos (homofermentantes obligados, heterofermentantes obligados y facultativos) sino también todos los carbohidratos que el manual de Bergey considera (Ver Anexo Tabla 22). En esta primera evaluación resultó muy difícil comparar los perfiles obtenidos entre sí, por lo que se compararon con un segundo patrón de fermentación simplificado (Ver Anexo Tabla 23), considerando únicamente aquellos carbohidratos más representativos y con mayor capacidad diferencial del grupo homofermentante. Se asignó así género y especie a los aislamientos estudiados:

- ✓ Aislamientos del individuo **3**: *Lactobacillus* del grupo 1
- ✓ Aislamientos de los individuos **1, 2, 4, 5 y 6**: *Lactobacillus* del grupo *casei*

La denominación “*Lactobacillus* del grupo 1” incluye a las especies *Lact. acidophilus*, *Lact. crispatus* y *Lact. gasseri*; debido a las similitudes observadas en sus patrones de fermentación ( Bergey (9)) (ver Tabla 22).

El perfil de fermentación obtenido para los bacilos intestinales aislados puede observarse en la Tabla 11.

Tabla 11-Perfil de Fermentación de carbohidratos de los aislamientos intestinales (Método API).

Individuo	Aislamiento	Arabinosa	Celobiosa	Galactosa	Glucosa	Gluconato	Maltosa	Manitol	Manosa	Melezitosa	Melibiosa	Rafinosa	Ribosa	Trehalosa	Almidón	Xylosa
1	F <sub>3</sub>	-	++	++	++	+/-	+/-	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>16</sub>	-	++	++	++	+/-	+/-	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>18</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	+	+/-	-	++	++	-	-
	F <sub>19</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>20</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	+	+/-	+/-	++	++	-	+/-
	F <sub>21</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	+	-	+/-	++	++	-	+/-
	F <sub>22</sub>	-	++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	++	++	-	+/-
2	F <sub>30</sub>	+/-	++	++	++	+/-	-	++	++	+	-	-	+/-	++	-	+/-
3	F <sub>37</sub>	-	++	++	++	-	++	-	++	-	-	+	-	++	-	-
	F <sub>37'</sub>	-	++	++	++	-	++	-	++	-	-	-	-	++	-	-
	F <sub>37'a</sub>	-	++	++	++	-	++	-	++	-	-	-	-	++	-	-
	F <sub>37''</sub>	+	++	++	++	+	++	+	++	+	-	-	-	++	-	-
4	F <sub>44</sub>	++	++	++	++	++	+	++	++	++	-	+/-	++	++	-	-
	F <sub>45</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>46</sub>	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>49</sub>	-	++	++	++	++	+	++	++	+	-	+/-	+	++	-	-
	F <sub>50</sub>	+	++	++	++	-	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>53</sub>	+	++	++	++	+	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>56</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>57</sub>	-	++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>57'</sub>	+/-	++	++	++	+	+	++	++	+	-	+/-	++	++	-	-
	F <sub>57''</sub>	-	+	++	++	++	+	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>57*</sub>	+/-	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>58g</sub>	-	++	++	++	++	+	++	++	+	-	-	++	++	-	-
	F <sub>58ch</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>62</sub>	++	++	++	++	++	+/-	++	++	++	-	-	-	++	-	-
	F <sub>63</sub>	+	++	++	++	+	++	++	++	++	-	-	-	++	-	-
F <sub>64</sub>	++	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	++	++	-	+/-	
F <sub>64'</sub>	++	++	++	++	+	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	
5	F <sub>65</sub>	+	++	-	++	+	+/-	+/-	++	+	-	-	-	++	-	-
	F <sub>66</sub>	+	++	++	++	+	+/-	++	++	+	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>67</sub>	+	++	++	++	+	-	++	++	+	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>68</sub>	+	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	+	++	-	-

- No fermenta, +/- Fermentación débil, + Fermentación moderada y ++ Fermentación intensa.

Tabla 11-Perfil de Fermentación de carbohidratos de los aislamientos intestinales (Método API)  
(continuación).

Individuo	Aislamiento	Arabinosa	Celobiosa	Galactosa	Glucosa	Gluconato	Maltosa	Manitol	Manosa	Melezitosa	Melibiosa	Rafinosa	Ribosa	Trehalosa	Almidón	Xylosa
<b>5</b>	F <sub>69</sub>	+/-	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>70</sub>	-	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>71</sub>	+/-	++	++	++	+/-	++	++	++	++	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>72</sub>	+/-	++	++	++	+/-	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-
	F <sub>73</sub>	+	+	++	++	+/-	-	++	++	+/-	-	-	-	++	-	-
	F <sub>74</sub>	-	++	++	++	+/-	-	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>75</sub>	+	++	-	++	+	-	++	++	+	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>76</sub>	+	++	++	++	+	+/-	++	++	+	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>77</sub>	+	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	+/-	++	-	-
	F <sub>78</sub>	+	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	-	++	-	-
	F <sub>79</sub>	+/-	-	++	++	+/-	-	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>80</sub>	-	++	++	++	+	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-
	F <sub>81</sub>	-	++	++	++	+	-	++	++	+	-	-	-	+	-	-
	F <sub>83</sub>	-	++	-	++	+/-	+/-	++	++	+	-	-	-	++	-	-
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	-	++	++	++	+	+	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>85</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	-	-
	F <sub>86</sub>	++	++	++	++	+/-	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>90</sub>	++	++	++	++	+	+/-	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>93</sub>	++	++	++	++	+	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>94</sub>	++	++	++	++	+	-	++	++	++	-	-	++	++	-	-
	F <sub>95</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	++	++	-	-

- No fermenta, +/- Fermentación débil, + Fermentación moderada y ++ Fermentación intensa.

#### **4.2.4 Desarrollo en medios selectivos. Método Ecométrico.**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de fermentación de carbohidratos y en el desarrollo en medios selectivos, se encontró una coherencia en los mismos ya que los cuatro aislamientos del individuo **3**, que anteriormente habían sido asignados como *Lactobacillus* del Grupo 1, no desarrollaron en presencia de cloruro de litio y propionato de sodio mientras que sí lo hicieron en presencia de bilis. Los aislamientos provenientes de los restantes individuos, desarrollaron en los tres medios de cultivo utilizados en este ensayo, apoyando de este modo la identificación como *Lactobacillus casei*. La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos para este ensayo.

Además del desarrollo selectivo, también se encontraron diferencias morfológicas en las colonias desarrolladas en los tres medios de cultivo. Por ejemplo, los aislamientos provenientes de los individuos **1** y **2** formaron colonias blancas convexas de bordes regulares, los provenientes del individuo **3** (que también en este aspecto se diferenciaron de los demás) formaron colonias muy particulares, con el aspecto de “gotitas de rocío” muy pequeñas y transparentes. Los aislamientos de los individuos **4**, **5** y **6** se mostraron como grupos heterogéneos de cepas donde la morfología de sus colonias se distribuyó entre colonias blancas convexas, de bordes regulares y otras convexas, más translúcidas y cremosas de bordes irregulares, generalmente de mayor tamaño.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica y el perfil de fermentación de carbohidratos así como el desarrollo en medios selectivos, se ajustó la clasificación de los aislamientos como pertenecientes al grupo *Lactobacillus casei* a aquellos

Tabla 12- Desarrollo de lactobacilos intestinales en medios selectivos (Método Ecométrico).

Individuo	Aislamiento	MRS (ICA)	MRS-LP (ICA/ICR)	MRS-Bilis (ICA/ICR)	Morfología de colonias					
					Convex. bordes reg. Blancas			Convex. bordes irreg. crem-trans.		
					MRS	MRS-LP	MRS-Bilis	MRS	MRS-LP	MRS-Bilis
1	F <sub>3</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>16</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>18</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>19</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>20</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>21</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>22</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
2	F <sub>30</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
3	F <sub>37</sub>	5	0	5/1				x		x
	F <sub>37'</sub>	5	0	5/1				x		x
	F <sub>37'a</sub>	5	0	5/1				x		x
	F <sub>37''</sub>	5	0	5/1				x		x
4	F <sub>44</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>45</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>46</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>49</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>50</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>53</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>56</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>57</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>57'</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>57*</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>58g</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>58ch</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>62</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>63</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
F <sub>64</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x	
F <sub>64'</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x	
5	F <sub>65</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>66</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>67</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>68a</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>68b</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>69</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x

ICA: Índice de Crecimiento Absoluto

ICR: Índice de Crecimiento Relativo

Tabla 12- Desarrollo de lactobacilos intestinales en medios selectivos (Método Ecométrico) (continuación).

Individuo	Aislamiento	MRS (ICA)	MRS-LP (ICA/ICR)	MRS-Bilis (ICA/ICR)	Morfología de colonias					
					Convex. Bordes reg. blancas			Convex. Bordes irreg. Crem-trans.		
					MRS	MRS-LP	MRS-Bilis	MRS	MRS-LP	MRS-Bilis
5	F <sub>70</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>71</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>72</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>73</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>74</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>75</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>76</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>77</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>78</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>79</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>80</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>81</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>83</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
6	F <sub>84</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>85</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>86</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>90</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x
	F <sub>93</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>94</sub>	5	5/1	5/1	x	x	x			
	F <sub>95</sub>	5	5/1	5/1				x	x	x

ICA: Índice de Crecimiento Absoluto

ICR: Índice de Crecimiento Relativo

obtenidos de los individuos **1, 2, 4, 5 y 6** (50 aislamientos) y como *Lactobacillus acidophilus* a los provenientes del individuo **3** (4 aislamientos.)

### **4.3 Diversidad genética de los lactobacilos intestinales (perfiles RAPD).**

La Figura 5 corresponde al dendrograma obtenido al procesar 17 aislamientos de lactobacilos intestinales, pertenecientes a los individuos **1, 2, 4, 5 y 6**, empleando los primers arbitrarios B06 (5'-TGCTCTGCCC-3'), B08 (5'-GTGACGCAG-3') y B10 (5'-CTGCTGGGAC-3').

Como puede observarse, los 3 aislamientos del individuo **5** (F<sub>74</sub>, F<sub>81</sub> y F<sub>83</sub>) podrían pertenecer a la misma cepa puesto que el coeficiente de similitud entre ellas supera el 90%; en cambio, la cepa F<sub>70</sub> demuestra tener un coeficiente de similitud muy distinto a las anteriores y, por tanto, se trataría de una cepa distinta.

Para el individuo **6** podrían reconocerse dos cepas diferentes (cada una de ellas con dos aislamientos) que muestran perfiles RAPD distintos. Ellas son: F<sub>84</sub> - F<sub>85</sub> y F<sub>93</sub> - F<sub>95</sub> donde una de las duplas serían dos cepas iguales pero a su vez diferentes a las otras dos, que también son iguales entre ellas.

En el caso del individuo **4**, los aislamientos F<sub>53</sub>, F<sub>64'</sub> y F<sub>64</sub> pertenecerían a la misma cepa, dado que sus coeficientes de similitud superan el 90%; los aislamientos F<sub>49</sub>, F<sub>56</sub> y F<sub>57</sub> en cambio, podrían pertenecer a una o dos cepas diferentes a las previamente mencionadas.

Refiriéndonos ahora al individuo **1**, ambos aislamientos analizados (F<sub>16</sub> y F<sub>22</sub>) podrían



pertenecer a la misma cepa puesto que el coeficiente de similitud entre ellas supera el 90%.

Con respecto al individuo **2** se analizó el único aislamiento del mismo y se obtuvo el correspondiente perfil. Finalmente, la cepa de colección utilizada (*Lact. rhamnosus* Z212T) mostró estar más emparentada genéticamente con aislamientos del individuo **4** (F<sub>57</sub>, F<sub>56</sub> y F<sub>49</sub>) e individuo 5 (F<sub>70</sub>) (coeficiente de similitud 60%).

La Figura 6 corresponde al dendrograma obtenido al procesar los aislamientos anteriormente mencionados, pero ahora junto a los dos aislamientos del individuo **3** (F<sub>37</sub> y F<sub>37'</sub>), utilizando los primers B06 (5'-TGCTCTGCCC-3') y B10 (5'-CTGCTGGGAC-3'). Estos últimos podrían pertenecer a la misma cepa puesto que el coeficiente de similitud entre ellos supera el 90%, y por otro lado, sus perfiles son muy diferentes a los de los demás aislamientos; lo cual indicaría que se trata de dos cepas pertenecientes a otra especie.

El programa que se utilizó para comparar los perfiles obtenidos de los distintos individuos, los agrupa en función del número y posición de bandas determinando así Clusters y Subclusters. Si bien la técnica RAPD-PCR no se utiliza para el fin taxonómico de asignar la especie a una cepa, la presencia en los perfiles RAPD de ciertas bandas muy conservadas entre cepas de la misma especie, permitieron a los expertos de la Unité de Recherches Laitières et Genétique Appliquée del INRA establecer la siguiente asignación de especies:

*Lactobacillus gasseri* (antes grupo *Lact. acidophilus*): F<sub>37</sub> y F<sub>37'</sub>

*Lactobacillus rhamnosus* (antes grupo *Lact. casei*): F<sub>16</sub>, F<sub>22</sub>, F<sub>30</sub>, F<sub>49</sub>, F<sub>53</sub>, F<sub>56</sub>, F<sub>57</sub>, F<sub>64</sub>, F<sub>64'</sub>, F<sub>70</sub>, F<sub>74</sub>, F<sub>81</sub>, F<sub>83</sub>, F<sub>84</sub>, F<sub>85</sub>, F<sub>93</sub> y F<sub>95</sub>

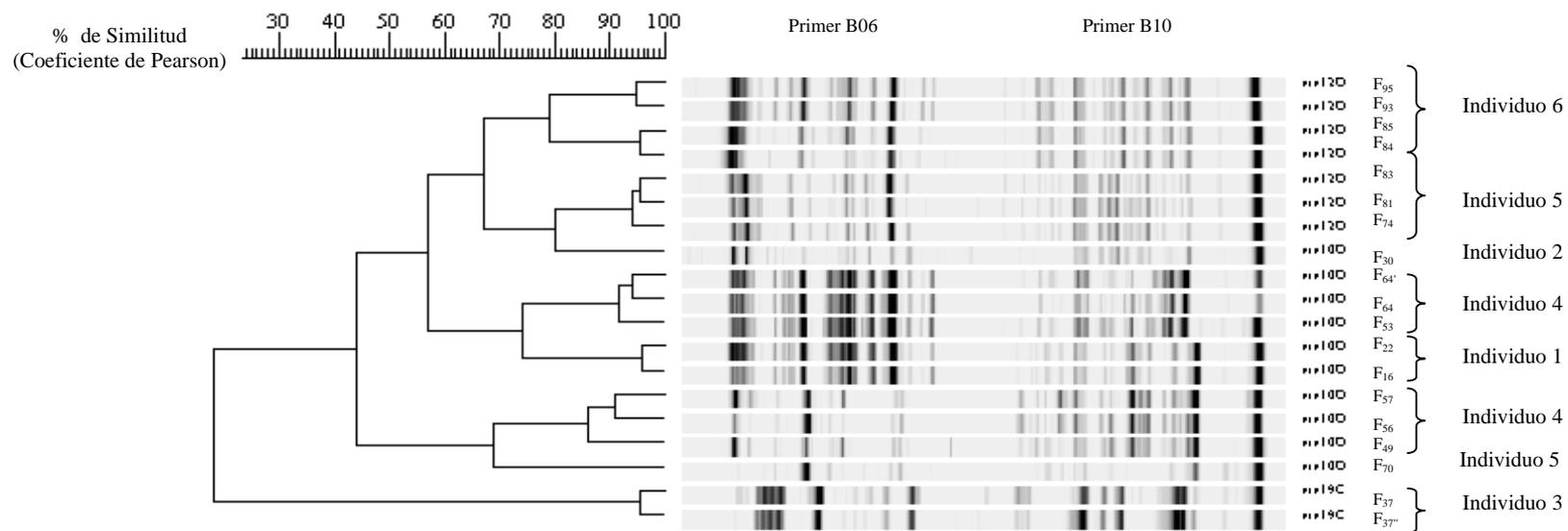


Fig. 6- Dendrograma obtenido por comparación (Programa Gel Compare, Applied Maths, Bélgica) y reagrupamiento (Método UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) de los perfiles RAPD de cepas de *Lact. rhamnosus* y *Lact. gasseri* aisladas de bebés.

## **4.4 Resistencia a las Barreras Biológicas.**

### **4.4.1 Resistencia a la secreción gástrica.**

La Tabla 13 muestra los valores correspondientes a la pérdida de viabilidad de las cepas estudiadas en solución gástrica simulada.

Exceptuando el aislamiento  $F_3$ , los aislamientos de los individuos **1** y **2** demostraron afectarse poco en este ensayo, al verificarse una caída promedio de 1.9 ordenes logarítmicos en los recuentos celulares al cabo de 3h.

Distintos fueron los resultados obtenidos para los aislamientos provenientes de los individuos **3**, **4**, **5** y **6**. Los cuatro aislamientos de *Lactobacillus gasseri* fueron severamente afectados en su viabilidad por el tratamiento gástrico, ya que dos de ellos ( $F_{37}$  y  $F_{37'}$ ) perdieron, en promedio, 5.3 ordenes logarítmicos en sus recuentos celulares; mientras que los otros dos sufrieron una caída promedio de 4.3 ordenes log. Para las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* provenientes de los restantes tres individuos, se observaron caídas de entre 1.9 a 5.4 ordenes logarítmicos (individuo **4**), de 2.9 a 6.6 ordenes logarítmicos (individuo **5**) y de 2.6 a 5.1 ordenes logarítmicos (individuo **6**).

Si bien esta pérdida de viabilidad es bastante marcada, dos lactobacilos:  $F_{58ch}$  y  $F_{64}$  merecen ser tenidos en cuenta, ya que sobrevivieron satisfactoriamente al tratamiento con solución gástrica y sus recuentos celulares sólo cayeron en 1.2 y 0.9 ordenes log., respectivamente.

Tabla 13- Pérdida de viabilidad celular para los aislamientos intestinales en solución gástrica (pH3, 37°C, 3h), expresada como disminución en los recuentos (ordenes log).

Individuo	Aislamiento	Recuento inicial Sol. Gástrica <sup>(1)</sup> (log UFCml <sup>-1</sup> )	Recuento final Sol. Gástrica <sup>(1)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Sol. Gástrica <sup>(2)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Control <sup>(2)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Neta <sup>(3)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	F <sub>3</sub>	9.97 ± 0.11	3.99 ± 0.55	<b>5.98</b>	<b>0.11</b>	<b>5.87</b>
	F <sub>16</sub>	10.41 ± 0.20	8.07 ± 0.41	<b>2.34</b>	<b>0.10</b>	<b>2.24</b>
	F <sub>20</sub>	9.57 ± 0.35	7.76 ± 0.40	<b>1.81</b>	<b>0.04</b>	<b>1.77</b>
	F <sub>21</sub>	9.67 ± 0.19	7.40 ± 0.11	<b>2.27</b>	<b>0.16</b>	<b>2.11</b>
	F <sub>22</sub>	8.79 ± 0.07	6.78 ± 0.35	<b>2.01</b>	<b>0.24</b>	<b>1.77</b>
<b>2</b>	F <sub>30</sub>	9.68 ± 0.10	7.70 ± 0.10	<b>1.98</b>	<b>0.16</b>	<b>1.82</b>
<b>3</b>	F <sub>37</sub>	9.12 ± 0.22	4.63 ± 0.10	<b>4.49</b>	<b>0.21</b>	<b>4.28</b>
	F <sub>37'</sub>	9.69 ± 0.02	4.22 ± 0.32	<b>5.46</b>	<b>0.22</b>	<b>5.24</b>
	F <sub>37'a</sub>	8.54 ± 0.34	4.10 ± 0.18	<b>4.44</b>	<b>0.08</b>	<b>4.36</b>
	F <sub>37''</sub>	10.21 ± 0.05	4.76 ± 0.51	<b>5.45</b>	<b>0.07</b>	<b>5.38</b>
<b>4</b>	F <sub>44</sub>	9.86 ± 0.29	5.88 ± 0.10	<b>3.98</b>	<b>0.16</b>	<b>3.82</b>
	F <sub>49</sub>	8.81 ± 0.47	6.15 ± 0.31	<b>2.66</b>	<b>0.25</b>	<b>2.41</b>
	F <sub>50</sub>	8.48 ± 0.43	5.21 ± 0.61	<b>3.27</b>	<b>0.14</b>	<b>3.13</b>
	F <sub>53</sub>	9.77 ± 0.30	7.18 ± 0.26	<b>2.59</b>	<b>0.04</b>	<b>2.55</b>
	F <sub>56</sub>	9.47 ± 0.56	4.78 ± 0.21	<b>4.70</b>	<b>0.22</b>	<b>4.48</b>
	F <sub>57</sub>	10.23 ± 0.12	7.48 ± 0.43	<b>2.76</b>	<b>0.27</b>	<b>2.49</b>
	F <sub>57*</sub>	9.83 ± 0.36	4.21 ± 0.19	<b>5.61</b>	<b>0.17</b>	<b>5.44</b>
	F <sub>58cb</sub>	8.70 ± 0.28	7.46 ± 0.11	<b>1.24</b>	<b>0.06</b>	<b>1.18</b>
	F <sub>62</sub>	8.73 ± 0.25	4.60 ± 0.41	<b>4.13</b>	<b>0.10</b>	<b>4.03</b>
	F <sub>63</sub>	9.07 ± 0.07	7.09 ± 0.44	<b>1.98</b>	<b>0.11</b>	<b>1.87</b>
	F <sub>64</sub>	9.39 ± 0.10	8.29 ± 0.36	<b>1.11</b>	<b>0.16</b>	<b>0.95</b>
	F <sub>64'</sub>	9.37 ± 0.10	4.40 ± 0.31	<b>4.98</b>	<b>0.21</b>	<b>4.77</b>
	<b>5</b>	F <sub>65</sub>	9.91 ± 0.16	4.31 ± 0.41	<b>5.60</b>	<b>0.33</b>
F <sub>67</sub>		9.37 ± 0.09	2.55 ± 0.17	<b>6.82</b>	<b>0.21</b>	<b>6.61</b>
F <sub>68a</sub>		9.75 ± 0.14	4.41 ± 0.11	<b>5.34</b>	<b>0.16</b>	<b>5.18</b>
F <sub>68b</sub>		9.92 ± 0.18	4.91 ± 0.15	<b>5.01</b>	<b>0.27</b>	<b>4.74</b>
F <sub>70</sub>		9.30 ± 0.09	4.61 ± 0.18	<b>4.68</b>	<b>0.14</b>	<b>4.54</b>
F <sub>71</sub>		9.64 ± 0.06	5.30 ± 0.21	<b>4.34</b>	<b>0.14</b>	<b>4.20</b>
F <sub>73</sub>		9.63 ± 0.13	4.57 ± 0.66	<b>5.07</b>	<b>0.16</b>	<b>4.91</b>
F <sub>74</sub>		8.98 ± 0.14	4.08 ± 0.07	<b>4.90</b>	<b>0.37</b>	<b>4.53</b>
F <sub>75</sub>		9.66 ± 0.11	4.07 ± 0.09	<b>5.58</b>	<b>0.05</b>	<b>5.53</b>
F <sub>77</sub>		9.31 ± 0.15	4.08 ± 0.07	<b>5.23</b>	<b>0.14</b>	<b>5.09</b>
F <sub>78</sub>		9.92 ± 0.13	6.61 ± 0.47	<b>3.31</b>	<b>0.19</b>	<b>3.12</b>
F <sub>79</sub>		9.70 ± 0.35	3.73 ± 0.06	<b>5.97</b>	<b>0.15</b>	<b>5.82</b>
F <sub>80</sub>		9.44 ± 0.14	4.88 ± 0.46	<b>4.57</b>	<b>0.35</b>	<b>4.22</b>
F <sub>81</sub>		9.39 ± 0.10	6.31 ± 0.10	<b>3.08</b>	<b>0.20</b>	<b>2.88</b>
F <sub>83</sub>		9.81 ± 0.10	3.68 ± 0.03	<b>6.14</b>	<b>0.15</b>	<b>5.99</b>

<sup>(1)</sup> Recuentos bacterianos expresados como promedio ± desviación standard

<sup>(2)</sup> Reducción (log UFC ml<sup>-1</sup>) = (Recuento inicial – Recuento final), para recuentos de Sol Gástrica y de Control.

