

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

BIFIDOBACTERIAS DE LECHE MATERNA
ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, TECNOLÓGICOS
Y FUNCIONALES

Lic. María Florencia Zacarías

Director: Dr. Gabriel Vinderola

Co-Director: Dr. Jorge Alberto Reinheimer

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

Los resultados de esta Tesis fueron publicados parcialmente en los siguientes trabajos científicos:

Revistas internacionales con referato

1. Zacarías, M.F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J. y Vinderola, G. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. 2011. *International Dairy Journal*, 21(8):548-55.
2. Vinderola, G., Zacarías, M.F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J. y Heller, K. Resistance to simulated gastric digestion as an indicator of functionality for *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1. 2012. *Food Microbiology*, 30(1):274-80.
3. Zacarías, M.F., Reinheimer, J., Forzani, L., Granette, C. y Vinderola, G. Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice. 2014. *Beneficial Microbes*, 5(4):427-36.

Congresos:

1. “Strategies for the dehydration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1”. Zacarías MF, Ambros S, Reinheimer J, Vinderola G, Kulozik U. V International Congress of Food Science and Technology (CICYTAC 2014), Noviembre de 2014. Córdoba, ARGENTINA.
2. “Conjugated bioactive lipid production by bifidobacteria strains isolated from human breast milk”. Terán. V., Zacarías, M.F., Luna Pizarro, P., Vinderola, G., Medina, R. y Van Nieuwenhove, C. IV Simposio Internacional de BAL, Octubre de 2013. Tucumán, ARGENTINA.
3. “Efecto protector de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 en un modelo de infección murino con *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*”. Zacarías, MF, Burns, P, Forzani, L, Reinheimer, J y Vinderola, G. MICROAL 2012. IV

Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, Noviembre de 2012. Buenos Aires, ARGENTINA.

4. “Producción de biomasa de bifidobacterias en suero de quesería”. Zacarías, M.F., Bockelmann, W., Heller, K., Vinderola, G. y Reinheimer, J. II Simposio Argentino de Lactología, Agosto de 2012. Santa Fe, ARGENTINA.
5. “Efecto del tratamiento tecnológico en la respuesta inmune desencadenada por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 y en su efecto protector frente a una infección con *Salmonella*”. Zacarías, M.F., Souza, T.C., Cara, D.C., Vieira, L.Q., Nicoli, J., Reinheimer, J. y Vinderola, G. 26° Congresso Brasileiro de Microbiologia – Simpósio Internacional de Bactérias Lácticas, Octubre de 2011. Foz do Iguacu, BRASIL.
6. “Utilidad del ratón como modelo para el estudio de la influencia de prebióticos y probióticos sobre el tránsito intestinal”. Zacarías, M.F., Torti, P., Nicoli, J., Reinheimer, J. y Vinderola, G. I Jornada Nacional de Bioteristas, Noviembre de 2010. Buenos Aires, ARGENTINA.
7. “Efecto del secado spray y el período de almacenamiento sobre la capacidad funcional de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1”. Zacarías, M.F., Burns, P., Vinderola, G. y Reinheimer, J. XII Congreso Argentino de Microbiología, Octubre de 2010. Buenos Aires, ARGENTINA.
8. “Antimicrobial spectrum of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 and the influence of drying on functionality”. Souza, T.C., Zacarías, M.F., Carmona, D., Vieira, L., Nicoli, J., Reinheimer, J. y Vinderola, G. XII Congreso Argentino de Microbiología, Octubre de 2010. Buenos Aires, ARGENTINA.
9. “Influence of growth conditions and the food matrix on the functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1”. Vinderola, G., Bockelmann, W., Neve, H., Zacarías, F., Reinheimer, J. y Heller, K.J. XII Congreso Argentino de Microbiología, Octubre de 2010. Buenos Aires, ARGENTINA.
10. “Evaluación preliminar de la utilidad del ratón para el estudio de la influencia de prebióticos sobre el tránsito intestinal”. Zacarías, M.F., Burns, P., Nicoli, J.,

Reinheimer, J. y Vinderola, G. II Congreso Internacional sobre Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Agosto 2010. Mendoza, ARGENTINA.

A mis directores, el Dr. Gabriel Vinderola y el Dr. Jorge Reinheimer, por darme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en su grupo de investigación. Por su formación y su confianza durante todos estos años, y por permitirme crecer como profesional y persona.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por haber posibilitado el desarrollo de esta Tesis a través de las becas de posgrado que me fueron otorgadas.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Ana Binetti, por su supervisión, ayuda y consejo en la etapa de identificación y caracterización genética de los aislamientos, y a la Dra. Liliana Forzani, por ayudarme a analizar los datos del capítulo IIIc.

A todos mis compañeros del INLAIN, que hicieron mediante un coffee break, un matecito robado o una discusión entre flujos laminares, que mi paso por el instituto fuera más placentero. A Patri, Manqui y Aye, mis compañeras de viajes y aventuras, a Guille por sus charlas catárticas, a Clau, Silvi y Sol por sus camaradería de pasillo, a Desi, y Agos, por hacer mis días más alegres y descontracturados, y a Nati, por tenerme una paciencia enorrorme como co-directora y colaborar activamente en parte de los experimentos del capítulo IIIb.

A la Dra. Roxana Paez, Luisi y Gabi, por recibirme siempre en el INTA Rafaela con una sonrisa, y posibilitar los ensayos con secado spray, parte fundamental de esta Tesis.

Al Dr. Jacques Nicoli, por su cariño, por transmitirme su serenidad y darme confianza en mis capacidades. A las Dras. Denise Carmona y Leda Quercia, por su paciencia y buena predisposición. Su orientación fue indispensable para la realización de parte del trabajo del Capítulo III. A todo el grupo de trabajo del ICB (Belo Horizonte, Brasil), especialmente Tassinha, por su amistad, por compartir horas interminables de trabajo o escapadas a algún butequim por una cervecita bien fría.

Al Dr. Knut Heller, por recibirme en el Max Rubner Institute (Kiel, Alemania) con los brazos abiertos y al Dr. Wilhelm Bockelmann, por transmitirme un poquito de su gran experiencia con fermentadores y liofilizadores. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo del capítulo IIa. A Torben y Stephan, por su comprensión y compañía, y brindarme su amistad hasta el día de hoy.

Al Dr. Ulrich Kulozik (“Uli”) del LMVT (TUM, Friesing, Alemania), por darme la oportunidad de trabajar y aprender en un instituto de excelencia, rodeada de un grupo humano increíble. El apoyo de todos fue vital para el trabajo que llevó al capítulo IIb. En especial a Sabine, por ser mi gran respaldo y compañera, a Hansi, por adoptarme y contagiarme su locura, a Yu y Miri por nuestras dulces charlas de oficina, a Astrid y Marianne (mis quasi madres alemanas), y a Jannika, Malee, Lisa, Vicky, Patrick y Jose por tantos lindos momentos compartidos.

Por último, a los tres grandes pilares de mi vida, sin los que estos años no habrían sido tan especiales y enriquecedores:

A Eli y Juanito, por su amistad incondicional, por estar siempre, compartiendo mis alegrías y haciendo el aguante. A Verito, Juanga, Mai, Aine, Pinkys y Cholis, por estar en las buenas y en las malas, y compartir tantas charlas filosóficas, discusiones eternas, salidas y reuniones gastronómicas. Que sean muchas más!

A mi FAMILIA: Papi, Coquita, Fer, Ova, Juancito... ustedes son en gran parte responsables de este momento, por su confianza ciega, su paciencia, sus consejos, su amor incondicional. Por hacerme el aguante los fines de semana y feriados de trabajo con animales, haciéndome de choferes, esperándome para almorzar, acomodándose a *mis horarios*... A mi madrinita querida, a Luci y a mis sobris truchos Lorenzo y Clari, por dar alegría a mi vida. Al resto de la flia. por estar siempre al pie del cañón y darme su cariño y contención.

A Dios, gracias por nunca soltarme la mano y darme una vida llena de bendiciones.

Esta Tesis va dedicada a vos Mamuchis,
mi roca y mi inspiración.

	Página
Resumen.	1
Summary.	6
Objetivos.	10
Capítulo I: Leche materna, fuente de cultivos potencialmente probióticos.	11
1. Introducción.	12
1.1. Colonización del tracto gastrointestinal.	12
1.2. Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune.	13
1.3. Leche materna humana y microorganismos.	14
2. Objetivos.	17
3. Materiales y métodos.	18
3.1. Muestras.	18
3.2. Aislamiento de microorganismos de interés para la industria de alimentos.	18
3.3. Identificación molecular.	19
3.4. Estudio de la diversidad genética (RAPD-PCR).	19
4. Resultados y discusión.	21
5. Conclusiones parciales.	31
Capítulo II: Propiedades tecnológicas de bifidobacterias de leche materna. Potencial uso en la industria láctea.	32
Introducción General.	33
Probióticos.	33
Probióticos en la industria láctea.	34
Selección de bacterias probióticas. Aspectos tecnológicos.	35

Capítulo IIa:	Desarrollo de bifidobacterias en medios de cultivo formulados y con suero de quesería.	37
1.	Introducción.	38
2.	Objetivos.	40
3.	Materiales y métodos.	41
3.1.	Cepas.	41
3.2.	Medios de cultivo.	41
3.3.	Desarrollo en medios de cultivo económicos.	41
3.4.	Liofilización y utilidad del suero de quesería como agente lioprotector.	42
3.5.	Desarrollo en suero de quesería en biofermentador.	44
3.6.	Análisis estadístico.	46
4.	Resultados y discusión.	47
4.1.	Desarrollo en medios de cultivo económicos.	47
4.2.	Utilidad del suero de quesería como agente lioprotector.	50
4.3.	Producción de biomasa en suero de quesería en biofermentador.	53
5.	Conclusiones parciales.	57
Capítulo IIb:	Tecnologías para la deshidratación de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	58
1.	Introducción.	59
2.	Objetivos.	63
3.	Materiales y métodos.	64
3.1.	Microorganismo.	64
3.2.	Preparación de las muestras y agentes protectores.	64
3.3.	Selección de condiciones de secado.	66
3.3.1.	Liofilización.	67
3.3.2.	Secado spray.	67
3.3.3.	Secado al vacío.	68

	Página
3.3.4. Secado al vacío asistido con microondas.	69
3.3.5. Liofilización asistida con microondas.	70
3.4. Test de almacenamiento acelerado.	71
3.4.1. Determinación de la viabilidad celular.	72
3.4.2. Determinación de humedad y actividad acuosa.	73
3.4.3. Determinación de integridad de membrana (%).	73
3.5. Secado spray de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche descremada a escala laboratorio e industrial.	74
3.6. Análisis estadístico.	75
4. Resultados y discusión.	76
4.1. Selección de parámetros de secado.	76
4.1.1. Liofilización.	76
4.1.2. Secado spray.	78
4.1.3. Secado al vacío.	81
4.1.4. Secado al vacío asistido por microondas.	82
4.1.5. Liofilización asistida con microondas.	85
4.2. Test de almacenamiento.	86
4.3. Secado spray de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche descremada a escala laboratorio e industrial.	96
5. Conclusiones parciales.	100
Capítulo III: Estudio funcional de una cepa de leche materna, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	101
Introducción General.	102
Sistema inmune asociado a la mucosa intestinal.	102
Probióticos y caracterización funcional.	105

	Página
Capítulo IIIa: Estudio funcional in vitro de bifidobacterias de leche materna y evaluación de su interacción con el intestino.	110
1. Introducción.	111
1.1. Prebióticos, probióticos y función intestinal.	111
2. Objetivos.	114
3. Materiales y métodos.	115
3.1. Seguridad y caracterización funcional in vitro.	115
3.1.1. Resistencia a antibióticos.	115
3.1.2. Hidrofobicidad.	116
3.1.3. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada.	116
3.1.4. Síntesis de derivados conjugados del ácido linoleico y linolénico.	117
3.1.5. Actividad antimicrobiana in vitro.	117
3.2. Evaluación preliminar de un modelo murino para el estudio de la influencia de inulina sobre el tránsito intestinal.	119
3.2.1. Animales.	119
3.2.2. Determinaciones analíticas.	119
3.3. Influencia de la administración de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 y de inulina en un modelo murino de tránsito intestinal.	120
3.3.1. Animales y alimentación.	120
3.3.2. Recuento presuntivo de bifidobacterias en heces.	120
3.4. Análisis estadístico.	120
4. Resultados y discusión.	122
4.1. Evaluación in vitro de la seguridad y funcionalidad de los aislamientos de leche materna.	122
4.2. Evaluación preliminar de un modelo murino para el estudio de la influencia de inulina sobre el tránsito intestinal.	131
4.3. Administración de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 e inulina en un modelo murino de tránsito intestinal.	134
5. Conclusiones parciales.	137

	Página
Capítulo IIIb: Capacidad inmunomoduladora en intestino de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	138
1. Introducción.	139
2. Objetivos.	140
3. Materiales y métodos.	141
3.1. Efecto inmunoestimulador de un cultivo fresco de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	141
3.1.1. Microorganismo.	141
3.1.2. Animales y alimentación.	141
3.1.3. Evaluación in vivo de la seguridad de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	142
3.1.4. Enumeración de células productoras de IgA.	142
3.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la funcionalidad de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	143
3.2.1. Microorganismo.	143
3.2.2. Animales y alimentación.	143
3.2.3. Cuantificación de IgA secretoria en contenido intestinal y enumeración de células productoras de IgA.	144
3.2.4. Determinación de IL-10.	145
3.3. Análisis estadístico.	145
4. Resultados y discusión.	146
4.1. Efecto inmunoestimulador de un cultivo fresco de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	146
4.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la funcionalidad de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	148
5. Conclusiones parciales.	153
Capítulo IIIc: Protección de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 frente a un modelo de salmonelosis.	154
1. Introducción.	155
1.1. Salmonella: taxonomía y características generales.	155

	Página
1.2. Salmonella: mecanismos de infección.	155
1.3. Salmonelosis.	157
1.4. Modelos de salmonelosis y probióticos: antecedentes.	158
2. Objetivos.	159
3. Materiales y métodos.	160
3.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento.	160
3.2. Evaluación del efecto protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 en ratones convencionales Swiss.	160
3.2.1. Animales y alimentación.	160
3.2.2. Evaluación histopatológica de íleon e hígados.	161
3.2.3. Determinación de la actividad de mieloperoxidasa.	162
3.2.4. Determinación de S-IgA e IFN- γ en contenido intestinal.	163
3.3. Evaluación del efecto protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 en animales BALB/c.	164
3.3.1. Animales.	164
3.3.2. Determinación de la dosis infectiva de Salmonella.	164
3.3.3. Determinación de la dosis protectora de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	165
3.3.4. Determinación del período de administración protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.	165
3.3.5. Comparación de la administración preventiva vs. Preventiva-terapéutica de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 frente a una infección con Salmonella ser. Typhimurium.	165
3.3.5.i. Animales y alimentación.	165
3.3.5.ii. Ensayo de translocación.	166
3.3.5.iii. Determinación de S-IgA y citoquinas.	166
3.4. Análisis estadístico.	167
4. Resultados y discusión.	169
4.1. Evaluación del efecto protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 en ratones convencionales Swiss.	169

	Página
4.1.1.	Evaluación histopatológica de íleon e hígados. 169
4.1.2.	Determinación de actividad mieloperoxidasa. 172
4.1.3.	Determinación de S-IgA e IFN- γ en contenido intestinal. 173
4.2.	Evaluación del efecto protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 en ratones BALB/c. 177
4.2.1.	Determinación de la dosis infectiva de <i>Salmonella</i> ser Typhimurium. 177
4.2.2.	Determinación de la dosis protectora de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1. 178
4.2.3.	Determinación del período de administración protector de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1. 179
4.2.4.	Comparación de la administración preventiva vs. preventiva-terapéutica de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 frente a una infección con <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium. 180
5.	Conclusiones parciales. 191
	Conclusiones Finales. 194
	Perspectivas. 196
	Bibliografía. 197
	Anexo. 226

ABRV	Agar bilis rojo violeta
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
a_w	Actividad acuosa (Water Activity)
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas (Basic Local Alignment Search Tool, en inglés)
CD	Células Dendríticas
CLA	Ácido Linoleico Conjugado (Conjugated Linoleic Acid)
CLNA	Ácido Linolénico Conjugado (Conjugated Linolenic Acid)
CMP	Caseinomacropéptidos
DGS	Digestión Gástrica Simulada
EFSA	Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (European Food Safety Authority)
EPS	Exopolisacáridos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (Gut-Associated Lymphoid Tissue)
IBS	Síndrome del intestino iritado (Irritable Bowel Syndrome)
IgA	Inmunoglobulina A
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
MPO	Mieloperoxidasa
NIH	Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health) de los Estados Unidos
NLM	Nódulos Linfáticos Mesentéricos

PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PI	Ioduro de Propidio (Propidium Iodide)
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
SIM	Sistema Inmune de la Mucosa
SQ	Suero de quesería
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa (Tumoral Necrosis Factor Alpha)
TGI	Tracto gastrointestinal
TO	Naranja de Tiazol (Thiazole Orange)
WHO	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
YE	Extracto de levadura (Yeast Extract)

Microorganismos

B.	Bifidobacterium
E.	Escherichia
L.	Lactobacillus
S.	Salmonella

En los últimos años la tendencia de la sociedad hacia un estilo de vida más saludable y una alimentación más equilibrada ha impulsado la investigación hacia el diseño de alimentos funcionales que otorguen un beneficio al consumidor, más allá del nutritivo. La leche materna humana es un alimento completo y complejo, fundamental para el desarrollo normal de los niños en sus primeros meses de vida, por lo que podría ser considerada como el alimento funcional natural por excelencia. No sólo tiene un alto valor nutritivo y contiene inmunoglobulinas y agentes bioactivos, sino que además es una fuente de bacterias que son transferidas de la madre al hijo desde el primer día de lactancia. Estas bacterias, entre las que se encuentran bifidobacterias y lactobacilos, son responsables en parte de la colonización temprana del tracto gastrointestinal del recién nacido y de la correcta maduración del sistema inmune asociado al mismo. Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, confieren un efecto saludable al hospedador. A nivel mundial, cepas específicas de lactobacilos y bifidobacterias, son las más estudiadas por sus efectos benéficos y las más comercializadas masivamente en productos lácteos y suplementos dietarios, entre otros. En este contexto, el uso de microorganismos provenientes de leche materna humana como probióticos, para su incorporación a alimentos funcionales direccionados a niños en sus primeros años de vida, resulta de potencial interés científico y para la industria de alimentos. Sin embargo, para que un microorganismo sea considerado probiótico, se debe recorrer un largo camino desde su aislamiento hasta la llegada al consumidor, donde, fundamentalmente, tres aspectos deben ser evaluados. En primer lugar, la seguridad de la cepa debe ser garantizada. En este sentido, contar con un microorganismo aislado a partir de una fuente segura como es la leche materna facilitaría esta afirmación, sumado a que los lactobacilos y bifidobacterias generalmente son reconocidos como seguros (GRAS, según su sigla en inglés), y además cuentan con una larga historia de consumo seguro. Los otros dos aspectos son igualmente importantes: la funcionalidad del microorganismo, es decir, su capacidad de inducir un efecto benéfico comprobable, y su resistencia a los procesos tecnológicos necesarios para ser producido en grandes volúmenes, vehiculizado en el

alimento o suplemento, y mantenerse viable en concentraciones adecuadas hasta el momento de ser consumido.

En la presente Tesis Doctoral se buscó avanzar en el conocimiento sobre los microorganismos presentes en la leche materna humana que pudieran ser de interés para la industria de alimentos, particularmente las bifidobacterias, de manera de evaluar su potencial tecnológico y funcional para ser utilizadas en alimentos o suplementos funcionales. En una primera etapa (Capítulo I), se trabajó en colaboración con diversas instituciones de salud y personal médico de la ciudad de Santa Fe y se realizaron aislamientos a partir de muestras de leche materna de madres locales, entre el día 1 y la semana 8 posparto. Los aislamientos presuntivos de bifidobacterias (y lactobacilos) fueron estudiados microbiológicamente y genéticamente (RAPD PCR) e identificados molecularmente, por secuenciación del ARNr 16S. Se conformó una colección de bacterias de leche materna, compuesta por 6 cepas de bifidobacterias correspondientes a 3 especies distintas: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium dentium*, además de 4 cepas de lactobacilos. A continuación se estudió el potencial tecnológico y funcional de las cepas de bifidobacterias, principalmente una de ellas, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Si bien a fines de facilitar la organización de los resultados, en el presente trabajo se informan primero los estudios relacionados al aspecto tecnológico (Capítulo II) y luego los estudios funcionales (Capítulo III), en realidad ambos aspectos están estrechamente relacionados por lo que han sido estudiado en paralelo a lo largo del desarrollo de la presente Tesis.

Respecto a la caracterización tecnológica, en primer lugar se evaluó el desarrollo de las cepas en diferentes medios de cultivo, de bajo costo y formulados con suero de quesería, a fines de hallar condiciones de crecimiento adecuadas para las mismas. No sólo se analizaron las condiciones de cultivo para obtener un alto número de células viables sino también cultivos resistentes al almacenamiento, a condiciones de acidez (simulación de digestión gastrointestinal) y al proceso de deshidratación más utilizado por las industrias productoras de cultivos lácticos y probióticos: la liofilización. Se observó un comportamiento diferencial entre las distintas cepas estudiadas, y en particular *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostró ser una cepa robusta, capaz de ser

desarrollada en medios de cultivo de bajo costo con buenos rendimientos y alta resistencia a la liofilización, al almacenamiento y a la simulación a la digestión gástrica, por lo que fue seleccionada para los estudios tecnológicos posteriores. En una segunda etapa, se evaluaron diferentes tecnologías de deshidratación sobre un cultivo concentrado de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 producido a escala industrial por una empresa italiana productora de cultivos lácticos. Se estudiaron algunas tecnologías de deshidratación utilizadas a nivel industrial, como la liofilización y el secado spray, y otras no convencionales como el secado al vacío y el secado al vacío y la liofilización asistidos por microondas. La liofilización y la liofilización asistida por microondas fueron las tecnologías para las cuales se obtuvo una mayor sobrevida de la cepa en estudio, cuando se las aplicó en el cultivo sin agregado de agentes protectores, mientras que el secado spray fue la tecnología menos efectiva bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, la adición de diversos agentes protectores (lactosa, maltodextrina, sorbitol, leche descremada, caseinomacropéptidos) permitió mejorar la sobrevida de los cultivos deshidratados en todos los casos. La lactosa fue seleccionada como agente protector para comparar las diversas tecnologías en un test de almacenamiento acelerado de 8 semanas en condiciones no óptimas (25°C, actividad acuosa de 0,23 y 0,43, atmósfera aeróbica). Para la actividad acuosa de 0,23, todos los cultivos mostraron niveles satisfactorios de viabilidad al finalizar el período de almacenamiento, mientras que a una actividad acuosa de 0,43 en todos los casos se observaron importantes pérdidas de viabilidad. Los resultados obtenidos confirmaron la robustez de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y demostraron que es una cepa versátil, capaz de resistir diferentes tecnologías de deshidratación y de sobrevivir en condiciones de almacenamiento adversas, por lo que posee potencial tecnológico para ser utilizada en la industria alimenticia o farmacéutica. Por último, con vistas a simular la adición de la cepa a una fórmula infantil, se realizaron ensayos preliminares de secado spray en leche descremada. Esta tecnología de deshidratación está disponible a nivel nacional en medianas y grandes industrias lácteas, por lo que su escalamiento y aplicación serían factibles. Se evaluó la sobrevida de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 al secado spray en leche descremada al 20% (p/v), a escala laboratorio e industrial. Se logró obtener polvos con humedades satisfactorias y sobrevida aceptable (reducciones

de viabilidad $\leq 0,5$ órdenes log a escala industrial y $\leq 0,2$ órdenes log a escala laboratorio). Estos resultados indican que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 posee potencial tecnológico para ser incorporada, mediante secado spray, a una fórmula infantil.

La seguridad y caracterización funcional de los aislamientos de leche materna se evaluaron a través de ensayos in vitro e in vivo. En una primera etapa de ensayos in vitro se analizó la resistencia de las 6 cepas de bifidobacterias a diversos antibióticos, su hidrofobicidad superficial y su resistencia a una simulación de digestión gastrointestinal en etapas sucesivas de pH ácido-pepsina, shock de sales biliares a pH 8 y exposición a sales biliares-pancreatina. En general se observaron resultados de resistencia a antibióticos e hidrofobicidad acordes a lo reportado previamente para miembros del género *Bifidobacterium*. Respecto a la digestión gastrointestinal, las 4 cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* (INL1, INL2, INL4 e INL5) y la cepa *B. longum* LM7a fueron resistentes a la acidez gástrica simulada y al shock de bilis, mientras que sólo *B. longum* LM7a fue capaz de sobrevivir a la exposición a pancreatina y *B. dentium* LM8a' mostró gran sensibilidad desde la primer etapa de la simulación. También se evaluó la capacidad de algunas de las cepas de sintetizar derivados conjugados del ácido linoleico y del ácido linolénico, siendo *B. animalis* subsp. *lactis* INL2 la cepa con mayor capacidad de síntesis entre las estudiadas para estos lípidos bioactivos.

Por último, para evaluar la funcionalidad en ensayos in vivo en ratones, se seleccionó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Se la utilizó en un modelo de tránsito intestinal, siendo administrada como cultivo puro o acompañada por inulina, un prebiótico con efecto bifidogénico reconocido, y en ambos casos fue posible detectar bifidobacterias presuntivas en las heces de los animales que la recibieron de forma oral, lo que indicaría su capacidad de sobrevivir al tránsito intestinal in vivo. También se analizó su capacidad inmunoestimuladora a nivel intestinal y su capacidad protectora frente a un patógeno intestinal (*Salmonella*), cuando se la administró como cultivo fresco a diferentes concentraciones y períodos de tiempo. Se utilizaron diversos diseños experimentales, dos cepas de ratones distintas (BALB/c y Swiss) y se evaluó la influencia de los tratamientos tecnológicos (secado spray, liofilización, congelamiento)

en las propiedades funcionales. La cepa fue capaz de estimular la respuesta inmune mucosa intestinal mediada por IgA cuando se la administró como cultivo fresco, y demostró capacidad protectora frente a una cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, disminuyendo los indicadores de daño inflamatorio y la translocación del patógeno a sitios extra intestinales, como bazo e hígado. Cuando fue sometida a tratamientos tecnológicos, mantuvo algunas de sus propiedades inmunoestimuladoras principalmente en su forma de cultivo secado spray, si bien se observó una cierta variabilidad en los resultados dependiente del diseño experimental utilizado y de la variabilidad intrínseca asociada al trabajo con animales. En su conjunto, los resultados obtenidos del estudio funcional in vivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 permiten postularla como una bacteria potencialmente probiótica, con capacidad de estimular la función inmune en el intestino y protegerlo parcialmente frente a una infección con *Salmonella* ser. Typhimurium. Estos hechos, sumado a su robustez ante diversos procesos tecnológicos, en escala laboratorio e industrial, además de la capacidad de mantener su funcionalidad cuando es sometida a los mismos, particularmente el secado spray, posicionan a *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como el primer aislamiento de leche materna humana del país con potencial probiótico demostrado en estudios in vivo y con potencial de ser transferida a la industria, una vez realizados los estudios clínicos en humanos necesarios para verificar los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis.

In the last years, the society's trend towards a healthier lifestyle and a more balanced nutrition has encouraged research on functional foods. Breast milk is a complex and complete food, essential for the normal development of infants in the first years of life, so it could be considered as an outstanding natural functional food. It has high nutritional value and contains immunoglobulins and bioactive agents, as well as it is a source of bacteria that are naturally transferred from mother to child since the moment the child is born. These bacteria, including bifidobacteria and lactobacilli, are responsible in part for the gastrointestinal colonization of the newborn and for the adequate maturation of the gut mucosal immune system. Probiotics are defined as live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. Specific strains of lactobacilli and bifidobacteria are the most studied microorganisms worldwide because of their beneficial effects, and they are at the same time the most used ones in food and pharma. In this context, the use of microorganisms derived from breast milk as probiotics for infant food raises scientific and industrial interest. However, for a microorganism to be regarded as probiotic, a long road must be ridden from its isolation to its commercialization. Three aspects must be evaluated, mainly. First, the safety of the strain must be guaranteed. The fact that breast milk is considered a safe food and that lactobacilli and bifidobacteria are considered GRAS microorganisms (generally recognized as safe), support the claim for safety. The other two aspects are equally important: the functionality of the microorganism (its capacity to induce a sustained beneficial effect), and its resistance to the technological processes found from production to consumption.

The aim of this Doctoral Thesis was to study the microorganisms present in the human breast milk that could be of interest for the food industry, particularly bifidobacteria, in order to evaluate their technological and functional potential to be used in functional foods or supplements. First (Chapter I), an isolation stage was carried out, in collaboration with health institutions and medical staff of Santa Fe city. Strains were isolated from breast milk samples donated by local mothers, and collected from day 1 to week 8 postpartum. Presumptive bifidobacteria and lactobacilli isolates

were microbiologically and genetically studied, and identified by 16S rRNA sequencing. A collection of breast milk strains was created, composed by 6 bifidobacteria strains corresponding to 3 different species: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium dentium*, and as well as 4 lactobacilli strains not further studied in this work. Next, the technological and functional potential of the bifidobacteria strains, mainly *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, was studied. To better present the results obtained, the technological aspects are reported first (Chapter II) and then the functional ones (Chapter III). However, as both are important for strain characterization, they've been studied in parallel along the development of the present Thesis.

Regarding the technological characterization, the growth of the bifidobacteria strains in different low-cost and whey formulated culture media was evaluated. The aim was to search for the conditions to obtain cultures with high viability but also resistant to storage, acidity (simulation of gastrointestinal digestion) and freeze drying, the dehydration process most widely used by manufacturers of starter and probiotic cultures. A strain-specific behavior was observed and, in particular, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 showed to be a strain able to grow in low-cost culture media with good yields and high resistance to freeze drying, storage and gastric acidity simulation, so it was selected for further technological studies. Different dehydration technologies were applied on a concentrated culture of *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, produced by an Italian manufacturer of lactic cultures. Two conventional dehydration technologies were studied, freeze and spray drying, together with 3 other non-conventional ones: vacuum drying and vacuum and freeze drying assisted by microwaves. Freeze drying and freeze drying assisted by microwaves were the two technologies for which a higher survival rate was observed, when applied on the bifidobacteria culture without adding a protectant, while spray drying was the most detrimental one. However, the addition of diverse protective agents (lactose, maltodextrin, sorbitol, skim milk, CMP) improved the survival for all the assayed technologies. Lactose was selected as reference protectant to compare the different technologies in an 8 week accelerated storage test under detrimental storage conditions (25°C, water activity (a_w) of 0.23 and 0.43, aerobic atmosphere). For an a_w of 0.23, all cultures showed satisfactory viability levels

at the end of the storage test, while at $a_w=0.43$, important viability losses were observed for all drying technologies. Together, these results confirmed that *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 is a strong and versatile strain, capable of resisting different dehydration technologies and surviving to adverse storage conditions, so it has potential to be used in the food or pharmaceutical industry. At last, in order to simulate the addition of the strain to an infant formula, preliminary spray drying tests were made, using skim milk as matrix. This dehydration technology is available at national level, in middle and big size dairy industries, so its scaling up and application would be feasible. *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 survival to spray drying in 20% (w/v) skim milk was evaluated at a laboratory and industrial scale. Powders with satisfactory moisture and acceptable survival rate were obtained (viability losses < 0.5 log orders for industrial scale and < 0.2 log orders for laboratory scale). These results indicate that *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 has the potential to be added, through spray drying, to an infant formula.

The safety and functional characteristics of the breast milk strains were evaluated by in vitro tests. In a first stage, the antibiotic resistance, the superficial hydrophobicity and the resistance to a simulated gastrointestinal digestion were studied for the 6 bifidobacteria strains. In general, the antibiotic resistance and hydrophobicity results were in accordance with published data for members of the genus *Bifidobacterium*. As for the gastrointestinal digestion, all the *B. animalis* subsp. *lactis* strains (INL1, INL2, INL4 and INL5) and the strain *B. longum* LM7a were resistant to the simulated gastric acidity bile salts shock at pH 8, whereas only *B. longum* LM7a was able to survive to pancreatin exposure and *B. dentium* LM8a' showed high sensitivity from the first step of the simulated gastrointestinal passage. The capacity of some strains to synthesize conjugated linoleic and linolenic acids was also studied, being *B. animalis* subsp. *lactis* INL2 the strain which displayed the highest production capacity.

At last, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 was selected to evaluate its functionality in in vivo assays. The strain was used in an intestinal transit model, administered alone or together with the known prebiotic inulin. In both cases it was possible to detect presumptive bifidobacteria in mice feces that received bifidobacteria orally. This could indicate the strain's capacity to survive the intestinal transit in vivo. The gut immunostimulating capacity and the protective capacity against *Salmonella* were also

evaluated, when the bifidobacteria strain was orally administered as fresh culture, at different concentrations and periods of time. Several experimental designs and 2 different mice strains (BALB/c and Swiss) were used, and the influence of technological treatments (spray drying, freeze drying, freezing) on the functional properties was studied. *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 was capable of stimulating the intestinal immune response mediated by IgA when administered as fresh culture and showed a protective capacity in a *Salmonella* infection model, diminishing the inflammatory damage indexes and the pathogen translocation to extra-intestinal sites (e.g. spleen and liver). When subjected to technological treatments, the strain kept some of its immunostimulating properties, especially as spray dried culture. A certain variability dependant on the experiment design and associated to the work with animals was observed. Together, these results allows to propose *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 as a probiotic bacterial strain, capable of stimulating the immune function in the intestine and protect it from a *Salmonella* infection. These facts, together with the resistance to different technological processes, at laboratory and industrial scale, makes *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 the first Argentinian breast milk-derived strain with probiotic potential as candidate for its use in the food or pharma industry, once demonstrated in human clinical trials the results obtained in this Thesis.

Objetivo General.

- ❖ Determinar la presencia en leche materna de microorganismos de interés para la industria de alimentos, principalmente la industria láctea, y sus propiedades tecnológicas y funcionales.

Objetivos Específicos.

- ❖ Aislar e identificar cepas de bifidobacterias (y eventuales lactobacilos de interés para otros estudios) a partir de muestras de leche materna para formar una colección de cepas de este origen.
- ❖ Determinar aspectos tecnológicos relacionados a la producción de biomasa y la viabilidad de los cultivos durante la conservación de las cepas.
- ❖ Determinar la capacidad de las cepas de modificar positivamente aspectos relacionados a la salud intestinal en modelos in vivo.
- ❖ Analizar la influencia de factores tecnológicos de interés en la industria láctea sobre la viabilidad y funcionalidad de las cepas in vitro e in vivo.

Capítulo I

**Leche materna, fuente de cultivos potencialmente
probióticos.**

1. Introducción.

1.1. Colonización del tracto gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal (TGI) humano está colonizado por una microbiota altamente diversa, conformada principalmente por bacterias, que contiene aproximadamente un total de 10^{14} células microbianas y es uno de los ecosistemas más densamente poblados, superando en aproximadamente 10 veces el repertorio de células eucariotas del ser humano (Qin y col., 2010). La microbiota intestinal cumple numerosas funciones que contribuyen a la salud del hospedador. Además de poseer un gran potencial metabólico (fermentación de oligosacáridos, producción de vitaminas) que resulta vital para los procesos digestivos, de detoxificación y bioactivación, la existencia de un epitelio intestinal saludable en asociación con una población microbiana estable y balanceada constituye una barrera eficaz que asegura la protección del hospedador contra la invasión de microorganismos patógenos y compuestos dañinos (Holzapfel y col., 1998, Isolauri y col., 2004). La composición de la microbiota intestinal es el resultado de múltiples factores tanto intrínsecos (pH, potencial redox, secreciones, movilidad) como extrínsecos (dieta, estrés, medicamentos). Géneros como *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium* predominan en el intestino grueso, junto a otros grupos como clostridios y estreptococos, mientras que los lactobacilos comprenden una mayor proporción de la población total en intestino delgado. La edad es uno de los factores más estudiados que en relación a su capacidad de determinar la composición de la microbiota intestinal. Numerosos estudios basados en el secuenciamiento de poblaciones fecales han mostrado que la microbiota intestinal es altamente variable durante los tres primeros años de vida y que su diversidad es significativamente menor respecto a la composición en un ser humano adulto, es decir que está dominada por menos especies bacterianas (Arrieta y col., 2014). La colonización del TGI es un proceso complejo y sistemático que comienza inmediatamente luego del nacimiento, o tal vez antes (Jiménez y col., 2008, Salazar y col., 2014), y que continúa a través de los primeros años de vida (Rautava e Isolauri, 2002, de la Cochetière y col., 2007). En los primeros días posparto,

son dominantes algunas cepas anaeróbicas facultativas de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli* y otras enterobacterias, que colaboran en crear un medioambiente reductor favorable para el establecimiento de microorganismos anaerobios obligados como bacteroides y clostridios, los cuales son luego reemplazados por anaerobios facultativos, principalmente de los filos Actinobacteria (bifidobacterias) y Firmicutes (lactobacilos y enterococos) (Fouhy y col., 2012, Voreades y col., 2014). Además de la edad, la composición de la microbiota intestinal del recién nacido es profundamente influenciada por el tipo de dieta que recibe, y esto se refleja en su microbiota fecal. Mientras que los neonatos alimentados con leche materna son colonizados preferentemente por bifidobacterias y lactobacilos, los niños alimentados con fórmulas comerciales tienen una microbiota diferente y más diversa, constituida por números relativamente elevados de Bacteroides, clostridios, enterobacterias, estafilococos y estreptococos, además de bifidobacterias presentes pero no predominantes. La dominancia de bifidobacterias en los niños que reciben leche materna es atribuida a la composición de la leche humana, la cual a diferencia de la leche bovina, es rica en factores bifidogénicos tales como los oligosacáridos (Wall y col., 2009). Cuando los niños alimentados con leche materna comienzan a recibir una alimentación suplementaria, los niveles de clostridios, estreptococos y *E. coli* aumentan y también aparecen progresivamente en números mayores especies del género Bacteroides y cocos Gram positivos. Así, luego del destete comienza la conversión hacia una “microbiota adulta normal”, alcanzándose ésta aproximadamente desde el segundo al tercer año de vida (Bergström y col., 2014, Voreades y col., 2014).

1.2. Rol de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune.

El sistema inmune de la mucosa (SIM) intestinal está anatómicamente en su lugar previo al nacimiento y su maduración está directamente relacionada con la dieta del recién nacido y el establecimiento de la microbiota a lo largo del intestino. La población microbiana intestinal es esencial para la estimulación inmune de la mucosa y la amplificación de las células inmunocompetentes. Las bacterias comensales otorgan resistencia contra la colonización de potenciales patógenos mediante la ocupación de los nichos disponibles (inhibición competitiva de los sitios de unión) y a través de

factores de regulación autogénica (síntesis de ácidos grasos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas) (Schmid y col., 2006, Stecher y Hardt, 2011). Además, el establecimiento de la microbiota influencia profundamente el desarrollo de los componentes humorales del sistema inmune de la mucosa intestinal y es esencial para la “afinación” de la función de los receptores de células T y los perfiles de citoquinas de células T colaboradoras tipo 1 o tipo 2 (O’Hara y Shanahan, 2006). Otra característica que remarca la importancia del establecimiento de una microbiota estable es que la colonización postnatal del intestino permite que el sistema inmune desarrolle tolerancia hacia una variedad de antígenos microbianos, resultando en respuestas inflamatorias y alérgicas controladas y atenuadas. Esto se logra principalmente a través de receptores que reconocen patrones (Patern Recognition Receptors, PRRs según su sigla en inglés) microbianos presentes en la superficie de las células epiteliales intestinales y de las células dendríticas (como los receptores tipo Toll, TLR según su sigla en inglés), ó bien a través de receptores intracelulares (como los receptores tipo NOD), los cuales al interactuar con la microbiota comensal desencadenan una cascada de señales que mantienen la homeostasis intestinal y suprimen activamente las reacciones inmunes (Weng y Walker, 2013). Es decir, si bien durante el período posnatal temprano la microbiota estimula el desarrollo tanto de la inmunidad sistémica como local, luego estos componentes evocan, por el contrario, mecanismos regulatorios (inhibitorios) con la intención de mantener balanceadas la inmunidad local y sistémica (Gleeson y Cripps, 2004, Salzman y col., 2007). Muchas enfermedades, incluyendo la inflamación intestinal crónica, el síndrome del intestino irritable (IBS según su sigla en inglés) o las gastroenteritis alérgicas, e infecciones, son actualmente asociadas a un desbalance de la microbiota, lo que pone en evidencia la importancia de la misma en la regulación de las respuestas inmunes mucosas y la salud intestinal (de Kivit y col., 2014).

1.3. Leche materna humana y microorganismos.

Durante años se consideró a la leche materna humana como un fluido estéril mientras que los estudios microbiológicos sobre este alimento se limitaban a evaluar su rol como transmisora de bacterias potencialmente patógenas provenientes de la piel

(Novak y col., 2000, Le Thomas y col., 2001). Sin embargo, en la última década, el uso de técnicas de cultivo más sofisticadas y el constante desarrollo de las ciencias “ómicas” (genómica, metagenómica, transcriptómica, metabolómica) ha revelado la presencia indígena de microorganismos en la leche materna (no provenientes de contaminaciones cutáneas) y ha impulsado la idea que pueden ser transferidas de madre a hijo durante la lactancia (Jeurink y col., 2013). Una de las primeras evidencias de la presencia de bacterias potencialmente benéficas en leche materna fue dada en 1979 cuando West y col. (1979) reportaron el aislamiento, junto a especies patógenas, de una cepa de *Lactobacillus plantarum* a partir de leche materna humana. Más tarde, análisis RAPD y PFGE permitieron concluir que una cepa de *Lactobacillus salivarius*, previamente aislada de las heces de un niño de 1 mes de edad alimentado con leche materna, podía ser detectada también en la leche de la madre, sugiriendo que la microbiota intestinal de los niños alimentados con leche materna es un reflejo parcial de la composición microbiana de la misma (Martín y col., 2006).

Además de numerosos factores tales como nutrientes, agentes antimicrobianos, oligosacáridos prebióticos, anticuerpos IgA y TGF- β , que contribuyen a la maduración inmunológica y al bienestar del niño (Mata y Wyatt, 1971, Rautava y col., 2006), la leche materna contiene cantidades significativas de microorganismos. Hasta el momento se han detectado aproximadamente 700 especies bacterianas presentes en leche materna, si bien el número de especies cultivables presentes en un individuo es mucho menor, encontrándose en un rango de 2 a 18 especies diferentes (Cabrera-Rubio y col., 2012, Jeurink y col., 2013). Esta característica de falta de capacidad de desarrollo en medios de cultivo tradicionales de laboratorio limitó por muchos años el avance del conocimiento de la composición microbiológica de la leche materna, hasta el desarrollo de las técnicas de metagenómica en los últimos diez años. Las bacterias comensales de leche materna incluyen estreptococos, lactobacilos, corinebacterias, micrococos y propionibacterias (O’Sullivan y col., 2005). En 2003, dos grupos europeos, uno finlandés (Heikkilä y Saris, 2003) y otro español (Martín y col., 2003), reportaron de forma simultánea e independiente el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de leche materna humana. El potencial probiótico de estas cepas fue evaluado y los autores concluyeron que era similar, al menos, al de cepas

comúnmente utilizadas en productos probióticos comerciales. La firma española Puleva Food S.L. (www.puleva.es) ha industrializado uno de estos lactobacilos (*Lactobacillus fermentum* CECT 5716) y en el año 2008 lanzó al mercado la primera leche en polvo que contiene lactobacilos probióticos aislados de leche materna, recomendada para niños a partir de los 6 meses de edad. A excepción de este caso, hasta el momento las fórmulas para bebés que contienen microorganismos probióticos han sido formuladas con cepas aisladas a partir de alimentos fermentados o de la microbiota fecal de niños (Chassard y col., 2014). El uso de BAL aisladas de leche materna humana es particularmente atractivo, considerando su origen y que cumplen a priori algunos de los requisitos generalmente recomendados para probióticos de uso humano (Cárdenas y col., 2014). En este contexto, la administración de bacterias aisladas de leche materna a neonatos y madres lactantes provee oportunidades para manipular de forma benéfica el establecimiento de una microbiota intestinal saludable, lograr que la composición de la microbiota de los niños alimentados con fórmula se asemeje a la de aquellos niños alimentados con leche materna y para reducir el riesgo de enfermedades (Ezendam y van Loveren, 2008, Moreno Villares, 2008).

2. Objetivos.

En el año 2008, el INLAIN comenzó una línea de investigación centrada en el aislamiento de microorganismos de interés a partir de leche materna humana, y los primeros resultados obtenidos formaron parte de mi tesina de grado correspondiente a la carrera de Licenciatura en Biotecnología (Zacarías, 2010). En esta etapa se realizó una ronda de aislamientos de la que participaron 16 madres, de las que se obtuvieron una o dos muestras de leche materna entre los días 1 y 12 posparto, y se aislaron 4 cepas de bifidobacterias (a partir de 4 donantes distintas), entre los días 1 y 6. La presente tesis buscó avanzar y profundizar el conocimiento sobre microorganismos de leche materna, particularmente bifidobacterias. En ese contexto, los objetivos específicos planteados para este capítulo fueron:

- 1) Realizar una nueva ronda de aislamientos y evaluar la composición de la microbiota de leche materna hasta la semana 8 posparto.
- 2) Aislar e identificar cepas de bifidobacterias (y eventuales lactobacilos de interés para otros estudios).
- 3) Estudiar la diversidad e identidad de los aislamientos mediante técnicas moleculares, y realizar comparaciones entre las dos rondas de muestreo realizadas en INLAIN, y con la información publicada por otros autores.
- 4) Conformar una colección de cepas de este origen.

3. Materiales y métodos.

3.1. Muestras.

Las muestras de leche materna fueron donadas voluntariamente por madres atendidas en el Instituto Médico de la Mujer, el Hospital Iturraspe y el Sanatorio Sagrado Corazón de la ciudad de Santa Fe, con conocimiento y consentimiento del uso de las mismas. Además, mediante una breve encuesta se determinó el tipo de parto (natural ó por cesárea), si la gestación llegó a término o se trataba de niños prematuros, y si durante el embarazo o la lactancia la madre consumió productos lácteos conteniendo probióticos (ver carta de consentimiento y encuesta modelo en sección Anexo). En el muestreo diez madres proveyeron muestras periódicas, entre los primeros días posparto y hasta 8 semanas luego del mismo. Para la toma de muestras se solicitó a las madres que limpiaran cuidadosamente la areola mamaria y la piel del pecho con jabón y luego enjuagaran varias veces con agua destilada estéril. Se ejerció una ligera presión sobre el pecho, los primeros 500-600 µl de leche materna fueron descartados, siendo recolectados los siguientes 500-1000 µl en tubos eppendorf estériles. Las muestras fueron inmediatamente refrigeradas a 5°C y procesadas en el laboratorio en un lapso de tiempo no mayor a 1-2 h desde la toma de las mismas.

3.2. Aislamiento de microorganismos de interés para la industria de alimentos.

Se realizaron diluciones seriales de la leche materna en agua de peptona 0,1% y se las sembró en agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia, ver composición en Anexo) adicionado al 0,1% (p/v) de L-cisteína (Sigma, St Louis, MO, USA) (MRS-C), acidificado o no con ácido acético glacial (Cicarelli, Buenos Aires, Argentina) a pH 5,5. Las placas fueron incubadas anaeróticamente (GENbox anaer, Biomérieux, Francia) a 37°C por 72 h. Las colonias que presentaron morfología típica de lactobacilos ó bifidobacterias (examinadas por microscopía de contraste de fase, 1000x) fueron aisladas y purificadas mediante estriados sucesivos (agar MRS-C), realizándose tinción de Gram, ensayo de movilidad y actividad de catalasa. Los aislamientos presuntivos de lactobacilos o bifidobacterias se conservaron a -70°C en

caldo MRS-C adicionado de glicerol 20% (v/v) para su posterior identificación y caracterización.

3.3. Identificación molecular.

Se obtuvo el ADN total de cada aislamiento a partir de cultivos overnight (caldo MRS-C), utilizando el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma, St Louis, MO, USA). Se determinó la identidad de las cepas mediante amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento de 1500 bp perteneciente al gen que codifica para el ARNr 16S, utilizando los primers universales pA y pH (Edwards y col., 1989). Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando 2 µl of DNA como templado, 2,5 U Taq de DNA polimerasa (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 200 nM de dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada primer (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX, USA) en un volumen final de 50 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 61°C y 30 seg a 72°C, y un paso final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE, se tiñeron con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) y se visualizaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001). Los amplicones se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Su secuencia nucleotídica se determinó por “primer extension” (servicio de secuenciación de Macrogen, Corea) y se ensambló empleando el software Vector NTI 9.0.0 (Informax). Finalmente, la identidad de las cepas se determinó mediante análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), por comparación con las secuencias disponibles en esta base de datos.