<sup>(3)</sup> Reducción Neta (log UFC ml<sup>-1</sup>) = (Reducción Sol. Gástrica – Reducción Control)

Tabla 13- Pérdida de viabilidad celular para los aislamientos intestinales en solución gástrica (pH3, 37°C, 3h), expresada como disminución en los recuentos (ordenes log) (continuación).

Individuo	Aislamiento	Recuento inicial Sol. Gástrica <sup>(1)</sup> (log UFCml <sup>-1</sup> )	Recuento final Sol. Gástrica <sup>(1)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Sol. Gástrica <sup>(2)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Control <sup>(2)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Reducción Neta <sup>(3)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	9.73 ± 0.11	7.08 ± 0.26	<b>2.65</b>	<b>0.06</b>	<b>2.59</b>
	F <sub>85</sub>	9.08 ± 0.14	4.18 ± 0.26	<b>4.90</b>	<b>0.12</b>	<b>4.78</b>
	F <sub>86</sub>	8.94 ± 0.13	3.71 ± 0.02	<b>5.23</b>	<b>0.08</b>	<b>5.15</b>
	F <sub>93</sub>	8.86 ± 0.05	4.22 ± 0.09	<b>4.64</b>	<b>0.13</b>	<b>4.51</b>
	F <sub>94</sub>	8.72 ± 0.09	5.32 ± 0.15	<b>3.40</b>	<b>0.11</b>	<b>3.29</b>
	F <sub>95</sub>	9.59 ± 0.10	5.17 ± 0.18	<b>4.41</b>	<b>0.04</b>	<b>4.37</b>

<sup>(1)</sup> Recuentos bacterianos expresados como promedio ± desviación standard

<sup>(2)</sup> Reducción (log UFC/ml) = (Recuento inicial – Recuento final), para recuentos de Sol Gástrica y de Control.

<sup>(3)</sup> Reducción Neta (log UFC ml<sup>-1</sup>) = (Reducción Sol. Gástrica – Reducción Control)

Los controles de todos los aislamientos se mantuvieron sin cambios significativos ( $p > 0.05$ ), de manera tal que, las caídas en los recuentos celulares pueden considerarse en práctica, sólo consecuencia del tratamiento con la solución gástrica.

#### **4.4.2 Cinética de muerte celular de los aislamientos en solución gástrica.**

Como puede observarse en la Figura 7, la pérdida de viabilidad celular del *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> se produjo de manera progresiva durante las 3h de tratamiento.

La Figura 8, muestra los resultados obtenidos para *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub>. En este caso no se registró una caída significativa en los recuentos durante los primeros 30 minutos, para luego caer abruptamente 3 ordenes log. durante la siguiente media hora y aproximadamente 2 ordenes log. adicionales durante las restantes 2 h.

Para las cepas *Lactobacillus gasseri* F<sub>37a</sub> y F<sub>37b</sub>, los resultados del tratamiento gástrico se observan en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Para ambos, la pérdida de viabilidad celular fue muy importante (5.5 y 4.5 ordenes log., respectivamente) y progresiva durante las 3 h de exposición.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos para *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>64</sub>. Se puede apreciar que su escasa pérdida de viabilidad celular se produjo muy lentamente a lo largo del tiempo de tratamiento.

Para *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>83</sub> (Figura 12), podríamos considerar que su pérdida de viabilidad celular a lo largo del tratamiento gástrico se produjo en dos etapas. Durante los

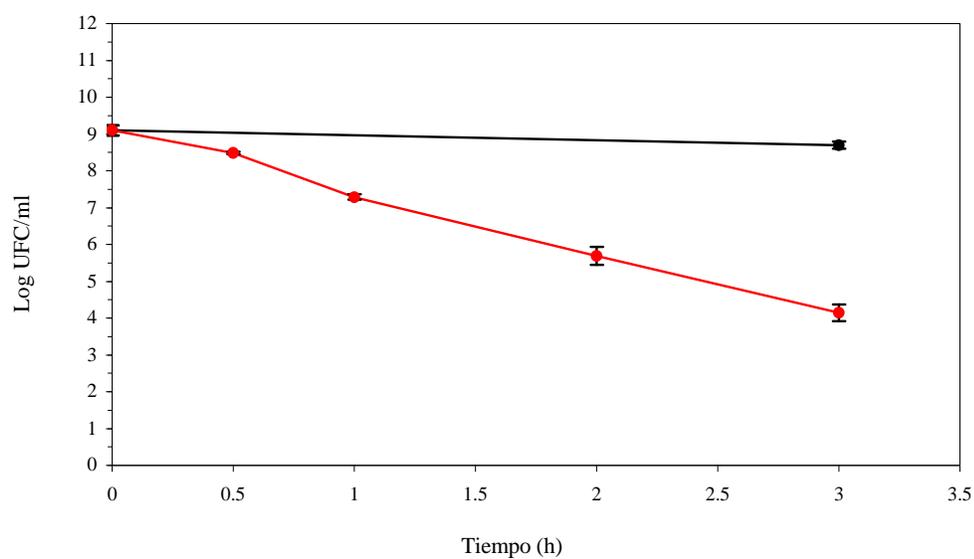


Fig. 7- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH 3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

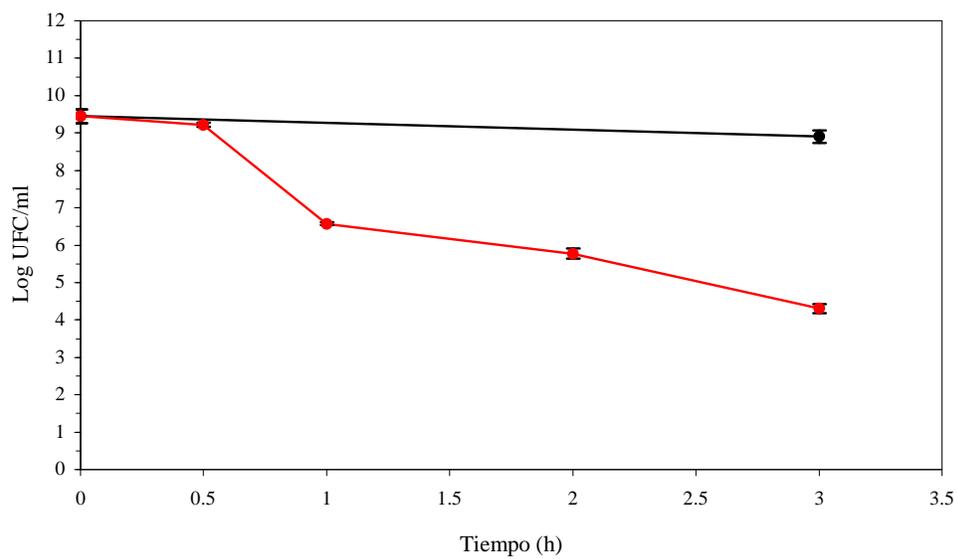


Fig. 8- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

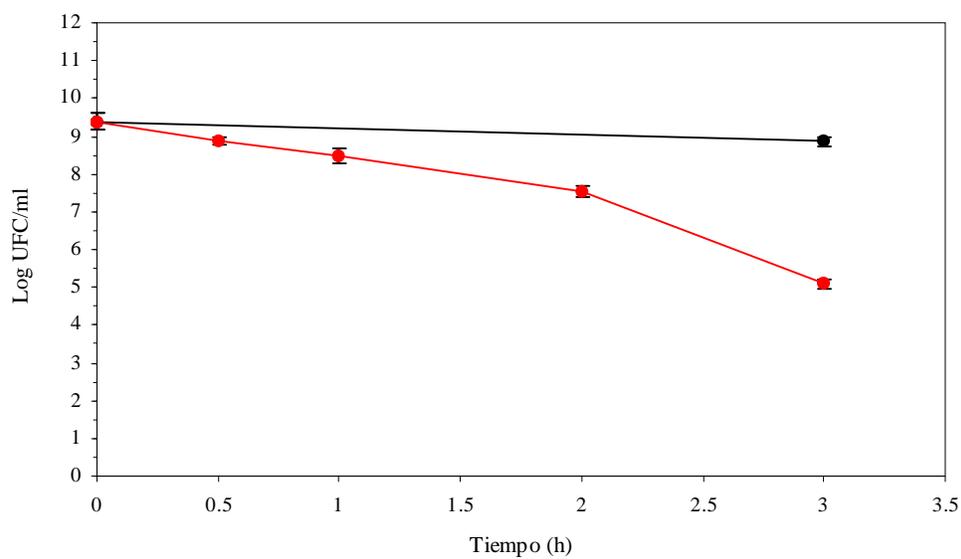


Fig. 9- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37a</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

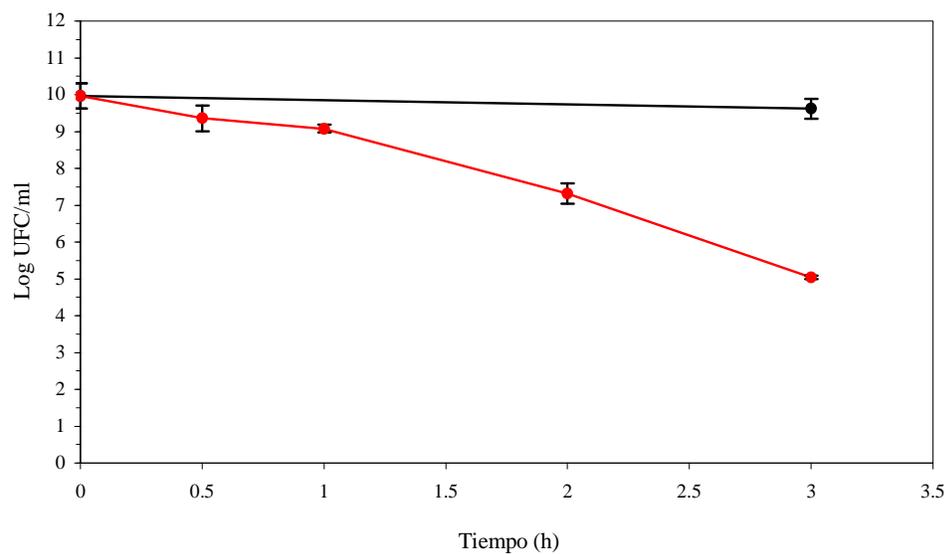


Fig. 10- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37r</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

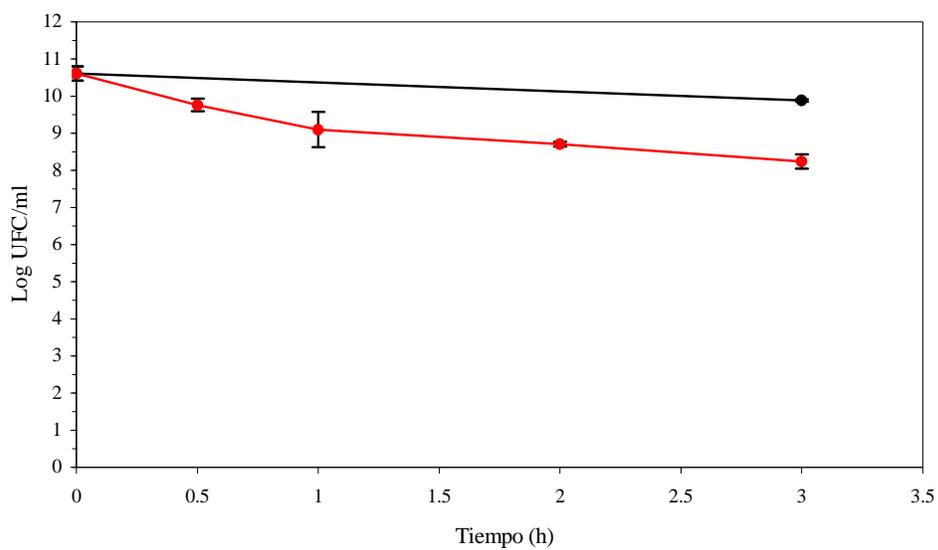


Fig. 11- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>64</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

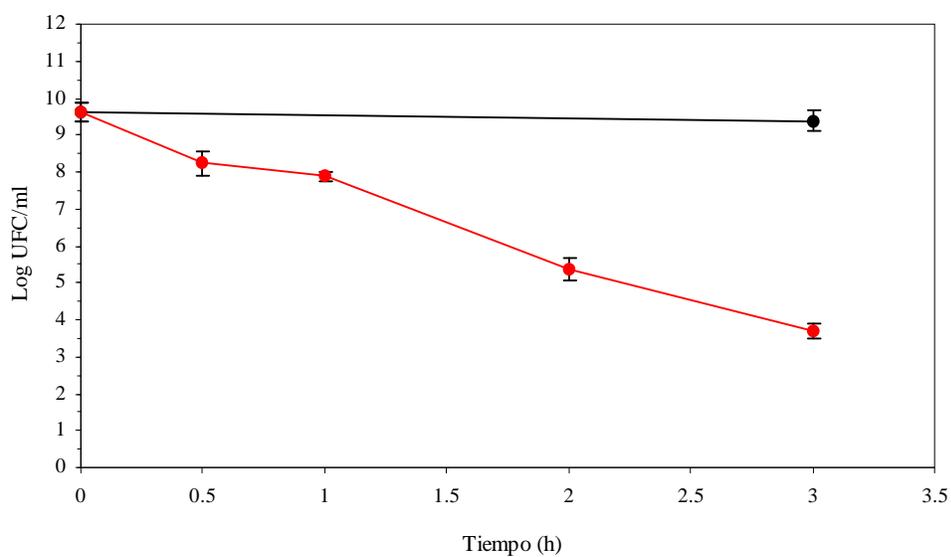


Fig. 12- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>83</sub> en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

primeros 60 minutos hubo una caída de 1.5 ordenes log. en sus recuentos celulares, incrementándose significativamente la muerte celular a partir de este momento, alcanzando el valor final de 5.5 ordenes log.

En cuanto a las cepas comerciales testeadas, la Figura 13 corresponde a *Lactobacillus acidophilus* La5. En ella se observa un descenso progresivo de 3 ordenes log. en los recuentos celulares, en el tiempo ensayado.

Por su parte, para *Lactobacillus casei* A13, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. Los primeros 60 minutos fueron significativamente letales para el microorganismo, ya que se produjo una fuerte caída en más de 3 ordenes log. en sus recuentos y luego de lo cual los mismos se mantuvieron prácticamente invariables.

Como puede observarse en todas las Figuras, la pérdida de viabilidad celular en los experimentos control, no resultaron significativas ( $p > 0.05$ ).

#### **4.4.3 Resistencia a la bilis.**

La inhibición del crecimiento bacteriano observado por el Ensayo de Difusión en Agar (EDA) fue, en todos los casos, de tipo parcial.

De las cuatro concentraciones de bilis ensayadas, 0.15% (p/v) no produjo efecto alguno sobre el desarrollo de los lactobacilos observándose los mismos resultados cuando se ensayó 0.3% (p/v) para los aislamientos de los individuos **2**, **3** y **6**. Para los restantes aislamientos, los halos de inhibición mostraron diámetros promedio de  $0.5 \pm 0.0$  cm para el individuo **1**,  $0.20 \pm 0.041$  cm para el individuo **4**, y  $0.13 \pm 0.047$  cm para el individuo **5**. Para

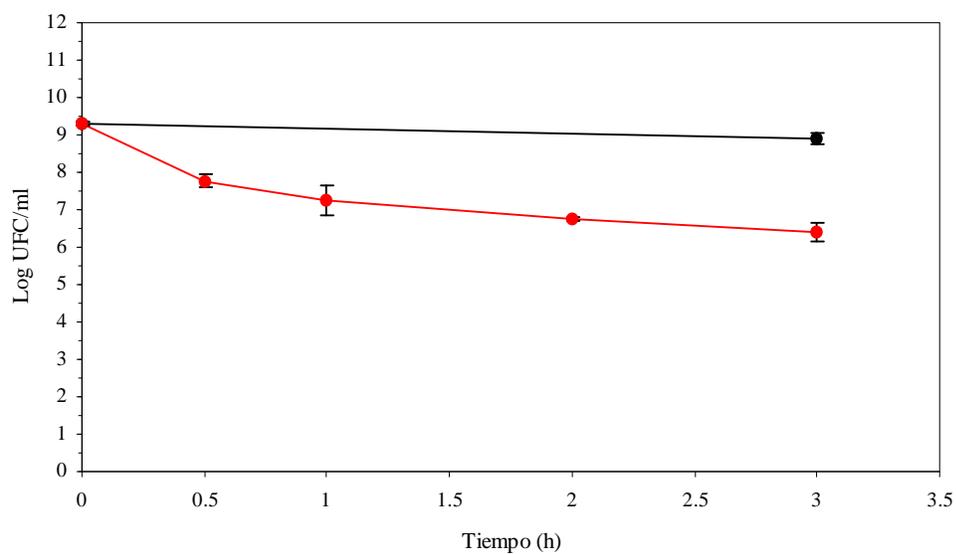


Fig. 13- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus acidophilus* La5 en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

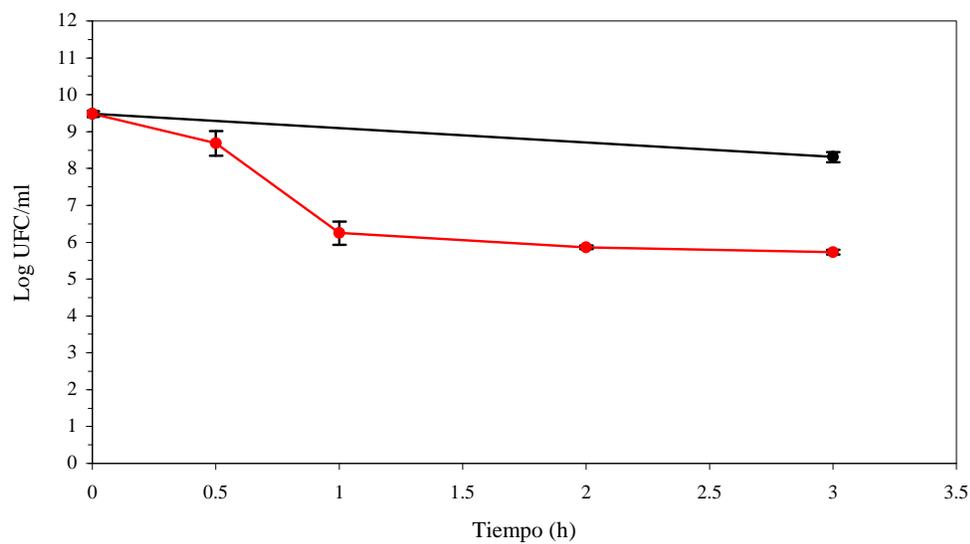


Fig. 14- Cinética de muerte celular de *Lactobacillus casei* A13 en solución gástrica (37°C, 3h, pH3) (●) y en buffer fosfato (control, ●), (valores medios de 3 determinaciones).

0.6 % de bilis, los halos de inhibición resultaron de  $0.6 \pm 0.057$  cm para el individuo **1**,  $0.3 \text{ cm} \pm 0.0$  (individuo **2**),  $0.44 \pm 0.061$  cm (individuo **4**),  $0.47 \pm 0.109$  (individuo **5**) y  $0.48 \pm 0.089$  cm (individuo **6**). Finalmente, para la concentración 1.0% (p/v) se observó una gran heterogeneidad en los halos de inhibición. Para el individuo **1** el promedio de los diámetros fue de  $0.70 \pm 0.119$  cm,  $0.5 \pm 0.0$  cm (individuo **2**),  $0.64 \pm 0.061$  cm (individuo **4**),  $0.73 \pm 0.141$  cm (individuo **5**) y  $0.68 \pm 0.134$  cm (individuo **6**). Resultó muy similar el comportamiento de los aislamientos de los individuos **4**, **5** y **6** frente a las concentraciones de bilis ensayadas.

Las cuatro cepas de *Lactobacillus gasseri* demostraron ser prácticamente resistentes a todas las concentraciones de bilis. Sólo se observó una ligera inhibición a 1.0% de bilis para los aislamientos F<sub>37</sub> y F<sub>37</sub>'.

La Tabla 14 muestra el tamaño de los halos de inhibición registrados para los aislamientos estudiados.

Por considerar suficientes los datos disponibles hasta este momento de la caracterización de los aislamientos, se realizó una evaluación comparativa entre éstos, para cada individuo. Dado que algunas de ellas mostraban un perfil fenotípico y propiedades bioquímicas idénticas, se descartaron algunos aislamientos para estudios posteriores, manteniendo los siguientes:

Individuo **1**: F<sub>3</sub>, F<sub>16</sub>, F<sub>20</sub>, F<sub>21</sub> y F<sub>22</sub>.

Individuos **2** y **3**: sin cambios.

Individuo **4**: F<sub>44</sub>, F<sub>49</sub>, F<sub>50</sub>, F<sub>53</sub>, F<sub>56</sub>, F<sub>57</sub>, F<sub>57</sub>\*, F<sub>58ch</sub>, F<sub>62</sub>, F<sub>63</sub>, F<sub>64</sub> y F<sub>64</sub>'.

Individuo **5**: F<sub>65</sub>, F<sub>67</sub>, F<sub>68a</sub>, F<sub>68b</sub>, F<sub>70</sub>, F<sub>71</sub>, F<sub>73</sub>, F<sub>74</sub>, F<sub>75</sub>, F<sub>77</sub>, F<sub>78</sub>, F<sub>79</sub>, F<sub>80</sub>, F<sub>81</sub> y F<sub>83</sub>.

Individuo **6**: F<sub>84</sub>, F<sub>85</sub>, F<sub>86</sub>, F<sub>93</sub>, F<sub>94</sub> y F<sub>95</sub>.

Tabla 14- Resistencia a la bilis de lactobacilos intestinales (Ensayo de Difusión en Agar - EDA).

Individuo	Aislamiento	Diámetros de halos de inhibición (cm) *			
		0.15% **	0.30% **	0.60% **	1.0% **
1	F <sub>3</sub>	0.0	0.0	0.6	0.8
	F <sub>16</sub>	0.0	0.0	0.0	0.5
	F <sub>18</sub>	0.0	0.0	0.5	0.6
	F <sub>19</sub>	0.0	0.0	0.6	0.6
	F <sub>20</sub>	0.0	0.5	0.6	0.8
	F <sub>21</sub>	0.0	0.0	0.6	0.8
	F <sub>22</sub>	0.0	0.5	0.7	0.8
2	F <sub>30</sub>	0.0	0.0	0.3	0.5
3	F <sub>37</sub>	0.0	0.0	0.0	0.3
	F <sub>37'</sub>	0.0	0.0	0.0	0.3
	F <sub>37'a</sub>	0.0	0.0	0.0	0.0
	F <sub>37''</sub>	0.0	0.0	0.0	0.0
4	F <sub>44</sub>	0.0	0.2	0.4	0.7
	F <sub>45</sub>	0.0	0.0	0.4	0.6
	F <sub>46</sub>	0.0	0.0	0.6	0.6
	F <sub>49</sub>	0.0	0.0	0.4	0.6
	F <sub>50</sub>	0.0	0.2	0.4	0.7
	F <sub>53</sub>	0.0	0.0	0.5	0.6
	F <sub>56</sub>	0.0	0.3	0.5	0.6
	F <sub>57</sub>	0.0	0.2	0.5	0.6
	F <sub>57'</sub>	0.0	0.2	0.5	0.7
	F <sub>57*</sub>	0.0	0.2	0.5	0.6
	F <sub>58g</sub>	0.0	0.2	0.4	0.6
	F <sub>58ch</sub>	0.0	0.2	0.4	0.6
	F <sub>62</sub>	0.0	0.2	0.4	0.8
	F <sub>63</sub>	0.0	0.2	0.4	0.6
	F <sub>64</sub>	0.0	0.1	0.4	0.7
	F <sub>64'</sub>	0.0	0.2	0.4	0.7
5	F <sub>65</sub>	0.0	0.2	0.4	0.6
	F <sub>66</sub>	0.0	0.1	0.5	0.8
	F <sub>67</sub>	0.0	0.1	0.5	0.6
	F <sub>68a</sub>	0.0	0.2	0.4	0.5

\* [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (cm)] (valor medio de 3 determinaciones).

\*\* Concentraciones de bilis ensayadas.

Tabla 14- Resistencia a la bilis de lactobacilos intestinales (Ensayo de Difusión en Agar - EDA)  
(continuación).

Individuo	Aislamiento	Diámetros de halos de inhibición (cm) *			
		0.15% **	0.30% **	0.60% **	1.0% **
5	F <sub>68b</sub>	0.0	0.1	0.3	0.6
	F <sub>69</sub>	0.0	0.1	0.6	0.7
	F <sub>70</sub>	0.0	0.2	0.4	0.5
	F <sub>71</sub>	0.0	0.2	0.3	0.5
	F <sub>72</sub>	0.0	0.2	0.3	0.7
	F <sub>73</sub>	0.0	0.1	0.5	0.6
	F <sub>74</sub>	0.0	0.1	0.4	0.8
	F <sub>75</sub>	0.0	0.1	0.4	0.7
	F <sub>76</sub>	0.0	0.2	0.5	0.8
	F <sub>77</sub>	0.0	0.3	0.3	0.9
	F <sub>78</sub>	0.0	0.2	0.4	0.5
	F <sub>79</sub>	0.0	0.1	0.4	0.6
	F <sub>80</sub>	0.0	0.2	0.4	0.7
	F <sub>81</sub>	0.0	0.2	0.5	0.7
F <sub>83</sub>	0.0	0.2	0.5	0.6	
6	F <sub>84</sub>	0.0	0.0	0.5	0.6
	F <sub>85</sub>	0.0	0.0	0.5	0.8
	F <sub>86</sub>	0.0	0.0	0.4	0.7
	F <sub>90</sub>	0.0	0.0	0.5	0.7
	F <sub>93</sub>	0.0	0.0	0.4	0.6
	F <sub>94</sub>	0.0	0.0	0.4	0.5
	F <sub>95</sub>	0.0	0.0	0.5	0.8

\* [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (cm)] (valor medio de 3 determinaciones).

\*\* Concentraciones de bilis ensayadas.

## **4.5 Caracterización probiótica de los aislamientos.**

### **4.5.1 Deconjugación de ácidos biliares.**

Se observó un desarrollo normal de colonias para todos los aislamientos en los medios adicionados de taurocolato y taurodeoxicolato de sodio. Sin embargo, sólo los cuatro aislamientos de *Lactobacillus gasseri* manifestaron actividad de deconjugación y precipitación de estos ácidos biliares, las cuales fueron intensas en el caso del taurodeoxicolato de sodio y moderada para el taurocolato de sodio.

También se observó un desarrollo normal para casi todos los aislamientos en el medio adicionado de glicolato de sodio, si bien no se observó actividad de deconjugación y precipitación del ácido biliar.

En el medio adicionado de glicodeoxicolato de sodio, no hubo desarrollo microbiano para la mayoría de los lactobacilos y en aquellos donde se observó desarrollo, éste fue muy débil. La actividad de deconjugación y precipitación del ácido biliar, también en este caso estuvo ausente.

La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 15- Desarrollo de lactobacilos intestinales en presencia de ácidos biliares.

Individuo	Aislamiento	MRS-TC (0.5%)		MRS-TDC (0.5%)		MRS-GC (0.5%)		MRS-GDC (0.5%)	
		Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga
1	F <sub>3</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>16</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>20</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>21</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>22</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
2	F <sub>30</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
3	F <sub>37</sub>	+	+	+	++	+	-	d	-
	F <sub>37'</sub>	+	+	+	++	+	-	d	-
	F <sub>37'a</sub>	+	+	+	++	+	-	d	-
	F <sub>37''</sub>	+	+	+	++	+	-	d	-
4	F <sub>44</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>49</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-
	F <sub>50</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>53</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>56</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>57</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>57*</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>58ch</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>62</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>63</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>64</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
F <sub>64'</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-	
5	F <sub>65</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>67</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>68a</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>68b</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>70</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>71</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>73</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>74</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>75</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>77</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-

+ desarrolla o deconjuga, - no desarrolla o no deconjuga.

++ intensa deconjugación, d desarrollo débil.

MRS-TC: agar MRS-Taurocolato de sodio

MRS-TDC: agar MRS-Taurodeoxicolato de sodio

MRS-GC: agar MRS-Glicolato de sodio

MRS-GDC: agar MRS-Glicodeoxicolato de sodio

Tabla 15- Desarrollo de lactobacilos intestinales en presencia de ácidos biliares (continuación).

Individuo	Aislamiento	MRS-TC (0.5%)		MRS-TDC (0.5%)		MRS-GC (0.5%)		MRS-GDC (0.5%)	
		Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga	Desarrolla	Deconjuga
<b>5</b>	F <sub>78</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>79</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>80</sub>	+	-	+	-	+	-	d	-
	F <sub>81</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
	F <sub>83</sub>	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>85</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>86</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>93</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>94</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-
	F <sub>95</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-

+ desarrolla o deconjuga, - no desarrolla o no deconjuga.

++ intensa deconjugación, d desarrollo débil.

MRS-TC: agar MRS-Taurocolato de sodio

MRS-TDC: agar MRS-Taurodeoxicolato de sodio

MRS-GC: agar MRS-Glicolato de sodio

MRS-GDC: agar MRS-Glicodeoxicolato de sodio

Luego, las Figuras 15, 16, 17, 18 y 19 permiten observar diferentes tipos de crecimiento por parte de los aislamientos en los distintos medios agarizados, y/o sus actividades de deconjugación; como así también crecimiento sin deconjugación; e incluso ausencia de crecimiento.

#### **4.5.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa).**

Para la totalidad de los aislamientos, se obtuvieron valores inferiores a 0.2 UM de actividad  $\beta$ -galactosidasa y por tanto se interpretó estos resultados como la falta de esta actividad enzimática en las cepas. Sin embargo, se observó un desarrollo óptimo en leche con coagulación de la misma (con excepción de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>67</sub>, F<sub>75</sub>, F<sub>76</sub> y F<sub>77</sub>), lo cual demostraría que los bacilos cuentan con otra enzima diferente de  $\beta$ -galactosidasa para la metabolización de la lactosa, posiblemente P- $\beta$ -galactosidasa. En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de actividad  $\beta$ -galactosidasa para la totalidad de los aislamientos.

#### **4.5.3 Hidrofobicidad.**

Para las cepas aisladas de los individuos **1** y **2**, se obtuvieron porcentajes de hidrofobicidad reducidos (entre 15% y 27%).

En cambio, para los cuatro aislamientos del individuo **3** los valores encontrados fueron bastante diferentes a los anteriores y a su vez muy variables (entre 9% y 53%).

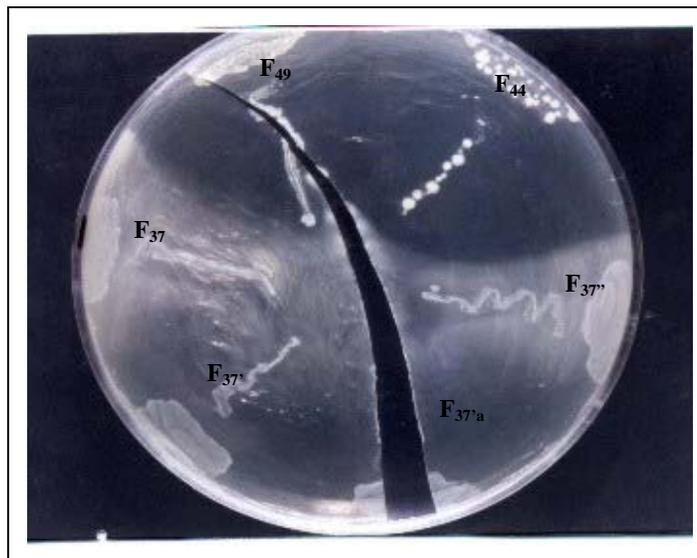


Fig. 15- Características del crecimiento de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub>, F<sub>37''</sub> y F<sub>37'a</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>44</sub> y F<sub>49</sub> en agar MRS-taurocolato de sodio 0.5%.



Fig. 16- Características del crecimiento de *Lact. gasseri* F<sub>37'</sub> y F<sub>37'a</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>44</sub>, F<sub>49</sub>, F<sub>50</sub>, y F<sub>53</sub> en agar MRS-taurocolato de sodio 0.5%.

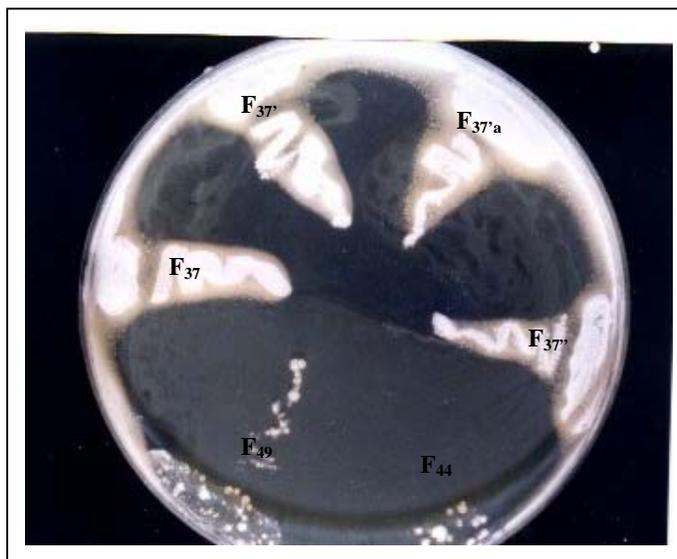


Fig. 17- Características del crecimiento de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub>, F<sub>37'a</sub> y F<sub>37''</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>44</sub> y F<sub>49</sub> en agar MRS-taurodeoxicolato de sodio 0.5%.

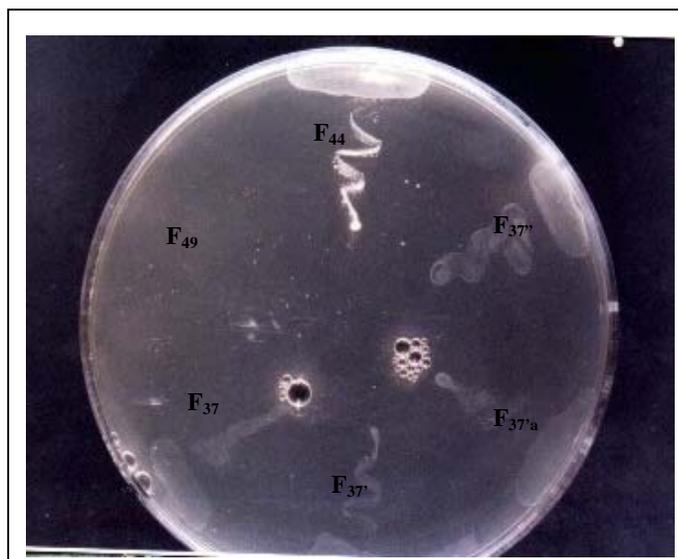


Fig. 18- Características del crecimiento de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub>, F<sub>37'a</sub> y F<sub>37''</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>44</sub> y F<sub>49</sub> en agar MRS-glicolato de sodio 0.5%.

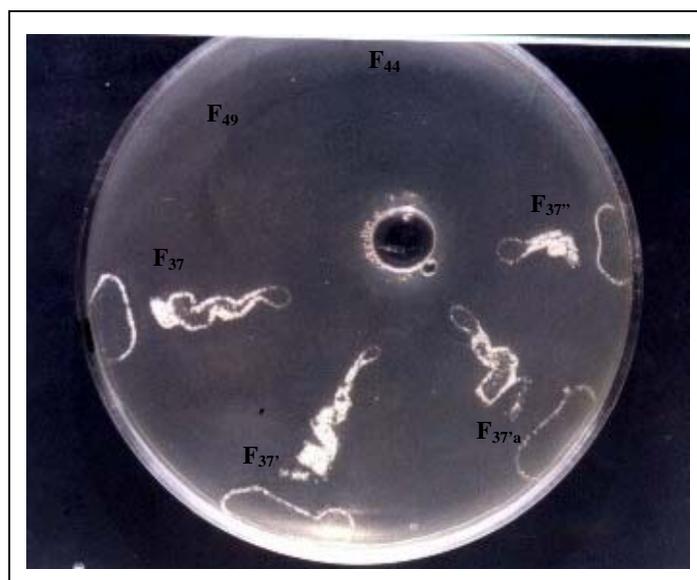


Fig. 19- Características del crecimiento de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub>, F<sub>37'a</sub> y F<sub>37''</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>44</sub> y F<sub>49</sub> (ausencia de desarrollo) en agar MRS-glicodeoxicolato de sodio 0.5%.

Para el individuo **4**, los porcentajes de hidrofobicidad variaron entre 18% y 36% (salvo para la cepa F<sub>64</sub>, cuyo valor fue de casi 50%). Para el individuo **5**, la mayoría de los aislamientos mostraron valores entre 15% y 30% aproximadamente, con excepción de uno de ellos (*Lactobacillus rhamnosus* F<sub>70</sub>) que demostró poseer una hidrofobicidad del 41%.

Finalmente, para el individuo **6**, los valores estuvieron comprendidos entre un 16% y 28%.

La Tabla 17 muestra los valores de % de Hidrofobicidad calculado según fórmula (ver 3.6.3).

La Figura 20 muestra la interfase orgánica (n-hexadecano)/acuosa (caldo MRS) teñida con Negro Sudán donde se observa la distribución de los bacilos entre ambas fases, en relación a su porcentaje de hidrofobicidad.

Tabla 16- Actividad de  $\beta$ -Galactosidasa para lactobacilos intestinales (Método de Miller modificado)  
(valores medios de 2 determinaciones).

<b>Individuo</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Unidades Miller (UM)</b>
<b>1</b>	F <sub>3</sub>	0.082
	F <sub>16</sub>	0.087
	F <sub>20</sub>	0.079
	F <sub>21</sub>	0.084
	F <sub>22</sub>	0.080
<b>2</b>	F <sub>30</sub>	0.078
<b>3</b>	F <sub>37</sub>	0.084
	F <sub>37'</sub>	0.090
	F <sub>37'a</sub>	0.095
	F <sub>37''</sub>	0.086
<b>4</b>	F <sub>44</sub>	0.088
	F <sub>49</sub>	0.085
	F <sub>50</sub>	0.087
	F <sub>53</sub>	0.078
	F <sub>56</sub>	0.074
	F <sub>57</sub>	0.082
	F <sub>57*</sub>	0.081
	F <sub>58ch</sub>	0.080
	F <sub>62</sub>	0.087
	F <sub>63</sub>	0.087
	F <sub>64</sub>	0.094
	F <sub>64'</sub>	0.097
<b>5</b>	F <sub>65</sub>	0.077
	F <sub>67</sub>	0.076
	F <sub>68a</sub>	0.103
	F <sub>68b</sub>	0.111
	F <sub>70</sub>	0.114
	F <sub>71</sub>	0.101
	F <sub>73</sub>	0.098
	F <sub>74</sub>	0.095
	F <sub>75</sub>	0.090
	F <sub>77</sub>	0.099
	F <sub>78</sub>	0.101
	F <sub>79</sub>	0.089
	F <sub>80</sub>	0.096
	F <sub>81</sub>	0.091
F <sub>83</sub>	0.085	

Tabla 16- Actividad de  $\beta$ -Galactosidasa para lactobacilos intestinales (Método de Miller modificado)  
(valores medios de 2 determinaciones) (continuación).

<b>Individuo</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Unidades Miller (UM)</b>
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	0.099
	F <sub>85</sub>	0.092
	F <sub>86</sub>	0.094
	F <sub>93</sub>	0.095
	F <sub>94</sub>	0.096
	F <sub>95</sub>	0.092

Tabla 17- Hidrofobicidad (%) de los aislamientos intestinales, medida luego de la partición de los mismos entre la fase polar (caldo MRS) y no polar (n-hexadecano).

<b>Individuo</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Hidrofobicidad (%)<sup>(*)</sup></b>
<b>1</b>	F <sub>3</sub>	27.04 ± 1.48
	F <sub>16</sub>	25.08 ± 1.37
	F <sub>20</sub>	15.04 ± 1.57
	F <sub>21</sub>	19.43 ± 1.71
	F <sub>22</sub>	23.48 ± 1.03
<b>2</b>	F <sub>30</sub>	27.15 ± 3.71
<b>3</b>	F <sub>37</sub>	53.15 ± 3.02
	F <sub>37'</sub>	9.21 ± 2.74
	F <sub>37'a</sub>	38.29 ± 3.58
	F <sub>37''</sub>	50.84 ± 6.97
<b>4</b>	F <sub>44</sub>	24.67 ± 2.48
	F <sub>49</sub>	22.68 ± 3.09
	F <sub>50</sub>	23.11 ± 1.72
	F <sub>53</sub>	35.97 ± 1.93
	F <sub>56</sub>	18.54 ± 2.53
	F <sub>57</sub>	31.69 ± 3.03
	F <sub>57*</sub>	23.43 ± 1.03
	F <sub>58ch</sub>	21.76 ± 5.97
	F <sub>62</sub>	35.79 ± 3.79
	F <sub>63</sub>	26.46 ± 0.39
	F <sub>64</sub>	49.51 ± 2.47
F <sub>64'</sub>	33.04 ± 2.21	
<b>5</b>	F <sub>65</sub>	27.62 ± 1.15
	F <sub>67</sub>	24.67 ± 1.54
	F <sub>68a</sub>	29.80 ± 3.38
	F <sub>68b</sub>	24.56 ± 13.66
	F <sub>70</sub>	41.06 ± 12.25
	F <sub>71</sub>	16.69 ± 4.41
	F <sub>73</sub>	26.20 ± 2.49
	F <sub>74</sub>	16.00 ± 1.22
	F <sub>75</sub>	17.82 ± 2.70
	F <sub>77</sub>	17.90 ± 0.89
	F <sub>78</sub>	21.77 ± 1.46
	F <sub>79</sub>	24.16 ± 0.72
	F <sub>80</sub>	22.09 ± 2.66
F <sub>81</sub>	21.20 ± 2.55	
F <sub>83</sub>	14.87 ± 2.09	
<b>6</b>	F <sub>84</sub>	27.89 ± 2.82
	F <sub>85</sub>	26.11 ± 2.52
	F <sub>86</sub>	26.28 ± 3.65
	F <sub>93</sub>	16.54 ± 2.79
	F <sub>94</sub>	16.09 ± 1.15
	F <sub>95</sub>	25.98 ± 1.28

(\*) Hidrofobicidad expresada en porcentaje promedio ± desviación standard (n= 3).