3.4. Estudio de la diversidad genética (RAPD-PCR).

La diversidad genotípica entre los aislamientos se determinó comparando sus perfiles genéticos mediante RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) utilizándose cuatro primers arbitrarios (B08, B10, M13 y 1254) en reacciones independientes. Las condiciones de amplificación para B08 y B10 fueron las siguientes: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 36°C y 2 min a 72°C, y un

paso final de 7 min a 72°C. Las condiciones de amplificación para los primers M13 y 1254 se utilizaron siguiendo las instrucciones de Giraffa y col. (2004): en ambos casos se realizó una desnaturalización inicial (3 min a 94°C) y un paso final (7 min a 72°C) y para el primer M13, las condiciones fueron 30 ciclos de 2 min a 94°C, 20 seg a 45°C y 2 min a 72°C. Cuando se utilizó el primer 1254, las condiciones fueron 4 ciclos de 5 min a 94°C, 5 min a 36°C y 5 min a 72°C seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL con 1 µL de templado, 2,5 U Taq Polymerase (GE Healthcare) y 200 nM de cada dNTP (GE Healthcare). Las concentraciones finales de los primers fueron 0,5 µM para B08 y B10, 2,0 µM para M13 y 0,8 µM para 1254. En todos los casos se utilizó un control negativo de reacción (sin templado). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), se tiñeron con GelRed y fotografiaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001).

4. Resultados y discusión.

Diez madres (denominadas LM1-LM10) proveyeron muestras a distintos días posparto (y en algunos casos hasta las 8 semanas posteriores al mismo). El grupo de madres estuvo conformado por 6 madres que tuvieron sus bebés por parto natural y 4 que tuvieron parto por cesárea (3 de ellas no llegaron a término y tuvieron bebés prematuros). En todas las muestras plaqueadas en agar MRS se encontraron cocos (sin interés para el desarrollo de la presente tesis). A partir de muestras de cinco de las diez madres participantes del muestreo se obtuvieron veintitrés aislamientos Gram positivos, catalasa negativos, y no móviles, de bifidobacterias o lactobacilos presuntivos (colonias que presentaron morfología celular características de bifidobacterias o lactobacilos) (Tabla 1). Todos los aislamientos presuntivos se obtuvieron de las placas de MRS-C agar sin acidificar, y en las primeras 4 semanas posteriores al parto, no encontrándose potenciales bifidobacterias ó lactobacilos entre las 4 y 8 semanas posteriores.

Tabla 1: Aislamientos de bifidobacterias y lactobacilos presuntivos a partir de muestras de leche materna en las semanas 1-4 posparto.

Muestra de leche materna (LM)	N° de aislamientos presuntivos (denominación)
LM1	3 (a-c)
LM4	4 (a-d)
LM5	9 (a-i)
LM7	2 (a,b)
LM8	5 (a, a', b, f y h)

El análisis RAPD con los primers B08, B10, M13 y 1254 permitió evaluar la diversidad genética entre los aislamientos de interés, previo al resultado de identificación molecular. Los aislamientos fueron denominados atendiendo a la denominación asignada a la madre (LM “X”) seguido de una letra. Si bien todos los

perfiles RAPD permitieron analizar diferencias entre los aislamientos (y detectar la posible aparición de cepas “repetidas”) pertenecientes a una misma madre, en particular los perfiles RAPD obtenidos con los primers B10 y M13 (Fig. 1) mostraron una mejor resolución de bandas (con los primers B08 y 1254 algunos aislamientos directamente no mostraron bandas o muy escasas). De su análisis surgió que:

- en la muestra LM1 habría al menos 2 aislamientos diferentes (LM1b diferente de LM1a y LM1c);
- en la muestra LM4 habría al menos 2 aislamientos diferentes (LM4c diferente de LM4a, LM4b y LM4d);
- en la muestra LM5 habría al menos 3 aislamientos diferentes (LM5a-d, LM5f y LM5h diferente de LM5e y LM5g, diferente de LM5i);
- en la muestra LM7 los dos aislamientos serían diferentes entre sí;
- en la muestra LM8 habría al menos 4 aislamientos diferentes (LM8h y LM8a diferentes de LM8f, diferente de LM8b, diferente de LM8a’).

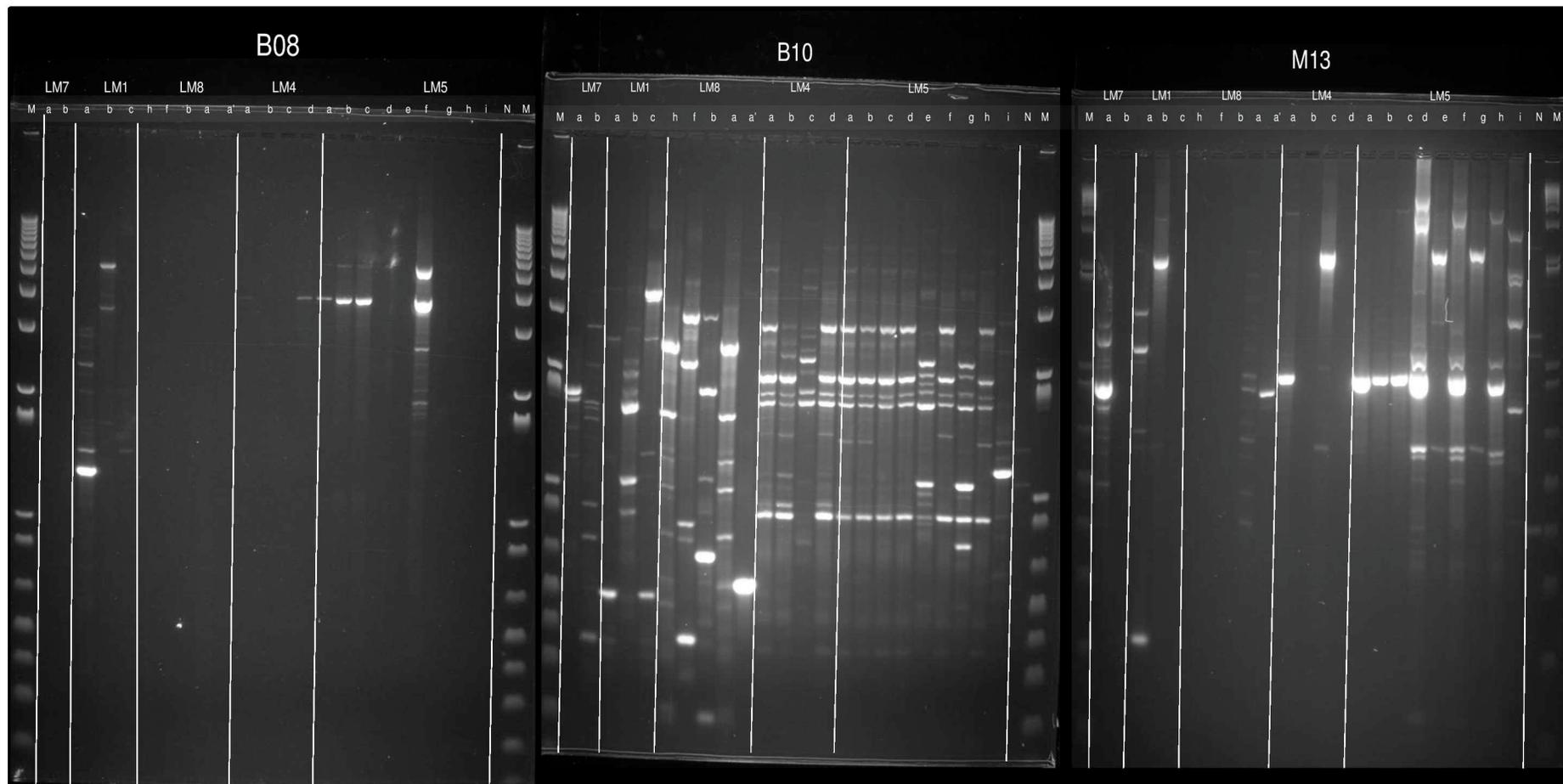


Figura 1: Perfiles de RAPD PCR obtenidos con los primers B08, B10 y M13 para los veintitrés aislamientos presuntivos (designados por letras minúsculas) de bifidobacterias y lactobacilos, a partir de 5 madres donantes (LM1, LM4, LM5, LM7 y LM8). N = control negativo; M= marcador de peso molecular TrackIt 1Kb plus (Invitrogen).

De la comparación de la diversidad genética mediante RAPD surgió la primer diferencia entre este muestreo y los aislamientos obtenidos en la primera ronda de aislamientos realizada en el año 2008. Mientras que para el primer B08, ninguno de los aislamientos presuntivos de bifidobacterias del presente muestreo presentó bandas, en el muestreo de 2008 se obtuvieron 6 aislamientos presuntivos de bifidobacterias, 4 de los cuales fueron identificados como pertenecientes a la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y denominados *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, INL2, INL4 e INL5 (Zacarías y col., 2011). Cuando se analizó la diversidad genética de estos aislamientos por RAPD PCR con diferentes primers (B06, B07, B08 y B10), el único primer que permitió detectar diferencias entre los aislamientos de leche materna y entre éstos y la cepa comercial *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 fue el primer B08 (Fig. 2).

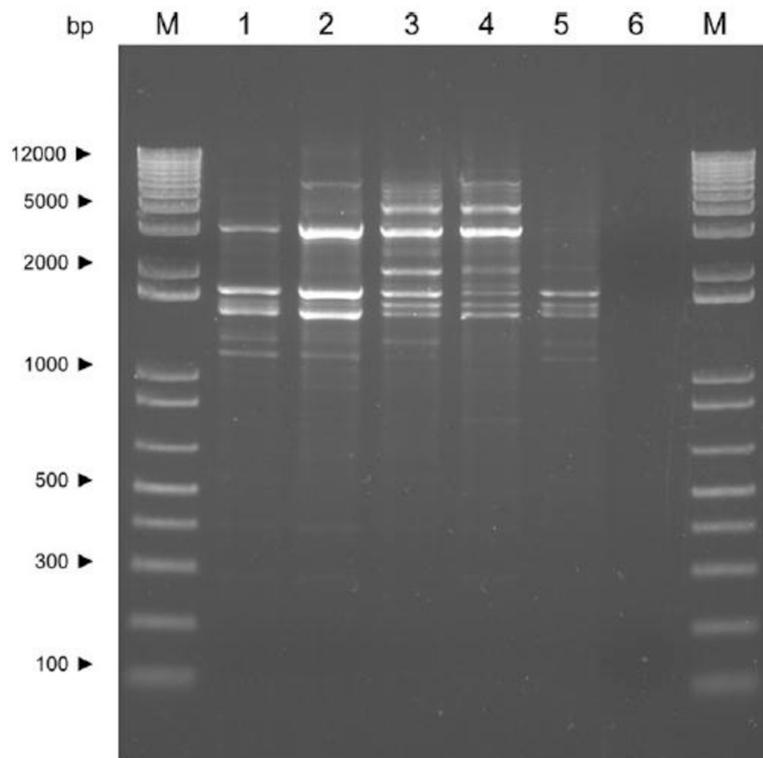


Figura 2: Perfiles de RAPD PCR obtenidos con el primer B08 para las cepas de bifidobacteria aisladas en el año 2008. Calle 1 = *B. animalis* subsp. *lactis* INL1; calle 2 = *B. animalis* subsp. *lactis* INL2; calle 3 = *B. animalis* subsp. *lactis* INL4; calle 4 = *B. animalis* subsp. *lactis* INL5; calle 5 = *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen); calle 6 = control negativo; calle M= marcador de peso molecular TrackIt 1Kb plus (Invitrogen).

Finalmente, todos los aislamientos fueron identificados genéticamente basado en la secuencia nucleotídica de un fragmento de 1500 bp dentro del gen ARNr 16S. Del análisis de las secuencias mediante análisis BLAST, se identificaron los siguientes aislamientos:

- *Bifidobacterium longum* LM7a, a partir de la muestra LM7, día 9 posparto;
- *Bifidobacterium dentium* LM8a', a partir de la muestra LM8, día 20 posparto;
- *Lactobacillus gasseri* LM8b, *Lactobacillus salivarius* LM8a y LM8f (2 cepas) y *Lactobacillus vaginalis* LM8f, a partir de la muestra LM8, semanas 3 y 4 posparto;
- El resto de los aislamientos fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Propionibacterium* y *Actinomyces*.

Todos los aislamientos hallados pertenecen a especies actualmente descritas en la bibliografía como potencialmente presentes en leche materna (Olivares y col., 2006, Jeurink y col., 2013), ya sea detectadas por técnicas dependientes ó independientes de cultivo. La presencia de especies como *L. salivarius*, *B. dentium* y *L. vaginalis* en leche materna, apoya la hipótesis de la existencia de diversas vías de transmisión microbiana madre-hijo (Funkhouser y Bordenstein, 2013) y de una vía endógena de transmisión, desde la microbiota materna a la glándula mamaria. Desde que se descubrió que la leche materna no es estéril, el origen de las bacterias presentes en la misma se ha vuelto un asunto controversial. Si bien en un primer momento se creía que las mismas provenían exclusivamente de una contaminación con bacterias de la piel de la madre ó de la cavidad oral del bebé, en estos últimos años se ha hecho evidente que los nichos ecológicos en el microbioma humano no son microambientes aislados sino una red de comunidades interrelacionadas que experimentan cambios constantes (Fernandez y col., 2013). Algunos filotipos hallados comúnmente en la piel, tales como *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* también son comunes en leche materna, por lo que la hipótesis de que la microbiota de la piel materna contribuye a

“moldear” la composición de la microbiota de la leche tiene validez. Sin embargo, existen grandes diferencias entre las dos comunidades microbianas. Una de ellas es la presencia de bifidobacterias en leche materna, las cuales pertenecen a un género estrictamente anaeróbico, lo que haría que la piel sea una fuente poco probable. Este hecho sumado a otros hallazgos basados en comparaciones de tipo genotípicas de poblaciones de piel y leche materna han impulsado la hipótesis de que el origen de las bacterias de leche materna podría ser el intestino materno, y que estas llegan a la glándula mamaria a través de una ruta endógena que involucra captación por células dendríticas a partir de la luz intestinal y transporte mediante macrófagos (Fernández y col., 2013). En 2007, Pérez y col. demostraron que ocurrió translocación bacteriana del intestino a los nódulos linfoides mesentéricos y glándula mamaria durante las etapas tardías de embarazo y durante la lactación en ratones. En un estudio reciente, Jost y col. (2014) fueron capaces de detectar la misma cepa de *B. breve* de leche materna, en heces de la madre y del niño. De comprobarse la existencia de una vía bacteriana entero-mamaria durante el período de lactación, la administración de microorganismos aislados de leche materna surge como una alternativa no sólo para niños que no pueden ser alimentados por sus madres sino también para mujeres embarazadas en el período final de gestación y durante la lactancia que vean restringidas sus posibilidades de amamantar.

Los niveles de células viables totales en las muestras de leche materna, cuando estas fueron plaqueadas en agar MRS-C, se encontraron en un rango de 3,42 – 5,82 log UFC/mL en las primeras dos semanas posparto y se mantuvieron a lo largo de todo el muestreo (Tabla 2), si bien la presencia de los aislamientos de interés para esta tesis, se observó sólo hasta la semana 4 posparto, y la concentración de cocos fue creciente a lo largo del muestreo (hasta la semana 8 posparto).

Tabla 2: Niveles de células viables totales en muestras de leche materna durante el muestreo (semanas 1 - 8 posparto).

Semanas posparto	Bacterias totales* (log UFC/mL) (promedio \pm SD)
1 y 2	4,62 \pm 1,2
3 y 4	4,38 \pm 0,47
5 y 6	4,62 \pm 1,12
7 y 8	4,31 \pm 0,87

*en agar MRS-C sin acidificar.

Las bifidobacterias en particular son un género atractivo para la manipulación de la microbiota intestinal, principalmente en niños, debido a que constituyen el grupo bacteriano intestinal predominante en bebés de 3 días de edad alimentados por leche materna y nacidos a término, pueden llegar a alcanzar hasta aproximadamente un 90% del recuento total bacteriano de su microbiota y su predominancia en la microbiota fecal puede llegar hasta los 6 meses de edad (Grönlund y col., 2007, Grönlund y col., 2011). En este estudio se aislaron dos cepas de bifidobacterias, una cepa de *Bifidobacterium longum* (denominada B. longum LM7a) y una de *Bifidobacterium dentium* (denominada B. dentium LM8a'). Estos aislamientos se obtuvieron a partir de dos madres distintas, y por única vez (en los muestreos correspondientes a los días 9 y 20 posparto respectivamente) y los niveles en que fueron halladas fueron de 1,48 y 2,51 log UFC/mL respectivamente. Estos valores (y los recuentos totales, Tabla 2) conciben con las estimaciones por PCR cuantitativa de Grönlund y col. (2007), Gueimonde y col. (2007) y Martín y col. (2009), y con los niveles hallados en el primer muestreo que se realizó previamente en el INLAIN (Zacarías y col., 2009, Zacarías, 2010), tanto para bacterias totales como para el género *Bifidobacterium* en leche materna. Resulta interesante de la comparación entre este muestreo y el realizado en el año 2008, la diversidad entre las especies encontradas. En el muestreo del año 2008 todos los aislamientos del género *Bifidobacterium* pertenecieron a la especie *B. animalis* subsp. *lactis* y no se aislaron cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, mientras que el muestreo realizado durante la presente tesis mostró mayor diversidad de

microorganismos pertenecientes a estos dos grupos. Otra observación que surgió de ambos muestreos fue que en los casos en los que se logró aislar bifidobacterias o lactobacilos, se trató de madres que tuvieron parto normal y gestaciones a término. Las diferencias en la composición de la microbiota de leche materna han sido descritas previamente y se ha postulado que podrían atribuirse a factores socio-económicos, genéticos y culturales, así como a los hábitos alimentarios y el uso de antibióticos (Jeurink y col., 2013). Aun así, en un estudio realizado sobre 61 pares madre-hijo, donde se detectó la presencia de bifidobacterias mediante técnicas moleculares en heces de madres e hijos, y en leche materna al 1º mes posparto (Grönlund y col., 2007), a nivel leche materna la especie predominante fue *B. longum*, seguida por *B. animalis*, y la predominancia de estas dos especies de bifidobacterias también fue observada por Gueimonde y col. (2007), lo que podría indicar que estas dos especies son “seleccionadas naturalmente” y de modo “preferencial” por la madre para ser transferidas al recién nacido. En total, de los dos muestreos de leche materna correspondientes a 26 madres distintas se obtuvieron las cepas detalladas en la Tabla 3. Todos los aislamientos pertenecientes al género *Bifidobacterium* se encontraron entre los días 1 y 20 posparto y, como ya se mencionó previamente, a partir de madres que dieron a luz por parto natural y gestaciones a término. La presencia de lactobacilos se detectó a partir de la tercer semana posparto por lo que ésta podría ser una de las razones por las que no fueron detectados en la primer ronda de aislamientos (muestreo entre los días 1 a 12 posparto). Para aumentar el conocimiento sobre la ecología de la leche materna, los niveles en los cuales cada especie se encuentra presente y el período durante el cual las madres transfieren las bacterias a los niños durante la lactancia serían necesarios planes de muestreo y análisis adicionales y el empleo de metodologías de secuenciamiento masivo para poder detectar microorganismos presentes pero no cultivables por las técnicas tradicionales de cultivo en placa.

Tabla 3: Composición de la colección de microorganismos de leche materna de INLAIN.

Cepas de bifidobacterias	Cepas de lactobacilos
B. animalis subsp. lactis INL1	L. gasseri LM8b
B. animalis subsp. lactis INL2	L. salivarius LM8a
B. animalis subsp. lactis INL4	L. salivarius LM8h
B. animalis subsp. lactis INL5	L. vaginalis LM8f
B. longum LM7a	
B. dentium LM8a'	

La intervención probiótica en el período neonatal ha atraído gran interés científico en los últimos años. Aunque la alimentación complementaria estaría desaconsejada antes de los 6 meses de edad (Chourraqui y col., 2008), varios resultados de ensayos clínicos sugieren que el empleo de ciertas cepas específicas de probióticos sería seguro (Dekker y col., 2009) y útil para reducir el riesgo de ciertas patologías como enterocolitis necrotizante (González de Dios y González Muñoz, 2013, Repa y col., 2015) o infecciones del tracto respiratorio (Luoto y col., 2014) en neonatos. En este punto, la dosis correcta en la cual el probiótico es administrado podría ser clave para que la administración de los mismos sea exitosa en los recién nacidos y niños. En los productos lácteos fermentados comerciales que contienen bacterias probióticas, se encuentran niveles de células viables de, al menos, 10^7 - 10^8 UFC/mL (Champagne y Gardner, 2005) y los ensayos clínicos reportados en recién nacidos también utilizan dosis diarias altas (Mugambi y col., 2012). Sin embargo, la dosis de bacterias viables que la madre transfiere al niño, de acuerdo a los niveles determinados en este trabajo y coincidentes con reportes previos (Grönlund y col., 2007, Martín y col. 2009), es mucho menor. El hecho de que las bifidobacterias estén presentes en la leche materna en un rango de 1 a 4 órdenes log podría indicar que la madre transfiere naturalmente bajas cantidades de bifidobacterias para la colonización del tracto gastrointestinal y evitar tal vez al mismo tiempo una reacción inflamatoria en un tejido intestinal aún

inmaduro inmunológicamente. Esta “dosis natural” debería ser considerada en el diseño de los protocolos adecuados para los estudios in vivo en niños, si se desea desarrollar productos con bifidobacterias funcionales de origen materno destinados a recién nacidos.

5. Conclusiones parciales.

La leche materna es una fuente de bacterias benéficas que la madre transfiere al niño para la colonización del tracto gastrointestinal y la maduración del sistema inmune en los primeros días de vida. En este estudio se observó que la composición de la microbiota (teniendo en cuenta las cepas cultivables exclusivamente) de la leche materna es muy variable de madre a madre y que, particularmente, la presencia de bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se observó sólo hasta la cuarta semana posparto, lo que refuerza el concepto de la importancia de esta transferencia parental en los primeros días de vida del bebé para su desarrollo saludable. Todos los aislamientos pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* fueron purificados y almacenados a -70°C en MRS-glicerol siendo los primeros de origen leche materna que integran la colección de cepas del Instituto de Lactología Industrial.

Capítulo II

**Propiedades tecnológicas de bifidobacterias de
leche materna.**

Potencial uso en la industria láctea.

Introducción General.

Probióticos.

Los componentes de la microbiota intestinal pueden dividirse por lo general según si las actividades que ejercen sobre el hospedador son potencialmente patogénicas, potencialmente promotoras de la salud o una mezcla de ambas. Desde el momento en que estos hechos fueron observados, numerosas investigaciones se han dedicado a analizar el uso en alimentos o en suplementos alimentarios o farmacéuticos de microorganismos que son beneficiosos para la salud del consumidor, con el fin de aprovechar su potencial para ejercer efectos exclusivamente benéficos. En 1989 el término probiótico fue introducido por el Dr. Roy Fuller para referirse a los suplementos dietarios microbianos vivos que afectaban benéficamente la salud del hospedador, mejorando su balance intestinal. A largo de los años la definición fue reformulándose, y hoy en día es ampliamente aceptada por la comunidad científica internacional propuesta por la Organización para la Agricultura y Alimentos de la ONU junto a la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, 2002), luego de una reunión de expertos internacionales realizada en Córdoba (Argentina) en Octubre de 2001 para discutir el estado del arte de la temática. En esta definición, los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico al hospedador, más allá de la nutrición básica”. En los últimos 20 años las investigaciones en el área de los probióticos han progresado considerablemente y se han obtenido importantes avances en la selección y caracterización de cultivos específicos y en la comprobación de los efectos benéficos que presenta el consumo de los mismos para la salud. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* constituyen los géneros más frecuentemente utilizados (Arbolea y col., 2011). Cepas específicas de estos géneros son las que han recibido la mayor atención por sus efectos funcionales y aptitud para su incorporación a productos alimenticios y suplementos dietarios. Hoy en día son los géneros más utilizados en alimentos probióticos comerciales como productos lácteos fermentados (yogures y quesos), y en mucha menor medida helados y nuevos alimentos funcionales basados en cereales, jugos de

fruta o salchichas, lo que representa un desafío tecnológico desde el punto de vista de su incorporación y viabilidad durante la vida útil del producto (Champagne y Gardner, 2005).

El género *Lactobacillus* forma parte de un grupo de bacterias genéticamente diversas denominadas bacterias ácido lácticas (BAL), utilizadas normalmente en la producción de productos lácteos fermentados. Algunas características de las BAL es que son bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles y catalasa-negativas. Dentro de las BAL, los lactobacilos son los miembros más resistentes a la acidez, encontrándose su pH de crecimiento inicial óptimo entre 5,5 y 6,2 (Hassan y Frank, 2001). Los lactobacilos son capaces de crecer anaeróbicamente pero son aerotolerantes y fermentan obligadamente azúcares, siendo el ácido láctico el principal producto final de su metabolismo. Dentro del género se observan especies tanto mesófilas como termófilas, y homofermentantes como heterofermentantes.

El género *Bifidobacterium* está constituido por bacterias Gram positivas, no esporuladas, no móviles y catalasa-negativas, con agrupaciones irregulares con forma de Y o V, que integran la familia Actinomycetaceae. Son bacterias productoras de ácido acético y ácido láctico en una proporción 1:1,5. Su hábitat natural es el tracto intestinal aunque también pueden ser encontradas en la microbiota vaginal y en caries dentales. Son generalmente consideradas como anaerobios estrictos (aunque algunas cepas pueden tolerar el oxígeno) y son ácido-tolerantes (pH óptimo de crecimiento entre 6,5 y 7,0). (Leahy y col., 2005).

Probióticos en la industria láctea.

En la actualidad, y desde su ingreso masivo al mercado a mediados de la década del 90, el número de alimentos probióticos y funcionales en general mantienen un ritmo sostenido de crecimiento, siendo los productos lácteos los que han mostrado históricamente el mayor desarrollo (leches fermentadas y en mucho menor medida quesos blandos, duros y semiduros y kéfir) como vehículo de bacterias probióticas (Gomes y Malcata, 1999, www.es.mintel.com). En el caso del género *Lactobacillus*, las especies más utilizadas como probióticos en productos lácteos son la de los grupos L.

casei (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) y *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*). Dentro del género *Bifidobacterium*, la especie más intensivamente utilizada para la aplicación probiótica es *B. animalis* subsp. *lactis* (Gueimonde y col., 2010) seguida de *B. longum* y *B. bifidum*. Cabe mencionar que las dos cepas más ampliamente utilizadas en alimentos probióticos comerciales son *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen) y *B. animalis* subsp. *lactis* DN 173 010 (Danone).

Desde mediados de la década del '90 se comercializan en Argentina una serie de leches fermentadas como Actimel (*L. paracasei* Defensis), Yakult (*L. casei* Shirota), leche SanCor Bio (*L. casei* CRL 431 + fructanos), yogur Probio 2 (*L. paracasei* / *B. animalis* subsp. *lactis*), Activia (*B. animalis* subsp. *lactis* + inulina), entre otros. En cuanto a quesos probióticos, Argentina fue el primer país de América Latina en implementar la adición de probióticos (cepas de *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. bifidum*) a un queso fresco comercial (Vinderola y col., 2000a), producto desarrollado por la empresa sucesores de A. Williner (marca Ilolay) en colaboración con el grupo de microbiología del INLAIN y comercializado entre 1999 y 2009 en la región. Actualmente La Serenisima comercializa un queso fresco conteniendo *Lactobacillus* GG.

Selección de bacterias probióticas. Aspectos tecnológicos.

Para seleccionar las cepas a ser utilizadas como microorganismos probióticos en alimentos no sólo deben ser consideradas sus propiedades funcionales, sino también los aspectos tecnológicos que hagan posible su uso en la industria. El criterio de selección debe incluir la capacidad de crecer a alta densidad celular en medios relativamente económicos, ser cosechadas por centrifugación formando un pellet firme, ser congeladas o deshidratadas, y de retener su viabilidad y propiedades funcionales a lo largo de la conservación del cultivo concentrado y de la vida de estante del producto utilizado como vehículo en el caso de que sean incluidas en un alimento. Por ejemplo, Hughes y Hoover (1995) estudiaron la capacidad de sobrevivencia de algunas cepas de bifidobacterias al almacenamiento refrigerado y congelado, haciendo hincapié en la

tolerancia al oxígeno y al pH de los productos fermentados como elementos condicionantes de la sobrevivencia. La resistencia a estos dos parámetros debe ser siempre tenida en cuenta, especialmente el último, considerando la sensibilidad que presentan a veces las bifidobacterias a la acidez. Adhikari y col. (2000) estudiaron la viabilidad de una cepa de *B. longum* utilizada en un yogurt durante el almacenamiento refrigerado y el efecto de la microencapsulación como alternativa, mientras que Amine y col. (2014) evaluaron la viabilidad de una cepa de *B. longum* incorporada previo a la manufactura de un queso tipo Cheddar. Sabikhi y col. (2014) estudiaron la viabilidad de una cepa de *B. bifidum* utilizada en la elaboración de un queso Edam y su efecto en la maduración del mismo. En otro estudio, Vinderola y col. (2000b) demostraron una escasa viabilidad de bifidobacterias en productos lácteos comercializados en Argentina. En todos los casos, los resultados siempre muestran una fuerte dependencia de la cepa, lo que remarca que no pueden realizarse generalizaciones para catalogar a una especie como más resistente o propicia para su uso en la industria láctea. Además, debe tenerse presente que es deseable que la funcionalidad de una cepa considerada probiótica se evalúe una vez que ésta es incorporada en el producto y no exclusivamente como cultivo puro, para constatar que el procesamiento, las características fisicoquímicas de la matriz y el almacenamiento no hayan afectado sus propiedades benéficas.

Capítulo IIa

Desarrollo de bifidobacterias en medios de cultivo formulados y con suero de quesería.

1. Introducción.

Uno de los pasos críticos para el uso masivo de microorganismos probióticos es su producción a gran escala en medios de cultivos de bajo costo. La producción de biomasa de cultivos probióticos, particularmente bifidobacterias, puede ser un proceso lento, debido a las bajas tasas de crecimiento en medios de cultivo sintéticos y basados en derivados lácteos y también, debido a la sensibilidad que presentan estos microorganismos, particularmente a la presencia de O₂ y a la acidez. A escala laboratorio, el medio de cultivo más ampliamente utilizado para el crecimiento de BAL y bifidobacterias es el medio formulado por de Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Si bien la eficiencia de producción de biomasa de este medio en su versión comercial es muy buena, su uso a escala piloto o industrial resulta económicamente inviable debido a su costo. Sumado a esto, es deseable también la formulación de un medio de cultivo económico para la producción de cultivos para adición directa para el proceso de producción, siendo la tendencia la modalidad “direct vat inoculation” (inoculación directa en tina), con cultivos concentrados comúnmente suministrados en sus formas liofilizadas o congeladas (Ross y col., 2005).

El suero de quesería (SQ) es un subproducto abundante de la industria láctea, resultante de la precipitación y remoción de la caseína láctea durante el proceso de manufactura tradicional del queso (Lavari y col., 2014). El SQ constituye el 90% de la leche y contiene compuestos hidrosolubles como proteínas, lactosa, vitaminas y sales minerales. Debido a su composición rica en lactosa y proteínas posee una carga orgánica relativamente alta, la cual es monitoreada por su demanda biológica de oxígeno (BOD según su sigla en inglés) y su demanda química de oxígeno (COD, según su sigla en inglés), por lo que una mala gestión de este efluente trae asociado un impacto medioambiental negativo (Prazeres y col., 2012). El SQ es simultáneamente un efluente con alto contenido orgánico y salino, pero también de alto valor nutricional, por lo que ofrece numerosas posibilidades para su explotación tecnológica. Puede ser utilizado para la producción de ricota, pero en este caso se genera otro efluente, el suero de ricota. Otra forma de valorizar el SQ es recuperar la fracción proteínica, típicamente por ultrafiltración, para producir los concentrados de proteínas de suero

(WPC según su sigla en inglés), y obteniéndose al mismo tiempo grandes volúmenes de un subproducto líquido rico en lactosa, el permeado de suero (Guimarães y col., 2010). La producción de polvos de suero es la forma más simple de agregar valor al mismo, sin embargo los productores de queso deben realizar grandes inversiones si quieren transformar el suero líquido en productos de mayor valor comercial (Peters, 2005). Otra alternativa para el uso del suero de quesería, tanto en su forma líquida o como polvo, sería su uso como medio de cultivo. Esto tendría importancia económica y al mismo tiempo aportaría benéficamente a la problemática medioambiental de su disposición final.

Las bacterias probióticas normalmente son comercializadas como cultivos superconcentrados congelados o liofilizados para ser adicionadas a los alimentos (leches fermentadas, quesos) en los que serán vehiculizados (Ranadheera y col., 2010). Varios factores relacionados a la producción de biomasa y su incorporación a alimentos comerciales que afectan la viabilidad celular y funcionalidad han sido descritos por estos autores. La definición de probióticos reconoce la capacidad de microorganismos vivos de ejercer un efecto benéfico en la salud de los consumidores. Desde el momento en el que son incorporados a los alimentos, la viabilidad celular, medida a través de recuentos en placas, es utilizada de rutina para monitorear la funcionalidad durante el almacenamiento. Aun más, el criterio científico de algún modo generalizado (Ross y col., 2005, Champagne y col., 1997) y la legislación actual de algunos países (Amagase, 2008, Degnan, 2008, Saxelin, 2008) requiere una concentración particular de células viables en determinados productos para poder ser denominados alimentos probióticos. Sin embargo, se han reportado cambios en la funcionalidad celular de una cepa probiótica, sin que se observen cambios en los niveles de células viables (Saarela y col., 2005), lo que indica que los recuentos microbiológicos de bacterias probióticas sólo reflejan parcialmente la capacidad funcional de una cepa (Heller, 2001). Es por lo tanto esencial aun definir otros criterios capaces de detectar cambios en la funcionalidad de las cepas en una matriz alimenticia determinada, como por ejemplo, la resistencia a la digestión gástrica simulada (DGS) (Saarela y col., 2006, Wang y col., 2009).

2. Objetivos.

En este capítulo se planteó determinar aspectos tecnológicos relacionados a la producción de biomasa de las cepas de bifidobacterias aisladas de leche materna, en vistas a una producción a gran escala. Los objetivos específicos propuestos fueron:

- 1) Formular medios de cultivo de bajo costo, empleando un subproducto de la industria láctea como el suero de quesería, para la producción de biomasa.
- 2) Comparar la productividad en estos medios con respecto a un medio comercial.
- 3) Evaluar la utilidad del suero de quesería como agente crioprotector para la obtención de cultivos de bifidobacterias liofilizados.
- 4) Estudiar cómo las condiciones de producción afectan la sobrevivencia y la resistencia a la digestión gástrica simulada durante el almacenamiento de los cultivos liofilizados.

3. Materiales y métodos.

3.1. Cepas.

Se utilizaron las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a'. Las cepas se mantuvieron a -70°C en caldo MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) adicionado de glicerol 20% (v/v) (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina).

3.2. Medios de cultivos.

En un primer ensayo se preparó caldo MRS a partir de ingredientes de calidad industrial y de producción nacional (provenientes de las empresas santafesinas Microquín S.R.L. y Cicarelli Reagents S.A.) y se compararon los niveles de células viables logrados con las 3 cepas seleccionadas, con la del medio de cultivo comercial MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) utilizado de rutina en el INLAIN para el desarrollo de bifidobacterias y BAL. Esto se realizó debido a las diferencias observadas previamente para la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, en su rendimiento, según la marca comercial del medio de cultivo MRS utilizado (resultados no mostrados).

En un segundo ensayo se prepararon dos medios de cultivo basados en suero de quesería en polvo, cedido por la industria láctea Verónica (Lehmann, Santa Fe, Argentina). Para la formulación de los medios se usó el suero de quesería en polvo al 5% (p/v) suplementado con extracto de levadura 1% (YE1) y 5% (YE5) (p/v) (Microquín) y se comparó el crecimiento de las 3 cepas en estudio, en relación al crecimiento en el medio MRS comercial (Biokar).

3.3. Desarrollo en medios de cultivo económicos.

Como procedimiento estándar, las cepas se reactivaron a partir de los stocks congelados en caldo MRS (Biokar) + L-cisteína 0,1% (p/v) (Cicarelli) y se realizaron dos repiques en caldo MRS (Biokar) (2% v/v) previo a su utilización. Los cultivos frescos (18 h) de las cepas en caldo MRS, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4) y se resuspendieron (aproximadamente 10⁹ UFC/mL) en el mismo buffer. Los medios de cultivo se inocularon (2% v/v) con estas

suspensiones y se incubaron a 37°C durante 18 h en anaerobiosis (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japón). Para el recuento de células viables se realizaron diluciones decimales en solución Ringer's (Merck, Darmstadt, Alemania) las cuales se sembraron en medio agar MRS-C. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en anaerobiosis.

3.4. Liofilización y utilidad del suero de quesería como agente lioprotector.

Cultivos frescos (18 h) en caldo MRS de las cepas en estudio se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se resuspendieron (concentración 10x) en una solución de suero de quesería 10% (p/v) (cedido por la industria láctea Verónica, Lehmann, Argentina) o lactosa 10% (p/v) (Merck) (crioprotector adoptado como de referencia). Las suspensiones celulares se alicuotaron (1 mL) en viales de vidrio de 10 mL de capacidad, se congelaron a una velocidad de congelamiento aproximada de 1°C/min y se almacenaron a -70°C hasta el momento de la liofilización. Las muestras se liofilizaron durante 24 h en un liofilizador de cámara simple (beta 2-16, Christ, Osterode, Alemania). Durante el secado principal se aplicó un vacío de secado de 0,37 mbar, asegurando una temperatura de producto de -15°C, mientras que en el secado secundario se llevó la temperatura final de producto a +25°C (Fig. 3). Al final del proceso de liofilización los viales se cerraron bajo vacío. Se determinó el contenido de humedad (H%) por gravimetría, por triplicado (101°C, aprox. 20 h).

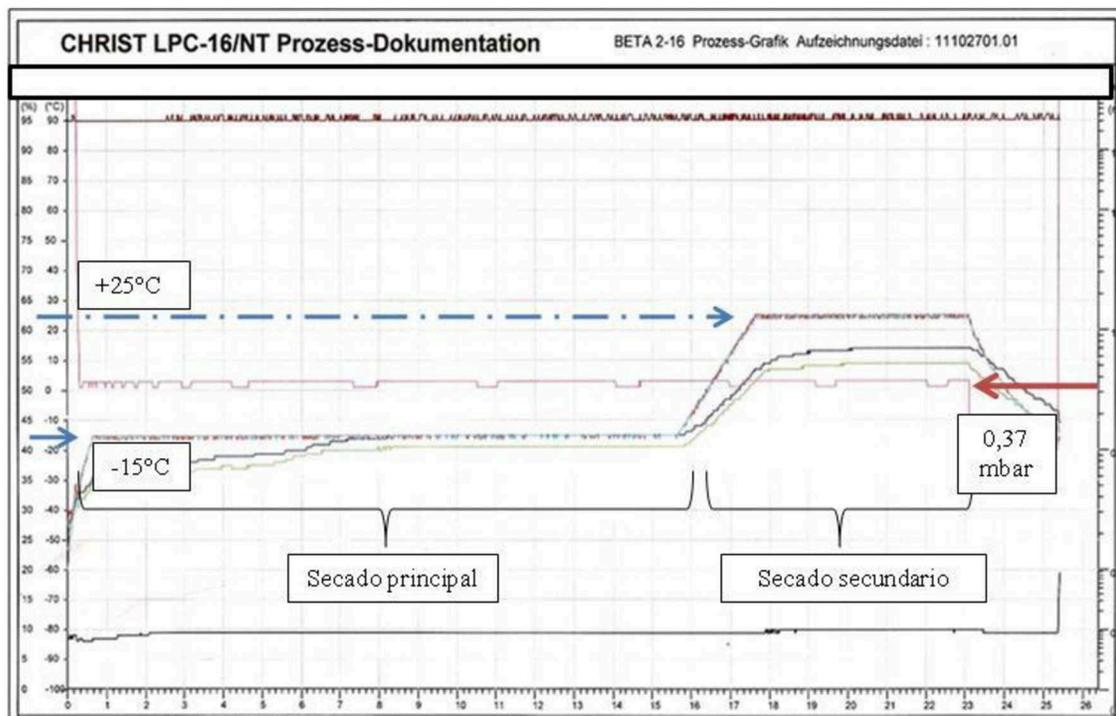


Figura 3: Perfil de presión y temperatura seleccionado para la liofilización de las cepas en estudio.

Para evaluar de forma rápida la utilidad del suero de quesería como crioprotector, se analizó la resistencia de las células liofilizadas a la digestión gástrica simulada (DGS) como un test de estabilidad luego del almacenamiento congelado (-20°C) y acelerado ($+25^{\circ}\text{C}$) de 3 semanas (Saarela y col., 2005). Para evaluar la viabilidad de los cultivos liofilizados y la resistencia a la digestión gástrica simulada (DGS), los cultivos deshidratados contenidos en el vial se reconstituyeron con agua destilada (el mismo volumen sublimado durante la liofilización) y las suspensiones celulares se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente, para una rehidratación adecuada. Luego, las suspensiones celulares fueron llevadas a pH 2,0 con HCl 5N y 0,1 N con el agregado de NaCl 0,5% (p/v) y pepsina porcina 0,5% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 37°C en baño de agua durante 90 min. Se realizaron diluciones seriadas en solución Ringer (Merck) y se realizaron recuentos en superficie (agar MRS-C) antes de la acidificación y luego de 90 min de exposición a la

solución simuladora de la digestión gástrica, por duplicado. Las placas se incubaron en anaerobiosis durante 48 h a 37°C.

3.5. Desarrollo en suero de quesería en biofermentador.

Para este estudio se seleccionó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, por haber demostrado mejor crecimiento en los medios de cultivo económicos a escala laboratorio y gran facilidad de manejo durante la centrifugación (pellet firme y fácilmente resuspendible). Esta etapa se realizó en el Instituto Max Rubner (Kiel, Alemania), durante una estadía corta de 2 meses por lo que las condiciones evaluadas no se determinaron utilizando un diseño estadístico sino que se exploraron algunas condiciones sugeridas por el grupo de trabajo (dada su experiencia en fermentaciones). En una serie preliminar de fermentaciones, se desarrolló la cepa en un biofermentador de 1,5 L (Biostat B, Sartorius Stedim Systems, Melsungen, Alemania) en suero de quesería 5% (p/v) suplementado con algunos de los ingredientes que se encuentran en el caldo MRS (extracto de levadura, glucosa, sales), donde se evaluaron diferentes condiciones de fermentación: pH neutro (pH 6,5) o ligeramente ácido (5,8 y 5,0), en modalidad pH libre o constante (controlado con soluciones de NaOH 8N o ácido láctico 20% (Merck)), aplicación de estrés ácido luego de un desarrollo a pH 6,5, tipo de gas utilizado para producir la anaerobiosis (N₂ y CO₂). Además se evaluó la utilidad de hidrolizar el suero de quesería mediante digestión enzimática debido a las dificultades que presentaba la esterilización del producto en grandes volúmenes, por la formación de agregados que precipitaban debido a la desnaturalización térmica de las proteínas del suero. Para esto, se preparó el suero de quesería 5% (p/v), se lo transfirió al biofermentador, se agregó tripsina pancreática (Novo 6.0 S, Type Saltfree, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) 0,3 % (p/p), y se incubó a 37°C, pH 7,5 (ajustado con NaOH 8N), durante 90 minutos, previo a la esterilización del medio.

Finalmente se seleccionó una formulación de medio de cultivo basado en la composición del medio de cultivo MRS, donde se reemplazaron el extracto de carne y la tripteína presentes en este medio (fuentes proteicas) por el suero de quesería 5% (p/v) hidrolizado y se disminuyó el contenido de glucosa de 2% (p/v) a la mitad. Este medio de cultivo se denominó MRS-SQ. El resto de los ingredientes que normalmente

se encuentran en el caldo MRS se mantuvieron en sus concentraciones originales (ver detalle de la composición del medio de cultivo MRS-SQ en el Anexo).

Se cultivó *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 bajo dos condiciones:

- pH 6,5 controlado (15 h) seguido de la aplicación de un estrés ácido inducido con ácido láctico (Merck) (pH 5,0, 4 h).
- pH libre (desde un pH inicial de 5,8) (15 h) seguido de adición de NaOH 8M (Merck) hasta pH 5,0, manteniéndose este pH constante durante 4 h.

El desarrollo de la cepa se realizó a 37°C con un influjo de CO₂ de 0,2 L/min y una velocidad de agitación de 150 rpm. Se tomaron muestras (500 mL) a las 15 y 19 h de cultivo (Fig. 4), se centrifugaron (5000 rpm, 15 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se suspendieron en solución de lactosa 10% (p/v). Las suspensiones celulares se alicuotaron (1 mL) en viales de vidrio de 10 mL de capacidad. Las muestras se congelaron a una velocidad de congelamiento aproximada de 1°C/min y se almacenaron a -70°C hasta el momento de la liofilización. Las muestras se liofilizaron durante 24 h en un liofilizador de cámara simple (beta 2-16, Martin Christ, Osterode, Alemania), bajo las mismas condiciones descritas en el inciso 2.4. Al final del proceso las muestras se cerraron bajo vacío y se determinó el contenido de humedad (H%) gravimétricamente, por triplicado (101°C, aprox. 20 h). Para comparar el efecto de las condiciones de crecimiento en la funcionalidad de la cepa, se analizó la resistencia de las suspensiones celulares en lactosa 10% (p/v) (previo a la liofilización) y de las células liofilizadas y rehidratadas a la DGS. Se llevaron las suspensiones celulares a pH 2,0 con HCl 5N y 0,1 N en presencia de NaCl 0,5% (p/v) y pepsina porcina 0,5% (p/v) (Merck) y se incubaron a 37°C en baño de agua durante 90 min. Se realizaron recuentos antes de la acidificación y luego de 90 min de exposición a la solución simuladora de la digestión gástrica en placas de agar MRS (Biokar).

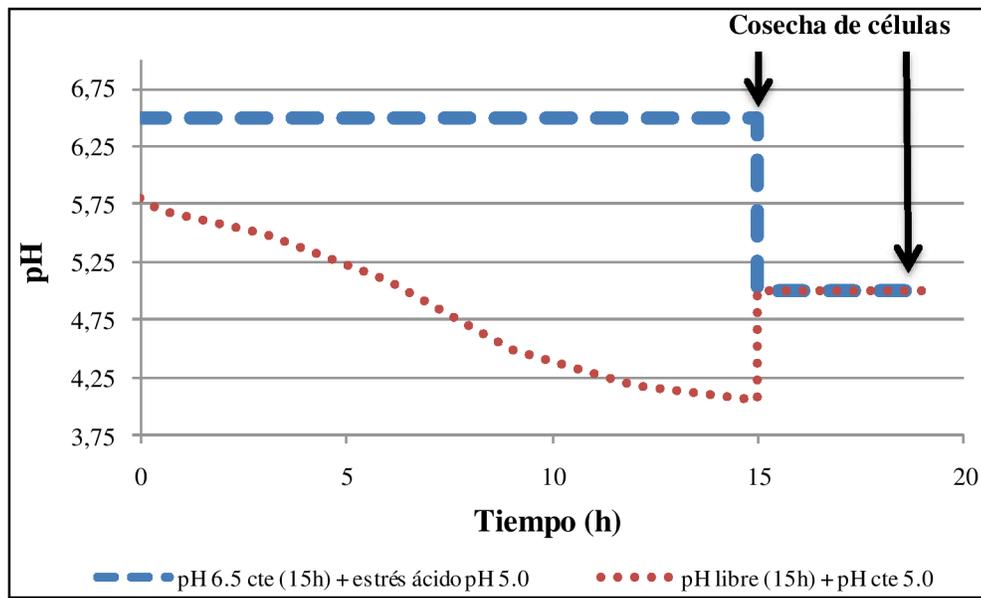


Figura 4: Perfiles de pH utilizados para el estudio del desarrollo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en el medio de cultivo MRS-SQ.

3.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los datos se analizaron utilizando un test t unilateral para comparar las diferencias en el número de células viables. El nivel de significancia estadística se estableció en 0,05.

4. Resultados y discusión.

4.1. Desarrollo en medios de cultivo económicos.

La Figura 5 muestra los niveles de células viables alcanzados para las cepas de bifidobacterias en estudio en el medio de cultivo MRS formulado a partir de ingredientes nacionales y en MRS comercial (Biokar).