Fig. 20- Observación microscópica de la distribución de un lactobacilo intestinal entre las fases orgánica y acuosa (contraste de fases, 1000 x).

#### 4.5.4. Inhibición de bacterias patógenas.

Prácticamente todos los aislamientos demostraron tener algún efecto inhibitorio frente a las cuatro bacterias indicadoras patógenas usadas.

Frente a *Salmonella* OMS-Ca, todos los lactobacilos, excepto *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>83</sub> (que no mostró efecto alguno) demostraron un poder inhibitorio total, con un diámetro promedio de los halos de inhibición de  $0.94 \pm 0.23$  cm.

Frente a *Staphylococcus aureus* 76, se observó en la mayoría de los casos una inhibición de tipo parcial, siendo el diámetro promedio de los halos registrados de  $0.81 \pm 0.27$

cm. Sólo hubo un caso de inhibición total entre los aislamientos del individuo **3** (*Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub>), dos para el individuo **4** (*Lactobacillus rhamnosus* F<sub>53</sub> y F<sub>64</sub>), dos para el individuo **6** (*Lactobacillus rhamnosus* F<sub>93</sub> y F<sub>95</sub>).

Frente a *Escherichia coli* V517, y exceptuando los *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>84</sub>, F<sub>85</sub> y F<sub>86</sub>, que ejercieron un poder inhibitorio parcial, el resto de los aislamientos demostró un efecto inhibitorio total, con diámetros para los halos de inhibición formados, de  $0.73 \pm 0.24$  cm.

Con respecto a *Listeria monocytógenes* ATCC 15313, la mayoría de los aislamientos ejercieron un efecto inhibitorio total, con excepción de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>70</sub> y F<sub>86</sub> que no lo evidenciaron. Para los primeros, el promedio del diámetro de los halos fue de  $0.99 \pm 0.27$  cm.

La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos en el Ensayo de Difusión en Agar (EDA) empleado para evaluar el poder inhibitorio de los lactobacilos intestinales frente a las bacterias patógenas usadas.

La Figura 21 muestra una observación macroscópica del EDA donde se ensayaron cinco SLC de los lactobacilos intestinales frente a *Staphylococcus aureus* 76 (pátina).

Tabla 18- Poder inhibitorio de los aislamientos intestinales frente a *Salmonella* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *Escherichia coli* V517 y *Listeria monocytógenes* ATCC 15313 (Método EDA).

Individuo	SLC del aislamiento	Diámetro halos de inhibición (cm) <sup>(1)</sup>			
		<i>Salmonella</i> OMS-Ca	<i>Staphylococcus aureus</i> N°76	<i>Escherichia coli</i> V517	<i>Listeria monocytógenes</i> ATCC N°15313
1	F <sub>3</sub>	1.08 <sup>t</sup>	0.82 <sup>P</sup>	0.80 <sup>t</sup>	1.17 <sup>t</sup>
	F <sub>16</sub>	1.19 <sup>t</sup>	0.91 <sup>P</sup>	0.91 <sup>t</sup>	1.49 <sup>t</sup>
	F <sub>20</sub>	1.04 <sup>t</sup>	1.06 <sup>P</sup>	0.69 <sup>t</sup>	1.89 <sup>t</sup>
	F <sub>21</sub>	0.89 <sup>t</sup>	0.63 <sup>P</sup>	0.49 <sup>t</sup>	0.62 <sup>t</sup>
	F <sub>22</sub>	1.00 <sup>t</sup>	0.83 <sup>P</sup>	0.90 <sup>t</sup>	0.90 <sup>t</sup>
2	F <sub>30</sub>	1.18 <sup>t</sup>	0.97 <sup>P</sup>	0.81 <sup>t</sup>	1.03 <sup>t</sup>
3	F <sub>37</sub>	1.42 <sup>t</sup>	1.07 <sup>t</sup>	1.06 <sup>t</sup>	1.05 <sup>t</sup>
	F <sub>37'</sub>	0.84 <sup>t</sup>	0.68 <sup>P</sup>	0.86 <sup>t</sup>	0.91 <sup>t</sup>
	F <sub>37'a</sub>	1.09 <sup>t</sup>	1.05 <sup>P</sup>	0.85 <sup>t</sup>	1.12 <sup>t</sup>
	F <sub>37''</sub>	0.83 <sup>t</sup>	0.84 <sup>P</sup>	0.67 <sup>t</sup>	0.59 <sup>t</sup>
4	F <sub>44</sub>	0.85 <sup>t</sup>	0.61 <sup>P</sup>	0.74 <sup>t</sup>	0.77 <sup>t</sup>
	F <sub>49</sub>	0.44 <sup>t</sup>	0.00	0.42 <sup>t</sup>	0.55 <sup>t</sup>
	F <sub>50</sub>	0.66 <sup>t</sup>	0.59 <sup>P</sup>	0.21 <sup>t</sup>	0.90 <sup>t</sup>
	F <sub>53</sub>	1.17 <sup>t</sup>	0.69 <sup>t</sup>	0.97 <sup>t</sup>	1.07 <sup>t</sup>
	F <sub>56</sub>	1.07 <sup>t</sup>	1.17 <sup>P</sup>	0.60 <sup>t</sup>	1.14 <sup>t</sup>
	F <sub>57</sub>	0.95 <sup>t</sup>	1.25 <sup>P</sup>	0.77 <sup>t</sup>	0.99 <sup>t</sup>
	F <sub>57*</sub>	0.84 <sup>t</sup>	1.12 <sup>P</sup>	0.80 <sup>t</sup>	0.95 <sup>t</sup>
	F <sub>58ch</sub>	0.92 <sup>t</sup>	0.96 <sup>P</sup>	0.84 <sup>t</sup>	0.90 <sup>t</sup>
	F <sub>62</sub>	0.82 <sup>t</sup>	1.12 <sup>P</sup>	0.87 <sup>t</sup>	1.13 <sup>t</sup>
	F <sub>63</sub>	1.02 <sup>t</sup>	1.09 <sup>P</sup>	0.88 <sup>t</sup>	1.08 <sup>t</sup>
	F <sub>64</sub>	1.35 <sup>t</sup>	1.17 <sup>t</sup>	1.32 <sup>t</sup>	1.30 <sup>t</sup>
F <sub>64'</sub>	1.11 <sup>t</sup>	0.21 <sup>P</sup>	0.64 <sup>t</sup>	1.41 <sup>t</sup>	
5	F <sub>65</sub>	1.16 <sup>t</sup>	0.93 <sup>P</sup>	0.83 <sup>t</sup>	1.46 <sup>t</sup>
	F <sub>67</sub>	0.96 <sup>t</sup>	1.02 <sup>P</sup>	0.93 <sup>t</sup>	1.53 <sup>t</sup>
	F <sub>68a</sub>	1.07 <sup>t</sup>	0.92 <sup>P</sup>	0.92 <sup>t</sup>	1.38 <sup>t</sup>
	F <sub>68b</sub>	0.97 <sup>t</sup>	0.78 <sup>P</sup>	0.90 <sup>t</sup>	1.52 <sup>t</sup>
	F <sub>70</sub>	0.34 <sup>t</sup>	0.00	0.21 <sup>t</sup>	0.00
	F <sub>71</sub>	1.13 <sup>t</sup>	0.40 <sup>P</sup>	0.75 <sup>t</sup>	0.88 <sup>P</sup>
	F <sub>73</sub>	0.65 <sup>t</sup>	0.16 <sup>P</sup>	0.59 <sup>t</sup>	0.73 <sup>t</sup>
	F <sub>74</sub>	0.92 <sup>t</sup>	0.49 <sup>P</sup>	0.85 <sup>t</sup>	1.15 <sup>t</sup>
	F <sub>75</sub>	1.23 <sup>t</sup>	0.80 <sup>P</sup>	0.95 <sup>t</sup>	1.26 <sup>t</sup>
	F <sub>77</sub>	1.12 <sup>t</sup>	0.83 <sup>P</sup>	0.99 <sup>t</sup>	1.20 <sup>t</sup>
	F <sub>78</sub>	1.06 <sup>t</sup>	0.75 <sup>P</sup>	0.83 <sup>t</sup>	0.90 <sup>t</sup>
	F <sub>79</sub>	0.75 <sup>t</sup>	0.22 <sup>P</sup>	0.63 <sup>t</sup>	0.66 <sup>t</sup>
	F <sub>80</sub>	1.14 <sup>t</sup>	0.00	0.65 <sup>t</sup>	1.06 <sup>t</sup>
	F <sub>81</sub>	0.90 <sup>t</sup>	0.83 <sup>P</sup>	0.75 <sup>t</sup>	1.08 <sup>t</sup>
	F <sub>83</sub>	0.00	0.00	0.87 <sup>t</sup>	0.68 <sup>t</sup>

<sup>(1)</sup> [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (cm)] (valor medio de 3 determinaciones).

<sup>P</sup> halos de inhibición parcial. <sup>t</sup> halos de inhibición total. SLC Sobrenadante Libre de Células.

Tabla 18- Poder inhibitorio de los aislamientos intestinales frente a *Salmonella* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *Escherichia coli* V517 y *Listeria monocytógenes* ATCC 15313 (Método EDA) (continuación).

Individuo	SLC del aislamiento	Diámetro halos de inhibición (cm) <sup>(1)</sup>			
		<i>Salmonella</i> OMS-Ca	<i>Staphylococcus aureus</i> N°76	<i>Escherichia coli</i> V517	<i>Listeria monocytógenes</i> ATCC N°15313
6	F <sub>84</sub>	0.74 <sup>t</sup>	0.00	0.49 <sup>p</sup>	0.67 <sup>t</sup>
	F <sub>85</sub>	0.82 <sup>t</sup>	0.00	0.45 <sup>p</sup>	0.61 <sup>t</sup>
	F <sub>86</sub>	0.40 <sup>t</sup>	0.00	0.50 <sup>p</sup>	0.00
	F <sub>93</sub>	0.84 <sup>t</sup>	0.56 <sup>t</sup>	0.19 <sup>t</sup>	0.89 <sup>t</sup>
	F <sub>94</sub>	0.95 <sup>t</sup>	0.00	0.38 <sup>t</sup>	0.74 <sup>t</sup>
	F <sub>95</sub>	0.68 <sup>t</sup>	0.75 <sup>t</sup>	0.45 <sup>t</sup>	0.56 <sup>t</sup>

<sup>(1)</sup> [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (cm)] (valor medio de 3 determinaciones).

<sup>p</sup> halos de inhibición parcial. <sup>t</sup> halos de inhibición total. **SLC** Sobrenadante Libre de Células.

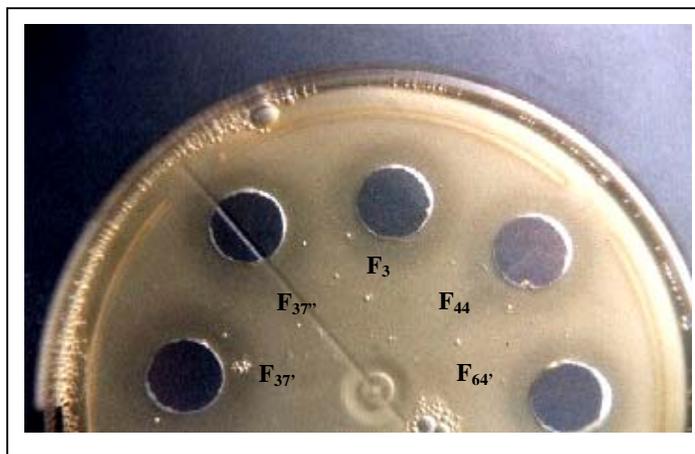


Fig. 21- Capacidad inhibitoria de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub>, F<sub>37'</sub> y *Lact. rhamnosus* F<sub>3</sub>, F<sub>44</sub> y F<sub>64'</sub> frente a *Staphylococcus aureus* 76 (Método EDA).

## 4.6 Caracterización tecnológica de los aislamientos.

### 4.6.1 Resistencia al pH.

Se observó un desarrollo normal para la totalidad de los lactobacilos aislados en los medios de cultivo a pH 5.0 y 5.5. En cambio, para pH 4.5 se obtuvieron resultados muy dispares, ya que aproximadamente el 50% del total de los aislamientos de cada individuo mostró un desarrollo débil en esas condiciones.

La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla 19- Resistencia al pH, sales y compuestos de aroma de lactobacilos intestinales (Método Desarrollo en Medio Líquido-DML).

Individuo	Aislamiento	pH			NaCl (% p/v)			KCl (%p/v)			Diacetilo (ppm)		Acetaldehído (ppm)	
		4.5	5.0	5.5	1.0	2.0	3.0	1.0	2.0	3.0	1000	2500	1000	2500
<b>1</b>	F <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>16</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
	F <sub>20</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>21</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>22</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	d
<b>2</b>	F <sub>30</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<b>3</b>	F <sub>37</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d	-
	F <sub>37'</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d	-
	F <sub>37'a</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
	F <sub>37''</sub>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<b>4</b>	F <sub>44</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
	F <sub>49</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>50</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>53</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	+	d
	F <sub>56</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>57</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
	F <sub>57*</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
	F <sub>58ch</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>62</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>63</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
	F <sub>64</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
F <sub>64'</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d	
<b>5</b>	F <sub>65</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
	F <sub>67</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
	F <sub>68a</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
	F <sub>68b</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	F <sub>70</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d
	F <sub>71</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>73</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>74</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>75</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>77</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>78</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F <sub>79</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d

- Ausencia de desarrollo, d desarrollo débil, + desarrollo normal.

Tabla 19- Resistencia al pH, sales y compuestos de aroma de lactobacilos intestinales (Método Desarrollo en Medio Líquido-DML) (continuación).

Individuo	Aislamiento	pH			NaCl (% p/v)			KCl (%p/v)			Diacetilo (ppm)		Acetaldehído (ppm)	
		4.5	5.0	5.5	1.0	2.0	3.0	1.0	2.0	3.0	1000	2500	1000	2500
5	F <sub>80</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	-
	F <sub>81</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>83</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
6	F <sub>84</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>85</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>86</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	F <sub>93</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d
	F <sub>94</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d
	F <sub>95</sub>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

- Ausencia de desarrollo, d desarrollo débil, + desarrollo normal.

#### **4.6.2 Resistencia a sales.**

Los aislamientos no fueron afectados en su desarrollo por la presencia de las sales NaCl y KCl, a las concentraciones de 1%, 2% y 3 % (p/v). La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

#### **4.6.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído).**

Tanto para el diacetilo como acetaldehído, se observó un importante efecto inhibitor en el desarrollo de los lactobacilos intestinales a la concentración de 2500 ppm, para la cual se obtuvieron resultados de desarrollo débil e inhibición completa del mismo para la mayoría de los aislamientos (tanto *Lactobacillus rhamnosus* como *Lactobacillus gasseri*), con excepción de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>65</sub>, F<sub>68a</sub>, F<sub>71</sub>, F<sub>73</sub>, F<sub>74</sub> y F<sub>83</sub> (individuo **5**) y *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>84</sub>, F<sub>85</sub>, F<sub>86</sub> y F<sub>95</sub> (individuo **6**), los cuales demostraron un desarrollo óptimo a 2500 ppm para el compuesto acetaldehído. Para la mayoría de los lactobacilos el diacetilo en la concentración de 1000 ppm resultó ser mucho más inhibitorio del desarrollo celular que el acetaldehído a la misma concentración.

La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos en este ensayo.

#### **4.6.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada y conservada a 5°C.**

Para la mayoría de los aislamientos se obtuvo una buena sobrevida en leche para las condiciones estudiadas de pH y temperatura. Todas las caídas registradas en los recuentos celulares, respecto a sus controles, fueron inferiores a 1 orden log. En algunos casos se observó desarrollo celular, obteniéndose diferencias negativas (inferiores a 1 orden log.). Un comportamiento opuesto manifestó el aislamiento F<sub>53</sub> del individuo **4**, ya que a pH 4 su recuento celular disminuyó más de 6 ordenes log.

La Tabla 20 resume los resultados obtenidos para la sobrevida de los lactobacilos intestinales bajo las condiciones antes mencionadas. En la sección Anexo la Tabla 24 muestra de manera más detallada los resultados de los recuentos expresados en órdenes logarítmicos y sus respectivas variaciones al cabo de cuatro semanas de refrigeración.

#### **4.6.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters.**

##### **4.6.5.a** Evaluación del efecto producido por SLC de lactobacilos intestinales sobre el desarrollo de bacterias lácticas de starters.

No se observó actividad inhibitoria alguna (Ensayo de Difusión en Agar) del SLC de

Tabla 20- Sobrevida de los lactobacilos intestinales en leche acidificada a 5°C (valores medios de 2 determinaciones).

Individuo	Aislamiento	Diferencia C <sup>(1)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Diferencia pH4 <sup>(2)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )	Diferencia pH 5 <sup>(3)</sup> (log UFC ml <sup>-1</sup> )
1	F <sub>3</sub>	0.15	0.24	0.15
	F <sub>16</sub>	0.40*	0.19	0.25
	F <sub>20</sub>	0.17	0.69*	0.43*
	F <sub>21</sub>	0.30	0.20	0.53
	F <sub>22</sub>	0.07	0.34	0.19
2	F <sub>30</sub>	0.25*	0.16*	0.23*
3	F <sub>37</sub>	0.93	0.76	0.75
	F <sub>37'</sub>	0.30	0.12	0.19
	F <sub>37'a</sub>	0.44	0.24	0.72
	F <sub>37''</sub>	0.19	0.38*	0.04
4	F <sub>44</sub>	0.17	0.09	0.22
	F <sub>49</sub>	0.22*	0.01*	0.12*
	F <sub>50</sub>	0.19	0.04*	0.18
	F <sub>53</sub>	0.48*	6.39	0.53*
	F <sub>56</sub>	0.36*	0.20*	0.20*
	F <sub>57</sub>	0.44	0.22	0.60
	F <sub>57*</sub>	0.40	0.39	0.23
	F <sub>58ch</sub>	0.42*	0.31*	0.37*
	F <sub>62</sub>	0.16*	0.14*	0.03*
	F <sub>63</sub>	0.18*	0.06*	0.05*
	F <sub>64</sub>	0.36	0.02	0.04*
	F <sub>64'</sub>	0.03	0.17*	0.03*
5	F <sub>65</sub>	1.20*	1.15*	1.10*
	F <sub>67</sub>	0.07*	0.04*	0.04
	F <sub>68a</sub>	0.14*	0.23*	0.22*
	F <sub>68b</sub>	0.31*	0.07	0.07*
	F <sub>70</sub>	0.14*	0.07*	0.21*
	F <sub>71</sub>	0.12	0.38	0.49
	F <sub>73</sub>	0.08*	0.09*	0.08*
	F <sub>74</sub>	0.06*	0.50*	0.27*
	F <sub>75</sub>	0.94	0.12	0.15*
	F <sub>77</sub>	0.23	0.35	0.60
	F <sub>78</sub>	0.06*	0.10*	0.18
	F <sub>79</sub>	0.67	0.11*	0.04
	F <sub>80</sub>	0.14*	0.33*	0.24*
	F <sub>81</sub>	0.14	0.29*	0.12
F <sub>83</sub>	0.42	0.35	0.44	
6	F <sub>84</sub>	0.12*	0.14	0.10
	F <sub>85</sub>	0.37*	0.13*	0.36*
	F <sub>86</sub>	0.19*	0.50*	0.58*
	F <sub>93</sub>	0.62	0.78*	0.16*
	F <sub>94</sub>	1.22	0.36	0.29
	F <sub>95</sub>	0.16*	0.27*	0.13

<sup>(1)</sup>Diferencia entre los recuentos correspondientes a t 30 días y t 0 días para el Control, <sup>(2)</sup> pH 4 y <sup>(3)</sup> pH 5.

\* Incremento en los recuentos.

todos los lactobacilos intestinales frente a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 y Hb2. En cambio, se registraron halos de inhibición de diferentes diámetros cuando se los enfrentó a las demás especies de bacterias lácticas.

Tanto para *Lactococcus lactis* A6 y Mo12 como para *Streptococcus thermophilus* 176 y A4, prácticamente todos los lactobacilos ejercieron un efecto de inhibición parcial del crecimiento con halos promedios de  $0.90 \pm 0.09$ cm y  $0.75 \pm 0.17$  cm para las 2 cepas de lactococos, y  $1.41 \pm 0.17$  cm y  $1.31 \pm 0.19$  cm para los estreptococos, respectivamente. Sin embargo, hubo tres aislamientos del individuo **6** que no produjeron efecto alguno sobre *Lactococcus lactis* Mo12 y dos de ellos tampoco ejercieron efecto alguno sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* A6.

La Tabla 21 muestra los efectos producidos por el SLC de los lactobacilos intestinales sobre el desarrollo de las bacterias lácticas.