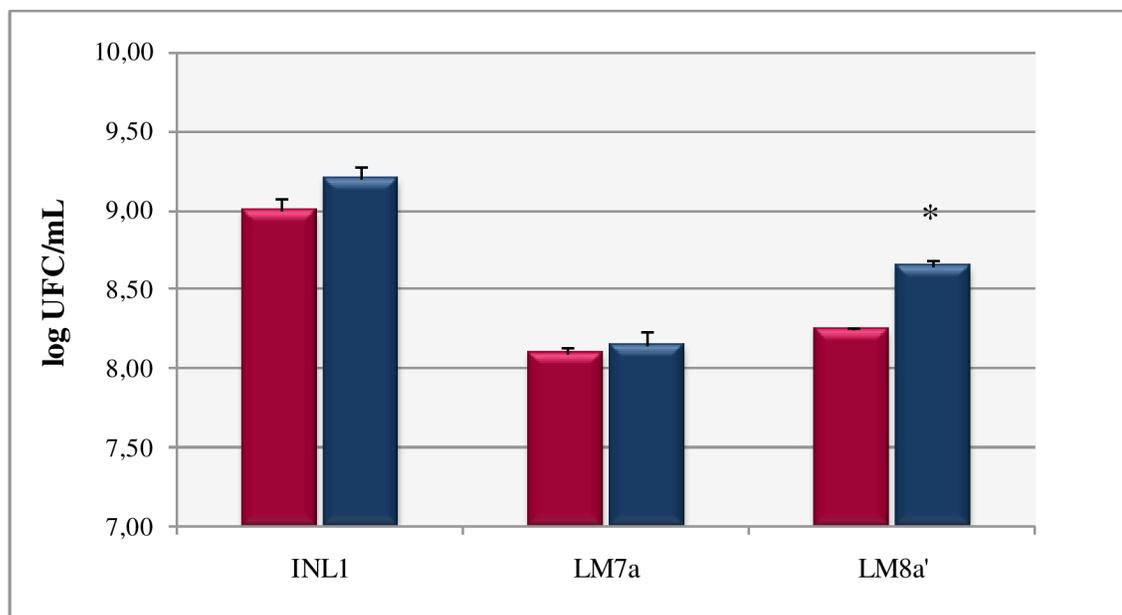


Figura 5: Recuento de células viables de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a' en MRS formulado (■) y en MRS comercial (■). Valores expresados como promedio \pm SEM.*Diferencia significativa para $p < 0,05$.

No se observaron diferencias significativas en el desarrollo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *B. longum* LM7a ($p=0,14$ y $p=0,68$ respectivamente) en los medios de cultivo evaluados. Por su parte, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 mostró crecimiento satisfactorio (aprox. 2 órdenes log) en ambos medios, y *B. longum* LM7a sólo presentó un aumento en el número de células viables de aproximadamente 1,3 orden log (6,79 log UFC/mL a tiempo cero), independientemente del medio de cultivo evaluado. Esto podría indicar que la cepa *B. longum* LM7a tiene mayores requerimientos nutricionales y plantearía la necesidad de formular un medio de cultivo que posibilite la obtención de

mayores rendimientos en biomasa para este microorganismo. En el caso de *B. dentium* LM8a', si bien tampoco se observaron crecimientos de 2 órdenes log, sí se observaron diferencias en cuanto al medio de cultivo utilizado, siendo mayor el nivel de células viables logrado en el medio de cultivo comercial ($p=0,001$).

La utilidad del suero de quesería para la producción de biomasa de lactobacilos (Pérez Guerra y col., 2007, Lavari y col., 2014) y bifidobacterias ha sido previamente reportada (Corre y col., 1992, Doleyres y col., 2002), en su forma de permeados o hidrolizados, o bien adicionado al medio de cultivo MRS. Los rendimientos de biomasa fueron variables de acuerdo a las condiciones de cultivo y las cepas utilizadas (Doleyres y Lacroix, 2005). En el ensayo de crecimiento en suero de quesería 5% (p/v) suplementado con extracto de levadura 1% (YE1) y 5% (YE5) (p/v) las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y *B. dentium* LM8a' mostraron crecimientos similares y satisfactorios 24 h luego de la inoculación en el medio YE5, en comparación con sus crecimientos en el medio de referencia MRS (9,0 y 8,9 log UFC/mL para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1; 9,18 y 8,9 log UFC/mL para *B. dentium* LM8a', en YE5 y MRS respectivamente). En el medio YE1, *B. dentium* LM8a' logró desarrollar 2 órdenes logarítmicos luego de 2 repiques (al 2% (v/v)) sucesivos en este medio, mientras que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 no logró crecer más de 1,5 órdenes log en el medio adicionado de extracto de levadura 1%, aún luego de repiques sucesivos (Fig. 6 (a) y (c) respectivamente).

En el caso de *B. longum* LM7a, esta cepa demostró en general grandes dificultades para desarrollar en los medios basados en suero de quesería y requirió de 48 h de incubación inicial más al menos un repique en los medios YE1 y YE5, para alcanzar (aproximadamente) los mismos niveles de crecimiento (de aprox. 1,4 órdenes log) observados para esta cepa en el medio de referencia (Fig. 6 (b)).

Estos resultados señalan la diversidad de comportamientos que pueden existir entre cepas en lo que hace a su velocidad de desarrollo y niveles de células alcanzados, dos parámetros de interés al momento de considerar el escalado de la producción de biomasa de un cultivo desde la etapa de laboratorio a la escala piloto e industrial. El comportamiento más satisfactorio fue observado para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

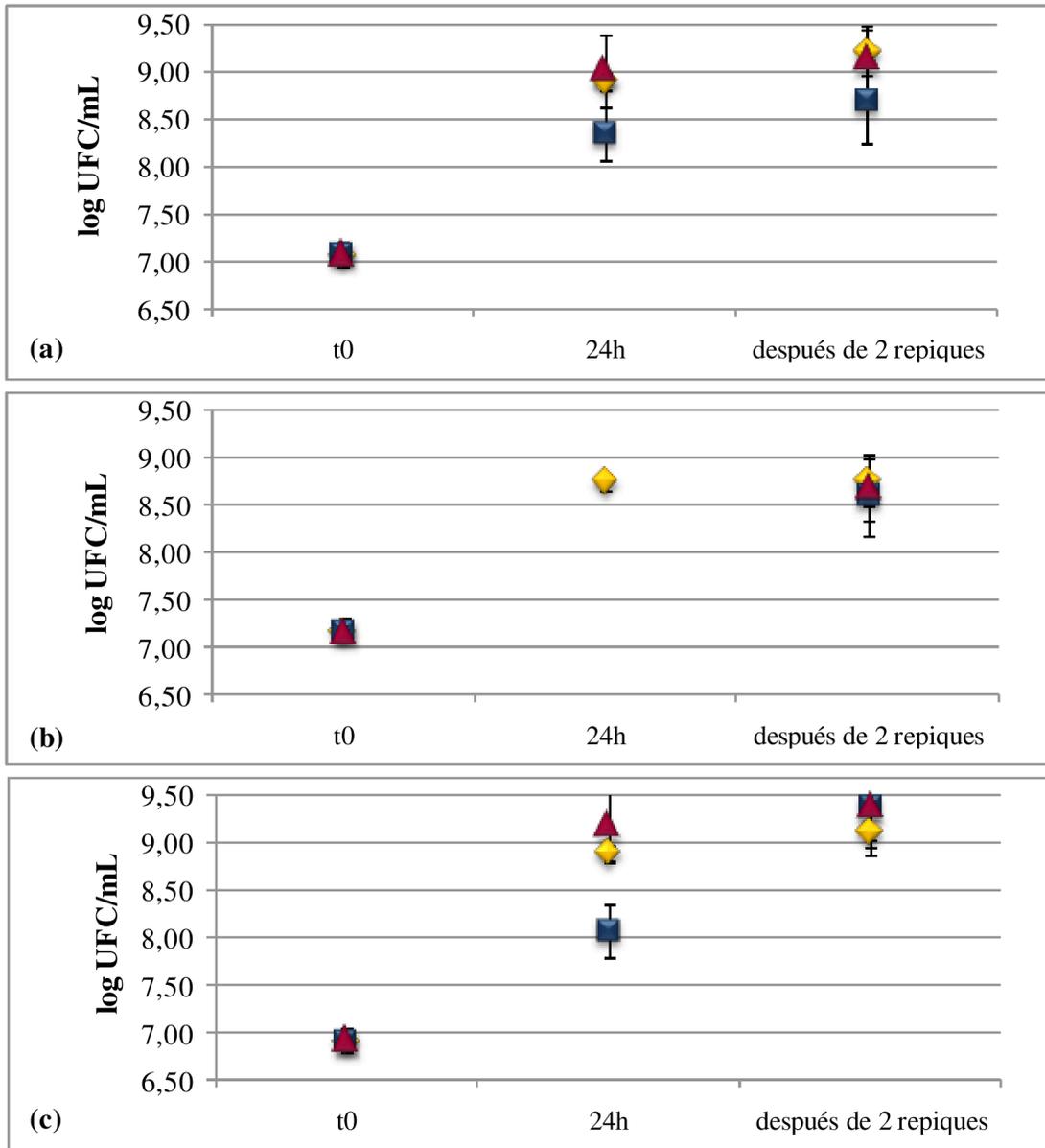


Figura 6: Desarrollo (log UFC/mL) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (a), *B. longum* LM7a (b), y *B. dentium* LM8a' (c), 24 h luego de su inoculación y luego de 2 repiques sucesivos, en caldo MRS (♦), suero de quesería 5% (p/v) + extracto de levadura 1% (■) o 5% (▲) (YE1 e YE5, respectivamente).

4.2. Utilidad del suero de quesería como agente lioprotector.

Se liofilizaron cultivos frescos de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a' en SQ 10% (p/v), empleándose solución de lactosa 10% (p/v) como lioprotector de referencia. Los cultivos se sometieron a un test de almacenamiento acelerado (25°C, 3 semanas) para detectar posibles diferencias en la sobrevivencia y/o resistencia a la DGS en relación al lioprotector utilizado. La Figura 7(a) muestra que para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, independientemente del crioprotector, se obtuvieron altos niveles (aprox. 10 órdenes log) de células viables luego de la liofilización y de 3 semanas de almacenamiento a -20°C y a 25°C. Cuando se analizó la resistencia a la DGS de los cultivos concentrados (previo a la liofilización), no se observaron diferencias significativas en los recuentos celulares antes y después de la exposición a pH 2,0, y en el caso de las células liofilizadas (tanto a tiempo cero como luego del período de almacenamiento), la lactosa y el suero de quesería fueron igualmente efectivos en la protección de las bifidobacterias contra las condiciones agresivas de la DGS.

B. longum LM7a mostró una menor resistencia a la liofilización (pérdidas ≤ 1 orden log) y, en el caso de sus células liofilizadas, se observó una reducción de los niveles de células viables de aproximadamente 2 órdenes logarítmicos cuando las mismas se sometieron a la DGS (Fig. 7(b)), para ambos lioprotectores. Durante el test de almacenamiento acelerado, el suero de quesería demostró ser un protector más eficiente que la lactosa (pérdidas de viabilidad de 1 orden log y 3 órdenes log respectivamente) pero, cuando los liofilizados almacenados a 25°C se sometieron a pH bajo, la pérdida de viabilidad fue mayor para los liofilizados en suero de quesería, obteniéndose niveles de células viables similares (aprox. 5 log UFC/mL) para ambos protectores.

Por último, *B. dentium* LM8a' mostró gran sensibilidad a la liofilización (pérdidas de viabilidad de aproximadamente 3 órdenes log) y el uso de lactosa como lioprotector resultó en una reducción del recuento de células viables de más de 4 órdenes logarítmicos cuando las células se expusieron a pH bajo, mientras que para el suero de quesería las pérdidas de viabilidad fueron ligeramente menores (Fig. 7(c)).

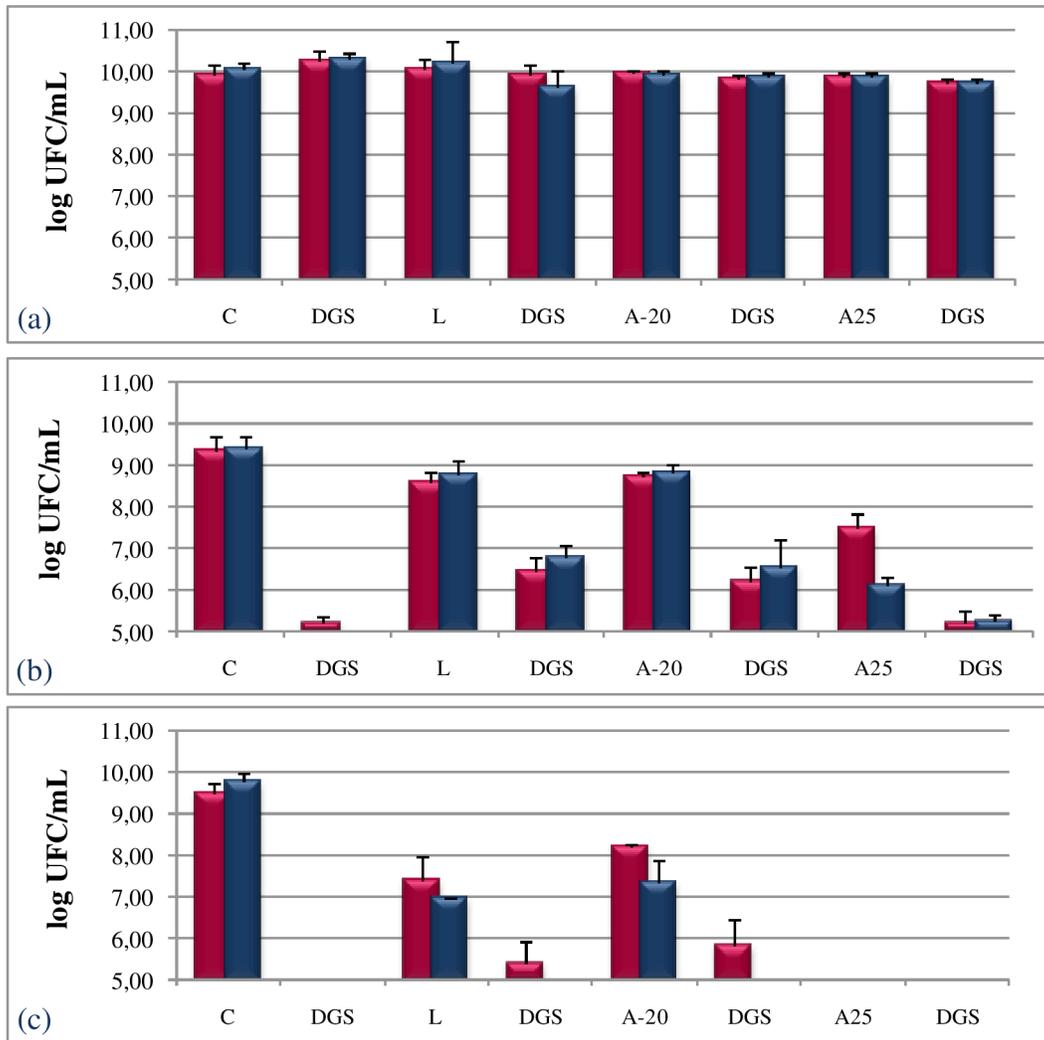


Figura 7: Resistencia de *B. animalis subsp. lactis INL1* (a), *B. longum LM7a* (b) y *B. dentium LM8a'* (c) a la liofilización en suero de quesería 10% (■) y lactosa 10% (■), a la digestión gástrica simulada (DGS) y almacenamiento por 3 semanas a -20°C y 25°C. Las suspensiones celulares frescas y concentradas (C) fueron liofilizadas (L) y almacenadas (A) durante 3 semanas a -20°C (A-20) y a 25 °C (A25) y se sometieron a una DGS. La columna denominada DGS a la derecha de cada etapa (C, L, A) indica el nivel de células viables remanentes luego de la aplicación del test de DGS.

El hecho de que para algunas de las cepas (*B. longum LM7a* y *B. dentium LM8a'*) el suero de quesería resultara un mejor lioprotector, frente al almacenamiento acelerado, respecto a la lactosa, no resultó sorprendente. Por ejemplo, si bien las

proteínas y los polisacáridos han sido usado como materiales emulsionantes, estabilizadores y de pared para la producción de microcápsulas obtenidas por secado spray (Lee y col., 2000), muchas veces el material de pared con un solo constituyente (carbohidratos o proteínas) no tiene las propiedades funcionales deseadas (Choi y col., 2010). En orden de superar este problema y ofrecer versatilidad, se ha sugerido una combinación de proteínas y polisacáridos como material de pared para la encapsulación de compuestos (Young y col., 1993). En este sentido, se podría pensar que el suero de quesería sería un protector más eficiente, debido a que se trata de una matriz compleja de proteínas y carbohidratos. Por otro lado, si bien es muy probable que todas las cepas en estudio tengan importancia funcional en el momento de ser transferidas de la madre al hijo vía el amamantamiento (por el papel que tiene la microbiota intestinal en la maduración inmunológica del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal), es evidente a partir de estos resultados que no cualquier microorganismo aislado de leche materna tiene potencial tecnológico para ser manipulado en laboratorio. Esto se concluye al observar, por ejemplo, que ciertas cepas presentaron dificultades para su desarrollo en medio líquido y para formar un pellet firme durante la centrifugación o inadecuada sobrevivida a procesos nobles de conservación como la liofilización o ante condiciones adversas de almacenamiento e inclusive pasaje gástrico (lo cual constituye un criterio de selección fisiológico de importancia para cultivos potencialmente probióticos). Nuevamente el comportamiento más satisfactorio fue observado para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Algunas cepas de la especie *B. longum* tienen importancia industrial no sólo por su función como probióticos (*B. longum* Morinaga BB536, *B. longum* ES1) sino también por su potencial para la biosíntesis de productos con valor agregado para la industria alimenticia como es el caso de β -galactosidasas (Hsu y col., 2007, Han y col., 2014). Los resultados obtenidos para la cepa *B. longum* LM7a tanto respecto a su crecimiento en medios económicos como al ser liofilizada, no fueron totalmente satisfactorios por lo que, su potencial utilización plantea el desafío en primer lugar de optimizar las condiciones de cultivo y deshidratación, en vistas a evaluar su utilidad para fines específicos y su potencial transferencia a la industria. La especie *B. dentium* ha sido descrita como patógeno oportunista ya que forma parte de la ecología de la cavidad oral, particularmente en el desarrollo de caries (Ventura y

col., 2009) por lo que la importancia de la cepa *B. dentium* LM8a' en este trabajo no radicó en su importancia con vistas a su uso como probiótico sino a fines académicos, , para contribuir a demostrar el hecho que existen diferencias en relación a la tolerancia a factores tecnológicos a nivel especie dentro de un mismo género y además al hecho de que no es posible, en principio, industrializar cualquier aislamiento obtenido de leche materna aunque a priori se consideren de interés funcional por su origen.

4.3. Producción de biomasa en suero de quesería en biofermentador.

Debido a su capacidad de desarrollo en medio líquido, la formación de un pellet firme, la resistencia a la liofilización y a la DGS, para esta parte del trabajo se seleccionó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 para ser cultivada en un biofermentador de 1,5 L en el medio de cultivo formulado con suero de quesería 5% (p/v) (MRS-SQ) bajo dos condiciones: a) pH 6,5 controlado (15 h) seguido de estrés ácido con ácido láctico hasta pH 5,0, manteniéndose este valor durante 4 h, y b) pH libre (desde pH inicial 5,8) (15 h) seguido de adición de NaOH 8N hasta pH 5,0, manteniéndose este valor constante durante 4 h. La selección de pH inicial 5,8 para la fermentación a pH libre se basó en la recomendación del Dr. Wilhelm Bockelmann, integrante del grupo de trabajo alemán (valor de pH que utilizaban de rutina para el crecimiento de microorganismos de este tipo).

Los valores de células viables al inicio de las fermentaciones fueron similares (7,00 y 7,04 log UFC/mL para las condiciones (a) y (b) respectivamente). Luego de 19 h de fermentación se obtuvieron recuentos de células viables similares (aprox. 10^9 UFC/mL) en ambas condiciones de fermentación (Fig. 8). Sin embargo, el crecimiento a pH 6,5 fue más lento y se observó un desarrollo de 0,5 órdenes log significativamente menor ($p = 0,0431$) respecto al crecimiento a pH libre, en las primeras 15 h de fermentación. Cuando se sometió el cultivo desarrollado a pH 6,5 constante a un estrés ácido con ácido láctico y se llevó a pH 5,0 constante durante 4 h, el crecimiento de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 continuó hasta alcanzar los niveles esperados de 9,0 órdenes log. En el caso de la fermentación a pH libre, el crecimiento deseado (2 órdenes log desde el

nivel inoculado) se obtuvo en las primeras 15 h de cultivo, y cuando se llevó a pH 5,0 constante, el crecimiento se detuvo y el nivel de células viables se mantuvo constante.

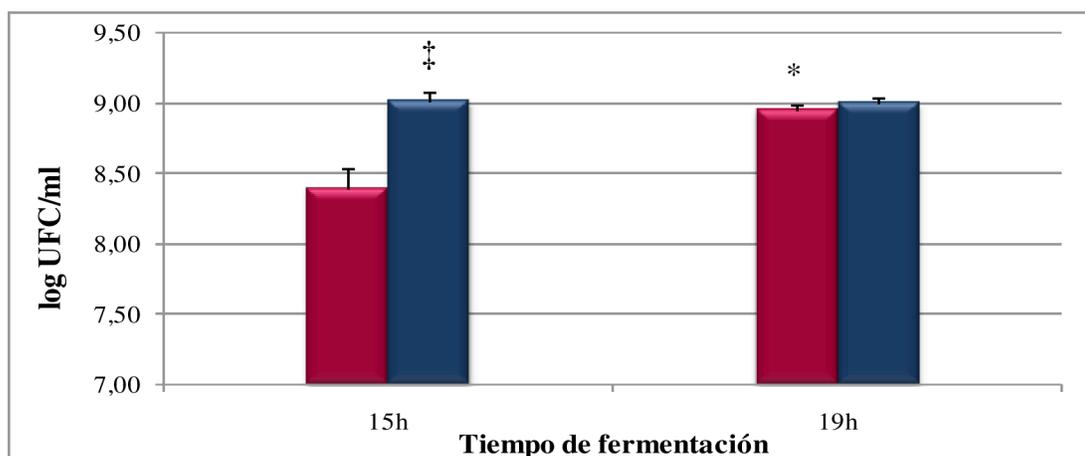


Figura 8: Crecimiento de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en medio de cultivo MRS-SQ a pH 6,5 constante (15 h) + estrés ácido hasta pH 5,0 (constante, 4 h) (■) y a pH libre (pH inicial 5,8; 15 h) + pH 5,0 (constante, 4 h) (■). Valores expresados como promedio \pm SEM. * Diferencias significativas para el mismo tiempo, entre diferentes condiciones de fermentación. † Diferencias significativas dentro de la misma condición de fermentación, respecto al tiempo de cosecha de las células; $p < 0,05$.

Cuando las células cultivadas a pH 6,5 constante + estrés ácido, y a pH libre, durante 15 y 19 h, se liofilizaron en lactosa 10% (p/v) y se sometieron a DGS, las células cultivadas a pH libre + pH 5,0 por 4 h, fueron las más resistentes a las condiciones adversas que simulaban el tránsito gástrico (Tabla 4), y no se observaron diferencias significativas en los recuentos celulares antes y después de la exposición a pH bajo ($p = 0,13$). Las células de esta fermentación cosechadas a 15 h (sin exposición a pH 5,0) mostraron cierta sensibilidad a la DGS, si bien las pérdidas de viabilidad de los liofilizados fueron cercanas a 1 orden log. Por el contrario, las células cultivadas a pH 6,5 constante (15 h) fueron las más sensibles a la acidez gástrica y presentaron pérdidas celulares de aproximadamente 4 órdenes log cuando se las expuso a las condiciones de la DGS (Tabla 4) y esta sensibilidad a la acidez no pudo ser contrarrestada cuando se sometió a las células a un estrés ácido durante su crecimiento.

Tabla 4: Sobrevida de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a la digestión gástrica simulada (DGS) en cultivos desarrollados a pH 6,5 + estrés ácido (hasta pH 5,0) y a pH libre (pH inicial 5,8) + pH 5,0 y liofilizados en lactosa 10% (p/v).

Condiciones de desarrollo	Tiempo de cultivo (h)	Recuentos (log UFC/mL \pm SEM) a tiempo 0 y 90 min de DGS	
		0 min	90 min
pH 6,5 constante	15	9,24 \pm 0,35 ^a	5,13 \pm 0,38 ^b
pH 6,5 constante + estrés ácido	19	8,42 \pm 0,24 ^a	4,52 \pm 0,25 ^b
pH libre (desde pH 5,8)	15	9,16 \pm 0,16 ^a	7,87 \pm 0,21 ^b
pH libre (desde pH 5,8) + pH 5,0	19	9,03 \pm 0,25 ^a	8,26 \pm 0,22 ^a

^{a,b} Los valores en la misma línea con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Esta parte del trabajo permitió poner de manifiesto la importancia de la estrategia de cultivo (pH constante vs. pH libre) no solo para alcanzar altos niveles de células viables sino también una adecuada resistencia a la digestión gástrica simulada. La dependencia de las condiciones de cultivo con este y otros parámetros de funcionalidad ha sido descrita para bacterias probióticas. Vinderola y col. (2012) mostraron para la misma cepa utilizada en este estudio cultivada en MRS a pH 6,5 constante y liofilizada en lactosa 10% (p/v), una significativa sensibilidad a la acidez gástrica, independientemente del tiempo al que las células fueron cosechadas (12 y 22 h), mientras que cuando las células fueron cultivadas a pH 5,0 constante durante el mismo tiempo, no se observó muerte celular significativa en los liofilizados expuestos a la DGS. La mayor resistencia a la DGS cuando las células son cultivadas a pH más ácidos también fue reportada por Saarela y col. (2009) quien reportó una mayor tolerancia a la acidez gástrica en *L. rhamnosus* E800 cuando se lo cultivó a pH 5,0 comparado a pH 5,8. Otros parámetros de funcionalidad también son dependientes del pH al cual las

células probióticas son producidas. Sashihara y col. (2007) demostraron que cultivos de *L. gasseri* OLL2809 producidos a pH menores fueron más efectivos para inducir la producción de IL-12 en células eucariotas. Otros estudios mostraron diferencias en la funcionalidad de cepas probióticas cuando se las cosechó a diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento. Estos autores demostraron que las células de *L. gasseri* OLL2809 cosechadas durante la fase estacionaria de crecimiento, estimularon mucho más la producción de IL-12 en esplenocitos murinos que las células cosechadas durante la fase logarítmica. Haller y col. (1999) observaron que las bacterias ácido lácticas en fase estacionaria indujeron una mayor cantidad de TNF- α en células mononucleares de sangre periférica que cultivos en su fase logarítmica. Maassen y col. (2003) observaron diferencias in vivo en la actividad inmunoestimuladora de *L. casei* dependiendo de la fase de crecimiento, siendo la relación entre anticuerpos IgG1 e IgG2a en suero de ratones mayor cuando los animales recibieron células de *L. casei* en fase estacionaria.

5. Conclusiones parciales.

El uso de suero de quesería como alternativa de medio de cultivo económico es prometedor y la producción de biomasa de bifidobacterias en medios de cultivo de bajo costo es posible, si bien las composiciones específicas de los medios a formularse y las condiciones de cultivo son cepa dependientes y deben ser optimizadas para obtener rendimientos de biomasa satisfactorios. Además, el suero de quesería fue efectivo en la protección de las bifidobacterias cuando estas fueron liofilizadas y sometidas a un test de almacenamiento acelerado.

En cuanto a la comparación entre los distintos aislamientos de bifidobacterias de leche materna, se observó que no todos poseen potencial tecnológico. Mientras que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostró ser una cepa robusta, con buenos rendimientos de biomasa y resistente a la liofilización, al almacenamiento acelerado y la acidez gástrica, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a' mostraron grandes dificultades para mantenerse viables al ser manipuladas y por la sensibilidad pronunciada a la DGS.

Finalmente, cuando analizados en su conjunto, los resultados de esta parte del estudio confirman la importancia de las estrategias y condiciones bajo las cuales los cultivos son producidos y concuerdan con la afirmación de Saarela y col. (2006) de que la viabilidad o estabilidad de los cultivos no es suficiente como indicador de la funcionalidad de una cepa en condiciones adversas como pH bajos. Algunos parámetros de funcionalidad como la tolerancia a bilis y a la acidez gástrica, la adhesión a epitelio intestinal y el efecto final del probiótico en el hospedador pueden ser afectados por los procesos a los que son sometidos durante la elaboración de los alimentos que lo transportan (Tuomola y col., 2000, Sashihara y col., 2007, Ranadheera y col., 2010), sin verse estos cambios reflejados por los niveles de células viables, los cuales pueden mantenerse constantes. Esta parte del trabajo demostró la utilidad de la determinación de resistencia a la DGS como un test sencillo para evaluar diferencias en la sensibilidad de las células a las distintas condiciones de producción de biomasa y liofilización cuando éstas no se observan a nivel de recuentos de células viables.

Capitulo IIb

Tecnologías para la deshidratación

de

B. animalis subsp. lactis INL1.

1. Introducción

Los productos lácteos, fermentados o no, y enriquecidos con microorganismos probióticos, se han convertido en una de las categorías más exitosas dentro de los alimentos funcionales. Desde la perspectiva de un ingrediente funcional, la generación de estos cultivos vivos en formato deshidratado es particularmente atractiva y ventajosa respecto al formato congelado por cuestiones de transporte y cadena de frío. Sin embargo, presenta grandes desafíos en términos de lograr altos niveles de células viables y mantener la funcionalidad probiótica durante la producción del cultivo deshidratado y su almacenamiento (Meng y col., 2008). Los métodos de producción de cultivos probióticos deshidratados deben ser tales que la viabilidad se mantenga en los polvos seguido a su producción y que el almacenamiento asegure que un número adecuado de bacterias puedan ser entregadas en el producto final. Consecuentemente, mantener una viabilidad alta durante la deshidratación y el almacenamiento, presenta desafíos particulares y puede ser considerada uno de los factores determinantes en la producción de probióticos comerciales. Además, la preservación de cultivos iniciadores (starters) y probióticos mediante procesos de secado alternativos, ha atraído creciente atención debido a los altos costos y consumo de energía del proceso clásico empleado para tal fin, la liofilización. La Tabla 5 muestra los costos relativos de algunos de los procesos de deshidratación utilizados en la industria, mientras que la Tabla 6 muestra el costo expresado en U\$/kg.

Tabla 5: Costos de diferentes procesos de deshidratación respecto al de la liofilización.*

Proceso	Costos (%)	
	Fijos	De producción
Liofilización	100,0	100,0
Secado al vacío	52,2	51,6
Secado spray	12,0	20,0
Secado en lecho fluidizado	8,8	17,9

*adaptado de (Santivarangkna y col., 2007).

Tabla 6: Costos de los procesos de deshidratación empleados en la actualidad.**

Proceso	Costos (U\$\$/kg)	
	Fijos	De producción
Liofilización	1228	95
Secado al vacío	5860	49
Secado spray	1360	19
Secado en lecho fluidizado	1000	17

**adaptado de Domínguez (2011).

Después de la liofilización, el secado spray es la tecnología más extensamente investigada para la producción de cultivos deshidratados debido a que presenta la ventaja de estar ampliamente instalada a nivel industrial, tanto en el área farmacológica como de alimentos. En esta última, es utilizada principalmente como herramienta de procesamiento de leche en la industria láctea para la obtención de leche en polvo. Otra ventaja que presenta esta tecnología es la rapidez de secado y capacidad de operación en forma continua, lo cual podría ser muy útil para la deshidratación de grandes cantidades de cultivos funcionales.

El secado al vacío también es un proceso conocido y aplicado en la industria farmacéutica y de alimentos, para la producción de extractos de carne y vegetales, secado de emulsiones y concentración de jugos vegetales (Domínguez, 2011). Es una alternativa útil en particular para aquellos materiales sensibles al calor o higroscópicos. A diferencia del secado spray, como esta tecnología opera bajo vacío, la humedad puede ser removida de los materiales a temperaturas más bajas. Por ej., mientras que el punto de ebullición del agua a 1 atm es 100°C, a 1 kPa (aprox. 0,01 atm) es aproximadamente 8°C. Aún más, las reacciones de oxidación durante el secado pueden ser minimizadas, por lo que esta tecnología resultaría auspiciosa para la deshidratación de bacterias ácido lácticas sensibles a oxígeno (Santivarangkna y col., 2007).

Respecto a los sistemas de secado mixto, hasta años recientes, pocos estudios se habían realizado para combinar las ventajas o características positivas de los diferentes

procesos de secado sobre cultivos bacterianos. Por ejemplo, Stadhouders y col. (1969) aplicaron secado al vacío para reducir el contenido de humedad de cultivos starters ácido lácticos secados spray de 8,3% a 5,2%, para mejorar su calidad al almacenamiento. Sin embargo, en los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de nuevas tecnologías no agresivas y económicamente eficientes para la deshidratación de ingredientes alimentarios y el desarrollo de nuevos productos. Una de las tecnologías que resulta más prometedora es la aplicación de energía radiante en sistemas a baja presión, como por ejemplo el secado al vacío o la liofilización asistidos por microondas. Cuando se aplican microondas a los alimentos, se genera calor dentro del producto. Así, la temperatura del mismo aumenta rápidamente y por lo tanto, la velocidad de remoción de agua es mayor que en los secados convencionales, lo que lleva a la principal ventaja de este tipo de secado: el ahorro de tiempo y energía (Gunasekaran y col., 1999). En cuanto a su combinación con la liofilización, se ha propuesto que la radiación de microondas sería útil para remover el agua residual que no puede ser eliminada por la primera, aunque presenta el problema de que, a las presiones utilizadas en la liofilización, se corre el riesgo de formación de plasma, por la ionización de los gases, y quemar así el producto. Respecto a la combinación del uso de microondas con el secado al vacío, esta es una alternativa interesante a la liofilización, y ya existen varios sistemas en el mercado para la industria farmacéutica y alimenticia, particularmente para la deshidratación de frutas. Este tipo de tecnología permite obtener productos deshidratados que conservan su aroma, atractivo estético y su valor nutricional (vitaminas y antioxidantes), si bien no existen antecedentes sobre su aplicación para la conservación de microorganismos. El costo operacional del secado al vacío asistido por microondas se considera intermedio entre la liofilización y el secado spray (Schiffman, 2006). Gehrman y col. (2009) compararon los costos relativos a la inversión necesaria para obtener el mismo rendimiento entre liofilización y otras técnicas de deshidratación alternativas, y también el uso específico de energía. Considerando a la liofilización como 100% de inversión relativa y uso específico de energía de 2 kWh/kg de agua, los valores para secado spray, secado al vacío y secado al vacío con microondas son: 52,2% / 1,6 kWh/kg; 65,2% / 1,3 kWh/kg y 82,6% / 1,5 kWh/kg, respectivamente. Respecto a la liofilización asistida por microondas, si bien

no se cuenta con valores estimados de su costo energético, una de sus principales ventajas en comparación a la liofilización es que resulta más eficiente en la etapa final de secado con bajos requerimientos energéticos (Feng y Tang, 1998, Torringa y col., 2001, Duan y col., 2010). Además las predicciones numéricas y experimentales muestran que su costo sería menor (Wu y col., 2004, Duan y col., 2010).

Otros parámetros a considerar relacionados a la estabilidad de los cultivos deshidratados es el uso de sustancias protectoras y las condiciones de almacenamiento. La adición de agentes protectores a cultivos microbianos es un paso recomendado para proteger las células durante el secado y el almacenamiento. Los excipientes adicionados pueden ser componentes simples agregados directamente al concentrado celular (azúcares) o componentes/polímeros más complejos utilizados como medio de suspensión o carrier (como leche descremada, suero, gelatina). Existen numerosos agentes protectores, y la efectividad de un protector dado varía con cada tipo de cultivo y de proceso de secado (Santivarangkna y col., 2007). Además, es importante notar que los mejores agentes protectores durante la deshidratación, no necesariamente son los óptimos para la protección durante el almacenamiento de las células (Selmer-Olsen y col., 1999) y viceversa.

2. Objetivos.

En este capítulo se determinaron aspectos tecnológicos relacionados a la producción de cultivos deshidratados de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, para su conservación. Parte de este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Prof. Ulrich Kulozik del Departamento de Ingeniería de Procesos Alimenticios y Tecnología Láctea de la Universidad Técnica de Munich (Alemania). Los objetivos específicos planteados fueron:

- 1) Estudiar la aplicación de 5 diferentes técnicas de deshidratación, convencionales y alternativas, sobre un cultivo concentrado de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.
- 2) Analizar la tolerancia a los mismos y la resistencia de los cultivos deshidratados al almacenamiento en condiciones controladas de humedad y temperatura, en vistas a encontrar alternativas de tecnología/condiciones para la deshidratación de esta cepa.
- 3) Estudiar en particular la aplicación del secado spray, tecnología de deshidratación instalada en las medianas y grandes industrias lácteas argentinas, a escala laboratorio e industrial, con vistas a avanzar en el conocimiento que lleve a una posible transferencia futura de la cepa al sector industrial.

3. Materiales y métodos.

3.1. Microorganismo.

Se utilizó *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, en forma de cultivo concentrado congelado producido especialmente para este trabajo por la empresa italiana productora de fermentos lácticos Clerici-Sacco (Cadorago, Italia) mediante la firma de un Acuerdo de Transferencia de Material Biológico entre la empresa y la UNL-CONICET. Para la producción de la biomasa se utilizó un fermentador de 600 L. Se inoculó (2% v/v) el medio de cultivo en base láctea (composición reservada por la empresa) previamente atemperado a 37°C, con un cultivo fresco de la cepa en fase estacionaria. Durante la fermentación se mantuvo una sobrepresión de 0,2 bar con N₂ en el espacio de cabeza del fermentador y la agitación se estableció a 120 rpm. Se mantuvo el pH constante a un valor de 6,0 por adición de solución de amonio 30%. El final de la fermentación se determinó por una marcada caída en la adición de base. Se refrigeró el caldo dentro del fermentador hasta aproximadamente 8°C y luego el cultivo fue concentrado en una centrífuga continua Westfalia. A partir del cultivo concentrado (sin lavado de las células) se obtuvieron pellets congelado por goteo en N₂ líquido. A partir de 600 L de medio de cultivo se obtuvieron aproximadamente 40 kg de cultivo concentrado con un nivel de células viables de aprox. 10¹¹ UFC/g. Las células concentradas y congeladas se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

3.2. Preparación de las muestras y agentes protectores.

En una primera etapa se realizaron secados preliminares correspondientes a las 5 tecnologías de deshidratación estudiadas: liofilización (L), secado spray (S), secado al vacío (V), secado al vacío con microondas (VMO) y liofilización con microondas (LMO), utilizando diferentes condiciones para la deshidratación de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, sugeridas por el grupo alemán dada su experiencia en el tema, o bien basadas en la experiencia previa para este microorganismo (particularmente para la L y el S). Estos ensayos se realizaron sin agregado de agente protector. Por las características operativas de las tecnologías empleadas (necesidad de operar con un cultivo líquido), se utilizó el cultivo concentrado descongelado para S, V y VMO,

mientras que para L y LMO se utilizaron directamente los gránulos concentrados congelados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 producidos y provistos por la empresa italiana. En una segunda etapa, una vez seleccionadas las condiciones para cada deshidratación, se realizó un ensayo para evaluar la estabilidad de los cultivos al almacenamiento y la influencia del agregado de un agente protector. Se realizaron dos secados independientes, para cada tecnología, sobre el concentrado de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, sin adición de agentes protectores extras, y dos secados independientes en presencia de un agente protector. Se adicionó a las suspensiones celulares lactosa monohidrato (Merck, Darmstadt, Alemania) en polvo como agente protector. Este soluto fue seleccionado como de referencia según la experiencia del grupo de trabajo alemán. Para las 5 tecnologías estudiadas, la masa de lactosa agregada a las suspensiones celulares fue del 50% (p/p) de los sólidos totales, los cuales se determinaron con un equipo CEM Smart Turbo (Matthews, NC, USA). En el caso del S, V y VMO, y debido a que estas tecnologías operan sobre suspensiones bacterianas líquidas, los gránulos se descongelaron, se agregó el protector y se siguió con el procedimiento de cada tecnología.

En el caso de la L y la LMO para incorporar el protector a los gránulos congelados, los mismos se descongelaron, se adicionó la lactosa, se homogeneizó, y se reformaron cuidadosamente por goteo en nitrógeno líquido, de manera de obtener partículas de aproximadamente el mismo tamaño que el cultivo original (sin protector) provisto por la empresa italiana (Fig. 9). Estos cultivos congelados con lactosa se almacenaron a -70°C hasta ser utilizados, para que su temperatura se estabilizara y fuera similar a la del cultivo sin agregado de protector. En los secados L y LMO sin protector se utilizó directamente el concentrado congelado provisto por la empresa, sin ser sometido a descongelamiento.

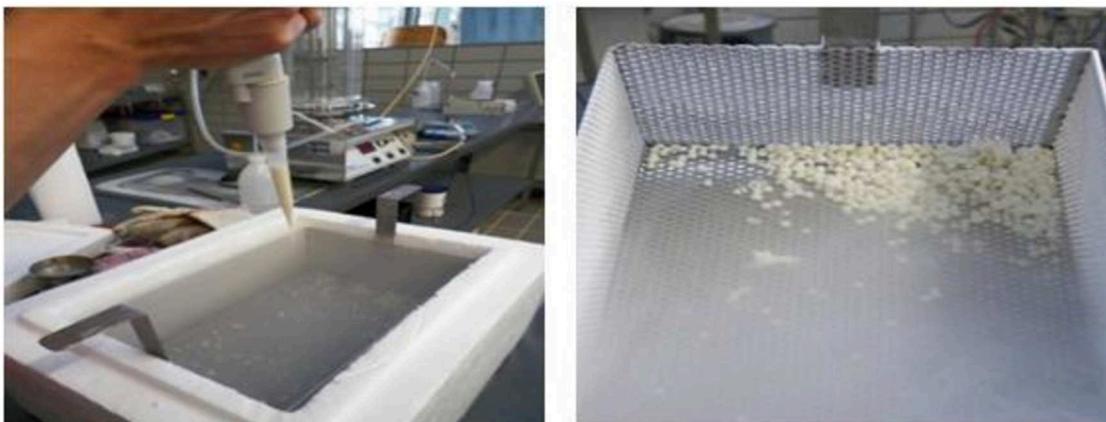


Figura 9: Preparación de los gránulos concentrados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 con lactosa para la liofilización (L) y la liofilización asistida por microondas (LMO), por goteo en N₂ líquido.

En función de los resultados obtenidos, para las tecnologías de secado al vacío (V) y secado al vacío asistido con microondas (VMO), se evaluaron protectores adicionales: sorbitol (Gerbu Biotechnik GmbH, Heidebrecht, Alemania), maltodextrina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y caseinomacropéptido (CMP, Davisco, Alemania). Los cultivos se prepararon de la misma forma que para lactosa (agregado del soluto protector al 50% (p/p) de los sólidos totales) y fueron deshidratados según las condiciones seleccionadas para el test de almacenamiento acelerado (ver sección 3.2).

3.3. Selección de condiciones de secado.

Se realizaron secados preliminares, variando aquellas condiciones más determinantes en la inactivación por deshidratación, para cada una de las cinco tecnologías estudiadas. Se seleccionaron aquellas que permitieron la obtención de un producto con mayor viabilidad, integridad de membrana satisfactoria, y valores de contenido de humedad relativa acordes a lo esperado para cada tecnología. Las condiciones utilizadas fueron sugeridas por el equipo de trabajo alemán teniendo en cuenta su experiencia en la deshidratación de microorganismos y el tiempo limitado de la estadía en este lugar de trabajo, por lo que de alguna manera deben considerarse exploratorias y no optimizadas.

3.3.1. Liofilización.

Se utilizó un liofilizador de mesada (Alpha LSC 1-24, Christ, Osterode, Alemania) (Fig. 10). La temperatura del estante en el pre-enfriamiento fue -40°C . Se colocaron 40 g de cultivo concentrado congelado de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en 4 placas metálicas (10 g/placa) y se posicionaron en el mismo estante, a igual distancia respecto al condensador de la cámara. Se evaluaron dos condiciones de liofilización: a) etapa primaria con presión en la cámara de 0,12 mbar y temperatura de estante de -20°C (tiempo aprox. 12 h) y etapa secundaria donde la temperatura de estante se elevó a $+25^{\circ}\text{C}$, duración total 21 h; y b) etapa primaria con presión en la cámara de 0,37 mbar y temperatura de estante -15°C (tiempo aprox. 15,5h) y etapa secundaria donde la temperatura de estante se elevó a $+25^{\circ}\text{C}$ (condiciones ya utilizadas para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, capítulo IIa), duración total 24 h.



Figura 10: Liofilizador de mesada Alpha LSC 1-24 (Christ) y gránulos liofilizados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 bajo las condiciones (b).

3.3.2. Secado spray.

Se utilizó un secadero spray Büchi modelo B-290 (Büchi, Flawil, Suiza) (Fig. 11). Se descongelaron para cada secado spray aprox. 100 g de cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, se trabajó siempre a una temperatura de entrada de aire de 160°C y flujo de aire de 50 mm (equivalente a aprox. 601 L/h de aire pulverizado), y se estudió el efecto de diferentes temperaturas de salida (60°C , 70°C y 80°C) ya que es reconocido como el parámetro que más afecta la viabilidad de los polvos obtenidos por secado

spray (Gardiner y col., 2000). La temperatura de salida se controló ajustando el caudal de la solución de alimentación. Para las temperaturas de salida 60°C, 70°C y 80°C los caudales de alimentación fueron de aproximadamente 0,015, 0,009 y 0,005 L/min.



Figura 11: Secadero spray (Büchi) y polvo obtenido de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 para las condiciones temperatura de entrada 160°C y temperatura de salida 80°C.

3.3.3. Secado al vacío.

Se utilizó un liofilizador de mesada (Gamma LSC 1-20, Christ, Osterode, Alemania) (Fig.12). Se descongelaron aprox. 20 g de cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y se distribuyeron en viales de vidrio de 25 mm de diámetro interno (Christ, Osterode, Alemania) en alícuotas de 1 g/vial (altura de la columna de muestra: 2 mm). Todos los viales se posicionaron en el mismo estante, a igual distancia respecto al condensador de la cámara. Se evaluaron dos condiciones: a) temperatura de estante 15°C, presión en la cámara 15 mbar, y b) temperatura de estante 35°C, presión en la cámara 25 mbar. El proceso de secado se llevó a cabo por 24 h.



Figura 12: Liofilizador de mesada Gamma LSC 1-20 (Christ) y viales con cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secado al vacío bajo las condiciones (b).

3.3.4. Secado al vacío asistido con microondas.

Se utilizó un equipo para secado al vacío asistido con microondas μ WaveVac0150 (Püschner Microwave GmbH, Schwanewede-Bremen, Alemania) (Fig. 13). Se descongelaron 100 g de cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y se distribuyeron en 4 recipientes de vidrio Duran (Schott, Mainz, Alemania). Se trabajó a una presión en la cámara de 7 mbar y una temperatura máxima de producto (TMP) de 40°C, y se varió la potencia de microondas aplicadas (1, 2 y 3 W/g). Estas potencias se aplicaron de manera constante hasta que el cultivo congelado alcanzó la TMP seleccionada, y luego las microondas se administraron en forma de pulsos de una potencia de 1W/g (mínima potencia utilizada por el equipo), de manera que la temperatura del cultivo nunca superó la TMP preestablecida. Los secados se monitorearon mediante el software WaveCAT 2007 (versión 4.2.1.4., Püschner Microwave GmbH) y se detuvieron cuando la pérdida de masa del producto se mantuvo invariable por aprox. 15 min. Al final de cada proceso se observó el tiempo de secado (h) y la energía absorbida en kWh, ya que en estos procesos la eficiencia energética es muy importante.



Figura 13: Equipo piloto para secado con microondas μ WaveVac0150 (Püschner Microwave GmbH) y cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secado al vacío con microondas a 2 W/g y presión de 7 mbar.

3.3.5. Liofilización asistida con microondas.

Se utilizó el mismo equipo que para el secado al vacío asistido con microondas (μ WaveVac0150, Püschner Microwave GmbH, Schwanewede-Bremen, Alemania). Se utilizaron 100 g de cultivo de la cepa en estudio y se colocaron en un recipiente de vidrio Duran de 20 cm de diámetro interno (Schott, Mainz, Alemania) (Fig. 14).



Figura 14: Cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 congelado (a y b) y posteriormente deshidratado (c) por liofilización asistida con microondas a 1,5 W/g y presión de 0,7 mbar.

Se trabajó a una presión en la cámara de 0,7 mbar y una temperatura máxima de producto (TMP) de 30°C, y se varió la potencia de microondas aplicadas (1, 1,5, 2 y 2,5 W/g). Estas potencias se aplicaron de manera constante hasta que el cultivo congelado alcanzó la TMP seleccionada, y luego las microondas se administraron en forma de pulsos de una potencia de 1W/g (mínima potencia utilizada por el equipo), de

manera que la temperatura del cultivo nunca superó la TMP preestablecida. Los secados se monitorearon mediante el software WaveCAT 2007 (versión 4.2.1.4., Püschner Microwave GmbH) (Fig. 15) y se detuvieron cuando la pérdida de masa del producto se mantuvo invariable por aprox. 15 min. Al final de cada proceso se observó el tiempo de secado (h) y la energía absorbida total en kWh.

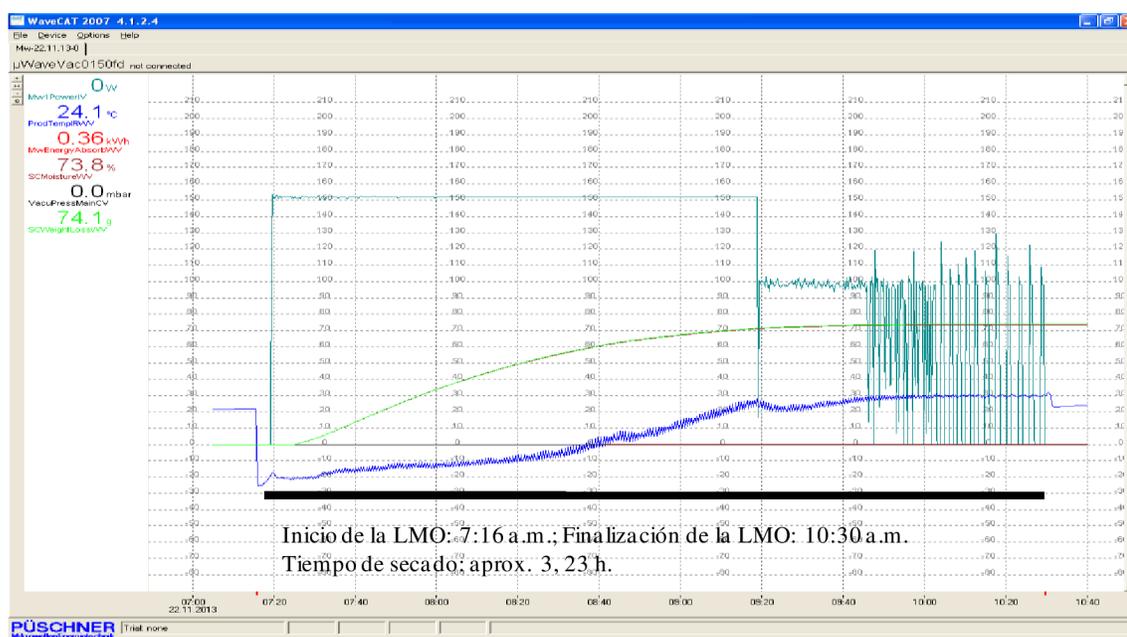


Figura 15: Potencia aplicada (—), energía absorbida (—), temperatura del producto (—), presión en la cámara (—) y pérdida de peso (—) durante la liofilización asistida con microondas de un cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a 1,5 W/g y presión de 0,7 mbar.

3.4. Test de almacenamiento acelerado.

Una vez seleccionada la condición de deshidratación más adecuada, entre las evaluadas, para cada tecnología de secado estudiada (ver sección Resultados), se realizaron dos secados independientes de la cepa para cada técnica, con y sin adición de agentes protectores extras (lactosa), como se describió en el punto 2.2. Los cultivos deshidratados se distribuyeron en viales de vidrio de 25 mm de diámetro interno (Christ, Osterode, Alemania) para su almacenamiento, a razón de 0,5-0,6 g de cultivo deshidratado/vial. Se almacenaron a 25°C en desecadores de vidrio en presencia de soluciones salinas saturadas de acetato de potasio y de carbonato de potasio para lograr

un ambiente con actividad acuosa (a_w) constante de 0,23 y 0,43, respectivamente. La sobrevida de la cepa, la integridad de membrana y el contenido de humedad residual se determinaron como se detalla a continuación, para las semanas 1, 2, 4, 6 y 8 post-secado. El test de almacenamiento acelerado implica la conservación de la muestra en condiciones adversas (altas temperaturas y a_w) de forma tal de poner de manifiesto, en un lapso de tiempo corto, la influencia de un almacenamiento más prolongado sobre los parámetros funcionales de interés en la cepa en estudio.

3.4.1. Determinación de la viabilidad celular.

Se determinó el nivel de células viables de las suspensiones celulares (con y sin agregado de lactosa) antes de los procesos de deshidratación, inmediatamente luego de los mismos, y a lo largo del almacenamiento en diferentes condiciones. Para el análisis de las muestras deshidratadas y almacenadas, se rehidrataron los cultivos a la masa fluida original de la muestra, con agua bidestilada estéril a 37°C, y se homogeneizó periódicamente durante 15 min. Estas condiciones de rehidratación se seleccionaron en un ensayo preliminar en el cual los cultivos obtenidos por las diferentes tecnologías de deshidratación se rehidrataron con agua bidestilada estéril a 37°C, se homogeneizaron y se midió D.O. a 600 nm a los 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos, seleccionándose el tiempo de rehidratación como el menor tiempo para el que se observó una lectura de D.O. constante para todos los cultivos (resultados no mostrados). En todos los casos, se prepararon diluciones de las muestras en solución Ringer (Merck), se plaqueó en agar MRS modificado (ver composición en el Anexo) y se incubó a 37°C durante 48h en anaerobiosis. Este medio MRS modificado es utilizado de rutina en el Instituto alemán para el crecimiento de bifidobacterias en medio agarizado, y fue descrito por Bauer y col. (2012), donde se modificó la composición de azúcares del MRS tradicional: en lugar de 20 g/L de glucosa monohidrato el medio modificado contiene 7 g/L de glucosa monohidrato y 7 g/L de maltosa monohidrato.

A fines de comparar los resultados de viabilidad celular con los porcentajes de integridad de membrana determinados por citometría de flujo, la tasa de sobrevida luego de los secados (TS_{SEC}) se determinó como:

$$TS_{SEC} (\%) = N / N_0 ,$$

donde N es el número de células viables de las muestras secadas y rehidratadas (expresado como UFC/g) y N_0 es el número de células viables (UFC/g) antes del secado. La tasa de supervivencia luego del almacenamiento (TS_{ALM}) se determinó como:

$$TS_{ALM}(\%) = N_{ALM} / N_{SEC} ,$$

donde N_{ALM} y N_{SEC} son el número de células viables (UFC/g) luego del almacenamiento y luego del secado (antes del almacenamiento), respectivamente.

3.4.2. Determinación de humedad y actividad acuosa.

Se determinó el contenido de agua residual (%) inmediatamente luego de los secados y durante el almacenamiento, por el método de Karl Fischer, (Fischer, 1935) con un equipo de titulación automático (Schott, Mainz, Alemania). Los resultados (humedad) se expresaron como porcentaje de agua relativo a la masa de la muestra. La actividad acuosa (a_w) de los cultivos deshidratados y durante el almacenamiento se determinó a temperatura ambiente en un instrumento Aqua Lab CX-2 (AquaLab, Pullman, WA, USA).

3.4.3. Determinación de integridad de membrana (%).

Se determinó por citometría de flujo utilizando dos fluorocromos: ioduro de propidio (PI; rojo) y naranja de tiazol (TO; verde). Mientras que PI sólo ingresa a las células con membrana comprometida (dañadas o no viables) y se une al ADN, TO ingresa a todas las células por difusión pasiva y se une al ADN y ARN, por lo que cuando se usan combinados, estos fluorocromos permiten distinguir entre poblaciones de células viables, dañadas y no viables. Para la tinción, las suspensiones celulares se ajustaron a una concentración aproximada de 10^6 UFC/mL en PBS, y se incubaron con PI ($5\mu\text{M}$) y TO (420 nM), durante 5 min en oscuridad. Se utilizó un citómetro de flujo Serie C6 (Accuri, New Jersey, USA.), para cada muestra se analizaron 50000 eventos y los datos se procesaron con el software CFlowPlus (Accuri) a través de gráficos de densidad. La integridad de membrana (IM%) se expresó como la relación entre el número de células viables y células totales, obtenido de los gráficos de densidad.

3.5. Secado spray de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en leche descremada a escala laboratorio e industrial.

Para el secado spray de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 a escala laboratorio e industrial se utilizó como matriz leche descremada 20% (p/v). Para la producción del polvo a escala laboratorio se cosecharon (en fase estacionaria tardía) cultivos overnight de la cepa en caldo MRS-C mediante centrifugación (5000 rpm, 15 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se resuspendieron en solución de leche descremada granulada San Regim (SanCor C.U.L., Sunchales, Santa Fe) al 20% (p/v). Las suspensiones celulares se deshidrataron (cuatro réplicas independientes) en un mini secadero spray Büchi modelo B-290 (Flawil, Suiza) facilitado por el INTA-EEA Rafaela (Santa Fe). Se trabajó a una temperatura de entrada de 160°C, temperatura de salida de 83°C, flujo de aire de 50 mm (correspondiente a 601 L/h) y un caudal de alimentación de 0,0075 L/min. La humedad residual de los polvos obtenidos se determinó por gravimetría en estufa hasta peso contante a 101°C.

Para el secado spray a nivel industrial se realizaron dos ensayos independientes en la planta industrial de la empresa GALAXIE Secado Spray S.A (Sarandí, Buenos Aires, Argentina) en los cuales se utilizó un secadero spray Galaxie Modelo 1612 (Fig. 16) y una suspensión de la cepa en 10 o 20 L de leche descremada al 20% (p/v) (cedida por Lácteos Verónica, Lehmann, Santa Fe). Debido a la imposibilidad de producir biomasa a escala industrial para estos ensayos, se utilizaron 3 litros de cultivo overnight de la cepa en MRS-C (37°C, 18 h, anaerobiosis), se centrifugaron (5000 rpm, 15 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se resuspendieron en 10 L de leche descremada 20% (p/v) para el primer ensayo, y en 20 L de la misma matriz para el segundo ensayo. En el primer ensayo se utilizaron tres pares de combinaciones temperatura de entrada (TE, °C)/temperatura de salida (TS, °C): 166°C/62°C; 171°C/78°C y 178°C/75°C, mientras que en el segundo ensayo la TE se mantuvo constante en 180°C y se evaluaron tres TS: 80°C, 85°C y 90°C. Se determinó el contenido de humedad (H%) de los polvos por gravimetría (101°C, aprox. 20 h) y la viabilidad pre y post-secado en agar MRS-C (37°C, 72 h, anaerobiosis) antes y luego del secado spray.



Figura 16: Secadero spray industrial Galaxie modelo 1612 (altura: 4,8 m).

3.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los datos se analizaron utilizando un test t unilateral para comparar las diferencias en el número de células viables. El nivel de significancia estadística se estableció en 0,05.

4. Resultados y discusión.

4.1. Selección de parámetros de secado.

4.1.1. Liofilización.

Se estudiaron dos condiciones de liofilización: a) etapa primaria: 0,12 mbar, -20°C; etapa secundaria: +25°C; duración total 21 h, y b) etapa primaria: 0,37 mbar, -15°C; etapa secundaria: +25°C; duración total 24 h.

En ambos casos se observaron pérdidas significativas de viabilidad celular post-liofilización ($p=0,0125$ y $p=0,0373$ para las condiciones a) y b), respectivamente) de 0,26 y 0,34 órdenes log. Para las dos condiciones estudiadas se obtuvieron valores similares y adecuados de humedad (%) y actividad acuosa: $5,63\pm 0,48\%$ y $a_w=0,23\pm 0,03$ para la condición (a) vs. $5,87\pm 1,01\%$ y $a_w=0,23\pm 0,06$ para la condición (b). Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones estudiadas, ni en la viabilidad celular de los liofilizados ni en la integridad de membrana (Fig. 17).

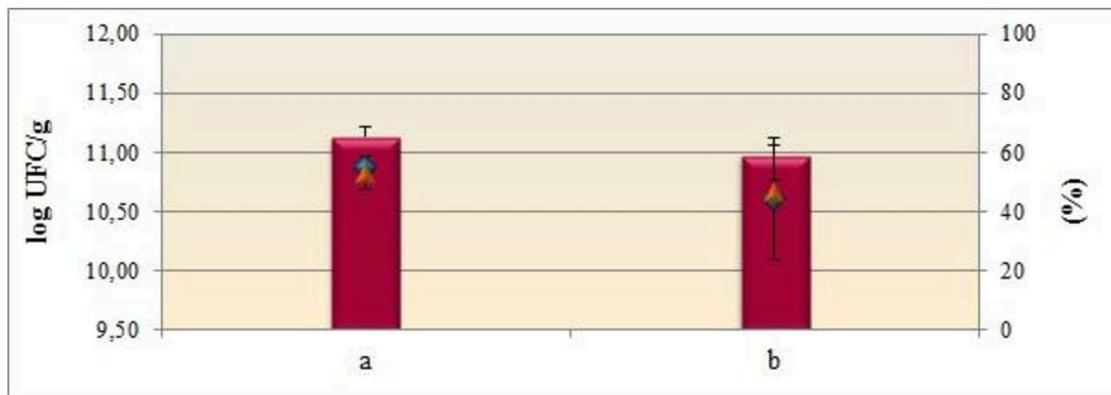


Figura 17: Número de células viables (■), tasa de supervivencia (%) (▲) e integridad de membrana (%) (◆) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sometida a dos condiciones de liofilización distintas: (a) = -20°C/0,12 mbar/+25°C; duración total 21 h ; (b) = -15°C/0,37 mbar/+25°C; duración total 24 h). Recuentos previos a la liofilización: $11,4\pm 0,1$ y $11,3\pm 0,1$ log UFC/g para las condiciones a) y b) respectivamente.

Además, si bien no siempre el uso de fluorocromos para el monitoreo de viabilidad de cultivos microbianos es efectiva (Bunthof y col., 2001), en este caso se observó una buena correlación entre las tasas de sobrevivencia (triángulos naranja) obtenidas en base a los recuentos en medio agarizado, y los niveles de integridad de membrana (rombos azules), obtenidos por citometría de flujo. Numerosos estudios (Rault y col., 2007, Martin-Dejardin y col., 2013) también evaluaron la utilidad de la citometría de flujo para el seguimiento de cultivos liofilizados y observaron buena una correlación entre los valores obtenidos por este método y los recuentos en medio agarizado. Esto validaría la utilización de técnicas rápidas como la citometría de flujo, para el seguimiento de rutina de la viabilidad de los cultivos liofilizados.

Ante la obtención de resultados positivos y similares, se seleccionó para el test de almacenamiento la condición (b) ya que si bien la duración del proceso fue mayor (24 h vs. 21 h), estas condiciones habían sido utilizadas exitosamente en *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (capítulo IIa).

Un estudio complementario que se realizó previo al ensayo de almacenamiento fue comparar la tasa de sobrevivencia de los cultivos liofilizados cuando fueron sometidos al proceso directamente en su formato de gránulos congelados provistos por la empresa italiana y cuando estos fueron previamente descongelados a temperatura ambiente y reformados en nitrógeno líquido. Esto se realizó para analizar la posible influencia del estrés por descongelación/congelación previo a comparar la liofilización en presencia y ausencia de un agente protector, ya que para la utilización de protectores, los gránulos debieron indefectiblemente ser descongelados. Se liofilizaron en un mismo batch a las condiciones de la liofilización (b) gránulos sin descongelar (GSD) y gránulos descongelados y reformados en N₂ líquido (GD) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y se observaron niveles similares de viabilidad: 10,98 vs. 10,94 log UFC/g para GSD y GD respectivamente. La integridad de membrana también fue similar en ambos casos (30% y 33% para GSD y GD respectivamente), si bien en este caso la correlatividad entre este parámetro y la tasa de sobrevivencia fue menor (TS de 49 y 51% respectivamente). En la Figura 18 se muestran los gráficos de densidad obtenidos por citometría de flujo para los GSD y GD y luego liofilizados.

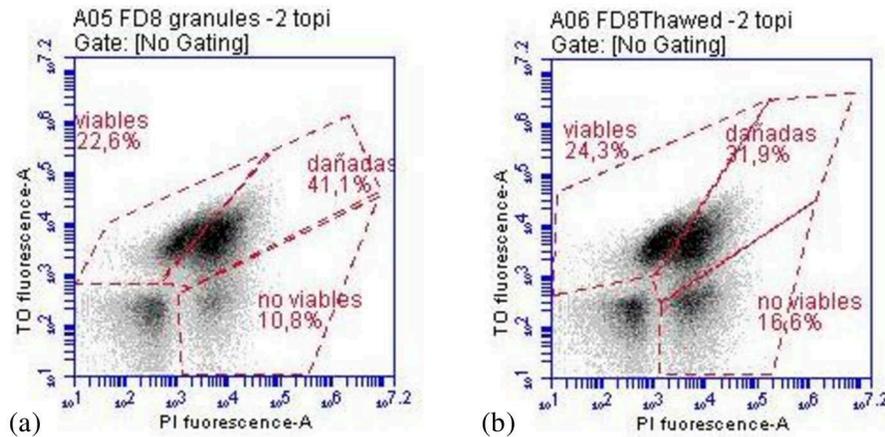


Figura 18: Gráficos de densidad obtenidos por citometría de flujo con los fluoróforos TO y PI para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sometida a liofilización como (a) gránulos sin descongelar (GSD) o (b) gránulos descongelados (GD) y reformados en N₂ líquido.

Se concluyó que a los fines de comparar los resultados con y sin agente protector, para la técnica de deshidratación por liofilización (y también la liofilización con microondas), podían utilizarse los gránulos sin descongelar en el caso de no usarse agente protector, ya que no se observó influencia del proceso de descongelamiento/recongelamiento en los parámetros estudiados.

4.1.2. Secado spray

El principal parámetro que afecta la viabilidad de los cultivos secados spray es la temperatura de salida del aire, que es la temperatura a la cual el producto deja la cámara de secado (Gardiner y col., 2000). Esta temperatura de salida depende a su vez de la temperatura de entrada, la velocidad de flujo de aire, la velocidad de alimentación y el tamaño de las gotas atomizadas. Cuando se utilizó el secado spray a una temperatura de entrada de 160°C y se evaluaron temperaturas de salida de 60°C, 70°C y 80°C en la suspensión de células sin agente protector, en todos los casos se obtuvieron altas pérdidas de viabilidad (y bajos valores de integridad de membrana), pero además se observaron valores de humedad no satisfactorios de 8,91±0,18%, 7,72±0,19% y 7,66±0,85%, respectivamente. Según Gardiner y col. (2000) son

necesarios valores de humedad de aproximadamente 4% para obtener polvos estables. Se decidió entonces evaluar, a los fines de seleccionar las condiciones para el test de almacenamiento, y basado en resultados previos para la cepa en estudio (Zacarías, 2010), el efecto de leche descremada y lactosa como protectores, y comparar los 3 parámetros en estudio (H%, TS% e IM%) respecto al cultivo sin protector.

La Figura 19 muestra los resultados obtenidos para una temperatura de salida de 80°C, cuando los agentes protectores, leche descremada y lactosa monohidrato, se adicionaron de modo que el porcentaje de sólidos totales en las suspensiones aumentó de 14% (sin protector) a aproximadamente 20%. En todos los casos se observaron pérdidas significativas de viabilidad post-secado, de 1,69, 0,92 y 0,64 órdenes log ($p=0,0008$, $p=0,0028$ y $p=0,0106$) para el cultivo sin protector, con leche descremada y lactosa, respectivamente. Para ambos protectores se obtuvieron polvos con humedad de entre 4% y 5% (acordes a los requerimientos para secado spray), actividades acuosas de 0,18 y 0,16 (vs. 0,24 para el polvo obtenido sin protector), y la TS pasó de aprox. 2,1% sin protector, a 13,9% y 25,6% para leche descremada y lactosa, respectivamente.

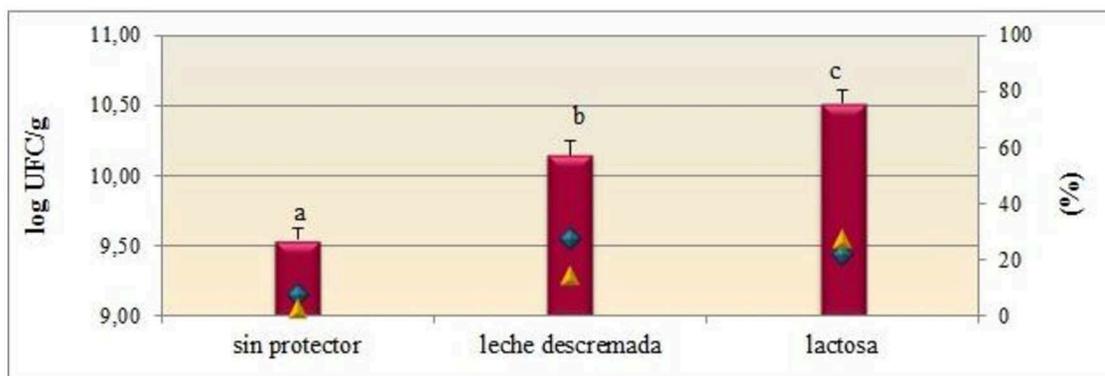


Figura 19: Número de células viables (■), tasa de sobrevivencia (%) (▲) e integridad de membrana (%) (◆) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sometida a secado spray con una temperatura de entrada de 160°C y una temperatura de salida de 80°C. ^{a,b,c} Los valores de viabilidad celular (log UFC/g) con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). Recuentos previos al secado spray: $11,2 \pm 0,1$, $11,1 \pm 0,1$ y $11,2 \pm 0,1$ log UFC/g para el cultivo sin protector, con leche descremada y lactosa, respectivamente.

Para temperaturas de salida menores (60°C y 70 °C), la H (%) de los polvos no fue satisfactoria (valores no mostrados), y por lo tanto, se seleccionó para el test de almacenamiento la temperatura de salida 80°C.

Determinar el mejor nivel de las variables asociadas al secado spray por adelantado es un proceso de optimización complejo. Las dificultades en la estabilización de la temperatura de salida pueden causar grandes variaciones en la viabilidad de los cultivos deshidratados (Santivarangkna y col., 2007). Varios autores reportaron que a menor temperatura de salida mayor viabilidad, y además, se encontró, para *B. longum* y *B. infantis* que la magnitud en la reducción de la sobrevida causada por el aumento de la temperatura, dependió del agente protector utilizado. Por ejemplo se observó que la mayor reducción de viabilidad fue para almidón soluble mientras que las menores pérdidas se observaron para goma arábica y leche descremada (Lian y col., 2002). Sin embargo, debe considerarse que una temperatura de salida muy baja puede causar valores de humedad residual elevados, que excedan los niveles requeridos para una adecuada estabilidad de los polvos durante el almacenamiento (Gardiner y col., 2000). En este estudio, sólo la mayor temperatura de salida evaluada (80°C) permitió obtener polvos con humedad aceptable. A esta temperatura, la lactosa mostró ejercer un mayor efecto protector que la leche descremada, si bien con ambos protectores se observaron pérdidas significativas de viabilidad.

Respecto a los valores de sobrevida e integridad de membrana, en general se observó una buena correlación entre ambos parámetros, por lo que el uso de la citometría de flujo sería también útil para obtener rápidamente una idea del estado fisiológico de los cultivos deshidratados por secado spray. Esto condice con los resultados de Ananta y col. (2005), que evaluaron la utilidad de la citometría de flujo y el análisis de la integridad de membrana vs. viabilidad por recuentos en medio agarizado, para un cultivo secado spray de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

4.1.3. Secado al vacío

El secado al vacío podría ser una alternativa de deshidratación interesante, especialmente para aquellos cultivos sensibles a las altas temperaturas. Los resultados obtenidos para las condiciones evaluadas, 35°C/25mbar y 15°C/15mbar se muestran en la Figura 20.

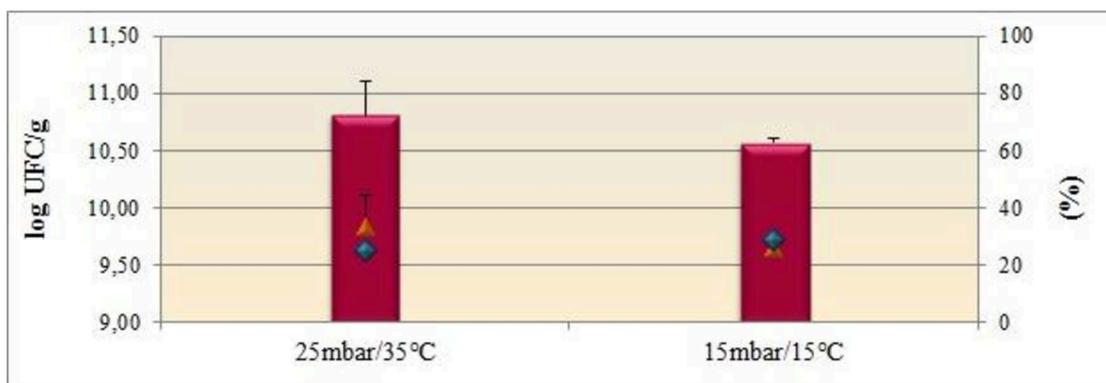


Figura 20: Número de células viables (■), tasa de supervivencia (%) (▲) e integridad de membrana (%) (◆) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secada al vacío durante 24 h, bajo dos condiciones: 35°C/25mbar y 15°C/15mbar. Recuentos previos al secado al vacío: 11,2±0,1 y 11,3±0,1 log UFC/g para 25mbar/35°C y 15mbar/15°C, respectivamente.

Comparando ambas condiciones, no se observaron diferencias significativas en los niveles de células viables post-secado ($p = 0,2946$). Para ambas condiciones se observaron pérdidas significativas de viabilidad celular post-secado, de 0,39 y 0,73 órdenes log para 25mbar/35°C y 15mbar/15°C, respectivamente, y éstas fueron significativamente menores para la primer condición ($p = 0,0061$ vs. $p = 0,0487$). Además, para la condición 25mbar/35°C se observó un contenido de humedad significativamente menor ($p = 0,007$) de 6,55±0,72%, casi la mitad de lo observado para 15°C/15mbar (12,06±1,50%), y la TS fue ligeramente mayor si bien no significativa, por lo que esta condición fue seleccionada para el ensayo de almacenamiento. Bauer y col. (2012) optimizaron las condiciones de secado al vacío para la cepa comercial *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 mediante un estudio de superficie de respuestas y también determinaron que las condiciones óptimas para esta cepa eran

25mbar/35°C, lo que de cierta forma apoya los resultados determinados para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, cepa perteneciente a la misma especie. Al igual que para la liofilización y el secado spray, la integridad de membrana (%) demostró ser una buena herramienta para estimar rápidamente la viabilidad de los cultivos deshidratados obtenidos por secado al vacío.

4.1.4. Secado al vacío asistido por microondas.

Se evaluó la combinación de secado al vacío con la aplicación de microondas y la influencia de la potencia de microondas aplicada, a 7 mbar y temperatura máxima de producto de 40°C. Cuando se utilizaron las suspensiones celulares sin agente protector, se observó que para la mínima potencia evaluada (1 W/g) no se observaron pérdidas significativas de viabilidad post-secado (0,25 órdenes log, $p = 0,0831$) y se obtuvo la mayor TS (61,5%), mientras que para 2W/g y 3W/g las pérdidas de viabilidad fueron significativas, de 0,65 y 0,89 órdenes log respectivamente ($p = 0,0335$ y $p = 0,0034$) y las TS fueron 23,8% y 12,7% (Fig. 21).

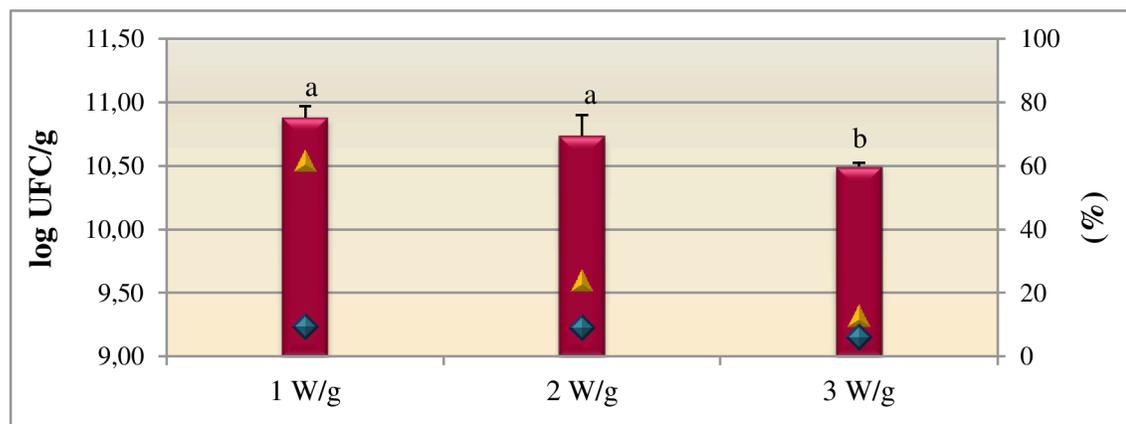


Figura 21: Número de células viables (■), tasa de supervivencia (%) (▲) e integridad de membrana (%) (◆) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secada al vacío con microondas, para potencias de 1, 2 y 3 W/g. ^{a,b} Los valores de viabilidad celular (log UFC/g) con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Recuentos previos al secado: $11,1 \pm 0,1$, $11,4 \pm 0,1$ y $11,4 \pm 0,1$ log UFC/g para 1 W/g, 2 W/g y 3W/g, respectivamente.

Sin embargo, el aumento en la sobrevida del cultivo deshidratado a 1 W/g fue acompañado de un costo energético considerablemente mayor: 0,58 kW vs. 0,25 kW y 0,26 kW, para 1, 2 y 3 W/g respectivamente, mientras que los niveles de humedad fueron elevados y similares para las 3 condiciones y se encontraron entre 9,7% y 10,8%, y los niveles de células viables post secado a 1 W/g y 2 W/g no fueron significativamente diferentes entre sí. Basado en estos hechos, se seleccionó la potencia de 2 W/g para el test de almacenamiento.

Respecto a los valores de integridad de membrana, resultó llamativa la divergencia observada respecto a los valores de sobrevida, especialmente para la potencia 1 W/g (TS 61,5% vs. IM 9,5%). Un análisis pormenorizado de los diagramas de densidad obtenidos de la citometría de flujo para estas muestras determinó que el número de células “dañadas” fue grande (Fig. 22(a)). Debido a que el secado por microondas es rápido y a que a diferencia de los secado convencionales, el calor se genera dentro del producto, haciendo que la mayor parte de la humedad se vaporice antes de dejar la muestra, una hipótesis que se planteó es que la alta tasa de evaporación podría hacer que la presión dentro de las células sea mayor a la resistencia de la membrana y que esto haga que se generen lesiones en la membrana celular, afectando su integridad temporalmente. Estas células dañadas, sin embargo, podrían tener la capacidad de recuperarse una vez que se depositen en el medio de cultivo para el recuento de células viables.

Para evaluar esta hipótesis se definió un nuevo parámetro, Integridad de Membrana Máxima (IMM), que incluyó también a las células dañadas y de esta manera representó al porcentaje máximo de células (viables o con capacidad de recuperarse) que pueden detectarse por recuentos en medios agarizados:

$$\text{IMM (\%)} = (\text{células vivas} + \text{dañadas}) / \text{células totales}$$

Cuando se calculó este parámetro para los diagramas de densidad de los cultivos secados al vacío con microondas, se observó una correlación entre la TS y la IMM (Fig. 22(b)), lo que al menos sostendría la hipótesis de una “permeabilización” transiente y reversible de la membrana.

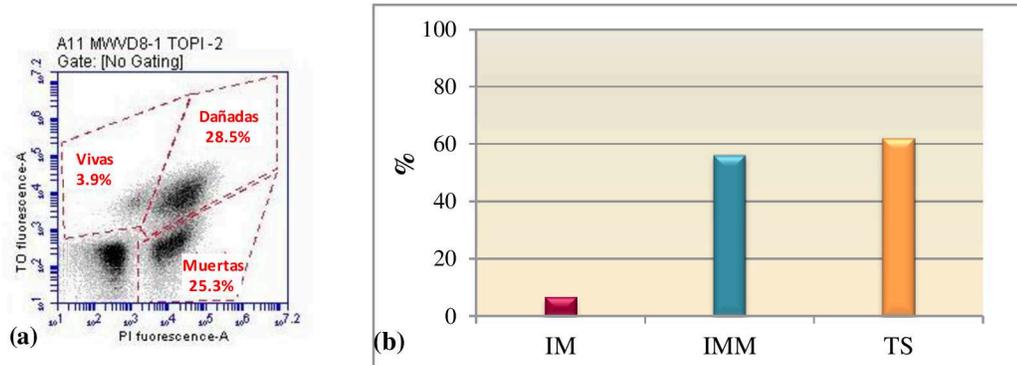


Figura 22: Diagrama de densidad de los resultados obtenidos por citometría de flujo con los fluorocromos TO y PI (a), y valores de integridad de membrana (%), integridad de membrana máxima (%) y sobrevida (%) (b), para un cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secado al vacío con microondas a la potencia de 1 W/g.

La comparación entre niveles de viabilidad obtenidos de recuentos en placas agarizadas y por citometría de flujo ha sido analizada por otros autores. Ben Amor y col. (2002) hallaron que la utilización de dos fluorocromos combinados es muy útil no sólo para discernir entre células vivas y muertas, sino también células que sufrieron daño subletal y tienen la capacidad de recuperarse. En este contexto, la citometría de flujo cobra relevancia particularmente para detectar cambios fisiológicos durante el monitoreo de cultivos probióticos durante su procesamiento y almacenamiento. Debido a que no existe actualmente registro sobre la aplicación de las tecnologías de deshidratación asistidas por microondas a cultivos microbianos, los efectos sobre el efecto de estas tecnologías sobre la membrana celular resultan desconocidos. En la actualidad la hipótesis sobre esta permeabilización transiente de la membrana durante el secado al vacío asistido con microondas está siendo investigada y forma parte de la tesis de grado de un alumno de la Universidad Técnica de Múnich.

4.1.5. Liofilización asistida con microondas

Se evaluó la combinación de la liofilización con la aplicación de microondas y se analizó la influencia de la potencia aplicada (W/g), a 0,7 mbar y temperatura máxima de producto de 30°C. No se observaron pérdidas significativas de viabilidad post-secado para ninguna de las potencias evaluadas (< 0,2 órdenes log para todos los casos). Los valores de tasa de sobrevida e integridad de membrana fueron elevados para todas las potencias evaluadas (Fig. 23) y los valores de humedad satisfactorios, entre 3,8% para 2,5 W/g y 5,6% para 1 W/g. La correlación entre TS y MI fue variable según la potencia aplicada. Si bien no se observaron diferencias tan marcadas como para el secado al vacío asistido por microondas, podría evaluarse también para esta tecnología la idea de una permeabilización transiente de la membrana.

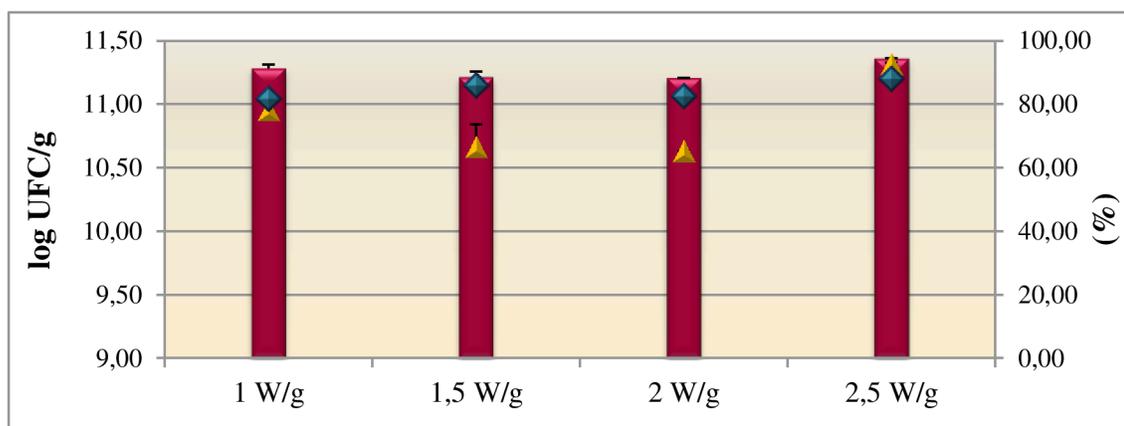


Figura 23: Energía total absorbida (kW) (■) y tiempo total de secado (h) (▲) de *B. animalis subsp. lactis* INL1 deshidratada por liofilización asistida con microondas, para potencias de 1, 1,5, 2 y 2,5 W/g.

No se observaron diferencias significativas en el número de células viables (log UFC/g) ni en la integridad de membrana (%), entre las condiciones ensayadas. Se seleccionó la potencia 1,5 W/g para el test de almacenamiento, ya que el costo energético para esta condición fue el más bajo (1,46 kW vs. 1,72 kW, 1,97 kW y 2,03 kW para potencias de 2, 2,5 y 1 W/g respectivamente) (Fig. 24). Los resultados obtenidos por esta técnica de deshidratación resultaron alentadores. Se obtuvieron TS similares o superiores a las obtenidas por la liofilización convencional, y en un tiempo

mucho menor. Por ej., para 1,5 W/g, el tiempo promedio de secado fue de 3,32 h (Fig. 24) mientras que para la liofilización se utilizaron entre 21 y 24 h.

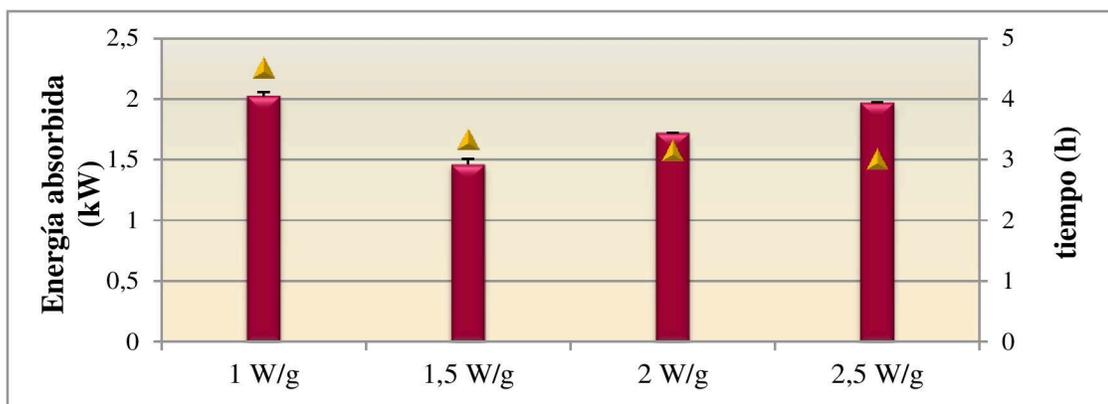


Figura 24: Energía total absorbida (kW) (■) y tiempo total de secado (h) (▲) de *B. animalis subsp. lactis* INL1 deshidratada por liofilización asistida con microondas, para potencias de 1, 1,5, 2 y 2,5 W/g.

4.2. Test de almacenamiento acelerado.

Las condiciones seleccionadas para cada técnica de deshidratación, surgidas de los ensayos preliminares, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones seleccionadas para la deshidratación de *B. animalis subsp. lactis* INL1.

Tecnología	Condiciones seleccionadas
Secado al Vacío (V)	Presión de la cámara: 25mbar; Temperatura de estante: 35°C; Tiempo total de secado: 24 h
Secado al Vacío con Microondas (VMO)	Potencia: 2W/g; Temperatura máx. de producto: 40°C; Presión de la cámara: 7 mbar
Liofilización (L)	Secado principal: -15°C, 0,37mbar; Secado secundario: +25°C, 0,37mbar; Tiempo total de secado: 24 h
Liofilización con Microondas (LMO)	Potencia: 1,5 W/g; Temperatura máx. de producto: 30°C; Presión de la cámara: 0,7 mbar
Secado spray (S)	Temperatura de entrada: 160°C; Temperatura de salida: 80°C; Flujo de aire: 50 mm; Caudal de alimentación: 0,005 L/min

Se realizó un test de almacenamiento acelerado para comparar la estabilidad de los cultivos deshidratados por las diferentes tecnologías, tanto en presencia como en ausencia de lactosa (protector seleccionado). La Figura 25 muestra los valores obtenidos a tiempo cero (luego de la deshidratación, previo al almacenamiento) para todos los parámetros analizados (TS, IM y H). Los valores de células viables luego de aplicadas las tecnologías de deshidratación se muestran en la Tabla 8, en la columna correspondiente a tiempo cero.

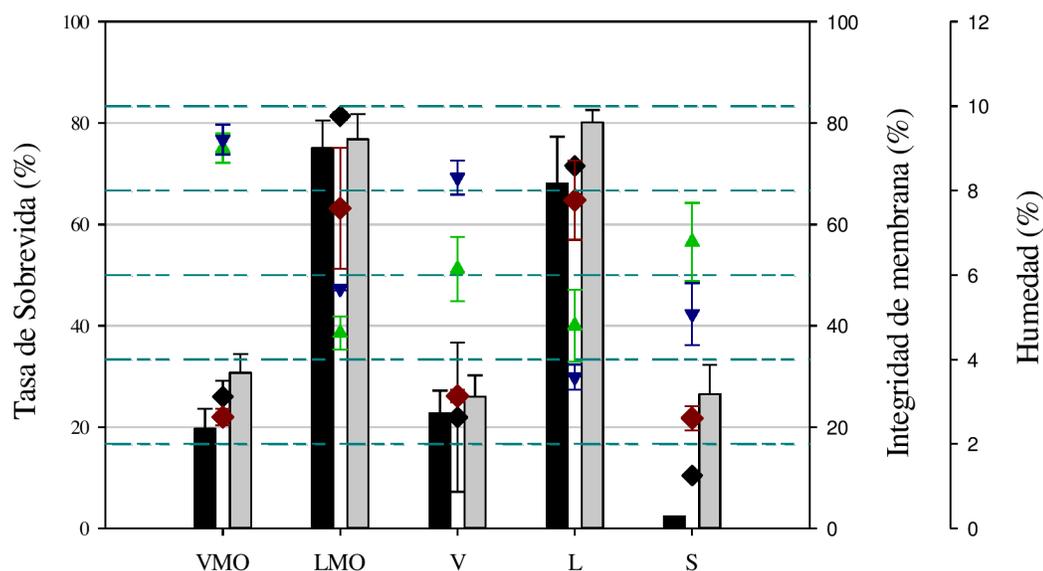


Figura 25: Tasa de sobrevivencia (TS), integridad de membrana (IM) y humedad (H) de un cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sometido a diferentes tecnologías de deshidratación: secado al vacío con microondas (VMO), liofilización con microondas (LMO), secado al vacío (V), liofilización (L) y secado spray (S). Sobrevivencia en cultivo sin protector (■) y con lactosa (■), integridad de membrana sin protector (◆) y con lactosa (◆), y humedad sin protector (▲) y con lactosa (▲).

En general, para los cultivos sin agente protector, los valores obtenidos de TS, IM y H coinciden con los que se observaron en el ensayo preliminar exploratorio. Cuando se compararon las diferentes tecnologías de deshidratación aplicadas a *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (y en las condiciones seleccionadas), se pudo observar que la cepa

mostró gran tolerancia a la liofilización y liofilización asistida por microondas (con y sin la adición de lactosa como protector), seguido por los secados al vacío y al vacío con microondas. Cuando se aplicaron estas tecnologías, la viabilidad no resultó alterada significativamente por el agregado de lactosa como agente protector. Se determinó el contenido de lactosa y ácido láctico por HPLC en el cultivo concentrado de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sin protector y se observó que contenía 0,98 g/L y 15,4 g/L respectivamente (remanentes de la producción de biomasa) por lo que tal vez esto podría estar de cierta forma enmascarando el efecto protector de la lactosa agregada previo a la deshidratación. El secado spray fue la tecnología de deshidratación más perjudicial para la viabilidad celular en ausencia del agente protector, pero los niveles de células viables aumentaron significativamente en presencia de lactosa ($p=0,0045$) y esto se vio reflejado en la tasa de sobrevivencia y la integridad de membrana (Fig. 25). En todos los casos los valores de humedad (%) y actividad acuosa se encontraron en el rango de valores adecuados para cada tecnología de deshidratación.

Todos los cultivos llegaron a la humedad relativa (a_w) a la cual fueron almacenados dentro de la primera semana. Los cultivos sometidos a L y LMO fueron los que mostraron mayor sensibilidad en las primeras semanas de almacenamiento a 25°C y $a_w=0.23$, en ausencia de lactosa, siendo el cultivo secado al vacío (V) el que mostró mayor sobrevivencia a lo largo del almacenamiento (Fig. 26a). Sin embargo, al finalizar el período de 8 semanas, todos los cultivos sin protector y almacenados bajo esta condición sufrieron pérdidas similares de viabilidad, de aprox. 1,5-2 órdenes log (Tabla 8). El efecto del agregado de lactosa se manifestó durante el almacenamiento de los cultivos L o LMO, y las sobrevivencias de los mismos se incrementaron aproximadamente 10 veces para ambas técnicas de deshidratación, al finalizar el mismo (Fig. 26b).

Tabla 8: Niveles de células viables de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 deshidratada, a tiempo cero y al cabo de 8 semanas de almacenamiento a 25°C, y a $a_w=0,23$ y $a_w=0,43$, en ausencia y presencia de agente protector (lactosa, L).

Técnica	Actividad acuosa	Protector	t_0 (log UFC/g)	t_{8s} (log UFC/g)
Secado al vacío	$a_w=0,23$	-	10,54±0,12 ^a	9,60±0,06 ^b
		L	10,46±0,06 ^a	9,18±0,24 ^b
	$a_w=0,43$	-	10,54±0,12 ^a	2,15±0,21 ^d
		L	10,46±0,06 ^a	3,56±0,54 ^c
Secado al vacío con microondas	$a_w=0,23$	-	10,45±0,09 ^a	9,00±0,11 ^c
		L	10,57±0,05 ^a	9,32±0,36 ^b
	$a_w=0,43$	-	10,45±0,09 ^a	2,56±0,80 ^c
		L	10,57±0,05 ^a	2,94±0,48 ^c
Liofilización	$a_w=0,23$	-	11,07±0,09 ^a	8,97±0,63 ^b
		L	11,08±0,05 ^a	10,04±0,13 ^b
	$a_w=0,43$	-	11,07±0,09	< 2,6
		L	11,08±0,05 ^a	2,65±0,66 ^c
Liofilización con microondas	$a_w=0,23$	-	11,07±0,07 ^a	8,26±0,32 ^b
		L	11,08±0,08 ^a	9,37±0,22 ^b
	$a_w=0,43$	-	11,07±0,07	< 2
		L	11,08±0,08 ^a	3,14±0,62 ^c
Secado spray	$a_w=0,23$	-	9,54±0,01 ^a	8,34±0,06 ^b
		L	10,51±0,10 ^a	8,73±0,15 ^b
	$a_w=0,43$	-	9,54±0,01 ^a	3,08±1,06 ^b
		L	10,51±0,10 ^a	2,98±1,14 ^b

* todos son valores promedio ± SD, de dos secados independientes. ^{a,b,c,d} Los valores en la misma línea con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,005$).