**4.6.5.b** Evaluación del efecto producido por SLC de *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1, *Strep. thermophilus* 176 y *L. lactis* Mo12 sobre el desarrollo de lactobacilos intestinales.

Al estudiar la presencia de agentes inhibidores en SLC de las bacterias lácticas de starters sobre el desarrollo de los lactobacilos intestinales, no se detectó efecto alguno.

Tabla 21- Poder inhibitorio de SLC de los aislamientos intestinales sobre el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 y Hb2, *Lactococcus lactis* A6 y Mo12 y *Streptococcus thermophilus* 176 y A4 (Método EDA).

Individuo	SLC del aislamiento	Diámetro halos de inhibición (cm) <sup>(1)</sup>					
		<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ab1	<i>Lact. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Hb2	<i>L. lactis</i> A6	<i>L. lactis</i> Mo12	<i>Streptococcus thermophilus</i> 176	<i>Streptococcus thermophilus</i> A4
1	F <sub>3</sub>	0.00	0.00	0.96	1.02	1.26	1.40
	F <sub>16</sub>	0.00	0.00	0.82	1.08	1.12	1.35
	F <sub>20</sub>	0.00	0.00	0.83	0.61	1.48	1.22
	F <sub>21</sub>	0.00	0.00	0.91	0.95	1.63	1.30
	F <sub>22</sub>	0.00	0.00	1.02	0.68	1.41	1.30
2	F <sub>30</sub>	0.00	0.00	0.95	0.66	1.38	1.24
3	F <sub>37</sub>	0.00	0.00	0.97	1.00	1.73	1.59
	F <sub>37'</sub>	0.00	0.00	0.90	0.82	1.59	1.31
	F <sub>37'a</sub>	0.00	0.00	0.93	0.75	1.68	1.48
	F <sub>37''</sub>	0.00	0.00	0.74	0.38	1.33	1.06
4	F <sub>44</sub>	0.00	0.00	0.83	0.77	1.41	1.59
	F <sub>49</sub>	0.00	0.00	0.96	0.54	1.33	1.45
	F <sub>50</sub>	0.00	0.00	0.92	0.76	1.28	1.40
	F <sub>53</sub>	0.00	0.00	0.80	0.90	1.49	1.26
	F <sub>56</sub>	0.00	0.00	1.05	0.79	1.45	1.16
	F <sub>57</sub>	0.00	0.00	0.86	0.34	1.26	1.25
	F <sub>57*</sub>	0.00	0.00	0.68	0.00	1.39	1.43
	F <sub>58ch</sub>	0.00	0.00	0.91	1.08	1.89	1.44
	F <sub>62</sub>	0.00	0.00	0.77	0.52	1.40	1.38
	F <sub>63</sub>	0.00	0.00	0.84	0.47	1.23	1.32
	F <sub>64</sub>	0.00	0.00	0.92	0.65	1.50	1.16
F <sub>64'</sub>	0.00	0.00	0.85	0.89	1.46	1.26	
5	F <sub>65</sub>	0.00	0.00	1.10	0.95	1.47	1.27
	F <sub>67</sub>	0.00	0.00	0.98	0.76	1.46	1.52
	F <sub>68a</sub>	0.00	0.00	0.86	0.69	1.17	1.11
	F <sub>68b</sub>	0.00	0.00	0.98	0.92	1.24	1.30
	F <sub>70</sub>	0.00	0.00	0.83	0.96	1.37	1.02
	F <sub>71</sub>	0.00	0.00	0.75	0.61	1.41	1.13
	F <sub>73</sub>	0.00	0.00	0.72	0.85	1.27	1.38
	F <sub>74</sub>	0.00	0.00	0.92	0.68	1.13	1.23
	F <sub>75</sub>	0.00	0.00	0.94	0.78	1.78	1.54
	F <sub>77</sub>	0.00	0.00	1.03	0.74	1.60	1.19
	F <sub>78</sub>	0.00	0.00	1.02	0.90	1.59	1.57
	F <sub>79</sub>	0.00	0.00	0.84	0.83	1.23	1.45
	F <sub>80</sub>	0.00	0.00	0.86	0.67	1.32	1.21
	F <sub>81</sub>	0.00	0.00	0.90	0.69	1.53	1.94
F <sub>83</sub>	0.00	0.00	0.87	0.68	1.34	1.04	
6	F <sub>84</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	1.28	1.21
	F <sub>85</sub>	0.00	0.00	0.94	0.00	1.31	1.14
	F <sub>86</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.80
	F <sub>93</sub>	0.00	0.00	0.99	0.50	1.34	1.17
	F <sub>94</sub>	0.00	0.00	0.00	0.77	1.41	1.35
	F <sub>95</sub>	0.00	0.00	0.93	0.58	1.36	1.37

<sup>(1)</sup> [diámetro halo de inhibición (cm) – diámetro del hoyo (cm)] (valor medio de 3 determinaciones).

**4.6.5.c** Determinación de la naturaleza del agente inhibidor presente en SLC de *Lact. gasseri* F<sub>37</sub> frente a *Strept. thermophilus* 176, *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 y *Lactococcus lactis* Mo12.

Como puede observarse en la Figura 22, el inhibidor encontrado en el SLC del *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> sobre el crecimiento de *Strept. thermophilus* 176 es de naturaleza ácida ya que en las situaciones donde se evaluó la presencia de compuestos termosensibles y de naturaleza proteica, al neutralizar la posible presencia de éstos el bacilo igualmente fue inhibido; en cambio cuando se trató el SLC con un álcali no se registró dicho efecto.

Por otro lado, la Figura 23 muestra los resultados obtenidos cuando se adicionó SLC de este mismo lactobacilo intestinal a un cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1. En este caso, puede apreciarse una contribución mayor en el efecto inhibidor por parte de **sustancias de naturaleza proteica** (probablemente bacteriocinas) y, en menor medida, por **ácidos orgánicos**.

La Figura 24 muestra los resultados obtenidos al ensayar el SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> frente a *Lactococcus lactis* Mo12. En ella se aprecia claramente, que el agente responsable de la inhibición de crecimiento del lactococo es un compuesto de naturaleza ácida, producto del metabolismo del lactobacilo intestinal.

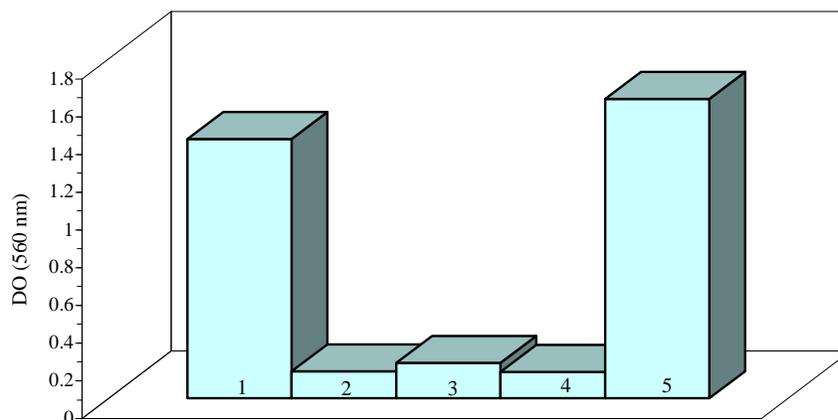


Fig. 22- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> sobre el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 176. (1) Control estreptococo, (2) estreptococo y SLC tal cual, (3) estreptococo y SLC tratado térmicamente, (4) estreptococo y SLC tratado con pepsina y (5) estreptococo y SLC adicionado de NaOH (37°C, 24h) (valores medios de 2 determinaciones).

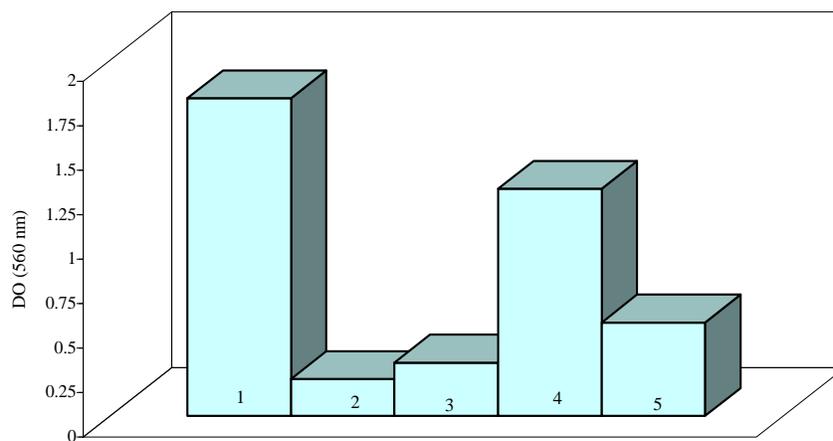


Fig. 23- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> sobre el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1. (1) Control lactobacilo, (2) lactobacilo y SLC tal cual, (3) lactobacilo y SLC tratado térmicamente, (4) lactobacilo y SLC tratado con pepsina y (5) lactobacilo y SLC adicionado de NaOH (37°C, 24h) (valores medios de 2 determinaciones).

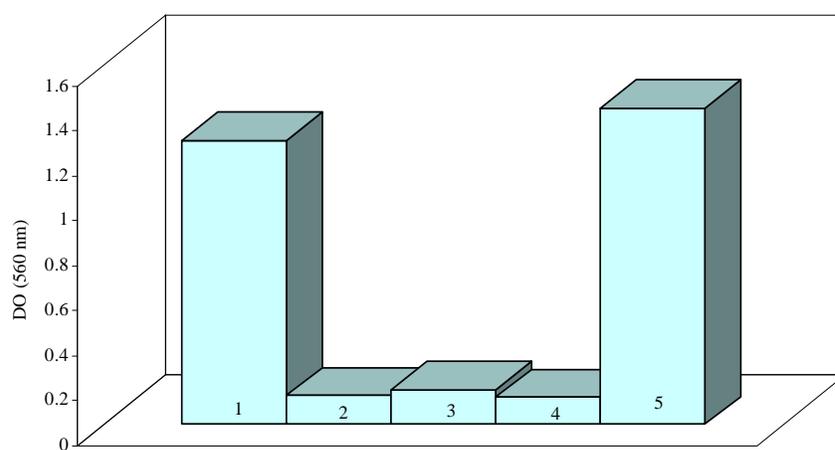


Fig. 24- Naturaleza del agente inhibidor del SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* Mo12. (1) Control lactococo, (2) lactococo y SLC tal cual, (3) lactococo y SLC tratado térmicamente, (4) lactococo y SLC adicionado de NaOH y (5) lactococo y SLC tratado con pepsina (37°C, 24h) (valores medios de 2 determinaciones).

**3.6.5.d** Efecto de SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub><sup>o</sup> y *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>71</sub> frente a bacterias lácticas de starters (cinéticas de crecimiento).

La Figura 25 muestra la cinética de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 176, en presencia y ausencia del SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub><sup>o</sup>. Comparando ambas curvas puede observarse que el SLC del lactobacilo intestinal produjo una inhibición total sobre el desarrollo del streptococo. Por el contrario, la Figura 26 muestra que cuando se agregó el SLC del streptococo al cultivo de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub><sup>o</sup>, no se registró efecto alguno sobre el desarrollo.

La Figura 27 por su parte, muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 con y sin agregado del SLC del *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub><sup>o</sup>. En este caso, también se produjo una inhibición total por parte del lactobacilo intestinal sobre el desarrollo del lactobacilo de origen comercial. La situación inversa, que se muestra en la Figura 28, en cambio muestra que éste último lactobacilo sólo produce un leve efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub><sup>o</sup>.

En la Figura 29 se observa el efecto producido por el agregado del SLC de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>71</sub> a un cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1, el cual se manifestó como un retardo en el crecimiento del lactobacilo comercial (es decir una inhibición parcial) pero que se revierte al cabo de las 20 h de incubación aproximadamente ya que a las 24h se obtuvo una D.O. que incluso superó a la correspondiente al control (lactobacilo comercial sin SLC). Por otro lado, la Figura 30 muestra resultados muy similares para la situación inversa. Es decir que, también el agregado de SLC del lactobacilo comercial ha producido una inhibición parcial en el desarrollo del lactobacilo intestinal.

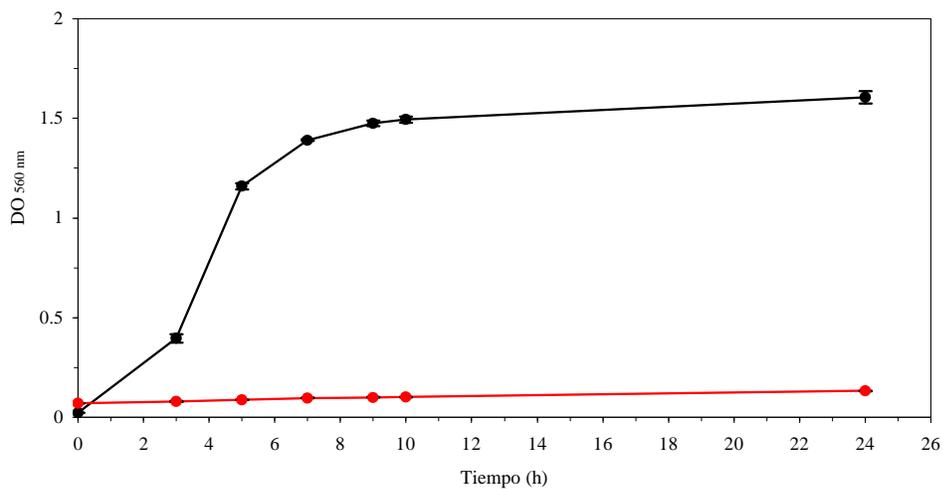


Fig. 25- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Streptococcus thermophilus* 176 control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

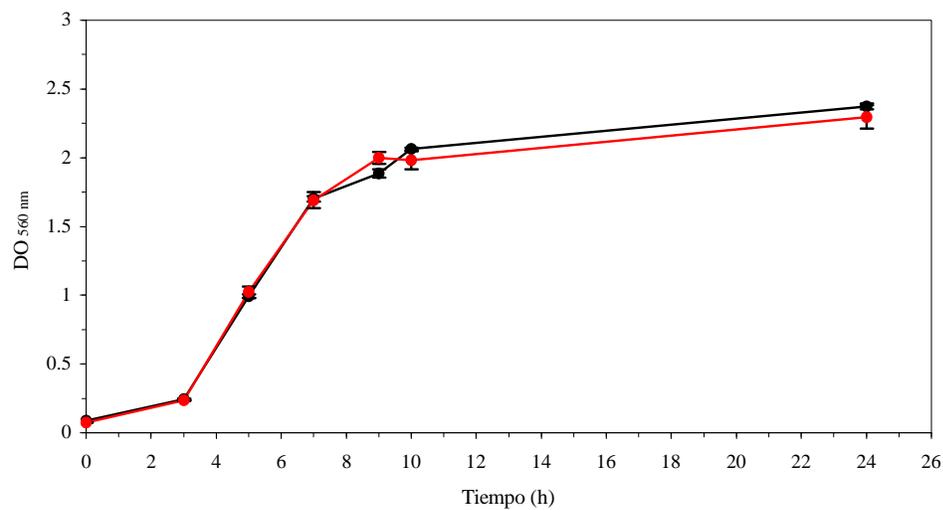


Fig. 26- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> control (●) y con adición de SLC de *Streptococcus thermophilus* 176 (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

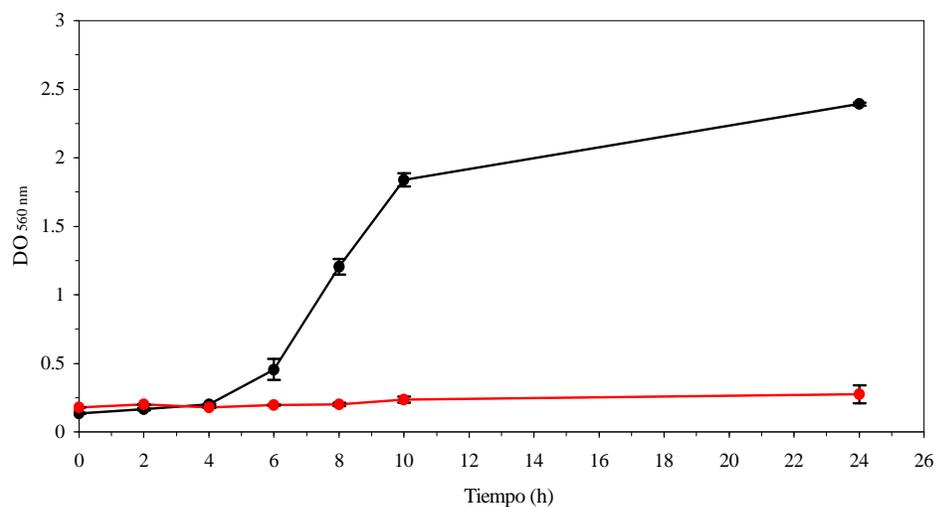


Fig. 27- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37r</sub> (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

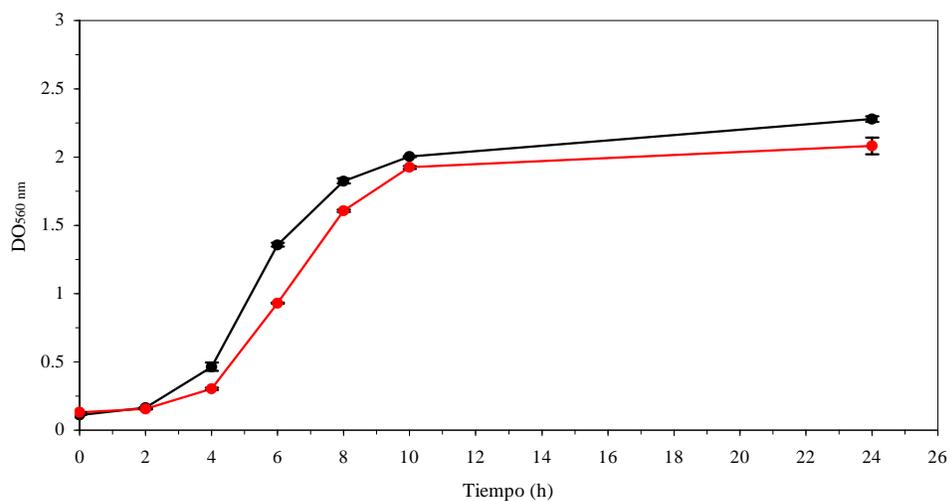


Fig. 28- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactobacillus gasseri* F<sub>37r</sub> control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

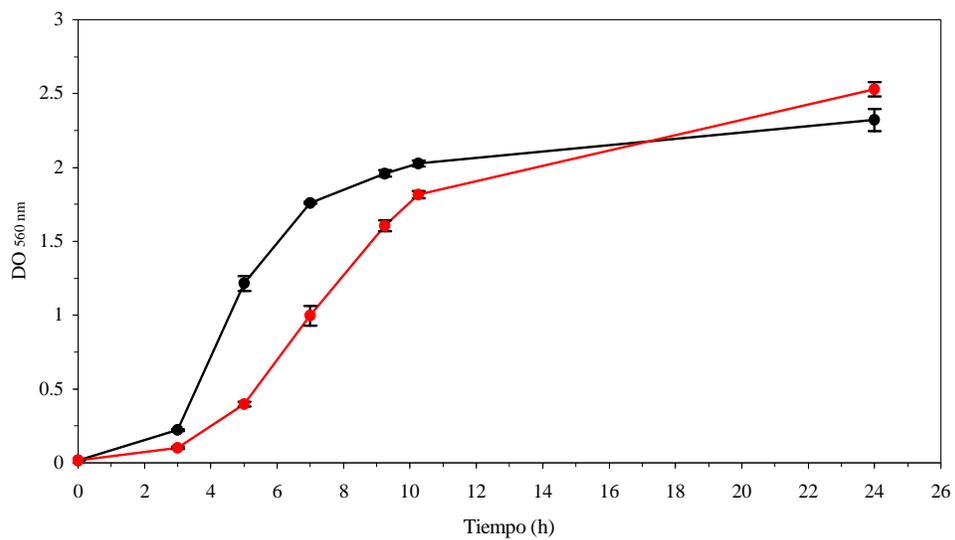


Fig. 29- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>71</sub> (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

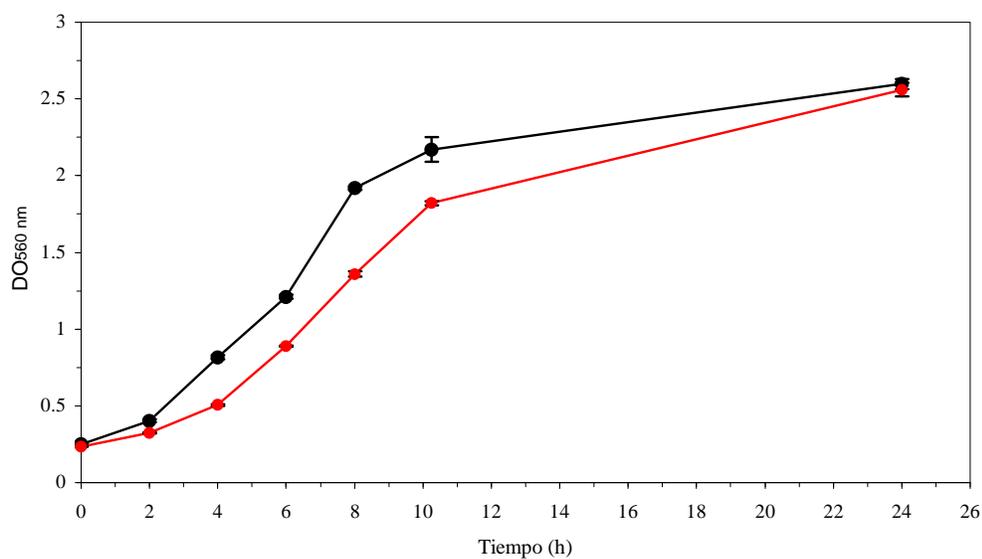


Fig. 30- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactobacillus rhamnosus* F<sub>71</sub> control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ab1 (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

Finalmente, el efecto producido por el agregado de SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> a un cultivo de *Lactococcus lactis* Mo12 puede observarse en la Figura 31. En ella vemos que, al igual que en la Figura 25, el agregado del SLC del lactobacilo intestinal produce una inhibición total de desarrollo sobre el lactococo, no habiéndose registrado efecto alguno cuando se investigó la situación inversa (datos no mostrados).