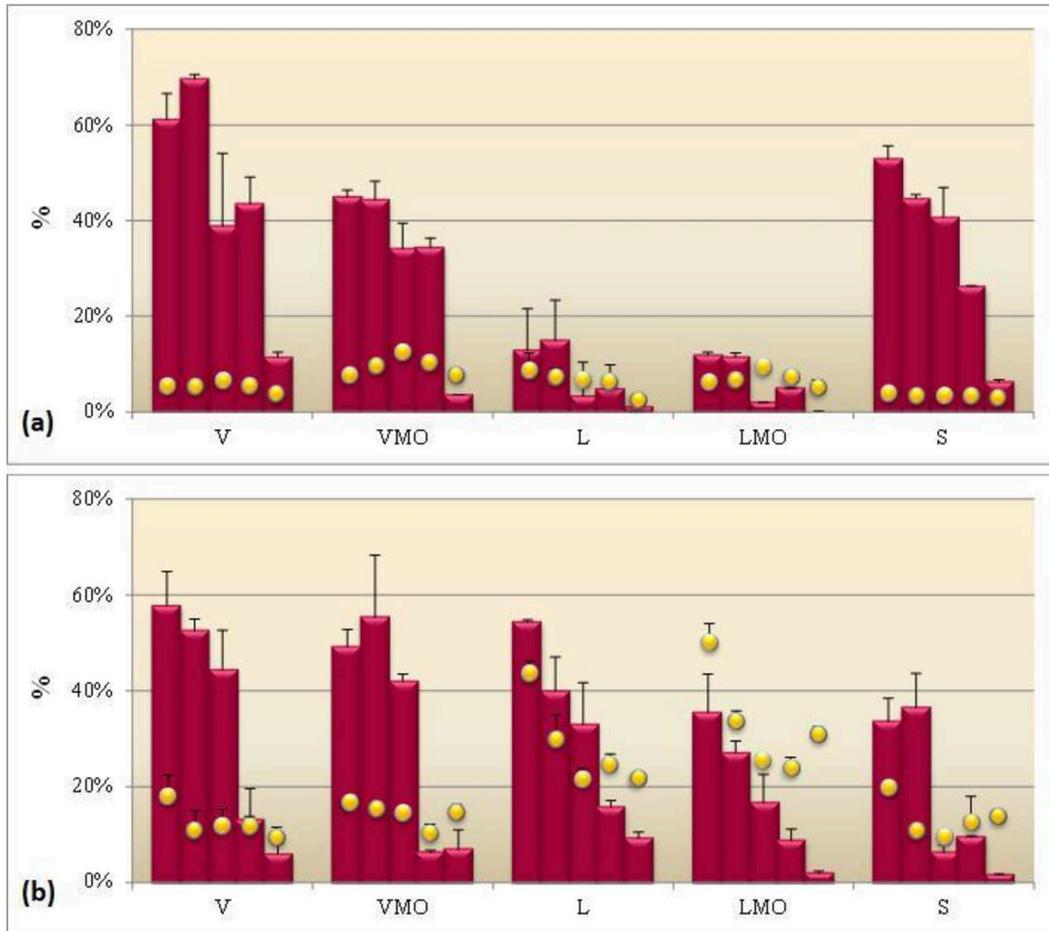


Figura 26: Tasa de sobrevivencia (%) (■) e integridad de membrana (%) (●) a las semanas 1, 2, 4, 6 y 8 (columnas consecutivas) de almacenamiento a 25°C y $a_w = 0,23$, para los cultivos deshidratados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sin protector (a) o con lactosa (b), obtenidos por secado al vacío (V), secado al vacío con microondas (VMO), liofilización (L), liofilización con microondas (LMO) y secado spray (S).

El uso de la citometría de flujo no resultó efectivo (como alternativa a la viabilidad) para el seguimiento de la estabilidad de los cultivos almacenados (Fig. 26). Esto podría deberse a la alta influencia que tienen la temperatura y humedad, en la estabilidad de las membranas biológicas cuando estas se encuentran “atrapadas” en una matriz vítrea (Ananta y col., 2005). Sin embargo, la citometría de flujo sí permitió,

cuando se compararon los valores de IM en ausencia y presencia de lactosa, observar el efecto estabilizador de la lactosa sobre la membrana celular.

Cuando los cultivos deshidratados se almacenaron a $a_w=0,43$ (condición de almacenamiento adversa), luego de una semana de almacenamiento todos los cultivos mostraron una humedad de aprox. 12,5% y el pardeamiento de los mismos fue evidente a simple vista. Las tasas de sobrevida fueron menores al 2% luego de 1 semana para los cultivos sin protector, y luego de 2 semanas para los cultivos con lactosa, para todas las técnicas de deshidratación excepto el V (TS= 9% luego de 2 semanas, con lactosa). Los niveles finales (log UFC/g) de células viables para todas las condiciones de almacenamiento se muestran en la Tabla 8.

La selección de lactosa como agente protector para todas las técnicas de deshidratación se basó en que fue utilizada previamente para la liofilización de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 con resultados positivos tanto durante el proceso de secado como durante el almacenamiento y la simulación a digestión gástrica (Capítulo IIa; Vinderola y col. 2012). Si bien en este trabajo se evidenció su efectividad como agente protector durante el proceso de deshidratación y/o el test de almacenamiento, particularmente para el secado spray, la liofilización y la liofilización asistida por microondas, para los secados al vacío y al vacío asistido por microondas no se observaron mayores diferencias entre los cultivos con y sin lactosa, por lo que se analizó la utilidad de otros agentes protectores.

Para el secado al vacío se seleccionó como agente protector alternativo la maltodextrina, un polímero de glucosa. Este polisacárido ha sido utilizado para la liofilización y el secado spray de cultivos bacterianos (Kurtman y col., 2009, Yonekura y col., 2014). Su selección para el secado al vacío se basó en resultados previamente obtenidos en el laboratorio del Dr. Kulozik en los que se obtuvieron buenas viabilidades para esta tecnología/agente protector cuando se aplicó a una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (resultados aún no publicados). Para las condiciones seleccionadas y utilizadas en el test de almacenamiento acelerado (25 mbar/35°C), se observó un aumento significativo en la tasa de sobrevida y la integridad de membrana en comparación al cultivo sin protector. Mientras que los valores de TS e IM obtenidos

para el proceso de deshidratación al vacío, para el cultivo sin y con lactosa, fueron de aproximadamente 20%-30%, los valores para maltodextrina fueron de 59% y 51% para TS e IM respectivamente. Estos resultados confirman que la maltodextrina, aún siendo un polímero de gran peso molecular en comparación con la lactosa, puede ser un buen agente protector para este tipo de deshidratación.

Para el secado al vacío con microondas se evaluaron 3 agentes protectores diferentes: sorbitol, maltodextrina y caseinomacropéptido (CMP). Se prepararon los cultivos de la misma forma que para lactosa y se secaron en un mismo batch de secado a una potencia de 2 W/g y temperatura máxima de producto de 40°C (Fig. 27). A simple vista se observó que la formación de espuma, característica de este tipo de secado, resultó visiblemente incrementada en el cultivo adicionado de CMP, debido probablemente a su naturaleza proteica.

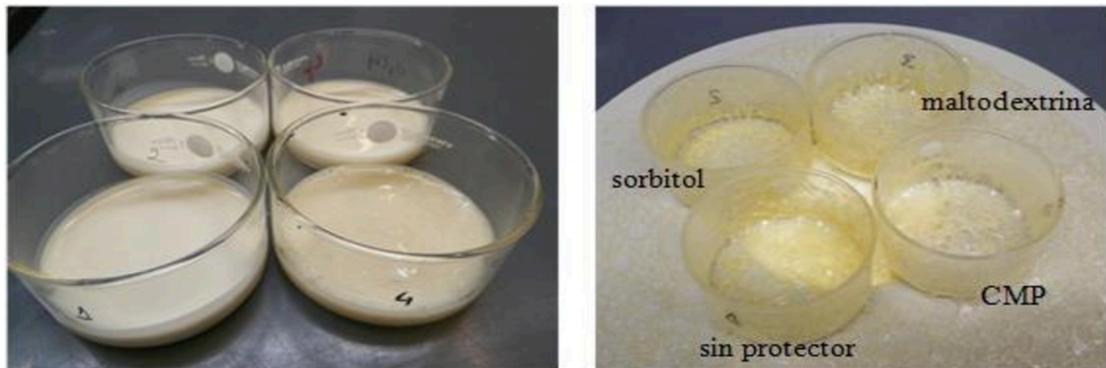


Figura 27: Cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sin protector y con sorbitol, maltodextrina y CMP, previo (izquierda) y posterior (derecha) al secado al vacío con microondas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28. Mientras que el sorbitol pareció no ejercer un efecto protector en el cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante el secado al vacío con microondas a las condiciones evaluadas, la maltodextrina y el CMP llevaron a un incremento en la sobrevivencia de las células. Los valores de TS pasaron de 24% en el cultivo sin protector a 42% y 64% para

maltodextrina y CMP respectivamente, superando así el valor obtenido para lactosa (31% de TS).

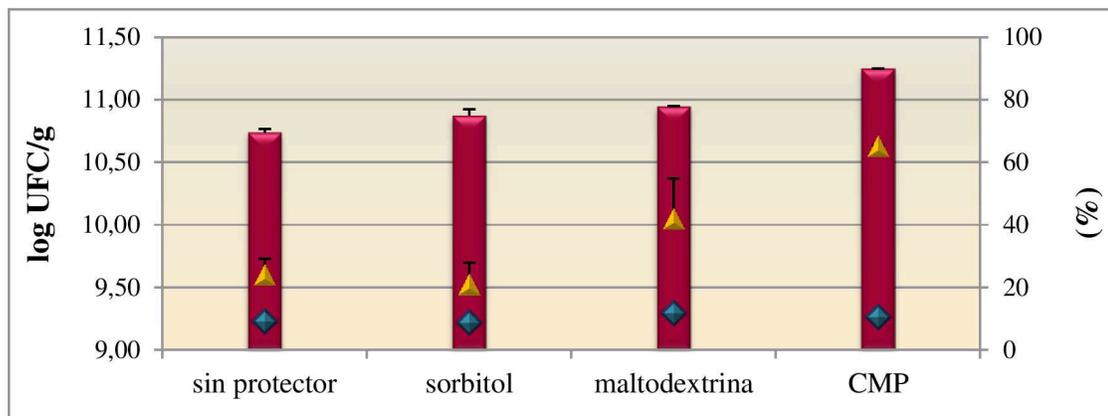


Figura 28: Número de células viables (■), tasa de supervivencia (%) (▲) e integridad de membrana (%) (◆) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 secada al vacío con microondas, para potencia de 2 W/g, sin protector o en presencia de sorbitol, maltodextrina y caseinomacropéptidos (CMP).

Respecto a los valores de IM, nuevamente se observó que la utilización de los fluoróforos TO y PI para el análisis por citometría de flujo no resultó útil como alternativa al recuento de células viables en medio agarizado, para esta tecnología de deshidratación. Evidentemente ocurrieron cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana durante el secado al vacío con microondas, que se pusieron de manifiesto cuando se utilizó la citometría de flujo para monitorear la viabilidad de los cultivos.

En este estudio se analizaron tecnologías de deshidratación “tradicionales” como la liofilización y el secado spray, una tecnología alternativa como el secado al vacío que ya ha sido evaluada para la obtención de cultivos starters y probióticos comerciales (Bauer y col., 2012) y dos tecnologías “innovadoras” sobre la que no existen reportes previos de su aplicación a cultivos bacterianos, como el secado al vacío y la liofilización asistidos por microondas. La ausencia de bibliografía respecto a estos últimos dificulta la discusión profunda de los resultados obtenidos, o extrapolar los resultados para seleccionar una tecnología de deshidratación óptima para cultivos de bifidobacterias, por lo que el objetivo de este trabajo tuvo como finalidad comparar las distintas tecnologías para la deshidratación de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1,

principalmente contraponiendo los resultados obtenidos para las tecnologías alternativas respecto a las tecnologías tradicionales. La liofilización es la tecnología más aplicada a nivel industrial para la remoción de agua de materiales sensibles al calor, entre ellos los cultivos bacterianos utilizados en la industria alimentaria, ya que permite obtener productos deshidratados de alta calidad comparado a otros métodos debido a las bajas temperaturas que utiliza y a la ausencia de oxígeno en el proceso. Además posee la ventaja de que la rehidratación de los liofilizados es fácil ya que debido a la sublimación, estos conservan la estructura y una cierta rigidez que previene que colapse la matriz sólida durante la deshidratación, por lo que se obtienen materiales porosos y fáciles de rehidratar (Duan y col., 2010). Sin embargo, el alto costo y la prolongada duración del proceso, sumado al creciente interés por el uso de tecnologías que minimicen el impacto medioambiental, hace que hoy en día el desarrollo de nuevas tecnologías de deshidratación esté en expansión. En la actualidad las tecnologías que hacen uso de microondas ya están siendo utilizadas, particularmente sobre productos de origen vegetal (Orsat y col., 2007, Malafronte y col., 2012, Pei y col., 2014). Aún más, en el período 2007-2013 se desarrolló un proyecto denominado “Novedoso secado al vacío asistido por microondas para alimentos sensibles al calor” financiado por un consorcio de la Unión Europea denominado Mild-Dry (www.milddry.eu), en el que no sólo se evaluó esta nueva tecnología debido a su menor costo y tiempos de secado sino que focalizaron en el diseño del equipamiento específico para la aplicación de esta tecnología a nivel industrial. Los resultados obtenidos para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 para las tecnologías de deshidratación asistidas por microondas (VMO y LMO) han sido comparables en viabilidad a la liofilización, y los tiempos han sido considerablemente menores. Aún cuando debido a la limitación de tiempo de la estadía en Alemania no se han podido evaluar un gran número de condiciones, la cepa ha demostrado ser robusta y sobrevivir en números satisfactorios a las tecnologías alternativas, bajo las condiciones estudiadas. Respecto al uso de agentes protectores, los azúcares son utilizados normalmente como lioprotectores ya que ayudan a aumentar la temperatura de transición vítrea y por lo tanto contribuyen a que las células viables alcancen el estado vítreo sin que se forme hielo intracelular (Tripathi y Giri, 2014), mientras que para el secado spray se han obtenido buenas tasas de sobrevivencia con

agentes de diversa naturaleza: leche descremada, proteínas de suero, lactosa y polímeros como dextrano y goma acacia (Hubalek, 2003), y para el secado al vacío el uso de sorbitol ha sido particularmente efectivo en la sobrevida de una cepa de *L. helveticus* (Santivarangkna y col., 2006). Cuando se analizó el uso de protectores alternativos a la lactosa, para el secado al vacío y el secado al vacío asistido por microondas, los resultados obtenidos mostraron que es posible mejorar la viabilidad post deshidratación utilizando maltodextrina y/o CMP respectivamente, y que la elección de un agente protector determinado debe ser analizado para cada tecnología de deshidratación en particular. Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de seleccionar un agente protector son las condiciones de almacenamiento que van a ser utilizadas para el cultivo deshidratado, ya que no siempre un buen protector para el proceso de deshidratación es sinónimo de un buen protector para la estabilidad de los cultivos en estado seco (Kurtmann y col., 2009). Por ejemplo, cuando son almacenados a temperatura ambiente o humedad relativa altas, la viabilidad de los probióticos en productos que contienen azúcares disminuye debido a su temperatura de transición vítrea ya que a temperatura ambiente los azúcares forman cristales altamente viscosos (Vega y Roos, 2006, Passot y col., 2012), mientras que la presencia de un estado vítreo mejora la vida durante el almacenamiento.

El contenido de oxígeno es uno de los factores más importantes que afectan la viabilidad de los probióticos especialmente durante el período de almacenamiento (Lee y Salminen, 2009), no sólo por la toxicidad directa que presenta para las células sino también por la producción de peróxidos tóxicos y radicales libres producto de la oxidación de algunos componentes, como los lípidos de la membrana (Korbekandi y col., 2011), por lo que se recomienda que el nivel del mismo debe ser tan bajo como sea posible durante el almacenamiento. Las bifidobacterias se encuentran entre los microorganismos probióticos más sensibles a oxígeno debido a su naturaleza anaeróbica si bien *B. animalis* subsp. *lactis* generalmente es la especie más aerotolerante dentro del género (Tripathi y Giri, 2014). La temperatura de almacenamiento también es un factor importante y generalmente es inversamente proporcional a la viabilidad de los microorganismos (Gardiner y col., 2000), debiendo

ser almacenados preferiblemente a una temperatura de 4-5°C (Mortazavian y col., 2007). Se han reportado pérdidas de viabilidad considerables para cultivos de bifidobacterias liofilizados y almacenados a 20°C (Bruno y Shah, 2003) o cultivos secados spray y almacenados a 15°C y 25°C (Simpson y col., 2005). Celik y O'Sullivan (2013) han estudiado la estabilidad al almacenamiento de la cepa comercial *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 liofilizada y de la cepa *B. longum* DJO10A, utilizando trehalosa como agente protector, bajo diferentes condiciones de temperatura (de -80 a 45°C), actividad acuosa (de 0,02 a 0,92), y atmósfera (aire, vacío, nitrógeno), y observaron que esta cepa comercial sobrevivió todas las condiciones de almacenamiento evaluadas, con sobrevivida satisfactoria a temperaturas de hasta 21°C, actividades acuosas de hasta 0,44 y en las 3 atmósferas evaluadas, mientras que la cepa de *B. longum* mostró mayor sensibilidad a las diferentes condiciones evaluadas. En este trabajo los cultivos deshidratados obtenidos con todas las tecnologías estudiadas fueron sometidos un test de almacenamiento acelerado, a 25°C y dos actividades acuosas: $a_w=0,23$ y $a_w=0,43$. Para que fuera posible que los cultivos llegaran a esas actividades acuosas, los mismos no fueron almacenados al vacío. Aún bajo estas condiciones desfavorables, particularmente la presencia de oxígeno que es una fuente de estrés para las bifidobacterias, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 mostró niveles de células viables de aprox. 9 log UFC/g para todas las tecnologías aplicadas, cuando se la almacenó a $a_w=0,23$ durante 8 semanas. Lo que sugiere que en condiciones de almacenamiento más adecuadas, podría ofrecer mejores resultados de viabilidad. Esto sugiere no sólo la robustez de la cepa hacia diferentes tecnologías de deshidratación sino también un alto grado de tolerancia a condiciones de almacenamiento adversas.

4.3. Secado spray de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en leche descremada a escala laboratorio e industrial.

El secado spray es un proceso de deshidratación ampliamente instalado en la Argentina, en todas las etapas desde el laboratorio hasta escala industrial. Luego de la liofilización, es la tecnología más estudiada para la deshidratación de cultivos, ya que permite la obtención de grandes cantidades de producto y a costos comercialmente

viabiles (Schuck y col., 2013). La existencia de un secadero spray de laboratorio en el INTA EEA-Rafaela (grupo con estrecha colaboración con el INLAIN) y los resultados positivos obtenidos durante el trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Roxana Páez (dirigida por el director del INLAIN) en relación a la viabilidad al secado spray de cepas comerciales de lactobacilos en leche descremada (Páez y col., 2012, Páez y col., 2013) alentaron a continuar estudiando la capacidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 de sobrevivir a la deshidratación mediante esta tecnología. Cuando se aplicó esta tecnología a escala laboratorio, empleando como matriz leche descremada al 20% (p/v), se obtuvieron para una temperatura de entrada de 160°C, temperatura de salida de 83°C y caudal de alimentación 0,0075 L/min, polvos con $3,86 \pm 0,11\%$ de humedad y un nivel de células viables de $9,93 \pm 0,21$ log UFC/g, registrándose una muerte térmica ($\log \text{ UFC/mL}_{\text{pre-secado spray}} - \log \text{ UFC/mL}_{\text{post-secado spray}}$) promedio (no significativa) de solo $0,21 \pm 0,17$ log UFC/mL. Comparando estos resultados con los obtenidos en la sección 3.1.2. del presente capítulo, puede observarse que para condiciones de secado similares (TS=83°C vs. TS=80°C; TE=160°C en ambos casos) y utilizando el mismo equipo de secado (secadero Büchi modelo B-290) y la misma matriz (leche descremada al 20% (p/v)), se obtuvieron resultados diferentes. Mientras que en la sección 3.1.2. se observaron pérdidas significativas de viabilidad post secado y tasas de sobrevida menores al 20%, en este trabajo se obtuvieron polvos con muerte térmica no significativa posterior al proceso. Mientras que el cultivo utilizado en la sección 3.1.2. se obtuvo a partir de una fermentación a escala industrial a pH constante (pH=6,0), las células utilizadas para este trabajo fueron cultivadas a escala laboratorio y a pH libre. Es ampliamente conocida la influencia de las condiciones de fermentación en la resistencia al congelamiento, la liofilización y el secado al vacío, siendo estos efectos fuertemente cepa-dependientes (Bauer y col., 2012). Los resultados obtenidos durante el secado spray de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 podrían indicar la dependencia de la resistencia de esta cepa al secado spray con las condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos a escala laboratorio generalmente no pueden generalizarse directamente a los procesos a escala piloto o industrial debido a las diferencias en los

equipamientos utilizados, lo que resulta en variaciones considerables en los parámetros operativos (Fu, y col., 1994, Fu y Chen, 2011). En este contexto, se realizaron dos ensayos de secado spray de la cepa en escala industrial, explorando condiciones preliminares que pudieran conducir a obtener polvos con alta sobrevida y humedad adecuada. En un primer ensayo se evaluaron tres pares de condiciones temperatura de entrada (°C)/temperatura de salida (°C): 166°C/62°C; 171°C/78°C y 178°C/75°C. En todos los casos se obtuvieron pérdidas de viabilidad menores a 0,5 órdenes log. en los polvos, aunque humedades elevadas (aprox. 7,3%). En el segundo ensayo, se trabajó a una única temperatura de entrada (180°C), y se evaluaron temperaturas de salida mayores a las del primer ensayo y crecientes: 80°C, 85°C y 90°C. Los resultados de viabilidad y humedad se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Viabilidad y humedad de los polvos obtenidos durante el secado a nivel industrial de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Recuentos pre secado (log UFC/mL)	Recuentos post secado (log UFC/mL)			Humedad (%)			
	80	85	90	80	85	90	
TS (°C)	80	85	90	80	85	90	
	8,02±0,01 ^a	7,64±0,06 ^c	7,75±0,02 ^b	7,51±0,03 ^c	5,9±0,1	4,6±0,1	5,3±0,1

En todos los casos se trabajó a una temperatura de entrada de 180°C. TS = temperatura de salida. ^{a,b,c} Los valores con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,005$).

Si bien bajo todas las condiciones evaluadas se obtuvieron pérdidas significativas de viabilidad post-secado de aproximadamente 0,5 órdenes log, lograron obtenerse polvos con humedades satisfactorias, particularmente para el par de condiciones TE/TS de 180°C/85°C. Además, bajo estas condiciones, se obtuvo una tasa de sobrevida elevada (aprox. 52%). Debido a la proximidad de este ensayo y la finalización del trabajo de Tesis Doctoral, no se disponen al momento del cierre de este manuscrito los

valores de viabilidad a lo largo del almacenamiento refrigerado de los polvos obtenidos.

Ensayos futuros deberían realizarse procurando trabajar con una suspensión celular más concentrada de la bifidobacteria, de manera que el escalado se aproxime más a la producción de un cultivo deshidratado a nivel industrial. Sin embargo, estos resultados, si bien preliminares, demuestran que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 es capaz de ser producida en forma de cultivo secado spray a nivel industrial.

5. Conclusiones parciales.

La obtención de cultivos deshidratados con alto número de células viables y estabilidad al almacenamiento es un paso fundamental con vistas a la transferencia de un cultivo potencialmente probiótico a la industria. La técnica más ampliamente utilizada en la actualidad es la liofilización, si bien presenta como principal desventaja el tiempo del proceso y el costo de instalación y operación. El secado spray es otra tecnología que, si bien no se usa aún de forma masiva para la producción de cultivos a gran escala, está ampliamente instalada en el ámbito local. Este hecho ha incentivado el interés de avanzar en el conocimiento sobre su potencial de aplicación. En esta parte del trabajo se estudiaron estas dos tecnologías de deshidratación y otras tres: secado al vacío, al vacío con microondas y liofilización con microondas, menos convencionales pero atractivas principalmente desde el punto de vista económico.

B. animalis subsp. *lactis* INL1 demostró ser una cepa robusta, obteniéndose para todos los secados altos niveles de viabilidad (mayores a 9,5 órdenes log). En particular la liofilización con microondas demostró gran potencial para la obtención de cultivos deshidratados, ya que en un corto tiempo se obtuvo un producto con bajo contenido de humedad y alta tasa de sobrevida. Respecto al almacenamiento en condiciones adversas (25°C, $a_w=0.43$), el secado al vacío mostró una leve mejor tolerancia respecto a los otras técnicas de deshidratación. El empleo de lactosa fue efectivo como protector durante la deshidratación y el almacenamiento de los cultivos obtenidos por secado spray, liofilización o liofilización asistida por microondas, pero para las otras técnicas deberían analizarse otros agentes protectores. Resultados preliminares muestran que la maltodextrina podría ser de interés para las deshidrataciones al vacío y al vacío con microondas.

Finalmente, se evaluó la aplicación de secado spray a escala industrial en leche descremada. Luego de dos ensayos independientes lograron obtenerse polvos con humedades satisfactorias y elevada sobrevida, lo que resulta prometedor debido a la factibilidad de aplicar este proceso a nivel industrial en nuestro país para la cepa en estudio.

Capítulo III

**Estudio funcional de una cepa de leche materna,
B. animalis subsp. lactis INL1.**

Introducción general.

Sistema inmune asociado a la mucosa intestinal.

El tracto gastrointestinal aloja la mayor colección de células inmunológicas del organismo y es el ambiente donde entran en contacto los antígenos alimentarios y las células residentes. El sistema inmune de la mucosa intestinal (SIM) está compuesto por células B y T, células dendríticas (CD), macrófagos y otros tipos celulares únicos dentro del sistema como las células M, las células de Paneth y los linfocitos intraepiteliales. Estos tipos celulares están presentes en forma difusa en la lámina propia de la mucosa u organizados en microambientes localizados, tales como las placas de Peyer en intestino delgado y los nódulos linfáticos mesentéricos (Fig. 29).

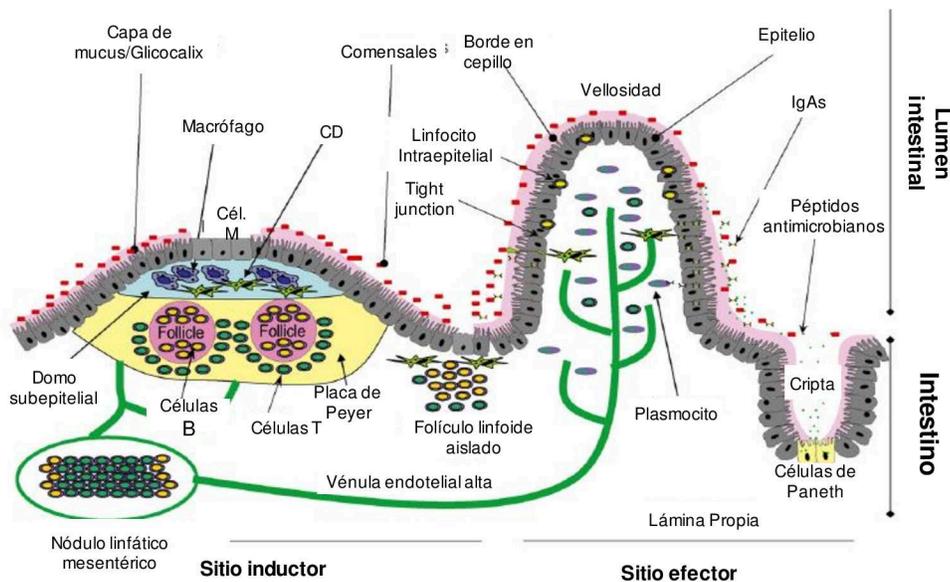


Figura 29: Diagrama esquemático de la organización del sistema inmune de la mucosa intestinal (adaptado de Magalhaes y col., 2007).

Debido a que la mucosa del tracto gastrointestinal es una de las mayores interfaces entre el hospedador y el ambiente, es sometida continuamente a una alta carga antigénica. Su tejido linfode asociado (GALT, según su sigla en inglés) debe ser capaz de montar respuestas protectoras contra los organismos invasores y al mismo tiempo

mantener un estado de no respuesta o tolerancia hacia los antígenos de su entorno, propios o no dañinos (bacterias comensales y antígenos dietarios) (Suzuki y col., 2007), además de asegurar la diversidad de la microbiota (Rescigno, 2013). Funcionalmente, el GALT puede ser dividido en sitios inductores y efectores. Los sitios inductores son aquellos donde los antígenos del lumen son colectados y la respuesta inmune es inducida, como los nódulos linfáticos mesentéricos, las placas de Peyer en el intestino delgado, los nódulos del intestino grueso y los folículos linfáticos aislados. Los sitios efectores son aquellos donde las células inmunes se diferencian y ejercen su función, e incluyen el epitelio y la lámina propia (Magalhaes y col., 2007).

Para ser capaz de responder a las necesidades del organismo, la respuesta inmune de la mucosa tiene algunas peculiaridades respecto al sistema inmune sistémico: mientras que el primero co-existe con un gran número de microorganismos (microbiota intestinal), en el otro la presencia de bacterias es señal de infección. Esto se vuelve evidente si consideramos que es importante no eliminar sino coexistir pacíficamente con la microbiota del intestino para prevenir la expansión de bacterias dañinas y al mismo tiempo mantener una microbiota variada y beneficiosa. Una de las peculiaridades del SIM es que produce constitutivamente grandes cantidades de inmunoglobulina A (IgA) en respuesta a la interacción con la microbiota (Kato y col., 2014). La IgA es el isotipo de anticuerpo predominante en la mucosa intestinal, es producida por las células B de la lámina propia una vez diferenciadas a células plasmáticas, secretada en forma de dímero y transportada a través del epitelio mucoso por una proteína receptora de inmunoglobulinas poliméricas, también conocida como componente secretorio. La IgA secretoria (S-IgA) actúa previniendo que antígenos lumbinales penetren la superficie intestinal, siendo capaz de neutralizar toxinas y organismos infecciosos además de regular la composición de la microbiota intestinal y limitar la inflamación local inducida por algunos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs de su sigla en inglés) (Wershil y Furuta, 2008). Otra particularidad importante del intestino es su capacidad de seleccionar mecanismos inmunes regulatorios y efectores de manera de neutralizar patógenos y prevenir al mismo tiempo el daño del tejido, de manera que no se vea comprometida la integridad de la barrera

intestinal (Cerutti y Rescigno, 2008). La relación del SIM con la microbiota es indispensable para un funcionamiento correcto de las defensas mucosas y se habla de una “homeostasis inmune” modulada por las bacterias comensales (Ivanov y Littman, 2010). Las señales de las bacterias intestinales promueven la integridad de la barrera epitelial, regulan las “tight junctions” (uniones firmes entre enterocitos) y protegen a las células epiteliales intestinales (CEI). También inducen la producción y secreción de S-IgA, de péptidos antimicrobianos por parte de las células de Paneth y de mucinas a partir de las células Goblet (Huang y col, 2013). Las mucinas forman la estructura del mucus, el cual cubre la superficie epitelial y está conformado por dos capas, siendo su capa interior más viscosa y prácticamente impenetrable para las bacterias, y el lugar donde se acumulan la mayor parte de los péptidos antimicrobianos y la S-IgA secretada.

Más allá de la barrera de mucus y la contención de las bacterias comensales, estas son detectadas por el SIM. Un “muestreo” es realizado por las células M en las placas de Peyer, lo cual es importante para la generación de respuestas antígeno-específicas. Además las CD de la lámina propia también pueden extender sus proyecciones citoplasmáticas (“dendritas”) al lumen intestinal y “muestrear” la microbiota intestinal. Un rol importante en muchas de las respuestas inmunes innatas son reguladas por receptores tipo-Toll (TLR de su sigla en inglés), una familia conservada de receptores inmunes innatos que reconocen patrones moleculares asociados a microbios como lipopolisacáridos, lipoproteínas y ácidos nucleicos metilados, y que se expresan en las CD, CEI y otras células inmunes de la mucosa. El reconocimiento de patrones microbianos por parte de estos receptores representa un factor crítico en la simbiosis entre hospedador y microbiota, la integridad de la mucosa e incluso están asociados a algunos efectos benéficos mediados por probióticos (Huang y col., 2013). Las CD son potentes células presentadoras de antígenos (APCs de su sigla en inglés) que inducen respuestas inmunes primarias contra infecciones microbianas y otros estímulos. Cuando se activan, las CD promueven la expresión de moléculas co-estimuladoras y migran hacia órganos linfoides secundarios donde activan células T antígeno-específicas. Los tipos de citoquinas y otros factores que son secretados por las CD y otras células

inmunes programa la diferenciación de células Th0 naives a células efectoras Th1, Th2 o Th17, o bien a células regulatorias Treg (Plaza Díaz y col., 2014). La secreción de citoquinas permite una alta comunicación entre las células del sistema inmune de la mucosa. Estas moléculas de naturaleza peptídica se encargan de regular la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune en función del estímulo activador. Algunas de las citoquinas involucradas en la respuesta inmune de la mucosa intestinal son las interleuquinas IL-4, IL-5 e IL-10 y el TGF β , secretadas por los linfocitos Th, las CEI y otras células de la inmunidad innata para inducir el cambio de células B a isotipo IgA, regular la secreción de este tipo de inmunoglobulina en la lámina propia y modular las respuestas inflamatorias (Blum y col., 1999).

Probióticos y caracterización funcional.

En los últimos 20 años el uso de probióticos ha proliferado considerablemente (Floch, 2014) y se han obtenido importantes avances en la selección y caracterización de cultivos específicos y en la comprobación de los efectos benéficos que presenta el consumo de los mismos para la salud. De estos estudios, cepas seleccionadas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* han recibido la mayor atención por sus efectos funcionales, principalmente a nivel de la mucosa intestinal, y se han reportado numerosos ensayos in vitro e in vivo en animales, seguidos en algunos casos de ensayos clínicos en humanos.

Desde un punto de vista funcional, la selección de bacterias se realiza en diferentes etapas. Normalmente se comienza con un “screening” donde las cepas en estudio deben demostrar ser capaces de resistir las barreras físico-químicas que presenta el tracto gastrointestinal, especialmente el estrés ácido y la presencia de bilis (Bao y col., 2010, Solieri y col., 2014). Si bien los efectos benéficos de muchos microorganismos probióticos son actualmente reconocidos, el conocimiento sobre los mecanismos particulares de cada cepa que explican estos efectos generalmente es limitado. Los modos de acción aceptados incluyen la producción de sustancias antimicrobianas, la competición por nutrientes y la exclusión competitiva de patógenos (Parvez y col., 2006), por lo que otro de los estudios in vitro que normalmente se realiza al momento

de seleccionar cepas de interés es la capacidad de inhibir microorganismos patógenos (Vinderola y col., 2008). Otras vías de acción propuestas para ejercer sus efectos probióticos se relacionan con capacidades metabólicas específicas como la capacidad de fermentar azúcares complejos, secretar exopolisacáridos (EPS) o sintetizar isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado (CLA) (Russel y col., 2011) por lo que en los últimos años se han utilizado este tipo de tests para evaluar estas capacidades metabólicas como criterio de selección. Algunos microorganismos, particularmente las bifidobacterias, son capaces de fermentar azúcares complejos como los prebióticos (Grimm y col., 2014). El término prebiótico fue introducido en 1995 por Gibson y Roberfroid como “ingredientes dietarios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un grupo limitado de bacterias en el colon, mejorando por lo tanto la salud del hospedador” (Bosscher y col., 2009). Los prebióticos más comúnmente utilizados son los fructanos como la inulina, la oligofruktosa, los fructo-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos como la rafinosa (Whelan, 2013). Cuando estos prebióticos son administrados en cantidades adecuadas, solos o en compañía de un probiótico, pueden incrementar la actividad sacarolítica dentro del intestino y promover selectivamente el crecimiento de bifidobacterias (Guarner, 2007). Una predominancia en el número de microorganismos beneficiosos no sólo fortalecería la función de barrera intestinal contra microorganismos potencialmente perjudiciales, sino que además la fermentación de estos azúcares lleva a la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA de su sigla en inglés), lo que a su vez sirve de combustible para los colonocitos, estimula el crecimiento de células mucosas colorrectales y disminuye el riesgo de aparición y proliferación de células cancerígenas en el colon (Rossi y col., 2005). La producción de EPS tiene relevancia ya que no sólo es importante para la colonización del hospedador y confiere resistencia al bajo pH gástrico y a bilis, sino que también podrían modificar positivamente la respuesta inmune del hospedador (Grimm y col., 2014). En cuanto a la síntesis de isómeros bioactivos de CLA, su relevancia reside en que éstos han mostrado ejercer una amplia variedad de actividades biológicas favorables en modelos animales experimentales y en cultivos de células humanas. Entre los efectos benéficos que se les

atribuyen a los distintos isómeros se encuentran actividad anti-inflamatoria, anti-cancerígena (O'Shea y col., 2012) y anti-adipogénica (Russell y col., 2011).

El siguiente paso en la evaluación funcional de potenciales probióticos es la evaluación de sus efectos benéficos en cultivos de células y en modelos in vivo. El modelo murino es ampliamente utilizado para estudios de inmunomodulación a nivel intestinal y se han reportado un considerable número de estudios en los que la administración de determinadas cepas de lactobacilos y bifidobacterias aumentaron la producción de IgA, el número de células productoras de IgA o bien produjeron modificaciones en los perfiles de citoquinas (de Moreno de LeBlanc y col., 2008, Mileti y col., 2009), si bien los mecanismos de acción de cada cepa probiótica no se han establecido en detalle aún para todos los aislamientos utilizados como probióticos (Sakai y col., 2014). Además, se han puesto a punto diversos modelos animales de enfermedades gastrointestinales para evaluar la utilidad las cepas probióticas en su tratamiento y prevención. En la actualidad existen modelos murinos para estudiar dolencias causadas por patógenos gastrointestinales como Salmonella (de Moreno de LeBlanc y col., 2010) y Helicobacter pylori (Chenoll y col., 2011), de diarrea aguda, asociada a antibióticos y del viajero, y de síndrome del intestino irritado (IBD de su sigla en inglés), entre otros. Una vez observada la seguridad y efectividad de un determinado microorganismo, y si su fin es el consumo humano, una etapa obligada previo a su transferencia a la industria y comercialización, es la realización de un ensayo clínico aleatorio (ECA) doble ciego con control de placebo en humanos (FAO/WHO, 2002). En los últimos años se ha visto un incremento considerable en el número de ensayos clínicos con probióticos para fines específicos, en particular estudios sobre el efecto benéfico en la población pediátrica (Chen y col., 2012). Algunos de los efectos saludables descritos incluyen disminución de la frecuencia de diarreas infantiles (Basu y col., 2009), atenuación de eczemas atópicos (Wickens y col., 2013) y enfermedades respiratorias (Kukkonen y col., 2008, Luoto y col., 2014), mientras que otros ensayos no han mostrado efectos positivos respecto al grupo placebo (Salazar-Lindo y col., 2004, Sung y col., 2014). Las discrepancias en los resultados de diferentes estudios utilizándose la misma cepa y aplicada para tratar una misma

afección, hace evidente que el éxito o no de la administración temprana de probióticos depende no sólo de la cepa empleada, sino también de la dosis (concentración y tiempo de administración) y de la patología sobre la que se pretenda actuar o prevenir.

Algunas de las cepas más ampliamente estudiadas y que mostraron efectos prometedores han sido introducidas al mercado principalmente en forma de suplementos dietarios ó bien incorporados a productos lácteos (Tabla 10).

Tabla 10: Productos probióticos comerciales para aplicación humana y efectos benéficos. [Adaptado de Saulnier y col. (2009), Saad y col. (2013), Viera y col. (2013).]

Nombre y tipo de producto	Cepa	Beneficio clínico/médico	Mecanismo de acción propuesto
Probio-Tec® (*) Suplemento dietario	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb12</i>	Alivia constipación Mejora las propiedades fecales y la microbiota Efectos positivos contra diarrea aguda Reduce diarrea asociada a antibióticos Aumenta la respuesta de anticuerpos intestinal en niños alimentados con fórmula	Aumento de la respuesta inmune Efecto en la inmunidad innata Modificación de la microbiota
Culturelle® Suplemento dietario	<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus GG</i>	Previene diarrea relacionada a rotavirus en niños Reduce el riesgo de infecciones del tracto respiratorio en niños Útil en la prevención de dermatitis atópica en niños con alto riesgo de alergia	Prevención de bacteremia sistémica Mejora de la homeostasis epitelial intestinal Atenuación de respuestas inflamatorias sistémicas y locales Secreción de sustancias anti-inflamatorias Producción de bacteriocinas
VSL#3® Suplemento dietario	4 cepas de <i>Lactobacillus</i> (<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>), 3 cepas de <i>Bifidobacterium</i> (<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> y <i>B. infantis</i>) y 1 cepa de <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>)	Enfermedad del intestino inflamado Pouchitis Síndrome de intestino irritado	Aumento de la respuesta inmune/efectos anti-inflamatorios Aumento de la defensa mucosa del hospedador Refuerzo de la función de barrera Modulación de la microbiota Reducción de inflamación en alergia a los alimentos

Actimel® Lácteo (leche fermentada)	Lactobacillus casei DN-114001	Modulación del sistema inmune
Activia® Lácteo (yogur)	Bifidobacterium animalis DN-173 010	Regula el sistema digestivo reduciendo el tiempo de tránsito intestinal
Yakult® Lácteo (leche fermentada)	Lactobacillus casei Shirota	Efecto en la inmunidad innata Atenuación de la respuesta a LPS

*muchos de los efectos positivos observados para Bb12 se observaron cuando estaba combinada con prebióticos y/o otros probióticos.

El objetivo de este capítulo fue avanzar en la caracterización del potencial funcional de las cepas de bifidobacterias aisladas de leche materna. Se describirán algunos tests preliminares de seguridad (resistencia a antibióticos) y funcionalidad in vitro, como la resistencia al pasaje gástrico y a la exposición a sales biliares, y la capacidad de sintetizar derivados de CLA, para algunos de los aislamientos. En particular, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 será estudiada en mayor detalle y se analizará su capacidad inhibitoria in vitro sobre algunos patógenos, su capacidad de inmunoestimular la respuesta inmune mucosa, de ejercer un rol protector frente a un patógeno intestinal, *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*, y de modificar el tránsito intestinal, en modelos in vivo.

Capítulo IIIa

**Estudio funcional in vitro de bifidobacterias de
leche materna y evaluación de su interacción con
el intestino.**

1. Introducción.

1.1. Prebióticos, probióticos y función intestinal.

La dieta juega un papel importante en el mantenimiento de la salud y en la prevención de numerosas patologías. Los alimentos funcionales son aquellos que ejercen efectos benéficos en el consumidor más allá de la nutrición básica. La funcionalidad deriva de la presencia de ingredientes bioactivos (compuestos prebióticos, bacterias probióticas, flavonoides, fitoesteroles, péptidos bioactivos). Los avances recientes en las investigaciones relacionadas a la microbiota intestinal han reforzado la idea de llegar a una composición equilibrada de la misma mediante dietas nutricionalmente bien balanceadas y la ingesta activa de alimentos funcionales, tales como oligosacáridos, fibra dietaria y leches fermentadas (Mitsuoka y col., 2014).

Uno de los efectos saludables que se adjudica al empleo de probióticos y/o prebióticos es la mejora de la motilidad intestinal, proponiéndose como mecanismo posible para éste beneficio la modificación en la composición de la microbiota intestinal y la producción de ácidos orgánicos de cadena corta. Ahora, si bien en la actualidad los modelos animales, y murinos en particular, son ampliamente utilizados en ensayos in vivo para evaluar el efecto de drogas o extractos naturales en la función intestinal y/o el tratamiento de ciertos desórdenes como constipación o diarreas originadas por distintas causas (Saito y col., 2002, Hu y col., 2009, Moriya y col., 2010), no ocurre lo mismo en el caso de los alimentos probióticos y/o prebióticos. Para evaluar la influencia de alimentos probióticos y prebióticos en el tránsito intestinal/colónico, generalmente los ensayos son llevados a cabo directamente en humanos (particularmente en niños, mujeres o ancianos, grupos más afectados por desregulaciones en la función intestinal) sin que se reporten ensayos previos en animales. Esta situación conlleva una gran inversión de dinero, tiempo y esfuerzo asociado al trabajo con humanos. Es debido a esto que el diseño de un modelo animal sencillo y representativo de tránsito intestinal sería de gran valor para ser utilizado como test de rutina en el área alimenticia previo a la puesta en marcha de ensayos con humanos, más costosos y laboriosos. La elección de trabajar con ratones parecería ser

la indicada ya que es un modelo ampliamente utilizado para análisis in vivo de la influencia de sustancias químicas sobre el tránsito intestinal (Adeyeni y col., 2009, Charoenthongtrakul y col., 2009).

Como se mencionó previamente, los prebióticos son sustancias que no se absorben ni digieren a nivel de intestino delgado sino que llegan al colon donde son fermentadas exclusivamente por los componentes benéficos de la microbiota, principalmente las bifidobacterias (Roberfroid, 2005). El efecto de los prebióticos es, esencialmente, un efecto indirecto ya que lo que se logra con su administración es alimentar y beneficiar a un número limitado de microorganismos ya presentes en el tracto gastrointestinal causando así una modificación selectiva de la microbiota del huésped. No es el prebiótico en sí mismo, sino los cambios inducidos en la composición de la microbiota y su actividad metabólica lo que se traduce en una mejor salud y bienestar y en la reducción del riesgo a enfermedades (Roberfroid, 2008).

Los hidratos de carbono no digeribles y considerados prebióticos más estudiados hasta este momento son la lactulosa (azúcar compuesto por los azúcares naturales fructosa y galactosa), los fructooligosacáridos y la inulina. Todas estas moléculas pueden formar parte de la composición intrínseca de los alimentos o añadirse a los mismos (fortificación). La inulina es una familia de glúcidos complejos (polisacáridos) compuestos de cadenas moleculares de fructosa, que se encuentran generalmente en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas (Bardana, achicoria, diente de león, yacón, entre otras) como sustancia de reserva (Cherbut, 2002). En la primera porción del intestino grueso las bacterias residentes comienzan a degradar la inulina en grandes proporciones y a metabolizarla produciendo en el proceso ácidos grasos de cadena corta (especialmente ácido butírico), dióxido de carbono, hidrógeno y metano (Roberfroid y col., 1998, Rossi y col., 2005). De este modo, estimula el crecimiento de la microbiota intestinal benéfica (Kolida y col., 2007, Roberfroid, 2007) como las bifidobacterias (Gibson y col., 1995) y los lactobacilos (Wendy y col., 2008), promoviendo su establecimiento y desarrollo (Langlands y col., 2004). Por favorecer el crecimiento de las bifidobacterias se dice que la inulina tiene un efecto bifidogénico (Kaur y col., 2002), y se ha propuesto utilizarla, sola o en combinación con bacterias

probióticas, en los tratamientos de la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), de la hipercolesterolemia (López y col., 2008) o del estreñimiento.

La capacidad de ciertos probióticos, prebióticos o productos simbióticos de modular el tránsito intestinal se manifiesta tanto modificando benéficamente el número de defecaciones, como la consistencia de las heces o actuando sobre los síntomas de distensión abdominal (Wendy y col., 2008, Tabbers y col., 2011). La frecuencia de deposiciones normal varía entre las personas, desde un par de veces al día hasta 2-3 veces a la semana. En caso de que la persona evacúe menos del mínimo establecido (cada 3-4 días o con menor frecuencia aún), o que sufra de evacuaciones muy firmes y con dolor se dice que esa persona padece de estreñimiento (Anthony Lembo y Camillieri, 2003). Estas heces firmes son el resultado de la absorción excesiva de agua por el colon. Normalmente, a medida que los alimentos se mueven a través del intestino grueso éste absorbe agua mientras se van formando las heces. Las contracciones musculares empujan las heces hacia el recto, y cuando las mismas llegan a la parte final se ha absorbido la mayor parte del agua, produciéndose heces sólidas. Cuando el tránsito intestinal está reducido, las heces se mueven a través del colon a una velocidad menor de lo habitual, lo que provoca una excesiva absorción del agua y por lo tanto una disminución de la humedad de las mismas. El estreñimiento, que puede considerarse como un trastorno o una enfermedad según altere o no la calidad de vida, afecta a gran parte de la población en algún momento de la vida, siendo así un síndrome muy presente. Este trastorno puede tener diferentes causas, aunque generalmente es de carácter funcional y responde a condicionamientos dietéticos, sociales y emocionales (Longstreth y col., 2006).

Dentro de las medidas generales de tratamiento del estreñimiento se encuentra el aumento en la ingestión de fibra vegetal, que aumenta la humedad de las heces, en combinación con la ingesta de bifidobacterias que regulan el tránsito intestinal, logrando conseguir una defecación regular mediante la normalización de la microbiota intestinal. De este modo, se eliminan también del intestino las sustancias nocivas, evitando así su absorción o disminuyendo el contacto con el epitelio intestinal.