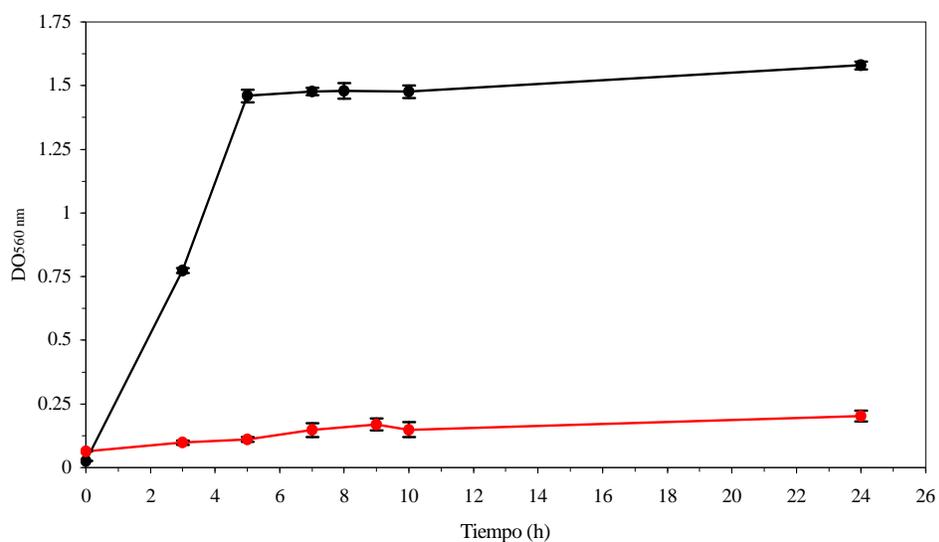


Fig. 31- Cinéticas de crecimiento correspondientes a *Lactococcus lactis* Mo12 control (●) y con adición de SLC de *Lactobacillus gasseri* F<sub>37</sub> (●) (37°C, 24h), (valores medios de 3 determinaciones).

### **5.1 Identificación de las cepas aisladas.**

Determinados géneros de bacterias gram (+) y catalasa (-), algunas productoras de ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa, constituyen la microflora normal del TGI humano. Dentro de ésta, se encuentran los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (1).

En el presente trabajo se obtuvieron, inicialmente, 54 aislamientos de heces de bebés alimentados con leche materna, que respondieron a las características morfológicas de interés (bacilos gram (+), catalasa (-)). Al comparar los perfiles de fermentación de carbohidratos de nuestros aislamientos con los patrones de fermentación de carbohidratos para *Lactobacillus* (Manual de Bergey) (ver Anexo Tabla 22 y Tabla 23), se asignó a los mismos la identificación de *Lactobacillus* del grupo 1 (aislamientos del individuo **3**) y *Lactobacillus* del grupo *casei* a los demás aislamientos de los restantes individuos. Comparando los perfiles RAPD-PCR de los aislamientos estudiados, pero separadamente por individuo, se encontraron coeficientes de similitud elevados para las cepas obtenidas de los individuos **1**, **2** y **3**. De este modo, se obtuvo 1 cepa determinada para dichos individuos. Para los 6 aislamientos del individuo **4**, se reconocieron 2 cepas diferentes cada una con 3 aislamientos; para el individuo **5**, 1 cepa con 3 aislamientos y otra cepa diferente (F<sub>70</sub>); finalmente para el individuo **6**, 2 cepas diferentes, cada una con 2 aislamientos

Reniero y col (26) estudiaron la permanencia de especies de *Lactobacillus* en el intestino de bebés lactantes a través de su detección en la materia fecal, a diferentes tiempos luego de la última ingesta. Éstos, muestreando al 4° y 8° día, encontraron una permanencia de bacilos que por sus perfiles de fermentación de azúcares (entre otras pruebas bioquímicas),

asignaron a la especie *Lactobacillus casei*. Concluyeron entonces que, su detección permanente hasta 8 días posteriores a la ingesta y en elevados recuentos (7 ordenes log.), sugeriría que el género *Lactobacillus* es un miembro predominante de la microflora intestinal en los bebés lactantes.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el presente trabajo donde también el género *Lactobacillus* (particularmente *Lactobacillus rhamnosus*) resultó ser dominante entre nuestros aislamientos.

Xanthopoulos y col (27) trabajaron también con muestras de materia fecal de bebés y realizaron la caracterización fenotípica y genotípica. Encontraron bacilos gram (+) catalasa (-) y aislamientos, que por sus perfiles de fermentación de carbohidratos, denominaron como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (6 aislamientos) y *Lactobacillus rhamnosus* (6 aislamientos). Todos fermentaron, entre otros, los 4 azúcares típicos que en el presente trabajo se consideraron para *Lactobacillus* grupo *casei* (ver Anexo Tabla 23). Por otro lado, encontraron 3 aislamientos que fermentaron celobiosa pero no los 4 azúcares típicos antes considerados y denominaron *Lactobacillus gasseri*. Los mismos investigadores encontraron otro aislamiento (con las mismas características antes descritas) que denominaron *Lactobacillus acidophilus* y diferenciaron de *Lactobacillus gasseri* por su capacidad de crecer a 45°C, hidrolizar arginina, producir CO<sub>2</sub> a partir de glucosa, además de su perfil de fermentación de carbohidratos.

Estos resultados (características morfológicas y perfil de fermentación de carbohidratos) se correlacionan con los obtenidos para nuestros aislamientos, tanto para *Lactobacillus* grupo 1 como para los restantes aislamientos.

Prasad y col (28) trabajaron con diferentes cepas de *Lactobacillus*, entre ellas 2 de

origen humano (HN y HN067), estudiaron la fermentación de carbohidratos y la identificación a nivel de especie con la técnica RAPD-PCR. Estos investigadores observaron que la cepa HN067 fermentó, entre otros, los 4 azúcares típicos anteriormente considerados para *Lactobacillus* grupo *casei* y que denominaron *Lactobacillus rhamnosus*. Con la utilización de la técnica RAPD-PCR lograron diferenciar aislamientos pertenecientes a un mismo género y especie.

El método de RAPD-PCR se basa en la utilización de secuencias cortas arbitrarias de nucleótidos sintéticos o primers, que se hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de DNA, las cuales flanquean la región de interés. La amplificación se consigue por ciclos repetitivos donde se desnaturaliza el DNA molde o templado, se hibridan los primers con el templado y se sintetiza el DNA complementario por medio de la enzima polimerasa del DNA. Los productos obtenidos en la amplificación pueden analizarse mediante diversas técnicas como hibridación *dot blot*, visualización del producto en geles de agarosa o poliacrilamida, el análisis de restricción, etc.

Esta metodología no permite la identificación de microorganismos a nivel de género y especie, sino que permite estudiar la diversidad genética entre cepas que pertenecen a un mismo género y especie.

Sus ventajas son: ser una técnica eficaz y rápida, permitir la amplificación de cualquier secuencia de DNA, obtener suficiente cantidad de material genético (a partir de muy pequeñas cantidades) para su posterior estudio molecular, etc. Por otro lado, sus desventajas son su elevado costo, las posibilidades de contaminación con material genético extraño, etc. (29).

Las ventajas de los métodos utilizados en el presente trabajo para la caracterización fenotípica de los aislamientos, son: ser técnicas sencillas, de bajo costo, etc. pero poseen

desventajas como, por ejemplo, tener escasa especificidad, requerir mayor tiempo para obtener resultados, etc.

## **5.2 Resistencia a las Barreras Biológicas.**

### **5.2.1 Resistencia a la secreción gástrica.**

Aproximadamente 2.5 L de jugo gástrico son secretados cada día, generando en el estómago un pH de entre 1 y 2 y una compleja mezcla de sales y enzimas. Ambos factores representan los primeros obstáculos que los gérmenes que se incorporan con los alimentos, deben salvar para alcanzar la mucosa intestinal (7).

La caída en alrededor de 2 ordenes log. en los recuentos celulares para la mayoría de los aislamientos de los individuos **1** y **2**, para 5 aislamientos del individuo **4** y sólo de 1 orden log. para los aislamientos  $F_{64}$  y  $F_{58ch}$  permitiría atribuirles a todos ellos una buena resistencia a la secreción gástrica. Para los demás aislamientos, la pérdida de viabilidad se manifestó con resultados muy variables.

Charteris y col., y Goldin y Gorbach (13), trabajando con *Lactobacillus rhamnosus* GG encontraron resultados similares entre sí pero poco comparables a los obtenidos en este trabajo. Los primeros, observaron una escasa sobrevivencia en solución gástrica simulada a pH 2 durante 1.5 h (inferior al 0.1% de células viables). Si bien las condiciones de trabajo fueron diferentes (pH y tiempo de incubación), esta gran susceptibilidad a la secreción gástrica de *Lactobacillus rhamnosus* GG podría extrapolarse con aquellos resultados encontrados para

aislamientos de los individuos **4**, **5**, y **6** donde las caídas en los recuentos celulares fueron de 3 a 5 ordenes log. Por otro lado, Goldin y Gorbach encontraron caídas en 2 ordenes log. en los recuentos celulares a pH 2.5 (valor de pH cercano al ensayado para los aislamientos intestinales) durante 30 minutos, resultados éstos más parecidos a los obtenidos para aquellos aislamientos intestinales más susceptibles, ya que podría estimarse que bajo esas condiciones a las 3h de incubación la pérdida de viabilidad sería mucho mayor.

Para los aislamientos del individuo **3**, que fueron fuertemente afectados por la secreción gástrica (caídas entre 4 y 5 ordenes log. en los recuentos celulares), los resultados obtenidos podrían relacionarse sólo relativamente a los hallados por Marteau y col. (30) debido a que para los aislamientos intestinales del presente trabajo no se evaluaron los efectos producidos sucesivamente por factores de stress como plantean estos autores, los cuales trabajaron con cepas de *Lactobacillus acidophilus*, exponiéndolas a factores tales como el descenso de pH desde 5 a 3 en 40 minutos. Bajo esas condiciones, los recuentos celulares cayeron 2 ordenes log. y al cabo de 3 h sólo se mantuvo un 10% de células viables.

Resultados opuestos encontraron Lankaputhra y Shah (31) al estudiar la sobrevivencia de 6 cepas de *Lactobacillus acidophilus* expuestas a pH 3 durante 3h, ya que los recuentos celulares se mantuvieron prácticamente constantes en algunos casos y en otros sólo cayeron 1 orden log.

Prasad y col (28) al evaluar criterios de selección de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* tolerantes a la bilis y a valores bajos de pH, encontraron resultados similares a los hallados por Lankaputhra y Shah (31).

También Chou y Weiner (32), trabajando con 7 cepas de *Lactobacillus acidophilus*, encontraron que todas poseían una buena sobrevivencia en medio líquido acidificado (caldo MRS

pH 3.5) durante 1 h 30 minutos y, por lo tanto, opuestos a los obtenidos para *Lactobacillus gasseri* en el presente trabajo.

Usman y Hosono (33) publicaron resultados poco comparables a los encontrados para el grupo de *Lactobacillus gasseri* del presente trabajo, ya que sometieron a 2 cepas de *Lactobacillus gasseri* a pH de 2.5 y 3.5 y encontraron que, bajo esas condiciones, los recuentos celulares cayeron sólo entre 1 y 2 ordenes log.

### **5.2.2 Resistencia a la bilis.**

La tasa de secreción biliar y la concentración de bilis en las distintas porciones del intestino son muy variables, dependiendo principalmente del tipo de ingesta. Es probable que no pueda establecerse con certeza cual es la concentración real de bilis en el intestino durante la digestión de los alimentos (7).

Se han empleado, en numerosas experiencias, concentraciones de entre 0.5 y 2% de bilis en la formulación de medios de cultivo selectivos para aislar bacterias bilis tolerantes a partir de cultivos mixtos.

Para la totalidad de los aislamientos, concentraciones de 0.15% y 0.30% de bilis prácticamente no produjeron efecto alguno sobre el desarrollo de los mismos. Sin embargo, 0.60% y 1.0% de bilis inhibieron el desarrollo encontrándose halos cuyos diámetros midieron entre 0.4 cm y 0.8 cm (individuos **1** y **4**), 0.3 cm y 0.5 cm (individuo **2**), 0.3 cm y 0.9 cm (individuos **5** y **6**). Sólo dos aislamientos del grupo de *Lactobacillus gasseri* (individuo **3**) fueron afectados por la bilis (1.0%), con diámetros de halos de inhibición de 0.3 cm.

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo encontraron Prasad y col. (28) quienes, para 0 y 0.4 % de bilis, no hallaron inhibición para *Lactobacillus rhamnosus* resultados éstos que podrían correlacionarse a los obtenidos en presencia de 0.15 y 0.3% de bilis para las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* de nuestro trabajo. Para 0.8 % de bilis, estos investigadores encontraron una inhibición del crecimiento manifestada en una caída en los recuentos celulares de 1 orden log., resultados éstos comparables a los obtenidos para nuestros aislamientos en presencia de 0.6 y 1 % de bilis. En este caso, si bien se comparan metodologías distintas, podría suponerse que a partir de 0.6 % de bilis, ésta comienza a ejercer su efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los lactobacilos.

También, estos mismos autores comparando el origen de las cepas y su capacidad de sobrevivir a valores bajos de pH y a elevadas concentraciones de bilis, encontraron que una gran proporción de cepas de origen humano resultaron ser más tolerantes al pH (de 1 a 3 durante 3 h) como así también a las concentraciones de bilis (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%) ensayadas, comparándolas con aquellas aisladas de productos lácteos. Contrariamente a lo observado para los aislamientos intestinales, encontraron que dentro del género *Lactobacillus* había diferencias entre cepas, ya que *Lactobacillus rhamnosus* poseía mayor tolerancia a ambos parámetros en comparación a *Lactobacillus acidophilus*.

Los resultados obtenidos para *Lactobacillus gasseri* del individuo **3** fueron parcialmente similares a los reportados por Lankaputhra y Shah (31). Éstos, evaluando el comportamiento de varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* en presencia de 0.01, 1.0 y 1.5 % de bilis, encontraron resultados variables, ya que 2 cepas resultaron ser tolerantes a dichas concentraciones mientras que otras cayeron entre 3 y 4 ordenes log. en los recuentos celulares en presencia de 1% de bilis. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo se

asemejan sólo a los de aquellos bacilos tolerantes encontrados por éstos investigadores.

Por otro lado, Marteau y col. (30) evaluando la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* a concentraciones mayores de bilis (2%) y previamente expuestos a otros factores de stress del tracto gastrointestinal, observaron una gran pérdida de viabilidad celular ya que sólo el 30% de las células sobrevivieron a dichas condiciones. Debido a que en nuestro trabajo no se evaluó el efecto producido por la bilis sobre microorganismos previamente expuestos a factores de stress y observando que hasta 1.5% de bilis el grupo de *Lactobacillus gasseri* demostró ser poco afectado en su desarrollo, no se podrían extrapolar los resultados obtenidos por los investigadores antes mencionados para nuestras cepas de *Lactobacillus gasseri* para 2% de bilis. Esto haría suponer que aún para 2% de bilis, estos lactobacilos podrían mantener una viabilidad considerable.

Kociubinski y col. (34) estudiaron la tolerancia de 29 aislamientos de lactobacilos (distintas especies) de origen humano y de otros orígenes, encontrando que en general para todos ellos la inhibición en el crecimiento de los mismos era mayor a medida que aumentaba la concentración de bilis. Para 0.1% de bilis, observaron que la totalidad de las cepas eran resistentes, resultados éstos iguales a los obtenidos en nuestro estudio. También determinaron la resistencia a 0.5 % de bilis, y en este caso, encontraron que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG resultó ser tolerante bajo estas condiciones. Comparando estos resultados a los obtenidos para 0.6 % de bilis en el presente trabajo, encontramos un comportamiento opuesto ya que la totalidad de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* intestinales fueron sensiblemente afectadas en su viabilidad.

### **5.3 Caracterización probiótica de los aislamientos.**

#### **5.3.1 Deconjugación de ácidos biliares.**

La enzima hidrolasa de sales biliares cataliza la hidrólisis de los ácidos biliares en aminoácidos y ácidos grasos libres. Esta deconjugación de los ácidos biliares jugaría un rol importante en el control de los niveles plasmáticos de colesterol, ya que al estar deconjugados no logran solubilizar ni permitir una eficaz absorción de los lípidos (8).

La totalidad de los aislamientos desarrollaron óptimamente en los medios adicionados de taurocolato de sodio (MRS-TC), taurodeoxicolato de sodio (MRS-TDC) y glicolato de sodio (MRS-GC). Sin embargo, para la mayoría de los mismos el desarrollo fue débil o nulo en el medio adicionado de glicodeoxicolato de sodio (MRS-GDC). Con respecto a la capacidad de deconjugar ácidos biliares, sólo las cuatro cepas de *Lactobacillus gasseri* (individuo 3) lo hicieron para taurocolato de sodio y taurodeoxicolato de sodio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se asemejan a los hallazgos reportados por Tanaka y col. (15) ya que éstos lograron detectar la presencia de la enzima hidrolasa de ácidos biliares en 9 cepas de *Lactobacillus gasseri* (cepas BSH positivas), pero no en *Lactobacillus rhamnosus*. Cabe aclarar, que en su estudio se determinó la presencia de la enzima utilizando una mezcla de sales biliares la cual fue adicionada al medio de cultivo, mientras que en nuestro trabajo se ensayó cada sal por separado.

Trabajos publicados por Bottazi (35) demostraron que el 100 % de cepas de *Lactobacillus acidophilus* ensayadas deconjugaron el taurocolato de sodio, mientras que sólo el 16.66 % deconjugaron el glicolato de sodio. En el mismo estudio, de 13 cepas de

*Lactobacillus casei* ninguna deconjugó el taurocolato de sodio y 9 lo hicieron frente al glicolato de sodio. Si comparamos los resultados obtenidos para *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus gasseri* (de los autores antes mencionados y del presente trabajo, respectivamente) y por otro lado para *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* (de los autores antes mencionados y del presente trabajo, respectivamente) vemos que sólo existe una semejanza para el taurocolato de sodio, no así para el glicolato de sodio.

También Usman y Hosono (36) encontraron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, ya que al estudiar 28 cepas de *Lactobacillus gasseri* y evaluar la capacidad de deconjugación de taurocolato de sodio (0.2%), encontraron resultados positivos para todos ellos. También revelaron que la velocidad de deconjugación del ácido biliar era diferente para cada cepa.

Walker y Gilliland (37), evaluando simultáneamente la tolerancia a la bilis, la capacidad de deconjugación de taurocolato de sodio y la asimilación de colesterol de 19 cepas de *Lactobacillus acidophilus* (11 de origen humano), encontraron que todas eran capaces de deconjugar el ácido biliar, actividad ésta que comenzaba a disminuir cuando se acidificaba el medio. Resultados similares encontraron también Buck y Gilliland (38). De este modo, para el taurocolato de sodio los resultados obtenidos en los trabajos realizados por los diferentes autores antes mencionados, fueron similares a los obtenidos para nuestros aislamientos intestinales.

Brashears y col. (39) han publicado, como lo han hecho varios investigadores, trabajos para evaluar conjuntamente la capacidad de deconjugación de ácidos biliares y la remoción de colesterol del medio (proceso asociativo). Encontraron que para *Lactobacillus casei*, el mantener constante el valor de pH del medio o dejar que se produzca la acidificación normal

durante el desarrollo bacteriano, no influía en la actividad de hidrolasa de ácidos biliares (para la cual encontraron valores dependientes de cada cepa) en presencia de taurocolato de sodio. En cambio, para *Lactobacillus acidophilus* se observó una diferencia notable en ambas condiciones de desarrollo. También observaron que *Lactobacillus casei* posee mayor capacidad de deconjugación para glicolato de sodio en comparación a taurocolato de sodio. Esto, poco se correlaciona con los resultados obtenidos para los aislamientos de *Lactobacillus rhamnosus* del presente trabajo ya que los mismos no manifestaron actividad alguna frente a ninguno de los ácidos biliares ensayados.

Corzo y Gilliland (14) también observaron, pero en este caso en 3 cepas de *Lactobacillus acidophilus* (2 de origen intestinal), una mayor preferencia de la enzima BHS hacia el glicolato de sodio que hacia el taurocolato de sodio. Nuevamente, los resultados obtenidos para nuestras cepas de *Lactobacillus gasseri* no se correlacionarían con estos últimos datos.

Buck y Gilliland (38) encontraron resultados muy similares a los hallados por Walker y Gilliland (37) sobre el efecto de los ácidos biliares y la bilis sobre el desarrollo de *Lactobacillus acidophilus*. Los primeros investigadores, encontraron que aquellas cepas que desarrollan más lentamente poseen una mayor actividad de deconjugación y por lo tanto son más afectadas por los ácidos biliares deconjugados que se liberan de dicha actividad que por los ácidos conjugados. Esto llevó, entonces, a denominar a esas cepas como bilis sensible. Contrariamente a esto, en el presente trabajo la resistencia a la bilis del grupo de aislamientos de *Lactobacillus gasseri* fue elevada, y sin embargo fueron los únicos en manifestar actividad de deconjugación de ácidos biliares.

Iguales resultados a los encontrados para nuestros aislamientos intestinales, fueron

publicados por Klaver y van der Meer (40) quienes estudiaron la capacidad de deconjugación de ácidos biliares primarios y secundarios. Éstos, observaron que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* ensayadas poseían una marcada actividad de deconjugación y que para la única cepa de *Lactobacillus casei*, dicha actividad enzimática fue nula.