2. Objetivos.

En el presente capítulo se propuso estudiar características funcionales de los aislamientos de bifidobacterias de leche materna humana. Para lograrlo, los objetivos específicos propuestos fueron:

- 1) Estudiar la seguridad de las cepas, determinando la susceptibilidad/resistencia a antimicrobianos.
- 2) Analizar parámetros indicadores de funcionalidad in vitro, que podrían dar una estimación de la interacción de las cepas con el tracto gastrointestinal como son la hidrofobicidad de la superficie celular, la resistencia a barreras gastrointestinales simuladas, la producción de sustancias bioactivas y la inhibición de microorganismos patógenos.
- 3) Evaluar, a través de la utilización de jaulas metabólicas, la utilidad de un modelo murino para analizar el efecto prebiótico de inulina en el tránsito intestinal y la influencia de su administración oral sobre la sobrevivencia al tránsito intestinal de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

3. Materiales y métodos.

3.1. Seguridad y caracterización funcional in vitro.

Se analizaron algunos de los parámetros utilizados de rutina para el “screening” de bacterias potencialmente probióticas (descritos en la introducción general) sobre las cepas pertenecientes a la colección de bifidobacterias de leche materna del INLAIN: *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, INL2, INL4 e INL5, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a’.

3.1.1. Resistencia a Antibióticos.

Se determinó a través de E-test[®] (AB Biodisk, Oxoid Inc., Ontario, Canadá). Cultivos frescos de las cepas se estriaron en agar MRS-C (72 h, 37 °C, anaerobiosis). A partir de una colonia aislada se estriaron placas de agar LSM (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) adicionado al 0,1% (p/v) de cisteína (LSM-C) y se incubaron bajo las mismas condiciones. Se suspendió una colonia aislada en un tubo con 1 mL de caldo LSM-C reducido (ver composición en Anexo), se impregnó un hisopo estéril en esta suspensión y se distribuyó la misma sobre la superficie de placas de agar LSM-C, aplicando el hisopo sobre toda la superficie de la placa, 3 veces por placa, rotando la misma 60° cada vez para distribuir uniformemente el inóculo. Las placas se dejaron secar (20 min, aproximadamente) en flujo laminar y luego se aplicaron (con pinza estéril) las tiras E-test[®] (AB Biodisk), para dosar la resistencia de las cepas frente a los siguientes antibióticos: clindamicina (CM), cloramfenicol (CL), eritromicina (ER), estreptomicina (ST), tetraciclina (TET) y vancomicina (VA). Las placas se incubaron (72 h, 37°C, anaerobiosis) y luego se leyeron los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC según su sigla en inglés) según las indicaciones del fabricante. La resistencia a tetraciclina se corroboró determinando la MIC por el método de las microdiluciones en caldo, según Cardamone y col. (2011). Brevemente, se preparó una solución madre del antibiótico en agua destilada y luego se esterilizó por filtración (diámetro del poro 0,22 µm) (Millipore, San Pablo, Brasil). Cultivos frescos (18 h, 37°C, anaerobiosis) de las cepas en MRS-C se diluyeron de manera de obtener un inóculo final de aproximadamente 10⁵ UFC/mL en la microplaca. Las cepas se diluyeron en caldo LSM. La interpretación de los resultados se basó en los puntos de

corte adoptados por la guía técnica actualizada de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008).

3.1.2. Hidrofobicidad.

Se determinó la afinidad de las cepas por una fase orgánica o acuosa como medida de su hidrofobicidad superficial, según Vinderola y Reinheimer (2003). Cultivos overnight (18 h, 37°C, anaerobiosis) de las cepas en MRS-C se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C), se lavaron 2 veces en buffer PBS (pH 7,2) y se resuspendieron en el mismo buffer. La suspensión celular se ajustó a una D.O._{560 nm} de 1,0 ± 0,1 con buffer PBS. Se pusieron en contacto 3 mL de la suspensión celular con 0,6 mL de n-hexadecano (Merck, Darmstadt, Alemania), y se agitó en vórtex durante 120 segundos a temperatura ambiente. Se incubó 1 h a 37°C para permitir la separación de las fases. La fase acuosa (inferior) se removió cuidadosamente con jeringa y aguja y se midió la D.O._{560 nm} de la misma. La hidrofobicidad celular (H%) se calculó con la fórmula:

$$H\% = [(D.O._i - D.O._f) / D.O._i] \times 100$$

donde D.O._i y D.O._f son las densidades ópticas antes y después de la extracción con n-hexadecano, respectivamente.

3.1.3. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada.

Cultivos frescos de las cepas en MRS-C se inocularon (2% v/v) en 40 mL de caldo MRS-C y se incubaron durante 18 h a 37°C en anaerobiosis. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces con buffer PBS estéril (pH 7,4) y el pellet se resuspendió en 20 mL de leche descremada estéril al 10% (p/v), adicionando luego 20 mL de solución salina conteniendo 0,6% de pepsina (Merck, Darmstadt, Alemania). La suspensión se incubó en un baño termostatzado a 37°C, con agitación y control dinámico de pH, acidificando gradualmente hasta pH 2,0 en un período de 90 min, mediante el agregado de volúmenes variables de HCl 1 o 0,1 M, de acuerdo a Marteau y col. (1997). Se realizaron recuentos de células viable en agar MRS-C a tiempo cero y a los 90 minutos. Luego de este tiempo se tomó una alícuota de la suspensión celular, se centrifugó (5000 rpm, 10 min, 5°C), se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el mismo volumen de solución de bilis bovina 1% (p/v) (Sigma)

disuelta en PBS (0,1 M, pH 8,0). Esta suspensión se mantuvo a 37°C durante 10 minutos (shock de bilis) y luego se realizó un recuento en agar MRS-C (37°C, 72 h, anaerobiosis). Finalmente una alícuota de esta suspensión se centrifugó bajo las condiciones anteriores, el pellet se resuspendió en una solución de bilis-pancreatina (0,3% p/v de bilis bovina y 0,1% p/v de pancreatina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) disuelta en PBS (0,1 M, pH 8,0) y se mantuvo a 37°C durante 90 minutos (digestión intestinal). Se realizó un recuento en agar MRS-C (37°C, 72 h, anaerobiosis).

3.1.4. Síntesis de derivados conjugados del ácido linoleico y linolénico.

Este estudio fue realizado en colaboración con la Dra. Carina Van Nieuwenhove y la Lic. Victoria Terán del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, Tucumán). Se utilizaron las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* INL2 e INL4, *B. longum* LM7a y *B. dentium* LM8a, y se evaluó la producción de ácidos grasos conjugados del ácido linoleico (CLA) y del ácido linolénico (CLNA). Se inocularon las cepas (2% v/v) en presencia de los sustratos respectivos, ácidos linoleico y linolénico respectivamente (LA y LNA) en una concentración final de 500 µg/mL, adicionados al medio de cultivo (MRS-C), y se incubó en anaerobiosis (48 h, 37°C). Se detectó la producción de ácidos grasos conjugados totales por espectroscopía UV (233 nm) y para aquellas cepas que dieron positivo, se determinó la concentración de 3 isómeros de CLA (c9t11CLA; t10c12CLA y t9t11CLA) y un isómero de CLNA (C18:3 n-5 CLNA), por cromatografía gaseosa. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la conversión del sustrato (LA y LNA según corresponda)

3.1.5. Actividad antimicrobiana in vitro.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ecología y Fisiología Microbiana (LEFM) del Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Universidad Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil), bajo la supervisión del Dr. Jacques Nicoli, en el marco de un proyecto MINCyT-CAPES. Se utilizó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y se determinó su capacidad antimicrobiana in vitro sobre 15 cepas patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas (Tabla 11) pertenecientes a la colección de cultivos del LEFM, mediante el método de la doble capa agarizada. Se desarrolló (37°C,

anaerobiosis, 48 h), en una primer capa de agar MRS-C, una colonia de la bifidobacteria a partir de un inóculo (5 µL) sembrado en superficie. La colonia se inactivó con cloroformo durante 30 min, se dejó evaporar el solvente residual y luego se colocó la segunda capa, conformada por la cepa patógena inoculada en soft agar BHI, en una relación 10 µL del patógeno en 3,5 mL de medio agarizado. Se midieron los halos de inhibición luego de la incubación (37°C, aerobiosis, 24 h) con un paquímetro digital (Mitutoyo, Japón) y los resultados se expresaron como diámetro de inhibición (mm).

Tabla 11: Microorganismos patógenos utilizados en el test de antagonismo in vitro para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Cepa
Staphylococcus aureus ATCC 29313
Listeria monocytogenes ATCC 19115
Micrococcus luteus ATCC 49732
Bacillus cereus ATCC 11778
Enterococcus faecalis ATCC 19433
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium FUNED
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 14028
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi ATCC 19430
Citrobacter freundii ATCC 8090
Klebsiella oxytoca ATCC 49131
Proteus mirabilis ATCC 25933
Serratia marcescens ATCC 8100
Enterobacter aerogenes ATCC 13048
Escherichia coli ATCC 25922
Shigella sonnei ATCC 11060

3.2. Evaluación preliminar de un modelo murino para el estudio de la influencia de inulina sobre el tránsito intestinal.

3.2.1. Animales.

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad ($20 \pm 1g$) provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET – UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se mantuvieron en el bioterio del INLAIN, y se aclimataron durante una semana previa al inicio del ensayo alojados en jaulas de plástico transparentes en grupos de 3 animales/jaula, en condiciones ambientales controladas a $21 \pm 2^\circ C$, humedad de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12h. Al momento de iniciar el ensayo, los animales se alojaron en jaulas metabólicas para ratas (3 animales/jaula) y recibieron dieta convencional ad libitum y agua de red (grupo C) o una solución 0,5% (p/v) de inulina (BENEO-Orafti, Bélgica), administrada en el agua de bebida (grupo I), durante 7 días. Esta solución fue reemplazada diariamente y al cabo de los 7 días se la reemplazó por agua de red.

3.2.2. Determinaciones analíticas.

Se determinó el contenido de humedad (H%) de las heces totales (recolectadas diariamente) y el peso de las heces secas por gravimetría (secado a $101 \pm 1^\circ C$ durante 24 h). El número de heces se determinó por conteo manual del total de heces secas luego de la determinación de humedad. El pH se determinó disolviendo las heces húmedas en agua destilada, en una relación 1:3. El homogenato se preparó en bolsas de stomacher, macerando y homogeneizando la suspensión durante 2 minutos a potencia máxima. El pH se midió con un pHmetro Orion 3 Star Benchtop (Thermo Scientific, USA).

3.3. Influencia de la administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y de inulina en un modelo murino de tránsito intestinal.

3.3.1. Animales y alimentación.

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad, tratados como se describe en el inciso 2.2.1. Para el desarrollo de este ensayo se adquirieron 4 jaulas metabólicas específicas para ratones (Tecniplast, Italia). Se utilizaron cuatro grupos de ratones BALB/c los cuales se alojaron en jaulas metabólicas (2 animales/grupo). Todos los animales recibieron durante 3 semanas dieta convencional ad libitum y agua (grupo control) y en el caso de los animales tratados, estos recibieron 0,2 mL/día de una solución de inulina 0,25 % (p/v) (grupo I), o 0,2 mL/día (intubación intragástrica) de una suspensión (10^9 UFC/mL) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (grupo B), o 0,2 mL/día de la suspensión de bifidobacteria en una solución de inulina 0,25 % (p/v) (grupo B+I). La suspensión de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se preparó diariamente a partir de un cultivo overnight de la cepa (18h, 37°C, anaerobiosis), centrifugado (5000 rpm, 10 min, 5°C), lavado y resuspendido en PBS.

3.3.2. Recuento presuntivo de bifidobacterias en heces.

Se realizó un monitoreo microbiológico parcial de las heces, a través del recuento de microorganismos totales y de bifidobacterias presuntivas. Se recogieron muestras de heces de cada grupo a los 3 días y al cabo de 1, 2 y 3 semanas de administración de los productos en estudio. Las mismas fueron inmediatamente procesadas en stomacher con agua de peptona 0,1% (p/v) estéril y se sembraron diluciones seriadas en un medio de cultivo descripto por de Moreno de LeBlanc y col. (2008), adecuado para la detección diferencial de bifidobacterias (ver composición del medio selectivo en Anexo).

3.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos de hidrofobicidad y resistencia a la DGS se analizaron utilizando un test ANOVA y las diferencias entre medias se detectaron mediante un test de rango

múltiple de Tukey. Los datos del ensayo de tránsito intestinal se analizaron utilizando un test t de Student. El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

4. Resultados.

4.1. Evaluación in vitro de la seguridad y funcionalidad de los aislamientos de leche materna.

La caracterización in vitro es el primer paso en la evaluación de microorganismos potencialmente probióticos. En las Tablas 12 y 13 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para las cepas de bifidobacterias aisladas de leche materna que forman parte de la colección de cultivos del INLAIN, en cuanto a su seguridad y funcionalidad. Si bien no todos los parámetros fueron estudiados para todas las cepas, los resultados en su conjunto permiten sacar conclusiones preliminares relacionadas a la seguridad y al potencial de estas cepas en vistas a ser empleadas como probióticos, una vez demostradas sus propiedades funcionales. Como se mencionó en el capítulo IIa, si bien *B. dentium* LM8a' no pertenece a una especie con potencial probiótico, fue caracterizada preliminarmente con fines académicos, de modo tal de evidenciar el comportamiento diferencial entre distintas especies de bifidobacterias.

El uso clínico de antibióticos ha llevado indudablemente a una significativa reducción en la morbilidad y mortalidad asociada con enfermedades infecciosas y también ha tenido un profundo impacto en el éxito de cirugías y terapias oncológicas, extendiéndose su uso incluso a veterinaria y agricultura (Ammor y col., 2007). Sin embargo, paralelamente esto ha conducido a un incremento en la resistencia a antibióticos en las bacterias, tanto patógenas como comensales y asociadas a alimentos (Mättö y col., 2007). Debido a que la cadena alimenticia ha sido reconocida como una de las principales rutas de transmisión de la resistencia a antibióticos entre las poblaciones bacterianas animales y humanas, y a la creciente expansión del mercado de productos fermentados y/o probióticos, resulta crítica la comprobación de la presencia de determinantes de resistencia transferibles en los microorganismos utilizados (Ammor y col., 2007). En este sentido, en la actualidad, se han publicado numerosos reportes con recomendaciones relativas a la virulencia y transferencia de resistencia a antibióticos, tendientes a establecer un criterio de seguridad para la selección de cepas de uso probiótico (EFSA, 2008, FAO/WHO, 2001). Si bien los tests de susceptibilidad

a antibióticos para las bacterias patógenas de mayor relevancia estaban bien estandarizados desde hace años, no ocurría lo mismo para bacterias no patogénicas y, en particular, bacterias anaeróbicas (como las bifidobacterias) utilizadas en alimentos. En 2005, Klare y col. formularon el medio de cultivo denominado LSM que buscó dar respuesta a este problema, y actualmente es ampliamente difundido para el desarrollo de bifidobacterias en presencia de antibióticos (Klare y col., 2005, Mättö y col., 2007). En el año 2008, la EFSA solicitó a su Panel de Riesgo Biológico que identifique, desde una perspectiva de salud pública, en qué extensión los alimentos sirven como fuente para la adquisición de bacterias resistentes a antimicrobianos o de genes de resistencia, que confeccione una lista de los riesgos identificados e identifique potenciales opciones de control para reducir la exposición. En el año 2012 su Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias utilizadas en Alimentación Animal (FEEDAP de su sigla en inglés) emitió una guía para la evaluación de susceptibilidades bacterianas a antimicrobianos de importancia humana y veterinaria. En esta guía se aconseja que los tests de susceptibilidad a antimicrobianos deben ser realizados de acuerdo a métodos estandarizados y reconocidos internacionalmente. Como requisito básico, la concentración inhibitoria mínima (MIC) expresada en mg/L o µg/mL debe ser determinada para cada una de las siguientes sustancias: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloramfenicol y, en casos específicos, tilosina, apramicina, ácido nalidíxico, sulfonamida y trimetoprima. Los valores de corte microbiológicos fueron definidos basado en reportes del Comité Europeo para la Evaluación de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST de su sigla en inglés), y de programas de monitoreo nacionales y europeos (EFSA, 2012). Según estos valores de corte, las cepas son categorizadas como susceptibles cuando es inhibida a una concentración de un antimicrobiano específico igual o menor al valor de corte establecido, mientras que son consideradas resistentes cuando no son inhibidas a una concentración del antimicrobiano específico mayor que el valor de corte. En este trabajo se utilizó el método Etest[®] en LSM-C para analizar la susceptibilidad de las cepas a seis antibióticos: clindamicina, cloramfenicol, eritromicina, estreptomina, tetraciclina y vancomicina. Los valores promedio de MIC se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Resistencia a antibióticos de los aislamientos de bifidobacterias de leche materna: clindamicina (CM), cloramfenicol (CL), eritromicina (EM), estreptomicina (SM), vancomicina (VA) y tetraciclina (TC) por E-test[®], y resistencia a TC por método de microdiluciones (MD).*

Cepa	MIC ($\mu\text{g/mL}$) determinada por E-test [®]						MIC ($\mu\text{g/mL}$) de TC por MD
	CM	CL	EM	SM	VA	TC	
INL1	0,04 \pm 0,01	2,5 \pm 0,7	0,14 \pm 0,07	144 \pm 50	0,31 \pm 0,09	14 \pm 3	> 32,0
INL2	0,05 \pm 0,01	0,19 \pm 0,09	0,05 \pm 0,02	432 \pm 90	0,62 \pm 0,18	0,19 \pm 0,09	32,0
INL4	0,03 \pm 0,02	0,37 \pm 0,18	0,05 \pm 0,01	768 \pm 180	0,38 \pm 0,00	0,25 \pm 0,10	< 0,5
INL5	0,03 \pm 0,01	0,25 \pm 0,10	0,06 \pm 0,02	384 \pm 90	0,44 \pm 0,08	0,19 \pm 0,00	< 0,5
LM7a	0,25 \pm 0,00	0,88 \pm 0,18	> 256	96 \pm 0	1,25 \pm 0,35	1,50 \pm 0,00	4,0
LM8a'	0,06 \pm 0,00	0,5 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00	192 \pm 0	0,25 \pm 0,00	0,38 \pm 0,00	ND

*Valores de corte ($\mu\text{g/mL}$) para bifidobacterias según EFSA (2012): CM: 1; CL: 4; EM: 1; SM: 128; VA: 2; TC: 8. Las cepas INL1, INL2, INL4 e INL5 pertenecen a la especie *B. animalis* subsp. *lactis*, LM7a a *B. longum* y LM8a' a *B. dentium*.

Como ha sido previamente informado para los aislamientos del género *Bifidobacterium* (Ammor y col., 2008), las cepas estudiadas mostraron, en general, una elevada resistencia a estreptomicina y una marcada sensibilidad a antibióticos de amplio espectro (cloramfenicol) y de la familia de los macrólidos (eritromicina y vancomicina). Los valores de MIC detectados resultaron similares a los informados por Mättö y col. (2007), para cepas de la especie *B. animalis* subsp. *lactis*. En particular, para la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se evidenció una marcada resistencia a tetraciclina, indicando cierta diversidad entre los aislamientos. La resistencia a tetraciclina ha sido recientemente reportada como la resistencia a antibióticos más común dentro del género *Bifidobacterium* y ha sido ampliamente estudiada para miembros de la especie *B. animalis* subsp. *lactis*, mostrando, todas las cepas de esta especie estudiadas hasta el momento, un grado de resistencia medio hacia el mismo (Gueimonde y col., 2010). En este estudio la resistencia a tetraciclina también fue analizada para todos los aislamientos por el método de microdiluciones en caldo (Tabla 11), uno de los métodos recomendados en la guía de EFSA, y se corroboró la resistencia de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, además de detectarse también la

resistencia para *B. animalis* subsp. *lactis* INL2 (no detectada por el E-test[®]). Los determinantes genéticos más abundantes responsables de la resistencia a este antibiótico entre las bifidobacterias son genes *tet* que codifican para proteínas de protección ribosomal. Con el fin de garantizar la seguridad de estas cepas para una potencial inclusión en formulaciones alimentarias, debería probarse la presencia de determinantes genéticos de resistencia a estos y otros antibióticos, mediante ensayos de PCR con sondas específicas, para determinar la naturaleza de la resistencia, es decir, si se trata de una resistencia intrínseca o adquirida (EFSA, 2012).

Las propiedades superficiales de los microorganismos son importantes para su supervivencia ya que varios constituyentes superficiales son los encargados de mediar el contacto y la interacción con el medioambiente. En particular, la hidrofobicidad de la superficie celular tiene relevancia debido a que está involucrada en diversos procesos e interacciones de importancia fisiológica y tecnológica tales como las interacciones célula-célula, la adhesión de las bacterias a superficies sólidas y a los tejidos de su hospedador, la separación entre distintas fases y la resistencia a tratamientos específicos con solventes orgánicos o antibióticos (Shakirova y col., 2013). Además, la adhesión de las cepas probióticas a la superficie gastrointestinal es considerada un prerrequisito para la exclusión competitiva de patógenos, para la persistencia en el intestino y para la modulación de la respuesta inmune (Lee y Puong, 2002). Se ha propuesto que los principales mecanismos de adhesión se deben a interacciones específicas receptor-ligando y a interacciones no específicas entre grupos hidrofóbicos (Vinderola y col., 2004), siendo aún poco clara la importancia relativa de estos mecanismos. Los porcentajes de hidrofobicidad hallados en este trabajo para las cepas aisladas de leche materna se muestran en la Tabla 13. Si bien se observaron valores bajos y similares para todas las cepas, esto coincide con lo reportado para *B. animalis* subsp. *lactis* por otros autores (Mättö y col., 2004, Vinderola y Reinheimer, 2003). Del Re y col. (2000) analizaron la hidrofobicidad superficial y la capacidad de autoagregación para *B. longum* y hallaron no sólo una gran variabilidad de la hidrofobicidad entre cepas (en un rango de 20% a 70%), sino que además no pudieron establecer una interrelación entre los dos parámetros estudiados, para identificar

aislamientos potencialmente adherentes. Numerosos trabajos han propuesto la importancia de seleccionar cepas probióticas con altos niveles de hidrofobicidad para ampliar la posibilidad de que las mismas se adhieran a la pared intestinal y sean capaces de ejercer sus efectos benéficos. Sin embargo, aunque en algunos casos existe correlación, no siempre es posible establecer una relación directa entre hidrofobicidad, medida in vitro, y adhesión en ensayos con líneas celulares intestinales (Gueimonde y col., 2005). Muchas de las cepas probióticas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* utilizadas a nivel comercial en la actualidad y cuya funcionalidad ha sido comprobada, han mostrado valores cercanos al 20% de hidrofobicidad (Vinderola y Reinheimer, 2003), valores similares a los obtenidos en este trabajo. Por lo tanto, un alto valor de hidrofobicidad es siempre deseable en un nuevo aislamiento con vistas a su empleo como probiótico, sin embargo valores bajos de este parámetro no deberían ser motivo suficiente para la exclusión de la cepa como potencial candidata probiótica, sin tener en cuenta otros parámetros de funcionalidad.

Tabla 13: Caracterización probiótica in vitro de los aislamientos de bifidobacterias de leche materna: hidrofobicidad (H%), resistencia a la digestión gástrica simulada (DGS) y síntesis de derivados de CLA.

Cepa	H (%)	Resistencia a DGS (log UFC/mL)				Síntesis de biolípidos conjugados (% de conversión)	
		t ₀	90 min pH 2,0 + Pepsina	Shock de Bilis	Bilis + Pancreatina	t _{9t11} CLA	C18:3 n-5 CLNA
INL1	18,8±1,2 ^a	9,0±0,1 ^a	9,3±0,2 ^a	8,9±0,4 ^a	4,7±0,4 ^d	ND	ND
INL2	18,9±0,5 ^a	9,0±0,1 ^a	8,4±0,2 ^a	8,6±0,6 ^a	3,6±0,4 ^d	12,88	65,44
INL4	22,6±1,5 ^a	8,1±0,1 ^a	8,8±0,6 ^a	8,5±0,6 ^a	5,0±0,6 ^c	0,19	0,62
INL5	22,0±2,7 ^a	9,2±0,1 ^a	9,1±0,2 ^a	8,9±0,4 ^a	5,4±0,2 ^d	ND	ND
LM7a	18,4±0,4 ^a	9,0±0,1 ^a	8,7±0,1 ^a	8,8±0,1 ^a	8,6±0,1 ^b	14,14	16,30
LM8a'	3,7±0,2 ^b	8,9±0,1 ^a	6,2±0,6 ^c	5,7±0,1 ^c	5,5±0,1 ^c	12,88	0,71

ND = no disponible. Las cepas INL1, INL2, INL4 e INL5 pertenecen a *B. animalis* subsp. *lactis*, LM7a a *B. longum* y LM8a' a *B. dentium*. ^{a,b,c,d} Superíndices distintos indican diferencias significativas entre cepas para la hidrofobicidad (H%), mientras que para la resistencia a la DGS, valores en la misma línea con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,005$).

La resistencia al tránsito gastrointestinal es otro de los parámetros de selección in vitro para microorganismos con potencial empleo como probióticos. Los ensayos convencionalmente utilizados para determinar este parámetro involucran la medición de la sobrevivencia de las cepas en medio acidificado con HCl (pH entre 2 y 3 por lo general, según los diferentes autores), con NaCl, pepsina y el posterior empleo de sales biliares (Mainville y col., 2005). La determinación de la resistencia a la digestión pancreática es un parámetro mucho menos estudiado en comparación con el estudio de la resistencia gástrica y a sales biliares. Por otro lado, tampoco existe consenso científico internacional en relación a cuáles son las condiciones estandarizadas para el ensayo (naturaleza y concentración de sales y enzimas a utilizar y tiempos de exposición) (Burns y col., 2014). Ante este panorama aún incierto, es probable

entonces que actualmente los tests de resistencia gastrointestinal tengan más validez a la hora de discriminar entre cepas más y menos resistentes que para predecir la verdadera resistencia in vivo de un aislamiento. Como se observa en la Tabla 13, las cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* fueron capaces de resistir la simulación de la digestión gástrica (pH 2,0 + pepsina, 90 min) y el shock de bilis, observándose pérdidas de viabilidad celular menores a 1 orden logarítmico. La resistencia a la acidez ha sido reportada en trabajos previos para *B. animalis* subsp. *lactis*, siendo esta tolerancia producto de un aumento en la actividad de la bomba H⁺-ATPasa (Matsumoto y col., 2004). En un ensayo comparativo realizado por Mättö y col. (2006) también se observó para cultivos frescos de dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* una disminución ≤ 1 orden log. luego de 2 h a pH 2,0 + pepsina, mientras que en ausencia de pepsina los cultivos mostraron una gran susceptibilidad, por lo que la pepsina estaría cumpliendo un rol protector. Sin embargo, para otras especies del género *Bifidobacterium*, incluida una cepa de *B. longum*, el efecto protector de la pepsina no fue detectado y las cepas se mostraron altamente sensibles a pH ácidos, si bien en este estudio *B. longum* LM7a demostró ser altamente resistente. En cuanto a las sales biliares, estas son detergentes sintetizados en el hígado a partir del colesterol y secretadas a través de la vesícula biliar dentro del lumen del TGI. Ejercen varias funciones fisiológicas incluidas la absorción lipídica y la homeostasis del colesterol. Debido a que las sales biliares poseen una considerable actividad antimicrobiana a concentraciones fisiológicas, la resistencia a bilis es importante para la colonización y persistencia de los microorganismos intestinales y es por lo tanto uno de los criterios para la selección de nuevas bacterias probióticas (Grimm y col., 2014). Varios genes y proteínas que confieren resistencia a bilis, como hidrolasas y transportadores de sales biliares, han sido identificados y caracterizados in vitro para distintas cepas de bifidobacterias (Gueimonde y col., 2009), y en el caso de una cepa de *B. animalis* subsp. *lactis*, interesantemente también se halló que una ATPasa, en este caso de tipo F₁F₀, estaba involucrada en su resistencia (Sánchez y col., 2006). La exposición a pancreatina en cambio causó una reducción de 3 a 5 órdenes logarítmicos en los recuentos celulares de las cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* de leche materna, mientras que la cepa de *B. longum* mostró una marcada resistencia. Esta susceptibilidad a la pancreatina para las cepas de *B. animalis* subsp.

lactis se condice con los resultados obtenidos por Masco y col. (2007), donde un estudio reveló que las cepas pertenecientes a esta especie fueron las que mostraron menor tolerancia hacia esta enzima pancreática, en un estudio comparativo entre miembros del género *Bifidobacterium*, tanto de referencia como aislados de productos probióticos comerciales, mientras que se observó una resistencia cepa-dependiente para el caso de *B. longum*.

Los términos ácido linoleico y linolénico conjugado (CLA y CLNA, respectivamente, según sus siglas en inglés) agrupan a una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (LA) y linolénico (LNA) con dobles enlaces en sus moléculas. A éstos lípidos bioactivos se les atribuye una amplia variedad de efectos beneficiosos para la salud, siendo el más importante de ellos el efecto anticarcinogénico del CLNA mientras que el CLA presenta propiedades inmunomoduladoras, anti-diabetógenas y contra la obesidad. Asimismo entre los 28 isómeros del CLA presentes en la naturaleza los dos de mayor importancia biológica son el c9,t11 y el t10,c12-CLA y por otro lado el c9,t11,c15-CLNA (van Nieuwenhove y col., 2012). Estos compuestos bioactivos se encuentran en la leche y diversos productos de consumo diario derivados de rumiantes siendo la principal fuente de ingesta para el hombre. Los mismos son generados como productos intermediarios durante los procesos de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados llevados a cabo por la acción de enzimas isomerasas de diferentes microorganismos presentes en el rumen. También se ha visto que pueden ser producidos *in vitro* por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos, diversas especies de lactobacilos, bifidobacterias y propionibacterias, lo que ha llevado a la búsqueda de cepas probióticas capaces de producir estos derivados a nivel intestinal y así incrementar los niveles de CLA y CLNA en el organismo. En este estudio, las 4 cepas de bifidobacterias evaluadas fueron capaces de crecer en presencia de ambos sustratos (LA y LNA) añadidos a la concentración de 500 µg/ml y de convertirlos a su forma conjugada luego de 48 h de incubación, determinados por cromatografía gaseosa. La producción de los distintos isómeros se muestra en la Tabla 13. La producción de isómeros y los porcentajes de conversión de ambos sustratos mostraron diferencias entre las distintas cepas de

bifidobacterias, encontrándose los rangos de conversión obtenidos entre 0,19% y 14% para CLA y el 0,6% y 65% para CLNA. Todas las cepas mostraron producción del isómero t9,t11 CLA como mayoritario, siendo un isómero con importantes propiedades biológicas demostradas (Ross y col., 2010, Russell y col., 2011). Sin embargo *B. animalis* subsp. *lactis* INL2 demostró los mayores porcentajes de producción tanto de CLA (12,88%) como de CLNA (65,44%), siendo LNA convertido a su forma conjugada de manera más eficiente que LA.

La capacidad de las bacterias benéficas de inhibir directamente el crecimiento y proliferación de microorganismos patógenos es considerado un mecanismo relacionado a la acción probiótica ya que confiere potencialmente al microorganismo inhibidor una ventaja sobre otros componentes de la microbiota intestinal (Ross y col., 2010). La actividad antimicrobiana in vitro de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fue estudiada mediante el método de doble capa agarizada y los resultados se muestran en la Tabla 14. Se evaluó la actividad inhibitoria sobre 15 cepas patogénicas, observándose la capacidad de la cepa de inhibir el crecimiento de 12 de ellas, incluidas bacterias patógenas Gram positivas y negativas, intracelulares y extracelulares, y formadores de esporas. Si bien in vitro, estos resultados resultan alentadores sobre la funcionalidad de esta bifidobacteria, particularmente para el potencial tratamiento o prevención de algunas enfermedades intestinales e infecciones causadas por dichos patógenos. También resulta interesante observar que para dos cepas de la misma especie y serotipo, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 tuvo un comportamiento diferencial, logrando inhibir el desarrollo de la cepa de colección (ATCC 14028) pero no así la cepa aislada en la Fundación Ezequiel Días (FUNED, Brasil). Esto refuerza una vez más el concepto que todos los efectos son cepa-dependiente y que cuando se habla de la caracterización funcional de un probiótico, no pueden generalizarse los resultados para una especie o género dado.

Tabla 14: Actividad antimicrobiana in vitro de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Microorganismo patógeno	Diámetro (mm) halo de inhibición (media ± SD)
Staphylococcus aureus ATCC 29313	29,92±0,66
Listeria monocytogenes ATCC 19115	IND
Micrococcus luteus ATCC 49732	18,01±2,19
Bacillus cereus ATCC 11778	36,87±1,82
Enterococcus faecalis ATCC 19433	IND
S. enterica ser. Typhimurium FUNED	IND
S. enterica ser. Typhimurium ATCC 14028	28,37±0,79
S. enterica ser. Typhi ATCC 19430	25,04±2,15
Citrobacter freundii ATCC 8090	43,09±1,20
Klebsiella oxytoca ATCC 49131	13,88±2,87
Proteus mirabilis ATCC 25933	33,09±4,16
Serratia marcescens ATCC 8100	13,87±6,71
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	29,21±7,57
E. coli ATCC 25922	27,16±5,19
Shigella sonnei ATCC 11060	27,47±5,26

IND = inhibición no detectada.

4.2. Evaluación preliminar de un modelo murino para el estudio de la influencia de prebióticos sobre el tránsito intestinal.

Para evaluar la influencia de inulina como agente modulador del tránsito intestinal se evaluaron diariamente 4 parámetros en heces: número total, peso seco, humedad y pH de las mismas. Si bien los animales tratados recibieron la inulina desde el día 1, los primeros dos días en las jaulas metabólicas no se consideraron para analizar el

comportamiento de los grupos sino que fueron tomados como días de aclimatación, debido al stress que puede producir en los animales el cambio de ambiente. El número limitado de jaulas (1 por grupo) y su limitada capacidad para albergar animales (máximo 3 ratones por jaula) no permitieron la aplicación de herramientas de estadística para comparar los resultados entre el grupo tratado y el control, por lo que estos resultados son exploratorios y una primera aproximación al fenómeno en estudio. Se observó aumento en el peso seco de las heces totales en el grupo que recibió inulina a partir del 4° día de administración (Fig. 30) y un aumento de la humedad de las mismas a partir del 5° día (Fig. 31), observándose diferencias aún 2 días después del reemplazo de inulina por agua (días 8 y 9).

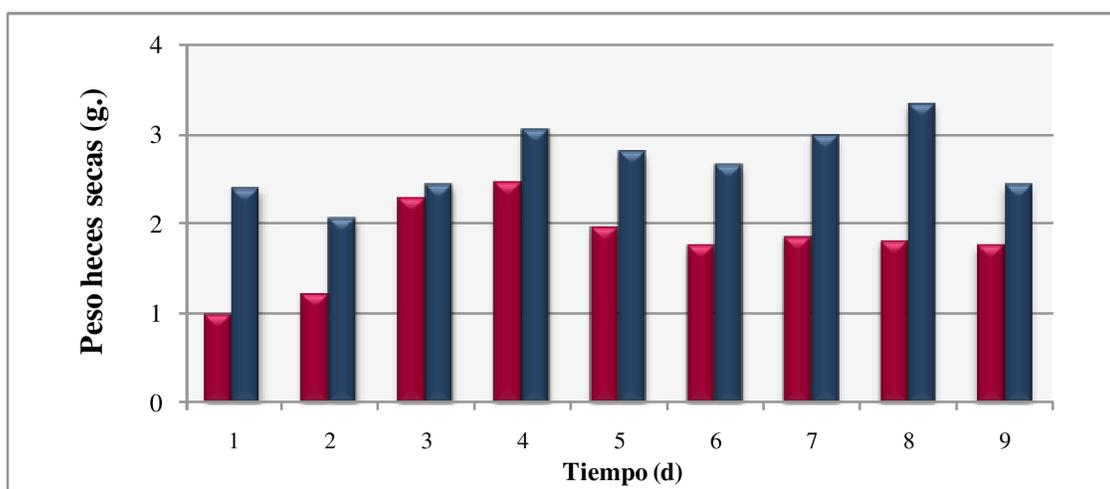


Figura 30: Peso total de heces secas de animales que recibieron ad libitum agua de red (grupo control, ■) o inulina 0,5% (p/v) (grupo tratado, ■) durante 7 días. En los días 8 y 9 todos los animales recibieron agua de red. (n=3 para cada grupo).

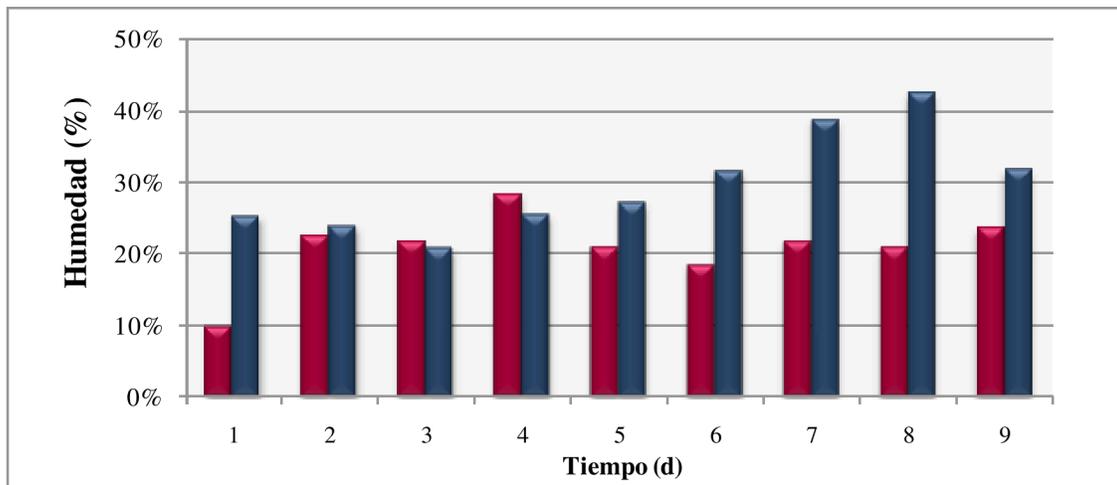


Figura 31: Contenido de agua (%) de heces de animales que recibieron ad libitum agua de red (grupo control, ■) o inulina 0,5% (p/v) (grupo tratado, ■) durante 7 días. En los días 8 y 9 todos los animales recibieron agua de red. (n=3 para cada grupo).

El número de heces (Fig. 30) fue mayor en los primeros días para el grupo tratado pero a partir del 6° día se observaron niveles similares en ambos grupos. Se observó además la formación de cúmulos de heces en el grupo que recibió inulina, debido probablemente al aumento en la humedad de las mismas. No se observaron diferencias en el pH de las heces a lo largo de la experiencia y los valores promedios para toda la experiencia fueron $6,76 \pm 0,04$ para el grupo control y $6,74 \pm 0,03$ para el grupo que recibió inulina.

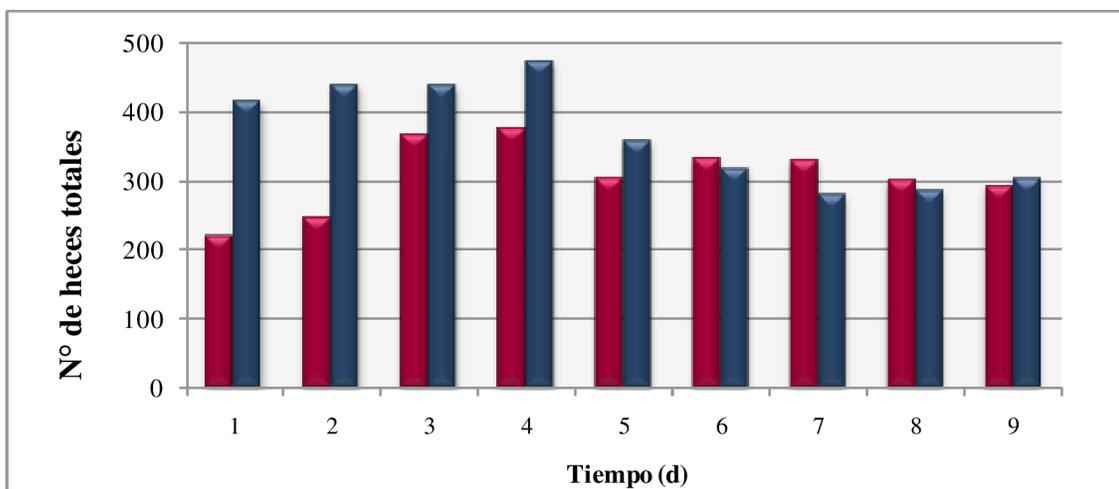


Figura 32: Número de heces totales de animales que recibieron ad libitum agua de red (grupo control, ■) o inulina 0,5% (p/v) (grupo tratado, ■) durante 7 días. En los días 8 y 9 todos los animales recibieron agua de red. (n=3 para cada grupo).

Al igualarse el número de heces manteniéndose la diferencia en el peso total, se concluye que se produjo un aumento en el tamaño y humedad de las heces de los animales tratados con inulina. Los resultados son alentadores en relación al empleo del ratón como modelo para el estudio de los efectos fisiológicos de sustancias prebióticas sobre parámetros relacionados a la modulación del tránsito intestinal.

4.3. Administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 e inulina en un modelo murino de tránsito intestinal.

Una de las características principales de los prebióticos es la capacidad de estimulación de grupos selectivos de microorganismos, entre ellos, las bifidobacterias (Huebner y col., 2008) integrantes de la microbiota intestinal. Los patrones de producción de ácidos orgánicos, gases y enzimas han sido utilizados como biomarcadores de la estimulación de diferentes géneros bacterianos, así como el crecimiento en medio selectivos o diferenciales de las bacterias recolectadas en las heces (Maisonneuve y col., 2002). Para analizar si se detectaba la presencia de la cepa administrada entre la microbiota fecal de los ratones que la recibieron, administrada sola o en presencia de inulina, se realizó semanalmente y durante 3 semanas el

monitoreo de las heces de cada grupo utilizándose un medio de cultivo diferencial para bifidobacterias. Cuando se plaquearon las heces de los animales que recibieron agua (C) o inulina (I), en este medio se observaron dos tipos de colonia, de tamaño mediano y chico, cremosas y de color blanco. La observación al microscopio de estas colonias determinó que se trataba en ambos casos de bacilos regulares, agrupados solos o de a pares. En los grupos que recibieron *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sola (grupo B) o con inulina (grupo B+I), se observó además un tercer tipo de colonia, del tipo puntiforme, con una coloración levemente celeste-grisácea en su superficie, diferente a la coloración de las de mayor tamaño. Al microscopio, se observaron bacilos cortos irregulares, con morfología presuntiva de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Los recuentos de bifidobacterias presuntivas se muestran en la Figura 33. En las primeras dos semanas se observaron niveles significativamente mayores para el grupo que recibió la bifidobacteria acompañada de inulina respecto al grupo que la recibió sola, mientras que en la semana 3 no se observaron diferencias entre grupos. Además, en ambos casos, dentro de cada grupo, los niveles fueron crecientes al aumentar el tiempo de administración en los primeras 2 semanas, mientras que en la tercer semana se observa una “estabilización” del número de bifidobacterias presuntivas en heces.

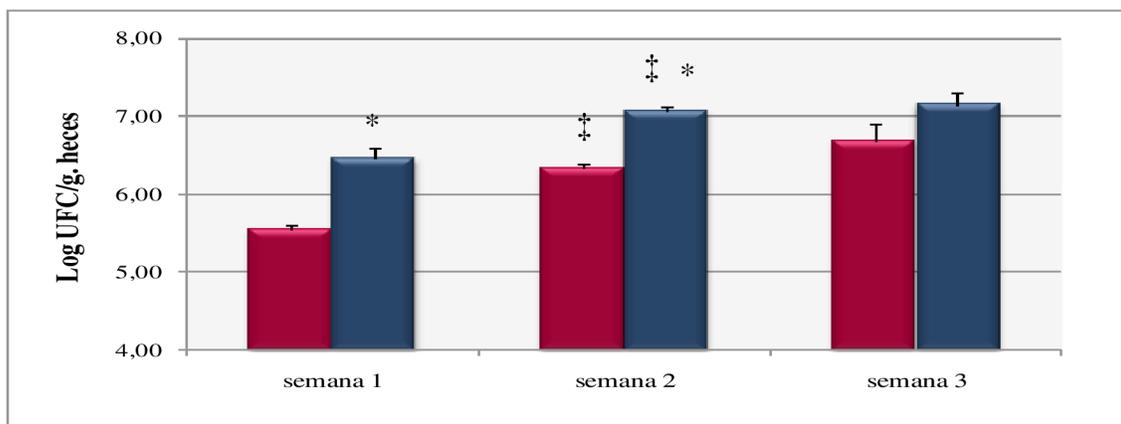


Figura 33: Recuentos de bifidobacterias presuntivas en heces de animales que recibieron *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sola (■) o junto a inulina 0,25% (p/v) (■). *Diferencias significativas entre grupos para el mismo tiempo de administración. ‡ Diferencias significativas dentro del mismo grupo, respecto a la semana previa; $p < 0,05$.

Una vez que atraviesan la parte superior del tracto gastrointestinal, los prebióticos sufren una fermentación selectiva por uno o por un número limitado de integrantes de la microbiota colónica, dando así a estos microorganismos ventajas en la proliferación y, en consecuencia, modificando su proporción y concentración en el intestino. De ahí la iniciativa de modificar, mediante la ingesta de alimentos funcionales que contienen prebióticos y probióticos, el patrón de la microbiota, promoviendo una composición saludable de la misma, y disminuyendo así el riesgo a enfermedades o malestares intestinales (Wendy y col., 2008). Los resultados obtenidos en este ensayo, demostrarían preliminarmente un efecto bifidogénico de la inulina sobre *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante el tránsito intestinal. Otra observación que surgió de este ensayo, si bien no se hicieron determinaciones analíticas, fue una notable modificación en el aspecto de las heces del grupo que recibió *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 junto a inulina. A simple vista se pudo inferir una diferencia en la humedad y tamaño de las heces a lo largo del ensayo, respecto a los otros tres grupos experimentales (Fig. 34).

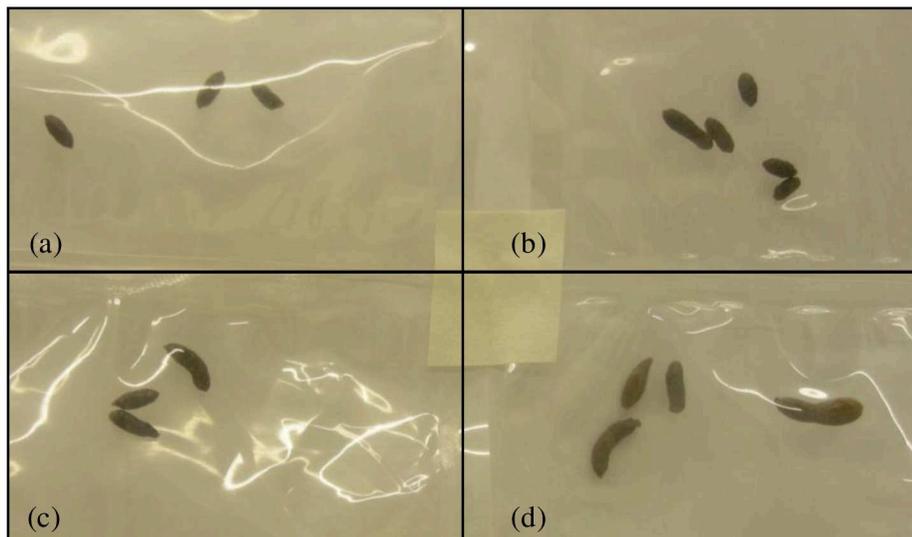


Figura 34: Heces de animales que recibieron agua (a), inulina (b), *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 o *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 + inulina (d).

5. Conclusiones parciales.

En este capítulo se estudiaron, en diferente grado, algunas propiedades funcionales de los aislamientos de bifidobacterias de leche materna. Se determinó su seguridad y funcionalidad mediante tests *in vitro* con resultados cepa dependiente. Se evaluó la resistencia a antibióticos y los valores observados concordaron con lo reportado en la bibliografía para este género bacteriano. Además se analizó la hidrofobicidad superficial y la resistencia a digestión gastrointestinal como medida de la interacción con el intestino y, en general, las cepas pertenecientes a las especies *B. animalis* subsp. *lactis* y *B. longum* demostraron alta resistencia a la simulación de la acidez gástrica y al shock de bilis. Estos resultados, sumado a la producción de sustancias bioactivas (conjugados de ácido linoleico y linoleico) por parte de algunos de los aislamientos y a la actividad inhibitoria frente a un amplio rango de patógenos por parte de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, posiciona a la leche materna como una fuente de bacterias con potencial probiótico.