### **5.3.2 Actividad de $\beta$ -galactosidasa (lactasa).**

Numerosos son los antecedentes bibliográficos sobre el importante aporte que realizan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* etc. de la enzima lactasa al organismo, cuando éstos son ingeridos en productos lácteos, fermentados o no. Esto resulta más importante en aquellos individuos intolerantes a la lactosa, debido a que les permite consumir productos conteniendo lactosa. El aporte directo de la enzima, por vía oral, exige que para llegar activa a la mucosa intestinal debe resistir a las condiciones existentes en las distintas porciones del tracto gastrointestinal (5).

Para la totalidad de nuestros aislamientos intestinales la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue prácticamente nula (valores de actividad menores a 1 UM), a pesar de mostrar un desarrollo óptimo en leche.

Estos resultados podrían explicarse a través del análisis sobre el metabolismo hidrocarbonado de las BAL que realizan Jojiono, Tsutomu Goto y Shigeo Okonogi, publicado por Wood y col. (5). Éstos plantean (al igual que otros autores) que las BAL pueden incorporar lactosa del medio a través del sistema PEP-PTS o bien por una Permeasa. En el primer caso, la lactosa es fosforilada y luego en el interior de la célula es hidrolizada por la

enzima P- $\beta$ -galactosidasa, mientras que en el segundo caso dicha hidrólisis es realizada por la  $\beta$ -galactosidasa. También estos autores plantean que ambas enzimas se encuentran distribuídas entre las diferentes especies pero, dependiendo de éstas, existe un predominio de una u otra enzima. También estos autores explican que en *Lactobacillus casei* (entre otras bacterias estudiadas) la actividad de  $\beta$ -galactosidasa es nula, y que toda la actividad de hidrólisis de lactosa sería llevada a cabo por la P- $\beta$ -galactosidasa.

Resultados muy diferentes observaron Shah y Jelen (41) trabajando con BAL y Hughes y Hoover (42) trabajando con bifidobacterias y *Lactobacillus acidophilus*. Empleando la misma metodología (método de Miller), ambos grupos de investigadores detectaron la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en *Lactobacillus acidophilus*.

En su estudio sobre la influencia de diferentes parámetros, como resistencia a la bilis y a la acidez del medio, captación de lactosa y actividad de  $\beta$ -galactosidasa de un grupo de *Lactobacillus acidophilus* sobre la digestión de la lactosa, Mustapha y col. (43) concluyeron que ni la actividad de  $\beta$ -galactosidasa total bacteriana ni el transporte del disacárido al interior del lactobacilo son factores limitantes del proceso de digestión de lactosa. En cambio, la resistencia a la acidez y a la bilis fueron factores fundamentales para permitir que estos bacilos lleven a cabo la hidrólisis. Esto es debido a que, por un lado, su resistencia a los valores bajos de pH encontrados en la secreción gástrica hace que se mantengan intactas las membranas y paredes celulares protegiendo a la lactasa intracelular; por otro lado, estos investigadores sugieren que la resistencia a la bilis determina un aumento en la permeabilidad de las membranas a la lactosa, provocando un mayor ingreso de lactosa al interior celular y por lo tanto, los lactobacilos “permeabilizados” pero no lisados serían necesarios para llevar a cabo la hidrólisis de la lactosa en el intestino. Comparando estos resultados y fundamentos

con los hallados en el presente trabajo, no encontramos puntos en común. Considerando las cepas de *Lactobacillus gasseri*, vemos que resultaron ser bastante resistentes a las concentraciones de bilis ensayadas; sin embargo su resistencia a la secreción gástrica fue muy baja. Teniendo en cuenta ahora las cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, F<sub>16</sub> se destacó por tener una importante resistencia a la bilis y a la secreción gástrica.

### **5.3.3 Hidrofobicidad.**

Para manifestar sus efectos benéficos, es fundamental que las BAL se mantengan ligadas a la mucosa evitando ser removidas por la peristalsis intestinal. Su capacidad de adherencia a las mucosas, entre otras propiedades, les confiere una ventaja competitiva frente a los demás integrantes de la población microbiana y les asegura una mayor permanencia y colonización del lugar (8).

Para los aislamientos de los individuos **1** y **2**, se obtuvieron porcentajes de hidrofobicidad inferiores al 28%, mientras que para el individuo **3** los resultados fueron muy heterogéneos (entre 9% y 53%). Los porcentajes obtenidos para los restantes individuos fueron bajos: entre 18% y 36% (individuo **4**), entre 15% y 30% (individuo **5**) y entre 16% y 28% (individuo **6**). Se destacaron por mostrar mayores valores los aislamientos F<sub>37</sub> (53.15%), F<sub>37''</sub> (50.84%) ambos del individuo **3**, F<sub>64</sub> (49.51%) del individuo **4** y F<sub>70</sub> (41.06%) del individuo **5**.

Los antecedentes bibliográficos sobre el tema son escasos. Pérez y col. (44) así como Gómez Zavaglia y col. (45) hallaron porcentajes de hidrofobicidad muy dispares (entre 0.1 ±

0.9 % y  $95 \pm 0.9$  %) para las distintas especies de *Bifidobacterium* ensayadas.

Por otro lado, Kiely y Olson (46) trabajando con 5 cepas de *Lactobacillus casei*, encontraron valores de hidrofobicidad que no superaron el 30 %; resultados éstos similares a los hallados en el presente trabajo.

Konings y col. (3) han publicado resultados obtenidos por otros autores, los cuales podrían relacionarse parcialmente con los observados para los aislamientos intestinales del presente estudio. Dichos autores, trabajando con líneas celulares Caco-2 y HT29 para evaluar la capacidad de adhesión de diferentes cepas de *Lactobacillus*, y comparando dichas cepas con una cepa referencia caracterizada como buena adherente (*Lactobacillus rhamnosus* GG), encontraron una adherencia completa a ambas líneas celulares tanto para el lactobacilo de referencia como para los demás.

#### **5.3.4. Inhibición de bacterias patógenas.**

Cuando los mecanismos de defensa del organismo son afectados por enfermedades, tratamientos inmunosupresores, etc., microorganismos que habitualmente forman parte de la población microbiana normal pueden manifestar su patogenicidad intrínseca y volverse responsables de diversos procesos inflamatorios e infecciosos denominados “infecciones oportunistas”(2). Probablemente el rol probiótico de las BAL como mejoradoras del sistema de defensa del huésped frente a bacterias patógenas tenga un origen multifactorial. Por un lado, la colonización de las mucosas del organismo por estas bacterias impide que otros microorganismos ocupen el mismo sitio, además de competir por los nutrientes disponibles en

el lugar. Por otro lado, el mejoramiento del sistema inmunológico humoral y celular que producen estas bacterias probióticas, junto a la producción de bacteriocinas, contribuirían también a prevenir infecciones por patógenos y mejorar el tratamiento de las mismas (8).

González y col. (47), estudiando el poder inhibitorio de diferentes lactobacilos frente a bacterias enteropatógenas, encontraron que *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* tenían un menor poder inhibitorio frente a *Salmonella* que a *Escherichia coli*. Contrariamente a esto y en general para las cepas intestinales aisladas en este estudio, se observó un menor poder frente a *Escherichia coli* que a *Salmonella*. Teniendo en cuenta sólo una misma bacteria patógena, por ejemplo *Escherichia coli*, estos investigadores encontraron que *Lactobacillus casei* poseía un menor poder inhibitorio en comparación con *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, para las cepas obtenidas por nosotros se observaron resultados similares para ambas especies. Dichos autores también encontraron que cuando se utilizaron distintas especies de *Salmonella*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, éstas ejercieron un poder inhibitorio muy semejante, resultados comparables a los hallados en el presente trabajo.

Dubois y col. (48) evaluaron el poder inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* frente a una gran variedad de bacterias patógenas, entre ellas *Escherichia coli* y *Salmonella*. En ambos casos encontraron resultados parecidos a los obtenidos en el presente trabajo.

Xanthopoulos y col. (49), en su estudio sobre caracterización de lactobacilos aislados de heces de infantes y evaluación de la actividad antimicrobiana de los mismos, encontraron que *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Lactobacillus acidophilus* poseían un importante poder inhibitorio frente a *Escherichia coli*, mientras que frente al mismo patógeno se observó un poder inhibitorio leve por parte de los aislamientos intestinales del presente trabajo.

Con respecto a *Staphylococcus aureus*, se obtuvieron resultados muy dispares para nuestros aislamientos intestinales y por el tipo de halos de inhibición obtenidos (débiles en su mayoría) quedó manifiesto un parcial poder inhibitorio. Resultados similares encontraron Dubois y col. (48), quienes observaron una cierta capacidad inhibitoria de *Lactobacillus acidophilus* frente al patógeno mencionado, pero que desapareció a las 48 h de incubación.

Finalmente, frente a *Listeria monocytógenes* se obtuvieron halos de inhibición cuyos diámetros fueron muy variables para la totalidad de nuestras cepas, aunque en todos los casos el tipo de inhibición fue total.

Lortie y col. (50), caracterizando sustancias antimicrobianas producidas por 4 cepas de *Lactobacillus casei*, encontraron que éstas inhibían completamente el desarrollo de *Listeria monocytógenes* y *Escherichia coli*, resultados que podrían correlacionarse a los hallados para nuestros aislamientos de *Lactobacillus rhamnosus*, aunque no todos los halos de inhibición del crecimiento fueron netos ni extensos.

## **5.4 Caracterización tecnológica de los aislamientos.**

### **5.4.1 Resistencia al pH.**

Entre los numerosos requisitos que deben cumplir estos microorganismos para ser utilizados como probióticos, se encuentra su capacidad de mantenerse viables en condiciones ácidas. Productos lácteos, como yogures, leches fermentadas y quesos, se caracterizan por tener valores de pH entre 4 y 5.5, y cuando a éstos se les adicionan bacterias probióticas, las

mismas deben mantenerse viables bajo esas condiciones para así poder ejercer los efectos benéficos sobre el consumidor. Son escasos los estudios y antecedentes bibliográficos disponibles que aporten información sobre el efecto que producen valores bajos de pH sobre la viabilidad de las bacterias probióticas (2).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que a valores de pH comprendidos entre 4.5 y 5.5 la viabilidad de los aislamientos intestinales resultó poco afectada. En general, sólo se observó una débil inhibición a pH 4.5.

Kailasapaty y Ribka (51), en su publicación sobre el potencial terapéutico de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. y sus sobrevividas en yogur, menciona que *Lactobacillus acidophilus* no desarrolla bien a valores de pH inferiores a 4. Si bien en nuestro estudio se evidenció sólo una leve inhibición a pH 4.5, esto permitiría estimar que a valores de pH inferiores al mismo (como el ensayado por los investigadores antes mencionados) la viabilidad de nuestros aislamientos intestinales podría comprometerse. Estos mismos autores, hacen mención de trabajos realizados por otros investigadores, quienes encontraron que *Lactobacillus acidophilus* posee una elevada capacidad buffer citoplasmática que le permite resistir cambios en el pH del medio (en el rango de 3.72 a 7.74).

Comparando la ácidotolerancia del grupo de aislamientos de *Lactobacillus gasseri* con la del de *Lactobacillus rhamnosus* utilizados en el presente trabajo, no podría concluirse que los primeros sean más ácidotolerantes que los últimos.

Chou y Weimer (32), en su trabajo sobre aislamiento y caracterización de cepas ácidotolerantes de *Lactobacillus acidophilus*, encontraron cepas no sólo ácido sino también bilis tolerantes a pH 4.5. Estos resultados se correlacionan con los hallados en nuestro trabajo ya que para las cepas de *Lactobacillus gasseri* (excepto F<sub>37</sub>'), el crecimiento fue normal. Con

respecto a *Lactobacillus rhamnosus*, son escasos los antecedentes bibliográficos que aporten datos del efecto del pH sobre su crecimiento. Para nuestras cepas de esta especie, no se observó un comportamiento típico por individuo ni una inhibición importante.

#### **5.4.2 Resistencia a sales.**

El uso tecnológico de las sales NaCl y KCl en la elaboración de producto lácteos fermentados, puede afectar negativamente la viabilidad de las bacterias adicionadas en los mismos. Probablemente, y al igual que ocurriría en presencia de azúcares, este agregado modifica el valor de aw, fundamental para la sobrevivencia de los microorganismos en el producto (2).

Se obtuvieron resultados satisfactorios al evaluar el desarrollo de nuestros aislamientos en medios adicionados de dichas sales, tanto para 1%, 2% y 3% de cada una de ellas, ya que poco afectaron el desarrollo de los mismos.

Son escasos los trabajos publicados sobre el efecto que producen las sales sobre el crecimiento de bacterias lácticas y no lácticas. Gómez y col. (52, 53) evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* tanto en leche como quesos elaborados por diferentes metodologías, y con una compleja relación de parámetros (temperatura y tiempo de almacenamiento, distintas concentraciones de NaCl y el uso de cultivos puros o mixtos). *Lactobacillus acidophilus* sólo se mantuvo prácticamente sin cambios en sus recuentos celulares durante 9 semanas de almacenamiento y en presencia de 3% de NaCl.

En otro trabajo, Gómez y col. (54) encontraron durante la maduración de quesos

semiduros Gouda que la tasa de muerte celular de *Lactobacillus acidophilus* (entre otros microorganismos presentes) resultó mayor frente a menores valores de aw y mayores concentraciones de sal (9 semanas de almacenamiento, entre 2% y 4% de NaCl).

Debido a que en el presente trabajo sólo se evaluó el efecto producido únicamente por la presencia de las sales NaCl y KCl en el medio de cultivo, los trabajos antes mencionados sólo aportan algunos datos a la presente discusión ya que las condiciones de trabajo son poco comparables. De todos modos, los resultados obtenidos por estos investigadores se asemejan a los observados para nuestros aislamientos intestinales. Este ensayo permitió caracterizar tecnológicamente los aislamientos con respecto a su susceptibilidad frente a las sales utilizadas y los resultados obtenidos deberían ser tenidos en cuenta para formulaciones en productos lácteos fermentados que contengan a las mismas.

Reddy y Marth (55) estudiaron la recuperación de bacterias lácticas acidificantes (distintas cepas de *Lactococcus lactis*) y no acidificantes a partir de distintos modelos de quesos Cheddar y encontraron que de los mismos, podían aislarse cepas de *Lactobacillus casei* luego de 12 y 24 semanas de maduración. Estos aislamientos se obtuvieron de quesos conteniendo entre 1.32% y 1.72% de NaCl y entre 1.51% y 1.76% de KCl.

#### **5.4.3 Resistencia a compuestos de aroma (diacetilo y acetaldehído).**

El diacetilo producido por BAL fermentadoras de citrato, posee un efecto antimicrobiano mucho más potente frente a bacterias gram (-), levaduras y hongos que frente a bacterias gram (+). Para ejercer dicho efecto, se requieren concentraciones mínimas de 400

ppm, dependiendo del microorganismo en particular. El acetaldehído, por su parte, es el responsable del aroma típico del yogur y también se le han reportado efectos antimicrobianos (en concentraciones de 10 a 100 ppm) frente a bacterias patógenas relacionadas a los alimentos (2).

En el presente trabajo se ensayaron concentraciones superiores a la antes mencionadas, observándose un efecto más potente del acetaldehído en comparación con el diacetilo, inhibición que aumentó con la concentración.

Es de destacar que el diacetilo, a pesar de ser menos nocivo hacia nuestros aislamientos, en general, logró inhibir el desarrollo de numerosos aislamientos de los individuos **1**, **3** y **4** a una concentración de 1000 ppm.

Debe, sin embargo, quedar en claro que estas inhibiciones se verificaron a concentraciones significativamente más altas que las encontradas en productos comerciales.

#### **5.4.4 Viabilidad celular de los aislamientos en leche acidificada y conservada a 5°C.**

El ácido láctico presente en los productos lácteos fermentados, también condiciona la viabilidad de las bacterias probióticas cuando éstas son adicionadas a los mismos (2). Por tanto su resistencia al mismo en condiciones de refrigeración, permite estimar la viabilidad de estas bacterias durante el almacenamiento de dichos productos.

Los resultados obtenidos para nuestros aislamientos revelaron una buena sobrevivencia en leche acidificada a 5°C en el rango de pH 4 a 5, salvo el aislamiento F<sub>53</sub> (individuo **4**) que fue

severamente afectada su viabilidad celular en dichas condiciones.

Usman y Hosono (33), evaluando la viabilidad de *Lactobacillus gasseri* en leche (pH 6.3, 4°C), observaron que los recuentos celulares caían en menos de 1 orden log. (para 2 del total de cepas estudiadas). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente trabajo. También lo son con respecto a los hallados por Nighswonger y col. (56) y Gilliland y Speck (57), quienes evaluando paralelamente la influencia del almacenamiento a 7°C (en yogur) de 5 cepas de *Lactobacillus acidophilus* y 1 cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, encontraron que para ambas especies no fue afectada la viabilidad celular.

Con respecto a la acidificación de la leche inoculada con nuestras cepas de lactobacilos intestinales, encontramos que ésta no se produjo, es decir que la actividad fermentativa en refrigeración estuvo ausente. Estos resultados coinciden con los reportados por Sanders y col. (58) en su trabajo sobre la “performance” de cultivos comerciales para su aplicación en leches fluídas.

Shah y Ravula (59), inoculando *Lactobacillus acidophilus* MJLA1 a yogur y evaluando su sobrevivencia en el mismo a 24h y 10, 20 y 30 días de almacenamiento en refrigeración, observaron que al cabo de 30 días su recuento celular disminuyó en casi 2 ordenes log. Esta susceptibilidad encontrada para *Lactobacillus acidophilus* no es comparable a la observada para los aislamientos de *Lactobacillus gasseri* del presente trabajo, ya que éstos demostraron ser mucho más tolerantes bajo dichas condiciones.

Shah y col. (60) hallaron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo para *Lactobacillus gasseri*, ya que observaron que a pH 4, 3 de 5 cepas de *Lactobacillus acidophilus* inoculados a yogur mantuvieron prácticamente invariables sus recuentos durante 30 días de almacenamiento en refrigeración.

Vinderola y col. (61), evaluando la sobrevivencia de bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*) en leche acidificada, encontraron que *Lactobacillus acidophilus* disminuía aproximadamente 1 orden log. sus recuentos celulares a valores de pH 5.5 pero a 4.5 lo hacía en 3 ordenes log. Estos resultados poco pueden compararse a los obtenidos para nuestras cepas de *Lactobacillus gasseri*, para los cuales a valores de pH 4 y 5 y durante el mismo período de almacenamiento, sus recuentos sólo disminuyeron menos de 1 orden log.

#### **5.4.5 Interacciones entre lactobacilos intestinales y bacterias lácticas de starters.**

Numerosos estudios han demostrado que para ejercer sus efectos benéficos, las bacterias probióticas deben resistir una serie de factores, entre ellos, el posible antagonismo frente a las bacterias lácticas de starters empleadas en los distintos productos lácteos. Del mismo modo, las bacterias probióticas tampoco deben afectar la viabilidad de los starters, sobre todo cuando las mismas se adicionan simultáneamente al comenzar las fermentaciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que ninguna de las bacterias de starters ensayadas inhibe el desarrollo de los lactobacilos intestinales aislados. Sin embargo, la situación inversa no fue igual. Frente a *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, nuestros aislamientos ejercieron una considerable inhibición en el desarrollo, sobre todo frente al segundo.

Nighswonger y col. (56) evaluaron la sobrevivencia durante el almacenamiento de yogur

de 5 cepas de *Lactobacillus acidophilus* y 1 de *Lactobacillus casei*. Los yogures habían sido elaborados con 2 tipos de starters (CM-2 y YC-4). Estos investigadores encontraron que, para *Lactobacillus acidophilus*, la sobrevivencia del mismo era tanto dependiente del starter usado como de la cepa utilizada. Para una de las cepas evaluadas (La 5), encontraron una caída en los recuentos celulares (a los 28 días de almacenamiento) de 1 y 1.5 ordenes log. frente a CM-2 y YC-4, respectivamente, asignando como causa de inhibición la posible producción de peróxido de hidrógeno por parte de éstos.

Vinderola y col. (17), evaluando la enumeración simultánea de bacterias probióticas y bacterias de starters en productos lácteos fermentados, observaron que los recuentos celulares de las mismas dependían de las características del producto (yogur tipo “diet” o entero, leches fermentadas y quesos frescos) y que en algunos no existían antagonismos entre los microorganismos enumerados. Para un yogur, por ejemplo, encontraron recuentos celulares de 9 ordenes log. para *Streptococcus thermophilus*, 7.8 ordenes log. para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 6.6 ordenes log. para *Lactobacillus acidophilus* pero muy bajo para *Lactobacillus casei*. En otro yogur, en cambio, observaron que junto a recuentos similares a los antes mencionados de *Streptococcus thermophilus* se hallaron recuentos de 8 ordenes log. únicamente para *Lactobacillus casei*. Por otro lado, para queso fresco hallaron recuentos considerables (superiores a 8.3 ordenes log.) tanto para *Streptococcus thermophilus* como para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. Estos resultados permitirían estimar que la presencia de bacterias probióticas no afecta la viabilidad de las bacterias de starters antes mencionadas, difiriendo de los encontrados en el presente trabajo para nuestros aislamientos intestinales. Resultados también opuestos a los del presente trabajo encontraron los mismos autores al observar que, tanto *Lactobacillus acidophilus* como *Lactobacillus casei*

no afectaban la viabilidad de *Lactococcus lactis*, inhibición que sí manifestaron nuestros aislamientos intestinales. Este tipo de comparaciones deja en evidencia que prácticamente todos los aspectos estudiados se han mostrado cepa dependientes.

Para una mejor caracterización probiótica, se hace necesario discutir de manera integrada los resultados obtenidos. A continuación se discute brevemente los aspectos más importantes de los aislamientos obtenidos por individuo y comparando sus diferentes aptitudes probióticas y características tecnológicas entre sus integrantes.

Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aisladas de los individuos **1** y **2**, si bien se mostraron considerablemente resistentes a la solución gástrica simulada, resultaron susceptibles a concentraciones de bilis superiores a 0.6%. Sus relativamente bajos valores de hidrofobicidad podrían afectar la adherencia y permanencia en la mucosa intestinal. Desde el punto de vista probiótico, no presentaron aptitudes destacables con excepción de su moderado poder inhibitorio frente a *Listeria monocytógenes* y *Salmonella*. Considerando ahora los factores tecnológicos, resistieron bien a algunos de ellos (pH, sales) y conservaron su viabilidad en leche acidificada durante 4 semanas a 5°C. En presencia de bacterias de starters como *Lactococcus lactis* y/o *Streptococcus thermophilus*, el SLC de los aislamientos intestinales inhibió el desarrollo de las mismas, y por tanto, resultarían incompatibles en formulaciones de productos lácteos que las contengan. Sin embargo, frente a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no manifestaron efecto alguno.

Cabe destacar la particularidad de las cepas de *Lactobacillus gasseri* (individuo **3**), ya

que mostraron un perfil probiótico, bioquímico y características morfológicas muy diferente al resto de los aislamientos. Resultaron ser más susceptibles a la acidez gástrica que los anteriores pero prácticamente no fueron afectados por la bilis. Este grupo resultó tener, en comparación a los demás, las mejores propiedades probióticas ya que deconjugaron y precipitaron ácidos biliares (no observado en las otras cepas) y su porcentaje de hidrofobicidad resultó considerable, lo cual les otorgaría mayores posibilidades de adherencia y permanencia en la mucosa intestinal. También se destacaron por tener un espectro de inhibición frente a bacterias patógenas más amplio (*Listeria monocytógenes*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*). Del punto de vista tecnológico, factores tales como pH y sales no afectaron su crecimiento y conservaron su viabilidad en leche acidificada durante 4 semanas a 5°C. Al igual que para los demás, este grupo de aislamientos afectó el desarrollo de bacterias lácticas de starters (*Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*).

Otro grupo de lactobacilos, los *Lactobacillus rhamnosus* aislados del individuo **4**, resultaron considerablemente susceptibles a la acidez gástrica y a la bilis. Esto, junto a valores bajos de hidrofobicidad, harían escasas las posibilidades de llegar viables en niveles altos a la mucosa intestinal. Sin embargo, a su favor poseen un espectro de inhibición de bacterias patógenas muy similar al grupo de *Lactobacillus gasseri*. Del punto de vista tecnológico, factores tales como pH y sales no afectaron su desarrollo en el medio y (con excepción del aislamiento F<sub>53</sub>), conservando su viabilidad en leche acidificada durante 4 semanas a 5°C.

El grupo de aislamientos que resultó más susceptible a la acidez gástrica fue el proveniente del individuo **5**. También fueron marcadamente afectados por la bilis, lo que hace

presuponer dificultades para arribar con éxito a la mucosa intestinal. También para estos aislamientos, factores tales como pH y sales no afectaron su desarrollo en el medio y conservaron su viabilidad en leche acidificada durante 4 semanas a 5°C.

Finalmente, el grupo de *Lactobacillus rhamnosus* del individuo **6** mostró características muy heterogéneas. Las bacterias lácticas de starters ensayadas no afectaron la viabilidad de este grupo de aislamientos. En la situación inversa, éstos tampoco lo hicieron frente a las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sólo lo hicieron levemente frente a las de *Lactococcus lactis* y más fuertemente frente a las de *Streptococcus thermophilus*. Frente a la solución gástrica simulada y a la bilis, resultaron considerablemente sensibles y poco inhibidores del crecimiento de las 4 bacterias patógenas ensayadas. Del punto de vista tecnológico, factores tales como pH y sales no afectaron su desarrollo en el medio y conservaron su viabilidad en leche acidificada durante 4 semanas a 5°C.

- Un número importante de aislamientos (54 cepas) se obtuvo a partir de 6 muestras de materia fecal de bebés alimentados sólo con leche materna. Todos respondieron a las características morfológicas de lactobacilos.
  
- De los 54 aislamientos, el 92.6% de los mismos se identificó como *Lactobacillus casei*, y el resto como *Lactobacillus* del Grupo 1, a partir del perfil de fermentación de carbohidratos (Manual Bergey). Posteriormente, con el estudio del desarrollo en medios selectivos y con los perfiles RAPD-PCR, se obtuvo la identificación definitiva de los aislamientos. Los adjudicados a *Lactobacillus* del Grupo 1 pasaron a ser considerados *Lactobacillus gasseri*, mientras que las cepas de *Lactobacillus casei* fueron adjudicadas a *Lactobacillus rhamnosus*.
  
- Al tratar los aislamientos con solución gástrica simulada, los mismos se vieron afectados en forma variable ya que se registraron disminuciones de entre 1 y 6.6 ordenes log. en los recuentos celulares. Sin embargo, expuestos a la bilis (0.15% y 0.30%), desarrollaron normalmente. Recién a partir de 0.6 % de bilis, se observaron mayores efectos inhibitorios sobre los mismos. En particular, los 4 aislamientos de *Lactobacillus gasseri* (individuo 3), prácticamente no fueron afectados en su viabilidad por las cuatro concentraciones de bilis ensayadas.

Resultó importante el efecto inhibitorio que ejerció el glicodeoxicolato de sodio (GDC) sobre la totalidad de los lactobacilos; sin embargo el taurocolato de sodio (TC), taurodeoxicolato de sodio (TDC) y glicolato de sodio (GC) no afectaron severamente el desarrollo de los mismos. Con respecto a la capacidad de deconjugar y precipitar esas

sales biliares, sólo las 4 cepas de *Lactobacillus gasseri* lo evidenciaron, pero únicamente frente a taurocolato de sodio (TC) y taurodeoxicolato de sodio (TDC).

La hidrofobicidad resultó un parámetro también cepa dependiente y sus valores no superaron el 53%.

Una importante aptitud probiótica que demostraron tener la casi totalidad de los aislamientos fue su poder inhibitorio frente a las 4 bacterias patógenas ensayadas: *Salmonella* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76, *Escherichia coli* V517 y *Listeria monocytógenes* ATCC15313.

- Del punto de vista de su aplicación tecnológica y, teniendo en cuenta los factores físico químicos a los cuales fueron sometidos los aislamientos, parte de los mismos fueron levemente afectados en su desarrollo frente a valores de pH de 4.5, mientras que a valores superiores no se observó efecto alguno. En cuanto a la presencia de ácido láctico en el medio, la totalidad de los aislamientos conservó una buena sobrevida cuando fueron inoculados en leche acidificada con este ácido y almacenados a 5°C. La presencia de NaCl y KCl (1%, 2% y 3%) no afectó el desarrollo de los aislamientos como así tampoco lo hizo el agregado al medio de acetaldehído (1000 ppm). Sin embargo este último a 2500 ppm y el diacetilo a 1000 ppm y 2500 ppm inhibieron (en mayor o menor medida) el crecimiento de los aislamientos intestinales, aunque debe tenerse en cuenta que estas concentraciones son muy superiores a las encontradas normalmente en productos lácteos fermentados.

Tampoco fueron afectados en su desarrollo, por el agregado de SLC de bacterias lácticas de starters. Contrariamente a esto, cuando se evaluó el efecto producido por el agregado

de SLC de los aislamientos sobre el crecimiento de bacterias lácticas de starters, se encontró efecto inhibitorio hacia *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* pero no frente a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

- Según los resultados obtenidos al aplicar criterios bioquímicos, probióticos, tecnológicos y genéticos para la diferenciación de cepas, resultó evidente que el análisis de un único criterio, entre los mencionados, no debería aplicarse para tal fin. Un examen integral de todos los caracteres resultó más exacto para identificar cepas distintas obtenidas de un mismo individuo.
  
- De acuerdo a lo observado en la caracterización de los aislamientos obtenidos, puede concluirse que resultaría erróneo asignar a los lactobacilos intestinales un rol “probiótico” o “no probiótico” ya que ninguna cepa (tal como fue demostrado en otros trabajos para probióticos comerciales) da un perfil probiótico completo. Cada capacidad probiótica investigada resultó cepa dependiente, por lo que, a los fines prácticos, debe pensarse más bien en utilizar combinaciones de cepas para mejorar el potencial probiótico de los productos y asegurar los efectos benéficos hacia la salud del huésped.

1. Tannock, G.W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5, 1059-1070.
2. Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. and Clemens R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 13-126.
3. Konings, W.N.; Kuipers O.P. and Huis in 't Veld J.H.J. (1999). Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. 199-394.
4. Wood, B. J.B. ed. 1992. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Applied Science London, England.
5. Nakasawa, Y. and Hosono, A.; ed. 1992. Functions of Fermented Milk. Challenges for the Health Sciences. Elsevier Applied Science. London, England.
6. Kociubinski, G. Bacterias acidolácticas y bifidobacterias: aptitudes probióticas. Tesis presentada para obtener el título de doctor. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (1999).
7. West, J.B. (1996) Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Cap. 6, 731-850.
8. Salminen, S.; Deighton, M.A.; Benno, Y. and Gorbach, S.L. (1998) Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects, Salminen, S. y von Wright, A. (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., 211-253.
9. Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Regular, nonsporing gram-positive rods. Bergeys's Manual (14) 1208-1234, 1418-1434.
10. Puhan, Z. (1999) Effect of probiotic fermented dairy products in human nutrition. *L'Industria del Latte*, 35, 3-11.

11. Lee, Y.; Nomoto, K.; Salminen S. and Gorbach S.L. (1999). Handbook of probiotics. (1) 1-22.
12. Dellaglio, F.; Lombardi, A. y Torriani S. (1998). Tassonomia e nuove prospettive nella identificazione dei microrganismi non starter di interesse caseario. *L'Industria del Latte* (1998), XXXIV, (3-4), 57-76.
13. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. and Collins, J.K. (1998) Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potencially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84, 759-768.
14. Corzo, G. and Gilliland, S.E. (1999) Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 472-480.
15. Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki T. and Mierau I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, 82, 2530-2535.
16. Corzo, G. and Guilliland, S.E. (1999) Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. *Journal of Dairy Science*, 82, 466-471.
17. Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. (2000) Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lact. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, 271-275.
18. Harrigan, W.F. y Mc Cance, M.E. (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
19. INPPAZ, OPS/OMS. (1993). Microbiología de alimentos. Control de calidad de medios de cultivo. Método Ecométrico.

- 
20. Romersburg, H.C. (1984). Cluster Analysis for Research. Belmont, CA: *Lifetime Learning Publications*.
21. Tailliez, P.; Quénee, P. y Chopin, A. (1996) Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: application de la RAPD à un groupe de lactobacilles. *Lait* 76, 147-158.
22. Reinheimer, J.A.; Candiotti, M.C.; Zalazar, C.A. y Demkow, M.R. (1988). Inibizione dei batteri coliformi con colture commerciali di *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 39 (5), 349-366.
23. Taranto, M. P.; Gonzalez de Llano, D.; Rodriguez, A.; Pesce de Ruiz Holgado, A. and Font de Valdez, G. (1996). Bile Tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products. *Milchwissenschaft* 51, 383-385.
24. Miller, J.H. (ed.) (1972). Assay of  $\beta$ -galactosidase. In: Experiments in Molecular genetics, 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
25. Biavati, B.; Sozzi, T.; Mattarelli, P. and Trovatelli, L.D. (1992) Survival of bifidobacteria from human habitat in acidified milk. *Microbiologica*, 15, 197-200.
26. Reniero, R.; Morelli L.; de Haen C. and Bottazzi V. (1991) Detection of permanent *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strains in weaned infants' gut. *Letters in Applied Microbiology* 13, 3-6.
27. Xanthopoulos, V.; Ztaliou, I.; Gaier, W.; Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1999) Differentiation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Applied Microbiology* 87, 743-749.

28. Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J. and Gopal, P.K. (1999) Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
29. Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Quénee, P.; Suarez, V. and Reinheimer, J. A. (1998) Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 591-596.
30. Marteau, P.; Minekus, M.; Havennar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80, 1031-1037.
31. Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal* 30, 2-7.
32. Chou, L. and Weimer, B. (1999) Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23-31.
33. Usman and Hosono, A. (1999) Viability of *Lactobacillus gasseri* and its cholesterol-binding and antimutagenic activities during subsequent refrigerated storage in nonfermented milk. *Journal of Dairy Science*, 82, 2536-2542.
34. Kociubinski, G.; Pérez, P. and De Antoni, G. (1999) Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62, 8, 905-912.
35. Bottazzi, V.; Zacconi, C. e Sarra, P.G. (ed.) (1985). Probiotica con Batteri Lattici. Futurgraf, Milano, Italia, p. 37 - 86.

36. Usman and Hosono, A. (1999) Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of Dairy Science*, 82, 243-248.
37. Walker, D.K. and Gilliland, S.E. (1993) Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76, 956-961.
38. Buck, L.M. and Gilliland, S.E. (1994) Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *Journal of Dairy Science*, 77, 10, 2925-2933.
39. Brashears, M.M.; Gilliland, S.E. and Buck, L.M. (1998) Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 81, 2103-2110.
40. Klaver, F.A.M. and Van der Meer, R. (1993) The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59,4, 1120-1124.
41. Shah, N. and Jelen, P. (1990) Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55, 2, 506-509.
42. Hughes, D.B. and Hoover, D.G. (1995) Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 268-276.
43. Mustapha, A.; Jiang, T. and Savaiano, D.A. (1997) Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 80, 1537-1545.

- 
44. Pérez, P.F.; Minnaard, Y.; Disalvo, E.A. and De Antoni, G.L. (1998) Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 21-26.
45. Gómez Zavaglia, A.; Kosiubinsky, G.; Pérez P.F. and De Antoni, G.L. (1998) Isolation and Characterization of Bifidobacterium Strains for Probiotics Formulation. *Journal of Food Protection*, 61, 7, 865-873.
46. Kiely, L.J. and Olson, N.F. (2000) The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, 17, 277-291.
47. Gonzáles, S.N.; Apella, M.C.; Romero, N.C.; Nader de Macías, M.E. and Oliver, G. (1993) Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *Journal of Food Protection*, 56, 9, 773-776.
48. Dubois, G.; Smoragiewicz, W.; Charbonneau, R. et Gagnon, M. (1982) Inhibition de quelques bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes par *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus helveticus*. *Lait*, 62, 681-687.
49. Xanthopoulos, V.; Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N (2000) Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, 17, 205-215.
50. Lortie, L.; Simard, R.E. and Lavoie, M.C. (1992) Characterization of the antimicrobial substances produced by four *Lactobacillus casei* strains. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10, 389-400.
51. Kailasapathy, K. and Rybka, S. (1997) *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.- their therapeutic potential and survival in yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology* 52, 28-35.

52. Gomez, A.M.P.; Teixeira, M.G.M. and Malcata, F.X. (1998) Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 221-240.
53. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X.; Klaver, F.A.M. and Grande, H.J. (1995) Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *The Netherland Milk Dairy Journal* 49: 71-95.
54. Gomes, A.M.P.; Vieira, M.M. and Malcata, F, X. (1998) Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering*, 36, 281-301.
55. Reddy, K.A. and Marth, E.H. (1995) Lactic acid bacteria in Cheddar cheese made with sodium chloride, potassium chloride or mixtures of the two salts. *Journal of Food Protection*, 58, 62-69.
56. Nighswonger, B.D.; Brashears, M.M. and Gilliland, S.E. (1996) Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 79, 212-219.
57. Gilliland, S.E. y Speck, M.L. (1997) Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 60, 1394-1399.
58. Sanders, M.E.; Walker, D.C.; Walker, K.M.; Aoyama, K. and Klaenhammer, T.R. (1996) Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *Journal of Dairy Science*, 79, 943-955.
59. Shah, N.P. and Ravula, R.R. (2000) Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 3, 127-131.

60. Shah, N.P.; Lankaputhra, W.E.V.; Britz, M.L. y Kyle, W.S.A. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5, 515-521.
61. Vinderola, C.G.; Bailo, N.B and Reinheimer, J.A. (2000) Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.

## **8.1 Medios de Cultivo.**

### **8.1.1 Medios de cultivo no selectivos**

#### **Medio Stuart**

Tioglicolato de sodio	0.9 g
Glicerofosfato de sodio	10.0 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Azul de metileno	0.002 g
Agar	3.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Se disuelven 7.5 g de medio de cultivo en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

#### **Agua de Peptona 0.1% (p/v)**

Se disuelve 1.0 g de peptona de caseína en 1000 ml de agua destilada. Fraccionar en tubos de a 10 ml. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

**Agar Plate Count**

Extracto de levadura	2.5 g
Tripteína	5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.0 ± 0.2	

Se suspendieron 23.5 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada, se calienta hasta total disolución, se fracciona en caso que fuera necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

**Agar MRS**

Polipeptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Tween 80	1,08 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g

---

MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6.4 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Caldo MRS**

Polipeptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	10 g
Glucosa	20 g
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Tween 80	1.08 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6.4 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Caldo MRS adicionado de glicerol**

Se preparan 1000 ml de Caldo MRS y se le adiciona 150 ml de glicerol. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Caldo Elliker**

Triptona	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Gelatina	2.5 g
Lactosa	5.0 g
Sucrosa	5.0 g
Glucosa	5.0 g
Acetato de sodio	1.5 g
Cloruro de sodio	4.0 g
Ácido ascórbico	0.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6.8 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Agar Elliker**

Se prepara un caldo Elliker al cual se le adiciona 15.0 g de agar por cada 1000 ml de caldo. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Caldo Triptona Soja (TS)**

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soja	3.0 g
D(+)-Glucosa	2.5 g
NaCl	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.3 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

**Caldo BHI**

Infusión de cerebro	20.0 g
Infusión de corazón	25.0 g
Peptona	10.0 g
D(+)-Glucosa	2.0 g
NaCl	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

**Agar BHI**

Se prepara un caldo BHI al cual se le adiciona 15.0 g de agar por cada 1000 ml de caldo. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

**Agar Nutritivo**

Peptona de carne	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g

Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH (25°C) 7.0 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Leche descremada reconstituida (LDR)**

Se disuelven 100 g de leche en polvo descremada en 1000 ml de agua destilada precalentada a 40°C, se fracciona en caso que fuera necesario. Esterilizar durante 30 min. a 115°C.

### **Medio semisólido Gibson**

Extracto de levadura	2.5 g
D(+) -Glucosa	50 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O 0.4%, pH 6.5	10 ml
(o Jugo de tomate)	100 ml
Leche descremada reconstituida (10%)	800 ml
Agar Nutritivo	200 ml
pH (25°C) 6.5 ± 0.2	

Se mezcla el jugo de tomate (o la solución de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) con la leche descremada reconstituida y calentando, se agrega el extracto de levadura y la D(+)Glucosa. Se adiciona el agar nutritivo y se ajusta el valor de pH en 6.5. fraccionar en tubos de 10 ml. Esterilizar durante 30 min. a vapor fluente, 3 días sucesivos. Después de cada esterilización se enfría rápidamente en baño de agua fría.

### **API 50 CHL**

Polipeptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio. $3\text{H}_2\text{O}$	5 g
Citrato diamónico	2 g
Sulfato de magnesio. $7\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
Sulfato de manganeso. $4\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Púrpura de bromocresol	0.17 g
Agua destilada	1000 ml
pH (25°C) $6.9 \pm 0.1$	

Se disuelven los componente en el agua destilada. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### 8.1.2 Medios de cultivo selectivos

#### Agar MRS-Bilis

Agar MRS fundido y atemperado a 50 °C, al cual se adicionan 1,5 ml cada 100 ml de medio agarizado de una solución de **bilis** al 10%. La solución de bilis se esteriliza en autoclave a 121°C por 20 minutos.

#### Agar MRS-LP

Agar MRS al cual se adiciona una solución de Cloruro de **Litio** y **Propionato** de Sodio. Las concentraciones finales de las sales en el medio de cultivo deben ser:

Cloruro de <b>Litio</b>	2g/l
<b>Propionato</b> de Sodio	3g/l

Las sales se pueden agregar al medio deshidratado antes de la esterilización (15 min. a 121°C).

### 8.1.3 Medios de cultivo modificados

#### Agar MRS-TC, MRS-TDC, MRS-GC y MRS-GDC

Agar MRS, al cual se adicionaron las sales biliares de manera tal de alcanzar en el medio una concentración final de 0.5 g% (p/v). Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

#### Caldo MRS base - Lactosa

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	10 g
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio.7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Sulfato de manganeso.4H <sub>2</sub> O	0.05 g
Tween 80	1.08 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6.4 ± 0.2	

Se disuelven los componentes del medio en agua destilada y se calienta si es necesario. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

Se pesaron 20 g de lactosa, se disolvieron en agua destilada y se llevaron a 100 ml. Esterilizar por filtración. Esta solución se agrega al caldo de manera tal que la concentración final del azúcar sea 0.1% (p/v).

## **8.2 Reactivos**

### **Buffer Fosfato de Potasio pH 6.5**

Se prepararon soluciones de fosfato monoácido de potasio 1M y fosfato diácido de potasio 1M, mezclando 38.1 ml de la primera con 61.9 ml de la segunda. De esta manera queda constituido el buffer fosfato de potasio de pH 6.5. Esterilizar durante 15 min. a 121°C.

### **Mezcla Tolueno : Acetona**

Se realizó una mezcla de 1 parte de tolueno en 9 partes de acetona. Se conservó la mezcla en refrigeración.

### **Solución de ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido)**

Se disolvieron 40 mg de ONPG en 10 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración y conservar a -20°C.

### **8.3 Tablas**



Tabla 23- Patrón simplificado de fermentación de carbohidratos para el género *Lactobacillus*. Manual de Bergey (9).

<b>Especie</b>	<b>Celobiosa</b>	<b>Gluconato</b>	<b>Manitol</b>	<b>Manosa</b>	<b>Melezitosa</b>	<b>Ribosa</b>
<i>Lactobacillus</i> del grupo 1	+	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> del grupo <i>casei</i>	+	+	+	+	+	+

En color rojo se indican los carbohidratos típicamente fermentados por cada grupo.