También se realizaron estudios *in vivo* para analizar el efecto de una sustancia prebiótica y la influencia de su administración acompañada de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en la función intestinal. Los resultados, si bien preliminares, son alentadores en relación al empleo del ratón para el estudio de los efectos fisiológicos de sustancias prebióticas y probióticas en el tránsito intestinal. Se logró determinar en forma preliminar el efecto de la inulina en el tránsito intestinal, la cual modificó positivamente la humedad y calidad de las heces, y también cuando se la administró junto a *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Se demostró además la capacidad de la cepa de sobrevivir al tránsito intestinal *in vivo* en ratones (detección presuntiva en heces). El empleo de estos modelos, una vez completamente desarrollados y caracterizados en profundidad, resultaría prometedor ya que podría significar un ahorro considerable de tiempo y dinero permitiendo evaluar la utilidad de distintos prebióticos y/o combinaciones prebiótico-probiótico como paso previo a los ensayos realizados en humanos.

Capítulo IIIb

Capacidad inmunoestimuladora en intestino de B. animalis subsp. lactis INL1.

1. Introducción.

La IgA es la principal inmunoglobulina secretoria de las superficies mucosas y su producción es inducida fuertemente por la presencia de bacterias comensales. Las células dendríticas muestrean las bacterias intestinales e inducen una serie de etapas biológicas que conducen al cambio de isotipo a IgA de las células B en los tejidos linfoides asociados a la mucosa, principalmente los NLM y las placas de Peyer, a través de mecanismos T-independientes y T-dependientes. Las células B migran a través de los vasos linfáticos y luego a través del torrente sanguíneo, para volver a la mucosa intestinal, particularmente a la lámina propia, como células plasmáticas secretoras de IgA (Macpherson y col., 2012). La S-IgA es secretada y transcitosada al lumen donde se une a las bacterias de la microbiota limitando su acceso al epitelio, previniendo su translocación y regulando su composición (Salzman, 2011).

El estudio de la capacidad de cepas de bifidobacterias y bacterias lácticas de promover la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia o la IgA secretoria es una medida de su funcionalidad y las convierte en candidatas para emplearse como cultivos probióticos por la relación positiva entre IgA y las defensas naturales del intestino (Perdigón y col., 2005).

2. Objetivos.

En este capítulo se evaluó la capacidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 de modificar positivamente aspectos relacionados a la salud intestinal en un modelo in vivo. Los objetivos específicos propuestos fueron:

- 1) Determinar la capacidad de la cepa de estimular la respuesta inmune mucosa mediada por IgA luego de distintos períodos de administración, cuando la bacteria se administró como cultivo fresco.
- 2) Analizar si el perfil funcional de la cepa se modifica cuando ésta es sometida a tratamientos tecnológicos utilizados de rutina en la industria láctea como el secado spray, la liofilización y el congelamiento, y que suelen ser aplicados a los cultivos probióticos para su industrialización y comercialización.

3. Materiales y métodos.

3.1. Efecto inmunoestimulador de un cultivo fresco de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

3.1.1. Microorganismo.

Se utilizó *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, la cual fue administrada oralmente como cultivo fresco. La cepa fue reactivada a partir de un stock congelado en caldo MRS (Biokar) + L-cisteína 0,1% (p/v) (Biopack) y se realizaron dos repiques en caldo MRS (Biokar) (2% v/v) previo a su utilización. Los cultivos frescos (18 h) de las cepas en caldo MRS, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en leche descremada 10% (p/v).

3.1.2. Animales y alimentación.

Se utilizaron 20 ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad ($19,3 \pm 0,5$ g) provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET–UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se alojaron en cajas de plástico transparentes en grupos de 5 animales/jaula y se mantuvieron a 21 ± 1 °C, con una humedad de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los animales recibieron ad libitum alimento balanceado convencional (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de red y se aclimataron por un período de 7 días previos al ensayo en el bioterio de INLAIN. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH según sus siglas en inglés) y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Se administró la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 por intubación intragástrica (aprox. 2×10^8 UFC/día/animal) durante 3, 6 y 10 días consecutivos, como cultivo fresco. Como control se utilizó un grupo de animales intubados durante 10 días consecutivos con leche descremada estéril 10% (p/v).

3.1.3. Evaluación in vivo de la seguridad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

A lo largo de la experiencia se monitoreó el peso y el estatus sanitario de los animales mediante la observación del estado del pelaje, actividad, agresividad y comportamiento de grupo. Al final de cada período de alimentación, los animales fueron pesados, anestesiados intraperitonealmente con 0,2 mL/animal de un cocktail que contenía 9 partes de ketamina (100 mg/mL), 9 partes de xilacina (20 mg/mL) y 3 partes de acepromacina (10 mg/mL) en solución fisiológica estéril, y sacrificados por dislocación cervical. Los órganos fueron examinados macroscópicamente para detectar posibles cambios morfológicos y se registró el peso de los hígados. Para evaluar la eventual aparición de hepatomegalia, se estudió la relación peso del hígado/peso corporal (PH/PC) al momento del sacrificio. Para determinar la presencia o no de translocación bacteriana se realizaron homogenatos de los hígados en 5 mL de una solución de PBS estéril mediante el empleo de un homogeneizador rotatorio de tejidos. Se sembró 1 mL de los homogenatos en profundidad en agar ABRV (Britania, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y los resultados se expresaron como translocación bacteriana positiva o negativa. En condiciones normales el hígado es un órgano estéril.

3.1.4. Enumeración de células productoras de IgA.

Luego de la extracción de órganos para el ensayo de seguridad, se removieron porciones de intestino delgado y grueso, se fijaron en solución de formaldehído bufferado 4% (v/v), se deshidrataron en una serie de alcoholes de concentración creciente y xilenos y se incluyeron en parafina (Sainte-Marie, 1962). El número de células productoras de IgA (IgA⁺) se determinó en cortes histológicos de íleon (cerca de placas de Peyer) e intestino grueso mediante inmunofluorescencia directa, empleando un anticuerpo monoespecífico anti-cadena α de IgA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Matar y col., 2001). Los cortes fueron desparafinizados y rehidratados en una serie de concentraciones decrecientes de etanol (desde alcohol absoluto a alcohol 70°), y luego tratados con una dilución (1/100) del anticuerpo en PBS e incubados en oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Las muestras fueron lavadas dos veces en PBS y examinadas con un microscopio de

fluorescencia (Nikon Eclipse E200 equipado con lámpara de Hg). Se determinó el número de células fluorescentes (microscopía de fluorescencia, 40x) y los resultados se expresaron como número de células IgA⁺ (células fluorescentes)/10 campos observados. Los resultados se reportaron como el promedio de tres recuentos, cada uno en un corte histológico diferente, para cada animal.

3.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la funcionalidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

3.2.1. Microorganismo.

Se utilizó la cepa como cultivo fresco (CF), congelado a -70°C (Co), secado spray (S) o liofilizado (L). La suspensión celular para los animales que recibieron CF se preparó diariamente a partir de un cultivo overnight (18 h) de la cepa, lavado dos veces con solución PBS y resuspendido en leche descremada 20% (p/v). Para la preparación de los cultivos congelado (Co), secado spray (S) y liofilizado (L), cultivos frescos de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (pH libre, 18 h) en caldo MRS, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se resuspendieron (concentrándolos 10x) en leche descremada 20% (p/v). Las suspensiones celulares se alicuotaron, se congelaron y se almacenaron a -70°C (grupo Co), o se deshidrataron mediante secado spray (mini secadero spray Büchi modelo B-290, Flawil, Suiza), utilizándose una temperatura de entrada de aire constante de 160°C, una temperatura de salida de 83°C y un flujo de alimentación de 0,0075 L/min (grupo S), o bien se liofilizaron (grupo L) durante 24 h en un liofilizador de cámara simple (beta 2-16, Christ, Osterode, Alemania) bajo las mismas condiciones utilizadas en el capítulo IIa (-15°C, 0,37 mbar; +25°C).

3.2.2. Animales y alimentación.

Se utilizaron 40 ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad (19,8 ± 0,4 g) provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET – UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Los animales se

alojaron en cajas de plástico transparentes en grupos de 5 animales/jaula y se mantuvieron a 21 ± 1 °C, con una humedad de $55\pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los animales recibieron ad libitum alimento balanceado convencional (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua de red y se aclimataron por un período de 7 días previos al ensayo en el bioterio de INLAIN. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Se administró *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 por intubación intragástrica (aprox. 1×10^9 UFC/día/animal) durante 10 días consecutivos, como cultivo fresco (CF), cultivo almacenado congelado a -70°C (Co), cultivo secado spray (S) o cultivo liofilizado (L). Como control se utilizó un grupo de animales intubados durante 10 días consecutivos con leche estéril 20% (p/v).

3.2.3. Cuantificación de IgA secretoria en contenido intestinal y enumeración de células productoras de IgA.

Al final del período de alimentación, los animales fueron pesados, anestesiados intraperitonealmente con un cocktail de ketamina/xilacina/acepromacina y sacrificados por dislocación cervical. Se recuperó todo el contenido de intestino delgado (desde el duodeno al íleon distal), lavando con 5 mL de PBS suplementado con 20 μL de un cocktail inhibidor de proteasas (P8340, Sigma, St Louis, MO, USA). Luego de centrifugarse ($2000 \times g$, 30 min, 4°C) se recogió el sobrenadante y se congeló a -70°C hasta el momento de su uso. La concentración de IgA secretoria total (S-IgA) se determinó por ELISA de captura según Rodrigues y col. (2000) utilizándose un anticuerpo anti-IgA de ratón obtenido en cabra (M-8769, Sigma). Las porciones distales del intestino delgado lavado y el intestino grueso se sometieron a fijación y preparación histológica para su inclusión en parafina según Vinderola y col. (2005). El número de células productoras de IgA (IgA^+) se determinó en cortes histológicos de muestras de íleon e intestino grueso mediante inmunofluorescencia directa, como se detalla en el inciso 2.1.4.

3.2.4. Determinación de IL-10.

Porciones de intestino delgado y grueso (120-170 mg) se almacenaron congeladas (-70°C) hasta el momento de su procesamiento, para la determinación de citoquinas. Las muestras fueron homogeneizadas (Ultra Turrax T8, Ika Labortechnik, Staufen, Alemania) en PBS conteniendo 1% de un cocktail de inhibidor de proteasas (Sigma), EDTA 10 mmol/L (Sigma) y Tween 20 0,05% (v/v) (Sigma) en una proporción de 1 mL PBS:100 mg tejido. Los homogenatos fueron luego centrifugados (10 min, 10000 rpm, 4°C) y los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -70°C para la cuantificación de IL-10 por ELISA, utilizándose anticuerpos comerciales (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), y de acuerdo a los procedimientos suministrados por el fabricante.

3.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos se analizaron utilizando un test ANOVA y las diferencias entre medias se detectaron mediante un test de rango múltiple de Duncan para el ensayo del efecto inmunomodulador del cultivo fresco de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 y mediante un test t unilateral para comparar cada grupo tratado con el control para el ensayo de efecto de los tratamientos tecnológicos. El nivel de significancia estadística se estableció en 0,05.

4. Resultados y discusión.

4.1. Efecto inmunoestimulador de un cultivo fresco de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

La realización de estudios in vivo para evaluar la seguridad y funcionalidad de nuevos aislamientos de potenciales probióticos para consumo humano en un prerrequisito (FAO/WHO, 2002) para el desarrollo de alimentos funcionales o suplementos farmacéuticos. Si consideramos que las cepas aisladas de leche materna son parte de la microbiota que las madres transfieren naturalmente a sus hijos durante los primeros días de vida para contribuir a la maduración del sistema inmune del tracto gastrointestinal, es probable que estas cepas sean moduladoras de la función inmune intestinal, una característica deseable para las bacterias probióticas (Vinderola y col., 2004, Maldonado Galdeano y col., 2007). Diferentes cepas del género *Bifidobacterium* son consideradas benéficas para humanos. En particular *B. animalis* subsp. *lactis* es la especie más comúnmente utilizada en productos funcionales y numerosos efectos benéficos, entre ellos la reducción del riesgo de diarrea en niños, han sido atribuidos a ciertas cepas de esta especie (Gueimonde y col., 2010).

La administración oral de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 no indujo efectos colaterales indeseables. Los animales mostraron comportamiento y actividad normal, mientras que el estado del pelaje (suave, no erizado) y el estado de salud general no se vieron alterados. No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales al momento del sacrificio: $19,9 \pm 0,5$ g para el grupo control vs. $20,2 \pm 0,2$ g, $20,1 \pm 0,5$ g y $19,8 \pm 0,4$ g (promedio \pm SEM) para los grupos que recibieron el cultivo fresco durante 3, 6 y 10 días, respectivamente. La examinación macroscópica de los órganos internos al momento del sacrificio no reveló diferencias evidentes en el tamaño, color y la morfología de los mismos y particularmente, con respecto al hígado, no se observaron diferencias significativas en el parámetro peso hígado/peso corporal (PH/PC) (0,6 para el control vs. 0,5, 0,6 y 0,5 para los grupos que recibieron el cultivo fresco durante 3, 6 y 10 días), lo que confirma la ausencia de hepatomegalia. No se observó translocación de enterobacterias a hígado (el ensayo de translocación fue negativo en todos los

casos). Este ensayo en ratones es comúnmente requerido como parámetro para evaluar la seguridad de nuevas cepas que quieren ser utilizadas en humanos, aún si pertenecen a especies consideradas como seguras.

En relación a las propiedades probióticas de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, se cuantificó el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado y grueso por inmunofluorescencia directa y se observó un aumento significativo en todos los grupos que recibieron *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. (Fig. 35). Este aumento fue entre 35% y 45% sobre el valor correspondiente al grupo control para todos los períodos de alimentación, excepto en intestino delgado del grupo que recibió *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días, que mostró un aumento de aproximadamente un 71% sobre el valor del grupo control.

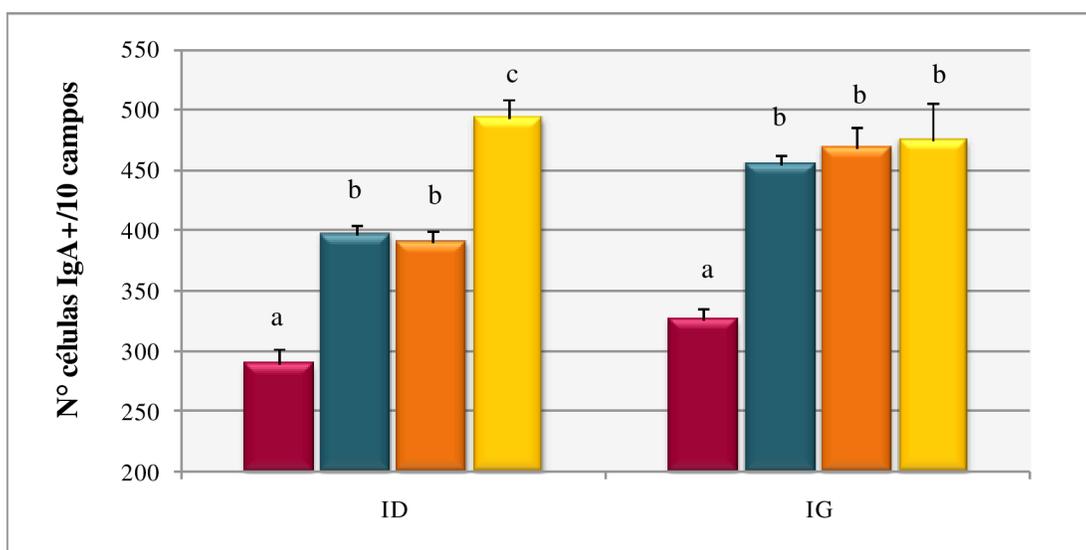


Figura 35: Efecto de la administración oral de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco durante 3 (■), 6 (■) o 10 (■) días consecutivos en el número de células productoras de IgA (IgA^+) en lámina propia de intestino delgado (ID) y grueso (IG) de ratones BALB/c, comparado con ratones control (■). Valores promedio \pm SEM. ^{a,b,c} Las columnas con superíndices distintos (para el mismo órgano) son significativamente diferentes ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,005$ para a, b y c, respectivamente) respecto al control correspondiente.

4.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la funcionalidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Se observó un aumento significativo en el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado cuando se administró *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco ($p = 0,004$) y como cultivo secado spray ($p = 0,019$) durante 10 días (Fig. 36), mientras que no se observó modificación en este parámetro cuando se administró la cepa liofilizada o congelada a -70°C . A diferencia de lo observado en el ensayo anterior, no se observaron diferencias en el número de células IgA^{+} a nivel de intestino grueso para ninguno de los grupos tratados respecto al control, si bien se observó una tendencia a estar aumentado en el grupo S (valores no mostrados).

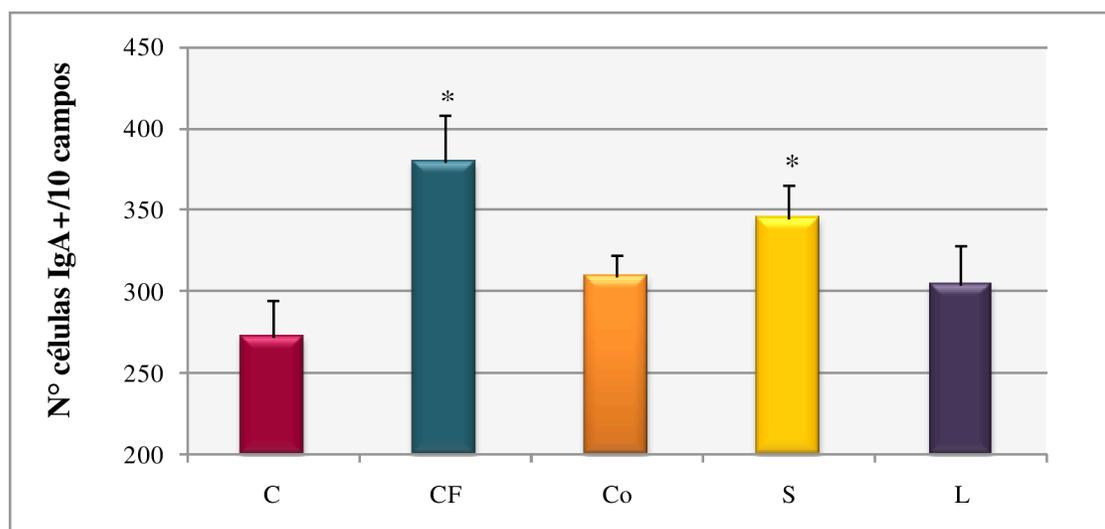


Figura 36: Efecto de la administración oral de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en el número de células productoras de IgA (IgA^{+}) en lámina propia de intestino delgado (inmunohistoquímica). La cepa fue administrada como cultivo fresco (CF), congelado a -70°C (Co), secado spray (S) o liofilizado (L) durante 10 días (aprox. 10^9 UFC/ratón/día), respecto al control (C). Valores promedio \pm SEM. *Diferencia significativa para $p < 0,05$.

También se determinó la concentración de IgA secretoria total (ELISA) (Fig. 37) en contenido de intestino delgado. La función principal de la IgA en el intestino es ejercer la exclusión inmune de patógenos y proteínas extrañas mediante una

cooperación íntima con los mecanismos de inmunidad innata no específicos (Macpherson y col., 2001) y un aumento en sus niveles es una característica deseada en los microorganismos probióticos. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados y control para los niveles de S-IgA.

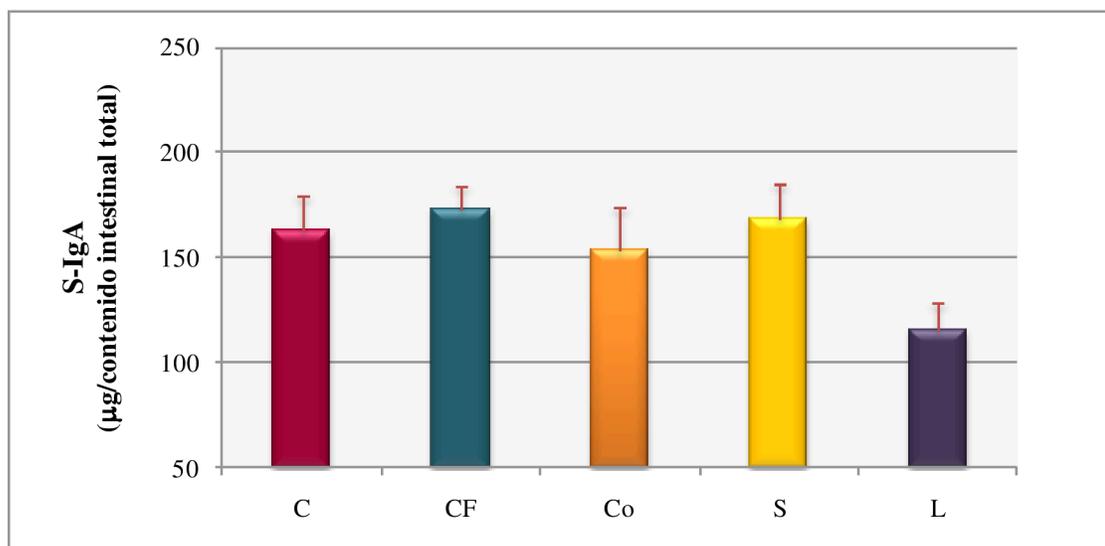


Figura 37: Efecto de la administración oral de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en la concentración de IgA secretoria (S-IgA) total en contenido de intestino delgado (ELISA). La cepa fue administrada como cultivo fresco (CF), congelado a -70°C (Co), secado spray (S) o liofilizado (L) durante 10 días (aprox. 10^9 UFC/ratón/día), respecto al control (C). Valores promedio \pm SEM.

La IL-10 es una de las citoquinas más frecuentemente analizadas cuando se estudia el perfil inmunomodulador de una cepa probiótica, ya que si bien muchas veces se la considera anti-inflamatoria (de Kivit y col., 2014), en realidad se trata de una citoquina reguladora que puede ser producida por distintas células inmunológicas como las células Treg y conducir, no a una respuesta inmune humoral o celular, sino al desarrollo de tolerancia oral (Johansson y col., 2012, Rescigno y col., 2013). Cuando se analizaron los niveles de IL-10 en homogenatos de intestino delgado e intestino grueso, se observó un aumento significativo ($p = 0,015$) para el grupo de animales que recibió la bifidobacteria liofilizada (Fig. 38) y una tendencia a estar aumentada en el grupo que la recibió congelada, a nivel de IG, aunque no significativa.

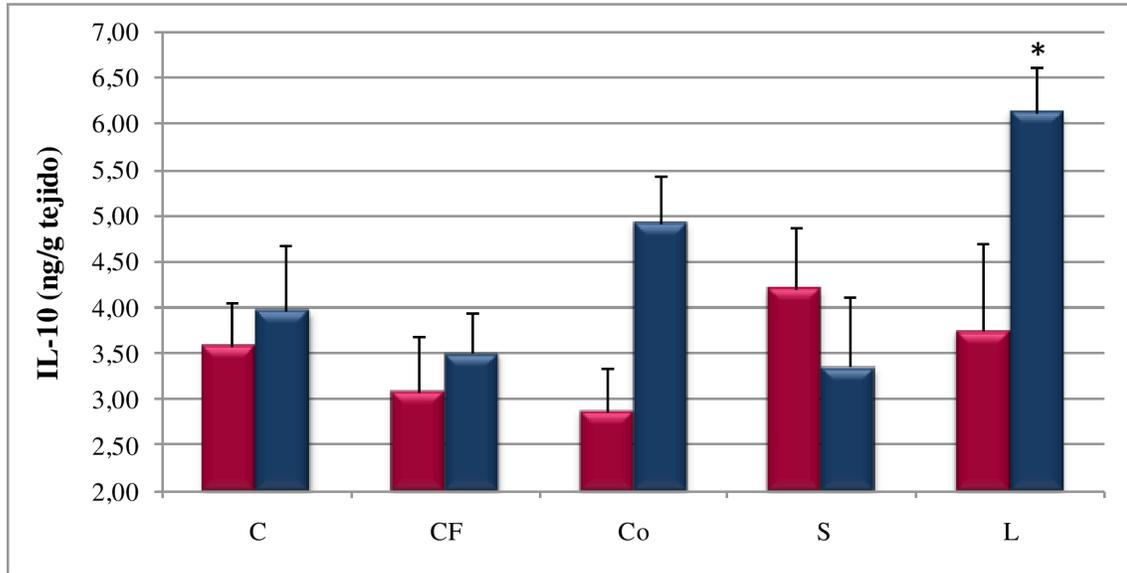


Figura 38: Efecto de la administración oral de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en la concentración de IL-10 en homogenatos de intestino delgado (■) y grueso (■) (ELISA). La cepa fue administrada como cultivo fresco (CF), congelado a -70°C (Co), secado spray (S) o liofilizado (L) durante 10 días (aprox. 10^9 UFC/ratón/día), respecto al control (C). Valores promedio \pm SEM. * Diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control del mismo órgano.

En esta parte del trabajo, la cepa fue administrada a ratones BALB/c en dos ensayos independientes. En el primero se observó proliferación de células productoras de IgA tanto en intestino delgado e intestino grueso cuando se administró como cultivo fresco. Sin embargo, estos resultados no se reprodujeron a nivel de intestino grueso cuando se administró el cultivo fresco en el segundo ensayo, lo que indica la variabilidad muchas veces observadas en estudios in vivo en animales y que puede estar ligada a factores intrínsecos del animal (partidas diferentes) o a factores externos no totalmente controlados. En relación a los efectos tecnológicos, se observó inducción de la proliferación de células productoras de IgA cuando se administró el cultivo fresco y secado spray, sin embargo no se observó este fenómeno en los cultivos congelados y liofilizados, que sí mostraron niveles aumentados o una tendencia a aumentar respecto al control, de la citoquina regulatoria IL-10. Es de interés remarcar que ambos procesos

comparten una etapa en común que es el congelamiento, el cual podría ser responsable, al menos en parte, de estos resultados, sin disponer al momento de una hipótesis que pueda explicar estas observaciones. En este sentido, Sousa y col. (2015) describieron diferentes sensibilidades a la digestión gástrica simulada de algunas cepas probióticas almacenadas congeladas, tanto libres como microencapsuladas, respecto a sus cultivos no congelados. Esto podría indicar que el proceso de congelamiento puede afectar la funcionalidad de un cultivo, aunque esto no se evidencie en la viabilidad del mismo. Cuando se analizó la inducción de la citoquina reguladora IL-10 en intestino delgado y grueso, se observó un aumento significativo sólo para el grupo que recibió *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo liofilizado. Existe una gran variabilidad en la respuesta de citoquinas inducidas por distintas cepas probióticas si bien aquellas que aumenten los niveles de citoquinas regulatorias como la IL-10 son preferidas por su potencial antiinflamatorio (Saxelin y col., 2005). Hart y col. (2004) observaron un aumento en los niveles de IL-10 que inhibió la generación de células Th1 cuando se administró el suplemento probiótico comercial VSL#3 compuesto por 8 cepas probióticas, y que este efecto se debió principalmente a las cepas de bifidobacterias presentes en el mismo. Por otro lado, recientemente Jeon y col. (2012) observaron un aumento de esta interleuquina a nivel de colon cuando se administró una cepa probiótica de *B. breve*. Sin embargo, no todas las cepas probióticas comerciales inducen la secreción de esta citoquina, o al menos los resultados no son concluyentes, como en el caso de la cepa probiótica más ampliamente estudiada clínicamente en el mundo, *Lactobacillus rhamnosus* GG (Kekkonen y col., 2008).

El conjunto de los resultados demuestra la importancia del estudio de cepas probióticas en los formatos tecnológicos en las cuales podrían llegar al mercado para el desarrollo de alimentos funcionales. Estudios previos han mostrado que la misma cepa probiótica, producida y/o preservada bajo diferentes condiciones de almacenamiento, puede presentar diferentes respuestas en relación a su susceptibilidad a las condiciones adversas del TGI, su capacidad de adherirse al epitelio intestinal o su capacidad inmunoestimuladora, modificándose su funcionalidad aunque se mantenga su viabilidad (Saarela y col., 2009, Vinderola y col., 2012). Si bien un aumento en los

niveles lumbales de S-IgA o la inducción de IL-10 es deseado, estos resultados no resultan desalentadores respecto a la funcionalidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. El enorme número de células de la inmunidad innata y adaptativa que residen junto a la aún más poblada microbiota comensal, hacen que el tracto gastrointestinal utilice mecanismos regulatorios, para conservar la homeostasis de su sistema inmune (Peterson y Artis, 2014). Además, podrían poner en evidencia la dependencia de los resultados con el modelo in vivo seleccionado para evaluar la funcionalidad de las cepas, debido a la siguiente observación: en un ensayo in vivo pero realizado con ratones de la cepa Swiss (de la misma edad y sexo que los ratones utilizados en este ensayo) se administró durante 10 días *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (aprox. 10^8 UFC/día/ratón) como cultivo fresco, secado spray y liofilizado. En este ensayo, realizado en el marco del proyecto de cooperación MINCyT-CAPES que se mencionó en el capítulo IIIa, se observó que los tratamientos tecnológicos aplicados no modificaron la capacidad de la cepa de inducir la secreción de IgA al lumen intestinal y la administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 indujo un aumento significativo en los niveles de S-IgA total en contenido intestinal respecto al control, tanto para el cultivo fresco como para los cultivos deshidratados (secado spray y liofilizado) (los resultados de este ensayo se muestran en el capítulo IIIc, sección 3.3).

5. Conclusiones parciales.

La cepa aislada de leche materna, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, demostró ser segura y no poseer propiedades invasivas (el ensayo de translocación resultó negativo en la totalidad de los animales). Además, cuando fue administrada oralmente a ratones BALB/c, como cultivo fresco y durante distintos períodos de administración, demostró tener la capacidad de aumentar el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado y grueso.

Cuando la cepa fue sometida a tratamientos tecnológicos la funcionalidad de la misma resultó modificada. La capacidad inmunomoduladora mediada por el aumento de células productoras de IgA observada para los cultivos frescos sólo se mantuvo en los animales que recibieron el cultivo secado spray, y a nivel de intestino delgado. Asimismo, no fue posible observar cambios en los niveles de IgA secretoria en contenido intestinal para ninguna de las formas de administración de la bifidobacteria. Los cultivos liofilizados y congelados de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 no fueron capaces de modificar el número de células productoras de IgA, en la dosis y período de administración estudiados, pero sí indujeron un aumento o una tendencia a aumentar la citoquina regulatoria IL-10 a nivel de intestino grueso, respectivamente. Estos resultados en su conjunto ponen de manifiesto la importancia de conducir estudios funcionales con el cultivo en el formato tecnológico o en la matriz en la que se va a vehicular la cepa.

La inducción de un aumento en el número de células productoras de IgA o en los niveles de IL-10, mediada por la administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, plantea que esta pueda ser considerada una bacteria potencialmente probiótica capaz de estimular la función inmune en el intestino.

Capítulo IIIc

**Protección de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1
frente a un modelo de salmonelosis.**

1. Introducción.

1.1. Salmonella: taxonomía y características generales.

El género *Salmonella* forma parte de la familia Enterobacteriaceae y está integrado por bacilos intracelulares Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son microorganismos fermentadores de glucosa, catalasa positivos, oxidasa negativos y suelen ser móviles. Tienen una muy importante homología general de su ADN, por lo que el género *Salmonella* está compuesto sólo de dos especies distintas: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se divide en seis subespecies, las cuales se diferencian bioquímicamente. Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura (Vi para *Salmonella*). Las seis subespecies de *Salmonella enterica* se clasifican en más de 50 serogrupos basado en el antígeno O, y se dividen en más de 2400 serotipos basado en el antígeno H (de Jong y col., 2012). La nomenclatura para *Salmonella* ha evolucionado con el tiempo y hasta el día de hoy el debate sobre cómo nombrar los distintos serotipos continúa (Brenner y col., 2000). El “Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Referencia e Investigación en *Salmonella*” recomienda unificar la nomenclatura de manera que, por ejemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* sea abreviada como *S. enterica* serovar *Typhimurium* o *Salmonella* ser. *Typhimurium* (Grimont y Weill, 2007), si bien en la literatura aún existe una gran variedad de nomenclaturas.

1.2. Salmonella: mecanismo de infección.

Salmonella enterica puede invadir un gran espectro de hospedadores causando tanto infecciones agudas como crónicas a través de su habilidad de replicarse y persistir tanto dentro de las células epiteliales no fagocíticas como fagocíticas (células dendríticas, neutrófilos y macrófagos) del sistema inmune innato del hospedador (Hurley y col., 2014). La infección con el patógeno generalmente se origina por el consumo de alimentos contaminados. Una vez ingerida, *Salmonella* se propaga

rápidamente a lo largo del tracto gastrointestinal y penetra la mucosa a través de tres rutas: (i) invasión preferencial de las células M (células epiteliales especializadas) ubicadas en los domos de las placas de Peyer o rodeando tejidos linfoides intestinales, (ii) invasión activa de enterocitos, y (iii) a través de las células dendríticas que se intercalan con las células epiteliales, extendiendo sus dendritas dentro del lumen intestinal (Pontier-Bres y col., 2014). Durante las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria, neutrófilos y macrófagos son reclutados al sitio de infección siguiendo señales de citoquinas específicas. Los neutrófilos fagocitan los patógenos invasores y los inactivan intracelularmente. Similarmente, los macrófagos y monocitos también funcionan fagocitando e inactivando los patógenos a nivel intracelular, y además son capaces de inactivar células propias infectadas e inducir reacciones inmunes en cascada a través de la presentación de antígenos superficiales, para señalar y reclutar otros tipos celulares. Una característica común de la salmonelosis es una marcada respuesta inflamatoria desencadenada por el sistema inmune innato del hospedador (Hurley y col., 2014). Salmonella ha evolucionado junto a la respuesta innata y cuenta con mecanismos de virulencia para aprovechar la respuesta inflamatoria a su favor y en detrimento de otros microorganismos con los que compete en el lumen intestinal. Es así que, si bien los neutrófilos representan un grupo crucial de leucocitos necesarios para defender al hospedador en las etapas tempranas luego de la infección, sus mecanismos no específicos pueden llevar al daño tisular y, cuando este es excesivo, contribuye a la patología de la enfermedad (Agbor y col., 2014). La presencia de daño inflamatorio no se localiza exclusivamente en el intestino. En ratones, por ejemplo, la respuesta a una infección con Salmonella ser. Typhimurium usualmente está marcada por una infiltración moderada de la mucosa intestinal y una marcada infección sistémica asociada con lesiones en hígado y bazo (Santos, 2014).

Los mecanismos de inmunidad específica y particularmente la relevancia de la inmunidad mediada por células versus la inmunidad humoral es aún discutida. El debate es complejo por los intentos de comparar diferentes modelos experimentales en los cuales varía la ruta de entrada de Salmonella y/o la susceptibilidad de distintas cepas de ratones. Sin embargo, otra característica observada de la respuesta inmune

contra *Salmonella* es la producción de interferón gamma (IFN- γ) por parte de las células natural killer (NK) en los primeros estadios de la infección, y por parte de células Th1 y Th2 en etapas posteriores (Spees y col., 2014). Además, los macrófagos activados también producen citoquinas como IL-18 e IL-12, las cuales desencadenan la producción dependiente de IFN- γ de células Th1 específicas (Patel y Mc Cormick, 2014). Por último, también se ha descrito el efecto de la IgA secretoria en la infección con *Salmonella*. Evidencia reciente ha mostrado su función neutralizando al patógeno, uniéndose por ejemplo a componentes de los LPS de la membrana bacteriana y, debido a que no activa respuesta inflamatoria, previniendo de este modo el daño inducido por inflamación del epitelio mucoso (Patel y Mc Cormick, 2014).

1.3. Salmonelosis.

Salmonella presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedador. Mientras algunos serotipos son capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies hospedadoras, otros serotipos sí son específicos como *S. enterica* serovar Typhi en el caso del hombre, que causa fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica severa responsable de aproximadamente 21 millones de casos de infección por año en el mundo. La infección con *Salmonella* o la enfermedad asociada con ella, salmonelosis, es a menudo caracterizada por una enteritis. Sin embargo, algunos serotipos restringidos a hospedadores específicos tienden a inducir altos niveles de bacterias en sangre, mientras que otros serotipos restringidos al ser humano causan una enfermedad sistémica con síntomas entéricos leves. Por lo general, las salmonelosis humanas se clasifican en dos grandes grupos según si son causadas por los serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoideos (bacteremia), o si son causadas por serotipos ubicuos también denominados serotipos de *Salmonella* no tifoideos (NTS de su sigla en inglés), que provocan diarrea, vómitos y fiebre. Todas las infecciones en animales de sangre caliente y en el ser humano son causados por la especie *Salmonella enterica*, principalmente *S. enterica* subsp. *enterica* (Santos, 2014). En el ser humano, los grupos con mayor riesgo de enfermedad severa y

muerte por infección con *Salmonella* son las personas mayores, las personas inmunosuprimidas y los niños, en especial aquellos menores de 12 meses. Aunque la salmonelosis en adultos y niños mayores está asociada con el consumo de alimentos contaminados, el contacto con mascotas o viajes recientes a países en vías de desarrollo, los factores de riesgo para la salmonelosis en bebés son menos claros. Estudios recientes que incluyeron bebés han sugerido que el amamantamiento está asociado con una disminución en el riesgo de salmonelosis (Rowe y col., 2004).

1.4. Modelos de salmonelosis y probióticos: antecedentes.

Entre los beneficios saludables del consumo de probióticos, aquellos relacionados a una mejora de la salud gastrointestinal son los más reconocidos (Foligné y col., 2013), incluyendo la prevención o mejora en la recuperación de distintos tipos de diarrea o inflamación intestinal. Es muy importante notar que el Panel en Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA según su sigla en inglés) estableció que la mayoría de las afirmaciones atribuidas a los probióticos fueron consideradas como (posiblemente) benéficas para la salud humana, en particular aquellos efectos relacionados a la salud intestinal (Binnendijk y Rijkers, 2013). Se han establecido modelos murinos de salmonelosis para estudiar la patogénesis de la fiebre tifoidea, utilizándose distintas cepas de una especie estrechamente relacionada, *S. enterica* serovar Typhimurium (Watson y Holden, 2010). El modelo murino es ampliamente utilizado no sólo para estudiar los mecanismos de la patogénesis (Mastroeni y Sheppard, 2004), sino también para estudiar la capacidad de bacterias probióticas en la prevención o tratamiento de infecciones entéricas causadas por *Salmonella* (Gill y col., 2001, Truusalu y col., 2008, Castillo y col., 2011). El amplio rango de virulencia entre distintas cepas de *S. enterica* presentes en la naturaleza (Heithoff y col., 2012) explicaría el amplio rango de dosis infectivas reportadas en ratones (10^5 a 10^{10} UFC/ratón) (Suitso y col., 2010). También se ha informado que la infección depende de las cepas de ratón y *Salmonella* utilizadas.

2. Objetivos.

Las recomendaciones de la guía FAO/WHO requieren estudios preclínicos en animales en modelos apropiados, sumado a los posibles efectos positivos de los probióticos reconocidos por EFSA. Teniendo en cuenta los resultados previos en cuanto a la capacidad inhibitoria in vitro de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 sobre *Salmonella enterica* y la capacidad de promoción de IgA, el objetivo de este capítulo fue estudiar la capacidad protectora de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en un modelo de infección intestinal por *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Parte de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología y Fisiología de Microorganismos (LEFM) del Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) (Belo Horizonte, Brasil), bajo la dirección del Dr. Jacques Nicoli y la orientación de la histopatóloga Dra. Denise Carmona del Laboratorio de Morfología del ICB de la UFMG. Los objetivos específicos planteados fueron:

- 1) Analizar el efecto protector de una dosis determinada de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en un modelo de salmonelosis con ratones Swiss, mediante un análisis histopatológico, estudiando la presencia de daño inflamatorio en íleon e hígado.
- 2) Comparar la efectividad de la cepa en estudio en forma de cultivo fresco, secado spray o liofilizado y analizar el comportamiento de dos parámetros inmunes: concentración de IgA secretoria y de IFN- γ en contenido intestinal.
- 3) Analizar el efecto protector de la cepa en un modelo de salmonelosis con ratones BALB/c, ajustando las condiciones de infección y dosis de la bifidobacteria.
- 4) Comparar el efecto de la administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 de forma preventiva y preventiva-terapéutica (pre y pre y post-desafío con el patógeno).

3. Materiales y métodos.

3.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento.

Previo a su uso, la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fue cultivada al menos tres veces en caldo MRS suplementado con 0,1% (p/v) de hidrocloreuro de L-cisteína (18 h, 37°C, anaerobiosis). *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium FUNED, una cepa de origen humano aislada en la Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) fue generosamente cedida por el Dr. Jacques Nicoli (ICB, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil). La cepa de *Salmonella* se mantuvo congelada a -70°C en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI según su sigla en inglés) adicionada con 20 % (v/v) de glicerol y fue reactivada (18 h, 37°C, incubación aeróbica) en caldo BHI, directamente desde un stock congelado, para los estudios de infección.

3.2. Evaluación del efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en ratones convencionales Swiss.

3.2.1. Animales y alimentación.

Se utilizaron veinticuatro ratones convencionales Swiss (6 semanas; peso entre 18-20 g) derivados de una colonia de ratones NIH Swiss libres de gérmenes, que se colonizaron por contacto con animales convencionales, de la colonia cerrada del Laboratorio de Ecología y Fisiología de Microorganismos (LEFM) de la Universidad Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil), y fueron divididos en cuatro grupos denominados grupos control (C), cultivo fresco (CF), secado spray (S) y liofilizado (L). Cada grupo estuvo conformado por 4 ratones machos y 2 ratones hembras, debido a la disponibilidad de animales de la colonia cerrada del instituto. Todos los animales tuvieron un período de adaptación de una semana en el bioterio antes de comenzar con los ensayos y fueron agrupados de a 2 o 4 animales por jaula, en condiciones ambientales controladas a 21±2°C, humedad de 55±2%, y ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de

Experimentación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y recibieron, ad libitum, agua de red estéril y alimento balanceado convencional estéril.

Los animales de los grupos CF, S y L recibieron (intubación intragástrica) 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días consecutivos, en forma de cultivo fresco (CF) o cultivos secado spray (S) o liofilizado (L), y rehidratados. La obtención de los cultivos deshidratados y la preparación de las dosis se realizaron como se detalla en la sección 2.2.1. del capítulo IIIb. Los animales del grupo control (C) recibieron durante 10 días leche descremada 10% (p/v). En el día 11 los animales recibieron (intubación intragástrica) una única dosis infectiva de 10^6 UFC de *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED. Al décimo día post desafío con el patógeno los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con un cocktail de ketamina/xilacina/acepromacina y sacrificados por dislocación cervical. Se recuperaron porciones de íleon e hígados para preparación de homogenatos, las cuales fueron inmediatamente congeladas a -70°C hasta el momento de su uso, mientras que otras porciones fueron fijadas en formaldehído bufferado 4% (v/v) y procesadas para su inclusión en parafina según Vinderola y col. (2005).

3.2.2. Evaluación histopatológica de íleon e hígados.

Cortes histológicos (3-5 μm) de íleon e hígado se desparafinaron en un gradiente de xilenos/alcoholes/buffer salino y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). Las láminas se codificaron para evitar sesgos al momento de su análisis. Los cortes se examinaron mediante microscopía óptica, empleándose un microscopio (Olympus BX41) equipado con una cámara digital (Moticam 2500). Para el análisis de íleon se tomaron fotografías (10x de objetivo) de los cortes y se analizaron cuatro indicadores de daño inflamatorio: (a) infiltrados anormales de células inflamatorias, (b) arquitectura, (c) ulceración y (d) edema. A los fines de facilitar la evaluación histopatológica y de algún modo cuantificar el grado de injuria tisular se definió el siguiente sistema de “scores” o puntajes:

Puntaje	Evaluación
0	ausencia de alteración
1	alteración leve
2	alteración moderada
3	alteración severa

Para cada grupo experimental se calculó el puntaje promedio total de inflamación, considerándose mayor el puntaje cuanto mayor era el grado de daño inflamatorio en íleon.

Para la evaluación histológica de los cortes de hígado se analizó el área de los infiltrados inflamatorios. En este caso se tomaron 3 fotografías de los cortes (10x) por animal, se realizó la medición morfométrica de las áreas infiltradas utilizándose el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y se definió el parámetro área infiltrada (μm)/área total (μm). Todos los análisis histopatológicos fueron realizados bajo la supervisión de la Dra. Denise Carmona Cara del Departamento de Morfología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil).

3.2.3. Determinación de la actividad de mieloperoxidasa.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima expresada específicamente en neutrófilos, por lo que la cuantificación de su actividad es una manera de cuantificar, indirectamente, el número de neutrófilos infiltrados en un tejido, después de una injuria inflamatoria. En este ensayo, se determinó la extensión de la acumulación de neutrófilos en íleon e hígado midiendo la actividad de mieloperoxidasa según Vieira y col. (2012). Brevemente, porciones de íleon o hígado se homogeneizaron (100 mg de tejido por cada 1,9 mL de buffer) en un buffer pH 4,7 (0,1M NaCl, 0,02M Na_3PO_4 , 0,015M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) y centrifugaron a 4°C, 12000 x g, durante 10 min. Los pellets se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05M (pH 5,4) que contenía HTAB 0,5% (bromuro de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamonio) (Sigma-Aldrich) y luego de homogeneizarse y someterse a 3 ciclos de congelamiento en N_2

líquido/descongelamiento, las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes fueron recuperados. Se adicionó a los sobrenadantes 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich) (3,845 mg/mL en dimetil sulfóxido) y se incubó 5 min a 37°C. Luego se agregó H₂O₂ y se incubó hasta la formación de color. La reacción se detuvo por la adición de H₂SO₄ y se midió la densidad óptica (D.O.) a 450nm. La actividad de MPO se expresó en unidades arbitrarias (basadas en absorbancia) por cada 100 mg de tejido.

3.2.4. Determinación de S-IgA e IFN- γ en contenido intestinal.

Se realizó un segundo ensayo con 52 ratones Swiss hembras, provenientes de la misma colonia del LEFM-ICB-UFMG. Se dividió a los animales en cuatro grupos (C, CF, S y L) y se los trató bajo las mismas condiciones que en el ensayo de histopatología (inciso 2.2.1). Los animales de los grupos CF, S y L recibieron (intubación intragástrica) 10⁸ UFC de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días consecutivos, en forma de cultivo fresco, secado spray o liofilizado, y rehidratados, mientras que los animales del grupo C recibieron leche descremada 10% (p/v). En el día 11, cuatro ratones de cada grupo fueron sacrificados como se describió previamente, para la medición de parámetros inmunes (S-IgA e IFN- γ) previo al desafío con el patógeno. Los animales restantes recibieron (intubación intragástrica) una única dosis infectiva de 10⁶ UFC de *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED. La mitad de los animales desafiados de cada grupo fueron sacrificados (como se describió previamente) al 4° día post desafío (4PD) y los animales restantes fueron sacrificados al día 8° post desafío (8PD). En todos los casos (animales desafiados y no desafiados) se recuperó el contenido intestinal total por lavado del intestino delgado desde el duodeno al íleon distal, se pesó y se diluyó 1:4 en PBS suplementado con un cocktail inhibidor de proteasas 1% (P8340, Sigma, St Louis, MO, USA). Luego de centrifugarse (2000 x g, 30 min, 4°C) se recogió el sobrenadante y se congeló a -70°C para cuantificación de S-IgA (Rodrigues y col., 2000) e IFN- γ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) por ELISA.

3.3. Evaluación del efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en animales BALB/c.

3.3.1. Animales.

Se utilizaron ratones BALB/c (machos, 6 semanas, 18-20 g) obtenidos de la colonia cerrada del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICiVet-Litoral, CONICET – UNL), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales tuvieron un período de adaptación de una semana en el bioterio del INLAIN antes de comenzar con los ensayos y fueron agrupados de 3 a 5 animales por jaula, dependiendo del experimento, en condiciones ambientales controladas a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad de $55 \pm 2\%$, y ciclo luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron tratados según la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA) y los ensayos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales recibieron, ad libitum, agua de red estéril y alimento balanceado convencional estéril (Cooperación, Buenos Aires) cuya composición es: proteínas, 230 g/kg; fibra, 60 g/kg; minerales totales, 100 g/kg; Ca, 13 g/kg; P, 8 g/kg; agua, 120 g/kg; y vitaminas.

3.3.2. Determinación de la dosis infectiva de *Salmonella*.

Un primer conjunto de experimentos se llevó a cabo para ajustar en las condiciones del INLAIN un modelo in vivo de infección en ratones BALB/c, utilizando la cepa *Salmonella* ser. Typhimurium FUNED, antes de evaluar la capacidad protectora de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Un cultivo overnight (18 h) del patógeno fue lavado dos veces con una solución salina fosfato (PBS, pH 7,4). Los ratones (tres grupos de 10 animales) fueron desafiados por intubación intragástrica (0,1 mL/ratón) con una única dosis infectiva correspondiente respectivamente a 10^4 , 10^5 o 10^6 UFC de *Salmonella*/ratón. La sobrevida a la infección se monitoreó diariamente hasta que no se

observaran muertes por tres días consecutivos. Los resultados se expresaron como sobrevida (%) a la infección.

3.3.3. Determinación de la dosis protectora de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Un cultivo overnight (18 h) de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 se preparó diariamente, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en leche descremada 10% (p/v). Los animales (10 por grupo) recibieron (intubación intragástrica) durante 10 días (0,1 mL/ratón) 10^7 , 10^8 o 10^9 UFC/día de la bifidobacteria y en el día 11 fueron desafiados oralmente con una única dosis de *Salmonella* ser. Typhimurium FUNED (10^6 UFC/animal). Los animales control recibieron 0,1 mL/ratón de leche descremada 10% (p/v) durante 10 días previo al desafío con *Salmonella*. La sobrevida fue monitoreada como se describió previamente.

3.3.4. Determinación del período de administración protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Tres grupos de ratones (10 animales/grupo) recibieron 10^9 UFC/día/animal de la bifidobacteria, preparada como se describió previamente, durante 3, 6 o 10 días consecutivos. Luego de esos períodos de administración los animales fueron desafiados con una única dosis de *Salmonella* ser. Typhimurium FUNED (10^6 UFC/animal). Los animales control recibieron 0,1 mL/animal de leche descremada 10% (p/v) durante 10 días previos al desafío con *Salmonella*. No se administró bifidobacteria luego del desafío. La sobrevida fue monitoreada según se describió previamente.

3.3.5. Comparación de la administración preventiva vs. preventiva-terapéutica de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 frente a una infección con *Salmonella* ser. Typhimurium.

3.3.5.i. Animales y alimentación.

Veinte ratones fueron divididos en tres grupos denominados grupo control (C) (6 animales), grupo preventivo (P) (7 animales) y grupo preventivo-terapéutico (T) (7 animales). Los animales de los grupos P y T recibieron (intubación intragástrica) 10^9 UFC de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días consecutivos, preparados diariamente como se describió previamente. Los animales del grupo C recibieron leche

descremada 10% (p/v). En el día 11 los animales recibieron (intubación intragástrica) una única dosis infectiva (ver sección Resultados para la selección de la dosis) de *Salmonella* ser. Typhimurium FUNED, y continuaron recibiendo leche descremada 10% (p/v) (grupos C y P) o *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (10^9 UFC/día/animal, grupo T).

3.3.5.ii. Ensayo de translocación.

Al quinto día post-desafío, los animales se anestesiaron con un cocktail de ketamina/xilacina/acepromacina y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajeron hígado y bazo, se realizaron homogenatos (Ultra Turrax T8, Ika Labortechnik, Staufen, Alemania) en agua de peptona 0,1% estéril, y se sembraron diluciones seriales en agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) para el recuento de enterobacterias. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis. Los resultados se expresaron como una proporción de animales infectados sobre el total de animales por grupo, considerándose animal infectado aquel que presentó translocación en hígado o hígado y bazo. Además, se compararon los recuentos (log UFC/g) de enterobacterias en ambos órganos entre los distintos grupos.

3.3.5.iii. Determinación de S-IgA y citoquinas.

Se recuperó el contenido intestinal presionando suavemente el intestino delgado desde el duodeno al íleon distal, se pesó y se diluyó 1:4 en PBS suplementado con un cocktail inhibidor de proteasas 1% (P8340, Sigma, St Louis, MO, USA). Luego de centrifugarse (2000 x g, 30 min, 4°C) se recogió el sobrenadante y se congeló a -70°C para cuantificación de S-IgA por ELISA (Rodrigues y col, 2000). Porciones distales del intestino lavado se sometió a fijación y preparación histológica para su inclusión en parafina según Vinderola y col. (2005). El número de células productoras de IgA (IgA⁺) se determinó en cortes histológicos de muestras de íleon e intestino grueso mediante inmunofluorescencia directa, empleando un anticuerpo mono específico anti-cadena α de IgA de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Matar y col., 2001). Los cortes histológicos fueron desparafinados y rehidratados en una serie de concentraciones decrecientes de etanol (desde alcohol absoluto a alcohol 70°), y luego tratados con una dilución (1/100) del

anticuerpo en PBS e incubados en oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Luego las muestras fueron lavadas dos veces en PBS y examinadas con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse utilizando una lámpara Hg). Los resultados se expresaron como número de células positivas (células fluorescentes)/10 campos y se reportaron como el promedio de tres recuentos, cada uno en un corte histológico diferente, para cada animal. También se obtuvieron porciones de intestino delgado y grueso (120-170 mg) y se almacenaron congeladas (-70°C) para la determinación de citoquinas. Las muestras fueron homogeneizadas (Ultra Turrax T8, Ika Labortechnik, Staufen, Alemania) en PBS conteniendo un cocktail de inhibidor de proteasas 1% (p/v) (Sigma), EDTA 10 mmol/L (Sigma) y Tween 20 0,05% (v/v) (Sigma) en una proporción de 1 mL PBS:100 mg tejido. Los homogenatos fueron luego centrifugados (10000 rpm, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -70°C para la cuantificación de citoquinas. La concentración de IL-10 e IFN- γ se determinó por ELISA utilizándose anticuerpos comerciales (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), y de acuerdo a los procedimientos suministrados por el fabricante.

3.4. Análisis Estadístico.

En todos los casos, salvo que se exprese lo contrario, los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis de los puntajes histopatológicos de íleon e hígados se analizó mediante el test de Mann-Whitney (no paramétrico), mientras que los datos de MPO en homogenatos de íleon e hígado se analizaron mediante ANOVA de una vía y las diferencias entre medias entre los grupos se detectaron mediante un test de comparación múltiple de Tukey. En ambos casos se utilizó el software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Los datos (% de sobrevida) de los ensayos de mortalidad fueron evaluados por el test Log Rank. Los datos de translocación en hígado y bazo, S-IgA en contenido intestinal y citoquinas IL-10 e IFN- γ en homogenatos de intestinos gruesos y delgados se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, version 15.0). Las diferencias entre medias fueron detectadas

mediante pruebas post hoc (test de Dunnet). En todos los casos se consideró una diferencia significativa para $p < 0,05$. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA de su sigla en inglés) para analizar el conjunto de datos obtenidos de las variables medidas tanto en intestino delgado como grueso utilizándose el programa R© (version 2.12.2 version, R Development Core Team, 2011).

4. Resultados y discusión.

4.1. Evaluación del efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en ratones convencionales Swiss.

4.1.1. Evaluación histopatológica de íleon e hígados.

Cortes histológicos de íleon e hígado fueron sometidos a tinción hematoxilina-eosina (HE), y analizados microscópicamente, con la supervisión de una histopatologista (Fig. 39).

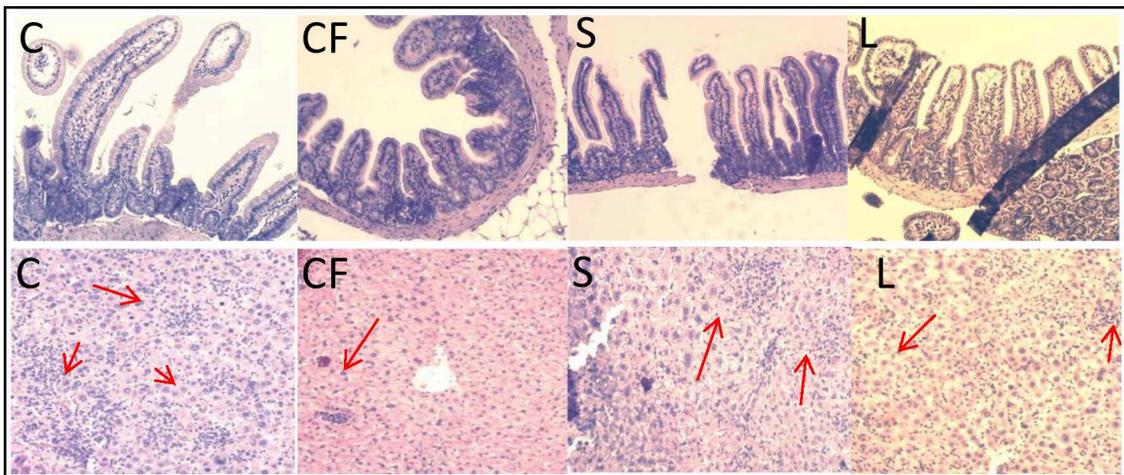


Figura 39: Cortes histológicos de íleon (arriba) e hígado (abajo) (tinción HE) de animales desafiados con *S. entérica* ser. Typhimurium, que recibieron previamente y durante 10 días leche descremada 10% (p/v) (grupo control, C) o 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en forma de cultivo fresco (CF), secado spray (S) o liofilizado (L). Las flechas rojas indican áreas de infiltrados de neutrófilos en tejido hepático.

A fin de facilitar la comparación de las observaciones sobre el estado de los íleon entre los grupos experimentales, se definió un sistema de puntajes (de 0 a 3) como se describió en la sección de Materiales y Métodos, con el cual se otorgó puntaje cero para ausencia de indicadores inflamatorios y un mayor puntaje cuanto mayor la magnitud del daño inflamatorio. Las infecciones intestinales debido a especies de *Salmonella* se manifiestan en el ratón a través de lesiones en íleon, que pueden extenderse a yeyuno y

ciego. Estas lesiones están caracterizadas por la presencia de úlceras asociadas con infiltraciones difusas de macrófagos, neutrófilos y linfocitos en la mucosa adyacente (Greaves, 2012). La Figura 40 muestra los puntajes totales resultantes del análisis histopatológico de los íleon para los grupos control (C) y tratados con *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco (CF), secado spray (S) y liofilizado (L). Este puntaje total fue la resultante de la sumatoria de cuatro parámetros analizados: alteración de la arquitectura intestinal, presencia de infiltrados inflamatorios, edema y/o úlceras. Se puede observar que todos los animales pertenecientes al grupo control de infección presentaron signos de daño inflamatorio (puntaje total por animal > 0 en todos los casos), y si bien no significativa, cuando se administró *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco se observó a nivel de íleon una atenuación en el daño inflamatorio ($p = 0,08$).

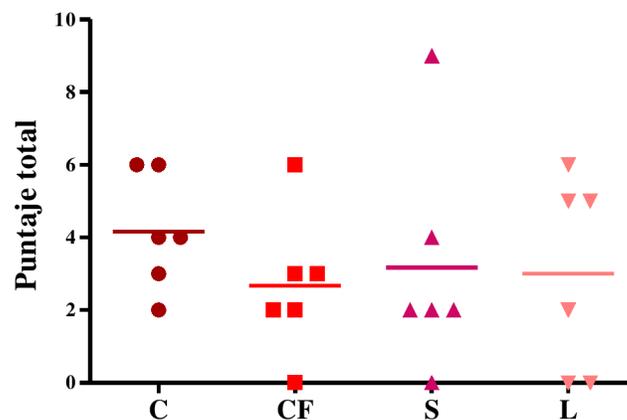


Figura 40: Puntaje histopatológico total obtenido por análisis microscópico de cortes de íleon (tinción HE) de animales desafiados con *S. enterica* ser. Typhimurium FUNED, que recibieron previamente y durante 10 días leche descremada 10% (p/v) (●) o 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en forma de cultivo fresco (■), secado spray (▲) o liofilizado (▼).

Cuando se analizó cada parámetro estudiado por separado, se observó una disminución significativa en las alteraciones del epitelio intestinal para los grupos que recibieron la bifidobacteria como cultivo fresco y secado spray respecto al grupo

control ($p = 0,03$ y $p = 0,02$ respectivamente, Fig. 41 (a)) y una tendencia a atenuarse la presencia de infiltrados inflamatorios también para estos grupos ($p = 0,10$ y $p = 0,17$, Fig. 41(b)).

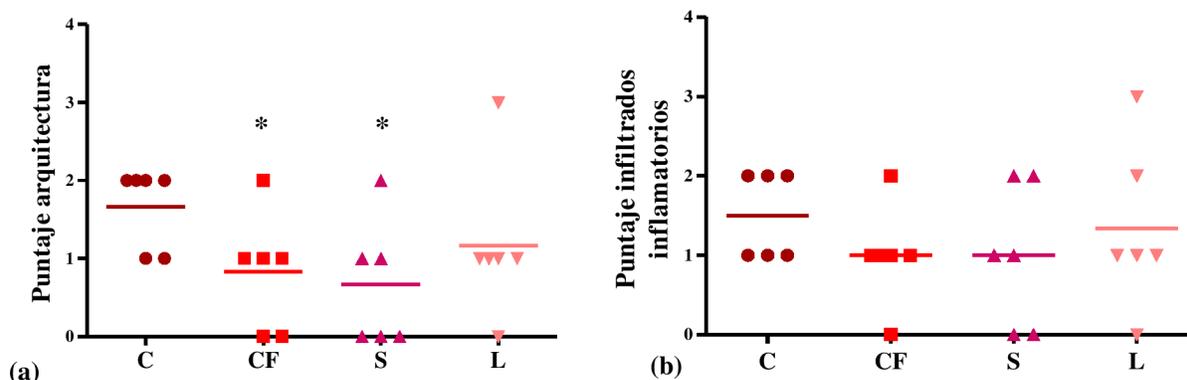


Figura 41: Puntajes histopatológicos asociados a alteraciones en la arquitectura intestinal (a) o a la presencia de infiltrados de neutrófilos (b) obtenidos por análisis microscópico de cortes de íleon (tinción HE) de animales desafiados con *S. enterica* ser. Typhimurium FUNED, que recibieron previamente y durante 10 días leche descremada 10% (p/v) (●) o 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en forma de cultivo fresco (■), secado spray (▲) o liofilizado (▼). *Diferencia significativa para $p < 0,05$.

El estado histopatológico de los hígados se analizó mediante la medición de las áreas que presentaban infiltrados de neutrófilos en relación al área total de tejido analizada (Fig. 42). Si bien estadísticamente no se observó una disminución significativa en este parámetro estudiado, principalmente debido a la gran variabilidad observada para los individuos de un mismo grupo, podría considerarse una atenuación de un grado de infiltración moderado observado para el grupo control a un grado de infiltración leve para el grupo que recibió *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco (área infiltrada/área total promedio = 0,03 para el grupo C vs. área infiltrada/área total promedio = 0,008 para el grupo CF).

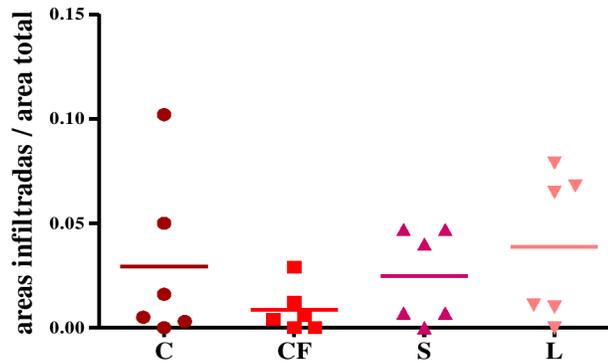


Figura 42: Relación áreas infiltradas/área total obtenida por medición morfométrica de cortes de hígados (tinción HE) de animales desafiados con *S. enterica* ser. Typhimurium FUNED, que recibieron previamente y durante 10 días leche descremada 10% (p/v) (●) o 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en forma de cultivo fresco (■), secado spray (▲) o liofilizado (▼). Todos los valores son el promedio del análisis de 3 láminas por animal.

4.1.2. Determinación de actividad mieloperoxidasa.

El reclutamiento de neutrófilos en intestino, hígado y bazo es una de las características más notables de la salmonelosis y constituye uno de los primeros mecanismos de virulencia del patógeno. Para cuantificar las observaciones microscópicas realizadas en el punto anterior relacionadas a la presencia de infiltrados inflamatorios en íleon e hígado se determinó la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), exclusiva de neutrófilos. Se observó una significativa reducción en la actividad de la enzima a nivel intestinal para todos los grupos que recibieron *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, mientras que éste efecto se observó sólo para la administración del cultivo fresco de la bifidobacteria a nivel hepático (Fig. 43).

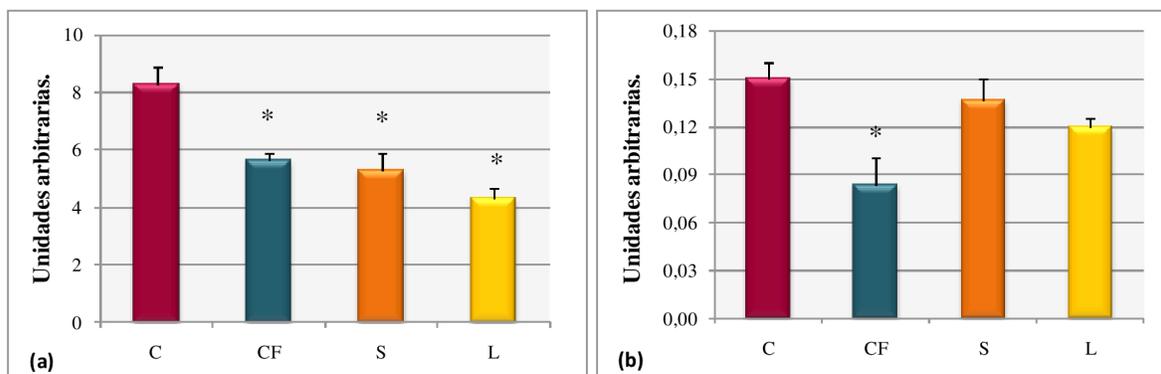


Figura 43: Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en homogenatos de íleon (a) e hígados (b) de animales desafiados con *S. enterica* ser. Typhimurium FUNED, que recibieron previamente y durante 10 días leche descremada 10% (p/v) (■) o 10^8 UFC de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en forma de cultivo fresco (■), secado spray (■) o liofilizado (■). Valores promedio \pm SEM, expresados en unidades arbitrarias (para 100 mg de tejido). *Diferencia significativa para $p < 0,05$.

En este caso, podría decirse que los procesos tecnológicos aplicados a la cepa afectaron su capacidad de inducir mecanismos antiinflamatorios en sitios extra-intestinales, ya que sólo el cultivo fresco logró “extender” a hígado el efecto observado a nivel de íleon para todos los modos de administración de la bifidobacteria.

4.1.3. Determinación de S-IgA e IFN- γ en contenido intestinal.

La unión de IgA secretoria (S-IgA) no específica a bacterias es funcionalmente importante en el intestino. En un ensayo con ratones mutantes que carecían de secreción de IgA se observó un aumento en la invasión de *S. enterica* ser. Typhimurium a células epiteliales, y en otro ensayo se observó que la presencia de S-IgA limitaba la translocación de bacterias aeróbicas del lumen intestinal a los NLM (Suzuki y Nakajima, 2014). Para profundizar los conocimientos sobre el potencial efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en el modelo de salmonelosis en ratones Swiss y la influencia de los tratamientos tecnológicos sobre su funcionalidad, se estudió la posible inducción de secreción de IgA y de IFN- γ al lumen intestinal. Cuando la bifidobacteria se administró durante 10 días en forma de cultivo fresco o

deshidratado (secado spray o liofilizado), se observó un aumento significativo en los niveles de S-IgA total en el lumen intestinal respecto al control. Luego del desafío con Salmonella (días 4 y 8 post desafío), los niveles también se vieron aumentados respecto a sus controles respectivos, para todos los grupos que recibieron la bifidobacteria, independientemente si ésta fue sometida a tratamientos tecnológicos o no (Fig. 44).

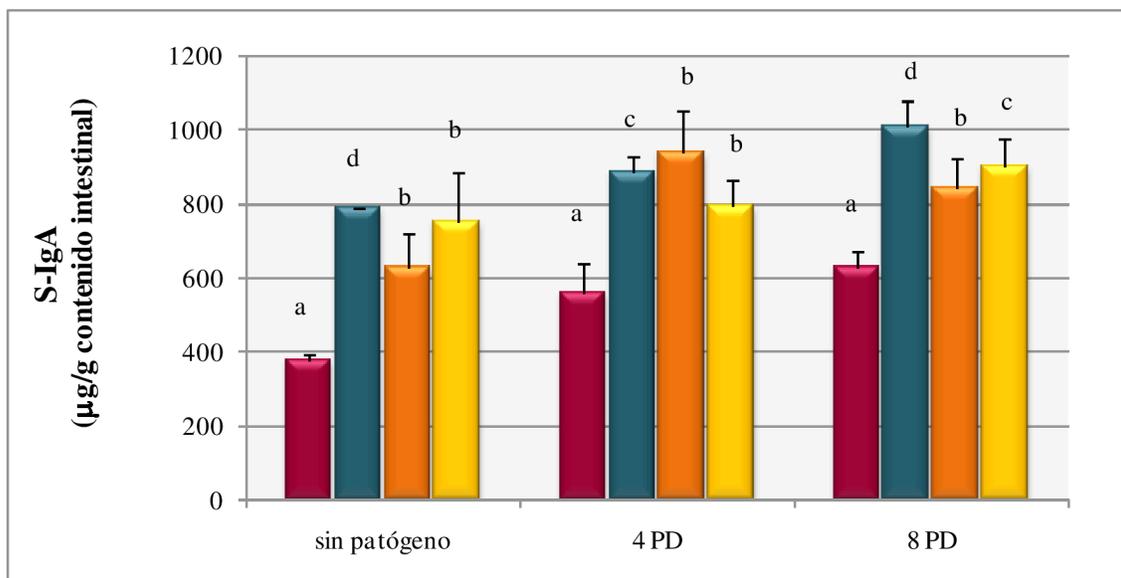


Figura 44: Niveles lumbales de IgA secretoria (S-IgA) total luego de la administración por 10 días de leche 10% (p/v) (grupo control) (■) o de 10^8 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco (■), secado spray (■) o liofilizado (■), previo a la infección con Salmonella (sin patógeno) y a los 4 y 8 días post desafío (4 PD y 8 PD, respectivamente) con el patógeno. ^{a,b,c,d} Las columnas con superíndices distintos son significativamente diferentes ($p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,005$) respecto al control correspondiente.

En cada uno de los tres momentos estudiados (previo a la infección con el patógeno y a los días 4 y 8 post desafío), la inducción en la secreción de IgA siempre fue significativamente más pronunciada para el cultivo fresco que para los cultivos deshidratados, respecto al control. Además, cuando se compararon los niveles de S-IgA total para cada grupo (CF, S y L) por separado, aplicando un test post hoc de Dunnet, se observó que para el grupo CF, los niveles previos a la infección no fueron significativamente diferentes a los correspondientes al día 4 PD, pero sí se vieron

aumentados al día 8 PD. En cambio, para los grupos S y L, no se observaron variaciones significativas en los niveles del anticuerpo a los días 4 y 8 PD respecto a sus valores previos a la infección. Es decir, aun cuando *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 fue capaz de inducir la secreción de S-IgA tanto cuando fue administrada como CF o deshidratada, la magnitud y el comportamiento de esta respuesta inmune humoral a lo largo del tiempo podrían estar afectados por el procesamiento tecnológico. Estos resultados, sumado a lo observado en el capítulo IIIb (sección 3.2.), donde *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 no fue capaz de inducir la secreción de IgA al lumen intestinal en ratones BALB/c, cuando se la administró como CF, S o L, pero sí se observó un aumento de células productoras de IgA en lámina propia para la bifidobacteria administrada como CF o S, refuerzan la importancia del modelo animal y el diseño experimental utilizado, además de la importancia del efecto de los procesos tecnológicos en la funcionalidad de la cepa en estudio.

Cuando se analizó la presencia de IFN- γ en el contenido intestinal, se observó que la administración de la bifidobacteria durante 10 días no alteró los niveles basales luminales. En cambio, una vez que los animales fueron desafiados con *S. ser. Typhimurium* FUNED, se observaron variaciones en los niveles de la citoquina a los 4 días post desafío (4 PD) para todos los grupos que recibieron *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (como CF, S o L), y en el caso del cultivo S, el efecto se mantuvo hasta los 8 días post-infección (8 PD) (Fig. 45).

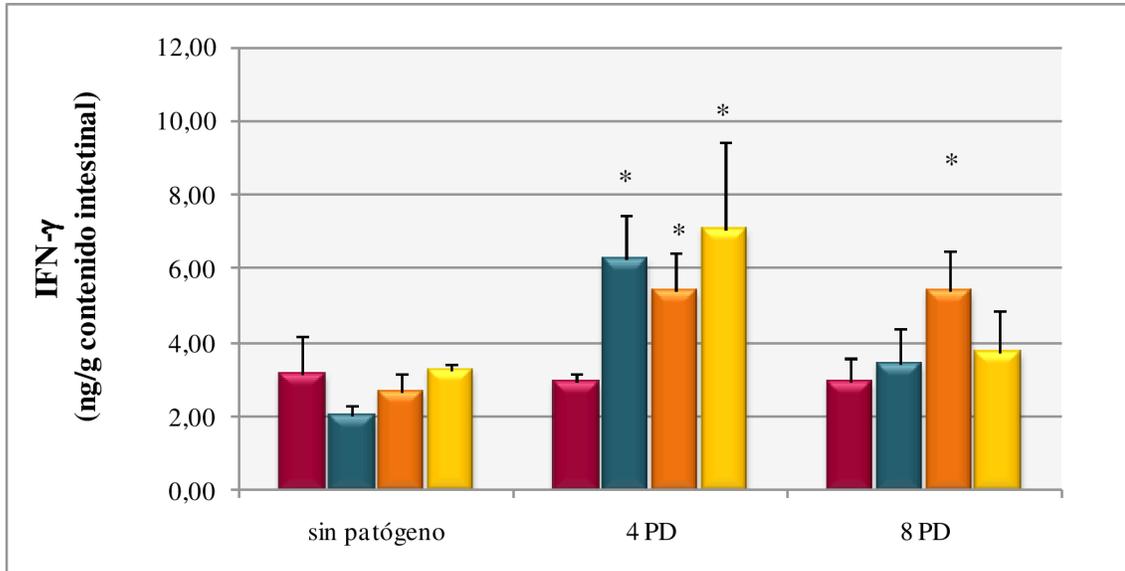


Figura 45: Niveles luminales de IFN- γ luego de la administración por 10 días de leche 10% (p/v) (grupo control) (■) o de 108 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco (■), secado spray (■) o liofilizado (■), previo a la infección con *Salmonella* (sin patógeno) y a los 4 y 8 días post-desafío (4 PD y 8 PD respectivamente) con el patógeno.*Diferencia significativa para $p < 0,05$.

El rol del IFN- γ en la respuesta inmune desencadenada contra *S. ser. Typhimurium* es ambiguo y complejo, debido a que su participación es fundamental en los primeros momentos posteriores a la infección para activar a los macrófagos y desencadenar la respuesta inflamatoria (Lapaque y col., 2009), pero si sus niveles no son adecuadamente regulados (por IL-12 e IL-23), puede llevar finalmente a un cuadro de inflamación aguda y daño tisular (Awoniyi y col., 2013). Además, se considera que su participación señala la interfase entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Kaiser y col., 2012) por lo que un aumento en los niveles de esta citoquina, especialmente varios días después de iniciada la infección, podría estar indicando la activación de mecanismos inmunes adaptativos mediados por células T.

4.2. Evaluación del efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en ratones BALB/c.

4.2.1. Determinación de la dosis infectiva de *Salmonella* ser. *Typhimurium*.

Los ratones macho de seis semanas de edad (control de bioterio, sin ningún tratamiento) desafiados con una dosis única de 10^4 , 10^5 o 10^6 UFC/ratón de *S. enterica* ser. *Typhimurium* mostraron una sobrevida de 90%, 70% y 50%, respectivamente (Fig. 46).

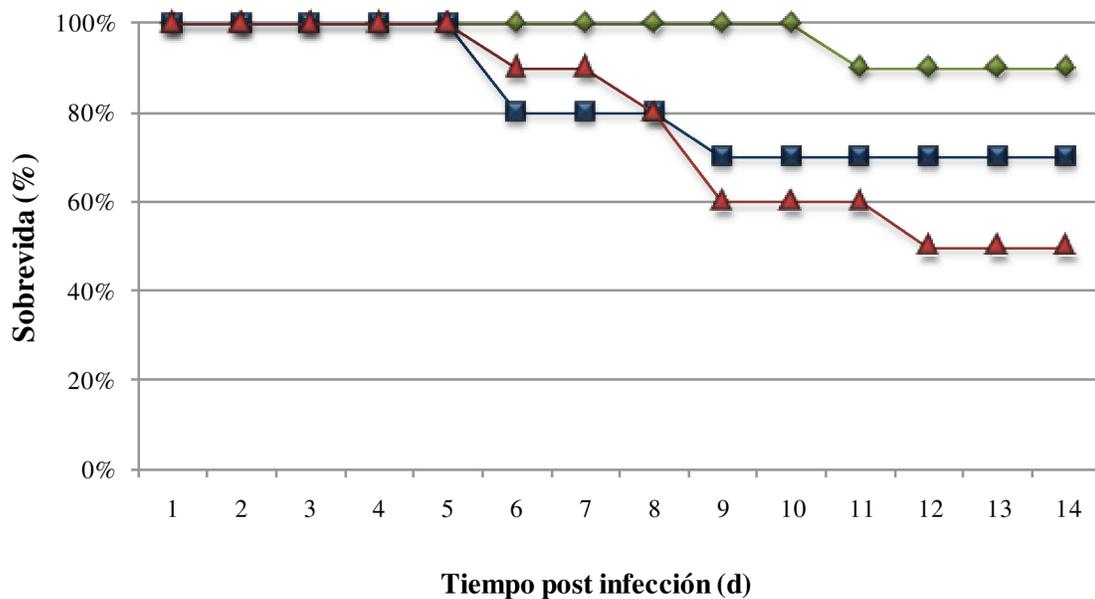


Figura 46: Sobrevida de ratones BALB/c a una infección con una única dosis (◆: 10^4 ; ■: 10^5 , ▲: 10^6 UFC/ratón, 10 animales/grupo) de *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED.

No se observaron diferencias significativas en la sobrevida acumulada ($p = 0,244$; Log Rank test) entre los grupos que recibieron 10^4 y 10^5 UFC/ratón de *Salmonella* ser. *Typhimurium*, ni entre los animales que recibieron 10^5 y 10^6 UFC/ratón ($p = 0,454$). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ($p = 0,049$) entre los grupos que recibieron 10^4 y 10^6 UFC/ratón del patógeno. Se seleccionó la dosis que permitió

un 50% de sobrevida, 10^6 UFC/ratón de Salmonella ser. Typhimurium, para los estudios posteriores.

4.2.2. Determinación de la dosis protectora de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Para definir la dosis protectora de bifidobacterias, se administró a los ratones 10^7 , 10^8 o 10^9 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días consecutivos. Los animales fueron luego desafiados con 10^6 UFC/ratón de Salmonella ser. Typhimurium FUNED (Fig. 47). La sobrevida del grupo control fue 40% y no se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron la bifidobacteria ($p = 0,905$) respecto al control, si bien el grupo que recibió 10^9 UFC de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 presentó 50% de sobrevida.

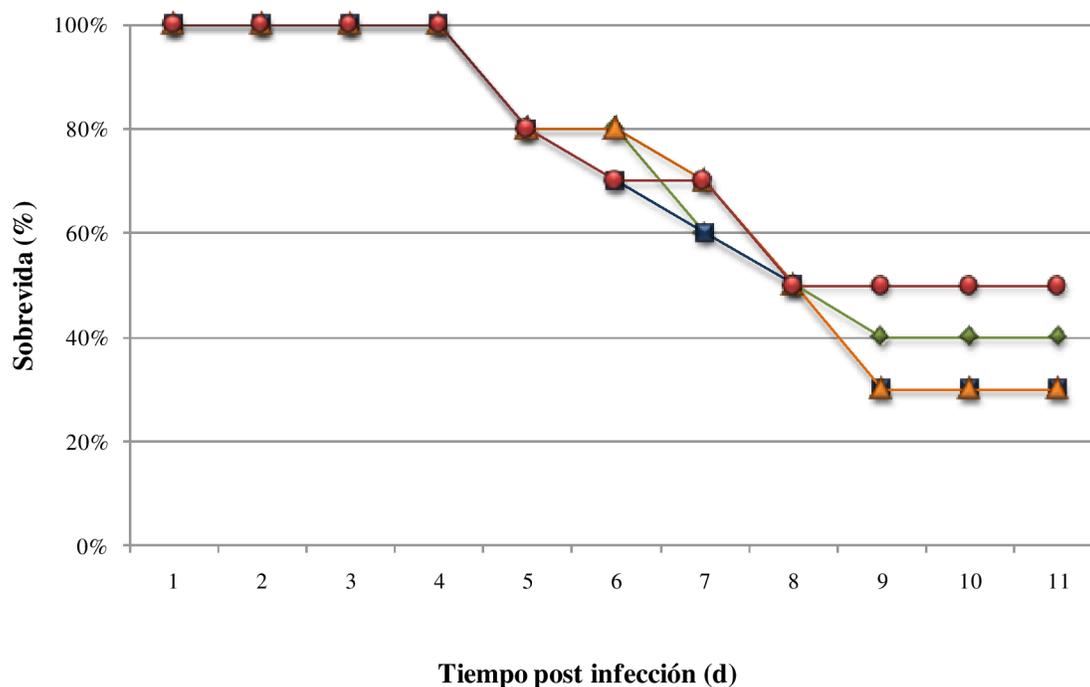


Figura 47: Sobrevida de ratones BALB/c alimentados durante 10 días consecutivos con 10^7 (■), 10^8 (▲) o 10^9 (●) UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (10 animales/grupo) y desafiados con una dosis única (10^6 UFC/ratón) de Salmonella ser. Typhimurium FUNED. ◆: animales control que no recibieron la bifidobacteria pero fueron desafiados con el patógeno.

4.2.3. Determinación del período de administración protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

Teniendo en cuenta estudios previos donde los ratones recibieron durante 10 días 10^9 UFC de la bifidobacteria por animal, se realizó un tercer ensayo en el cual los animales recibieron la misma cantidad de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 diariamente durante 3, 6 ó 10 días consecutivos y luego se desafió los animales con 10^6 UFC/ratón de *Salmonella*. En este ensayo, ningún animal control sobrevivió la infección (Fig. 48), mientras que el grupo que recibió la bifidobacteria durante 10 días consecutivos presentó ($p = 0,01$) mayor sobrevida.

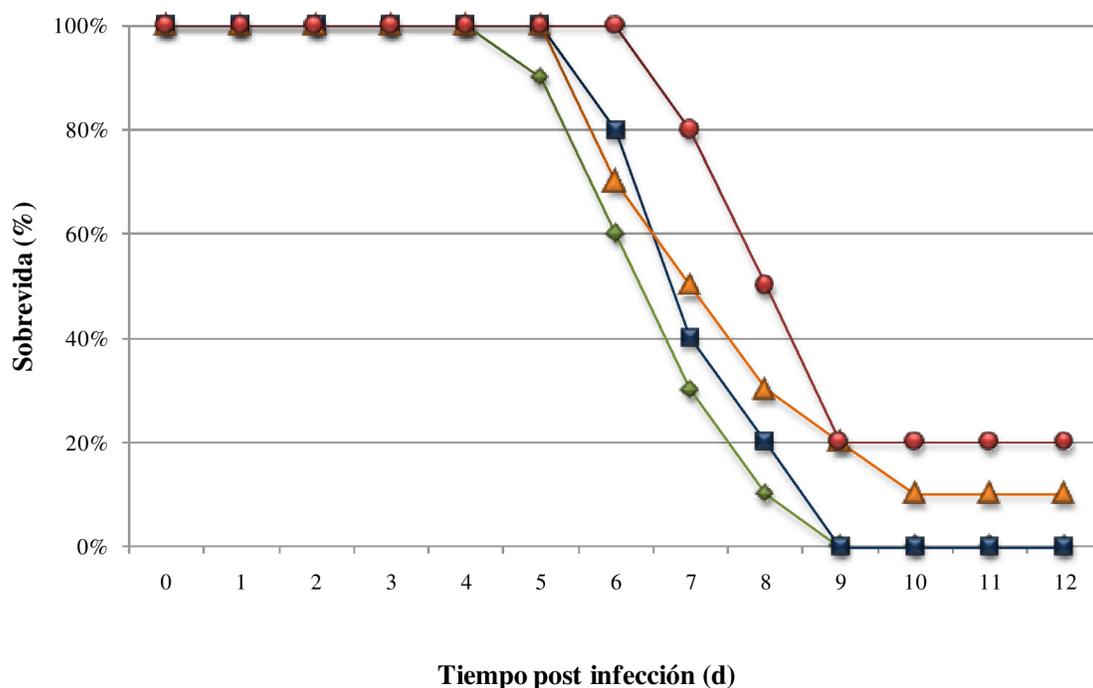


Figura 48: Sobrevida de ratones BALB/c alimentados durante 3 (■), 6 (▲) o 10 (●) días consecutivos con 10^9 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (10 animales/grupo) y desafiados con una única dosis infectiva (10^6 UFC/ratón) de *Salmonella* ser. Typhimurium FUNED. ◆: animales control, que no recibieron la bifidobacteria pero fueron desafiados con el patógeno.

4.2.4. Comparación de la administración preventiva vs. preventiva-terapéutica de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 frente a una infección con *Salmonella* ser. *Typhimurium*.

Se administró *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, ya sea sólo durante 10 días consecutivos previo al desafío con *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED (grupo preventivo, P) o durante 10 días consecutivos previos al desafío y hasta el día anterior al sacrificio (5 días posteriores al desafío con el patógeno) (grupo preventivo-terapéutico, T). Se realizaron recuentos totales de enterobacterias en hígado y bazo al día 5 post-infección (Fig. 49).

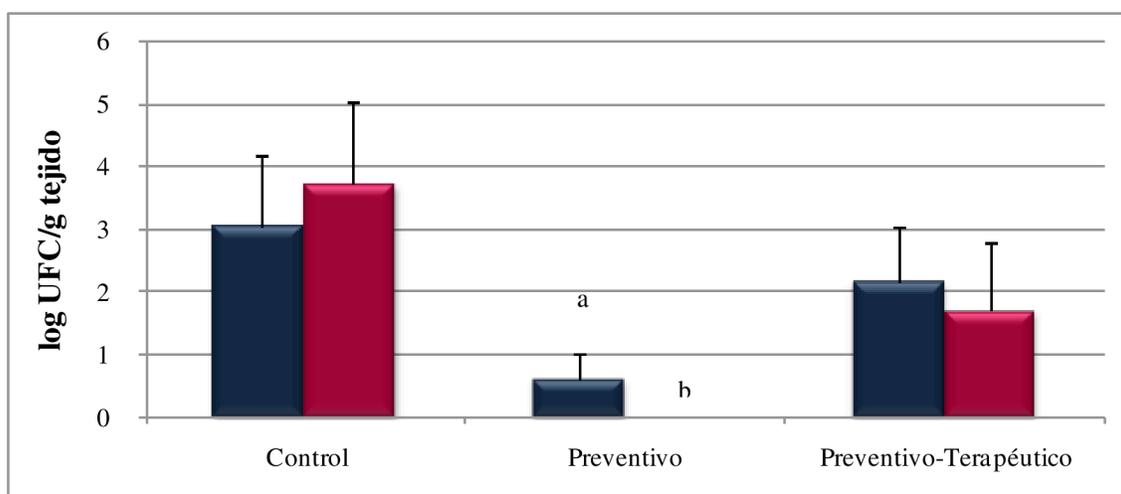


Figura 49: Ensayo de translocación: recuentos de enterobacterias totales en hígado (■) y bazo (■) de ratones BALB/c al día 5 post-desafío con *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED (promedio \pm SEM). Los animales recibieron 10^9 UFC/día de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en leche descremada 10% (p/v) (grupos preventivo y preventivo-terapéutico) o leche descremada 10% (p/v) (grupo control) durante 10 días consecutivos y luego fueron desafiados con una dosis infecciosa única (10^6 UFC) de *Salmonella* ser. *Typhimurium* FUNED. En el grupo Preventivo-terapéutico, los animales continuaron recibiendo la bifidobacteria posterior al desafío con *Salmonella*.
^{a,b} Significativamente diferentes comparado a los controles correspondientes ($p = 0,024$ para recuentos en hígado y $p = 0,001$ para recuentos en bazo, respectivamente).

Se consideraron animales infectados aquellos que presentaron translocación positiva en hígado (presencia de enterobacterias en placas de agar McConkey). Las proporciones de animales infectados/animales fueron 5/6 para el grupo control, 2/7 para el grupo preventivo y 4/7 para el grupo preventivo-terapéutico. El análisis estadístico determinó que las proporciones fueron significativamente diferentes entre grupos ($p = 0,04$). El test unilateral de Dunnett determinó que la proporción de animales no infectados en el grupo preventivo fue significativamente mayor que en el grupo control ($p = 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y preventivo-terapéutico ($p = 0,24$). La administración de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 posterior al desafío con *Salmonella* (preventivo-terapéutica) no aumentó la protección frente a la translocación.

Se evaluó la severidad de la infección considerando el nivel de colonización de hígado y bazo en los animales infectados (Fig. 49). Los animales infectados del grupo control presentaron una colonización promedio entre 3 y 4 órdenes log en hígado y bazo, mientras que para el grupo preventivo-terapéutico la infección fue de aproximadamente 2 órdenes log en ambos órganos. Por el contrario, en el grupo preventivo no se observó colonización de bazo ($p = 0,001$) mientras que la colonización del hígado mostró valores significativamente menores ($p = 0,024$) de menos de 1 orden log al día 5 post-desafío. La IgA secretoria total se cuantificó en el contenido de los intestinos delgados mientras que IFN- γ e IL-10 fueron determinados en homogenatos de intestino grueso (Tabla 15).

Tabla 15: Concentración de IgA secretoria (S-IgA) en contenido intestinal de intestino delgado y de IFN- γ e IL-10 en homogenatos de intestino grueso (promedio \pm SEM) al día 5 post- infección con Salmonella. ^{a,b} Los valores en columnas con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p = 0,0064, 0,0128$ y $0,0122$ para S-IgA, IFN- γ e IL-10, respectivamente).

	Concentración (promedio \pm SEM)		
	Control	Preventivo	Preventivo- Terapéutico
S-IgA ($\mu\text{g/g}$)	275,5 \pm 28,2 ^a	371,4 \pm 20,6 ^b	268,6 \pm 24,1 ^a
IFN- γ (pg/g)	622,9 \pm 62,4 ^a	732,6 \pm 142,1 ^a	239,6 \pm 81,4 ^b
IL-10 (pg/g)	3613,5 \pm 538,9 ^a	7191,7 \pm 1070,5 ^b	4088,1 \pm 1148,6 ^a

Tanto la concentración de S-IgA como la de IL-10 se vieron aumentadas significativamente ($p = 0,064$ y $0,01$, respectivamente) en el contenido intestinal y el intestino grueso, respectivamente, de los animales del grupo preventivo.

Todas las variables analizadas en intestino delgado y grueso (número de células productoras de IgA en lámina propia y concentración de IL-10 e IFN- γ en homogenatos) al día 5 post-infección con Salmonella, fueron consideradas en su conjunto en un Análisis de Componentes Principales (PCA de su sigla en inglés) con el objetivo de proveer herramientas adicionales para visualizar e interpretar los resultados observados. Se obtuvo una representación estructural de la variabilidad de las respuestas y se determinó cómo se distribuyeron para los distintos grupos (control, preventivo, preventivo-terapéutico) (Fig. 50).

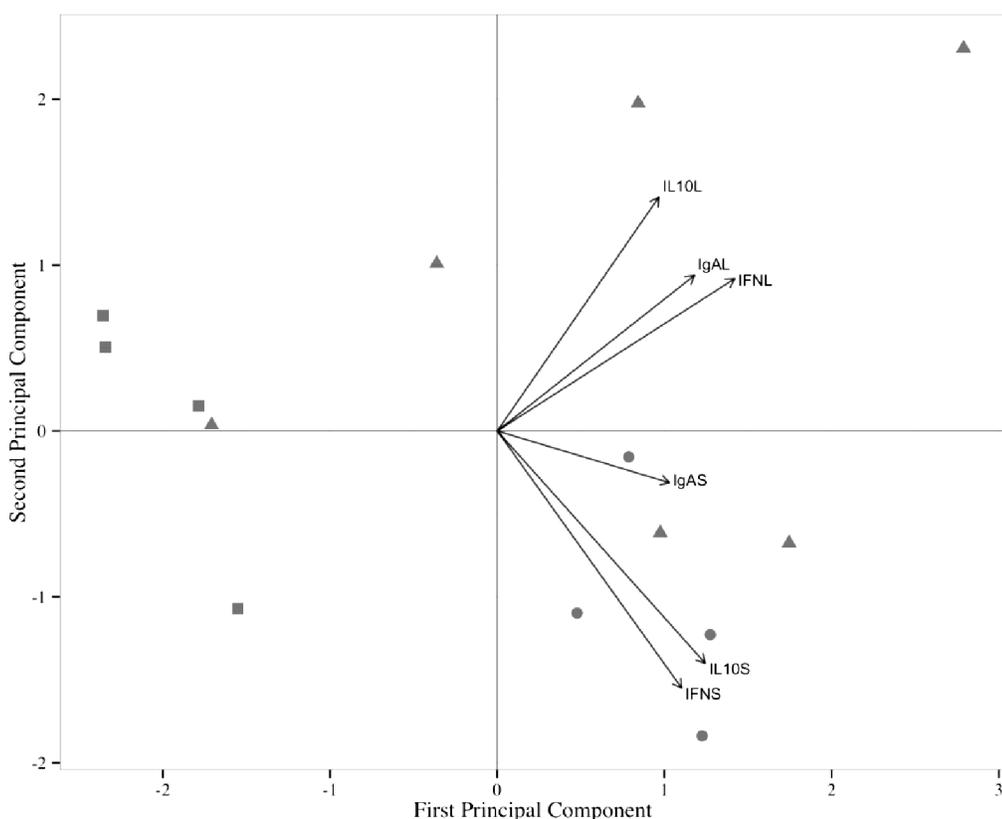


Figura 50: Análisis de componentes principales (PCA) para las variables células productoras de IgA/10 campos en lámina propia de intestino delgado (IgAS) e intestino grueso (IgAL) (inmunohistoquímica) e IL-10 e INF- γ en homogenatos de intestino delgado (IL10S, IFNS) e intestino grueso (IL10L, IFNL) (ELISA), al día 5 post-infección con Salmonella. Grupos: control (●), Preventivo (▲) y Preventivo-Terapéutico (■).

Los primeros dos componentes principales explican el 55% del total de la variabilidad de los datos. Los coeficientes se muestran en la Tabla 16. La primera componente mostró un efecto paralelo o un movimiento paralelo de las variables: si una de las respuestas aumenta en un ratón, lo mismo sucede en las otras respuestas de ese mismo animal. La primera componente también agrupa las respuestas individuales de los grupos control y preventivo en el sector derecho de la gráfica, mientras que las

respuestas individuales del grupo preventivo-terapéutico se ubican en el sector izquierdo. Las respuestas individuales del tratamiento preventivo se dispersaron visiblemente en el espacio bidimensional. En contraste, las muestras de los grupos control y preventivo-terapéutico mostraron un agrupamiento mucho mayor lo que sugiere que los animales más infectados (grupos control y preventivo-terapéutico) aparentemente adquirieron una infección uniforme (en todos los animales las variables se “movieron” en el mismo sentido). La segunda componente separó la respuesta del grupo preventivo (sector superior de la gráfica) de la respuesta del grupo control (sector inferior del gráfico), mientras que la respuesta del grupo preventivo-terapéutico se distribuyó en el medio del gráfico.

Tabla 16: Coeficientes del análisis de componentes principales de las respuestas de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado (IgAS) e intestino grueso (IgAL) (determinado por inmunohistoquímica) e IL-10 e INF- γ en homogenatos de intestino delgado (IL10S, IFNS) e intestino grueso (IL10L, IFNL) (determinado por ELISA).

Parámetro	Componente Principal	
	1	2
IgAS	0,36	0,11
IgAL	0,41	-0,33
IL10S	0,44	0,49
IL10L	0,34	-0,49
IFNS	0,39	0,54
IFNL	0,50	-0,32

El rango de la dosis infectiva para las distintas cepas de Salmonella ser. Typhimurium puede ser muy amplio y dependiente además de la cepa de animales utilizada (Suitso y col., 2010). Por esto se planteó un primer experimento para definir una dosis infectiva adecuada de S. enterica ser. Typhimurium FUNED, la cepa utilizada en este estudio, para el modelo en ratones BALB/c en el INLAIN. La

sobrevida fue dosis-dependiente (Fig. 46). La dependencia de la sobrevida con la dosis infectiva fue informada por Wijburg y col. (2006), quienes hallaron que dosis de 10^4 , 10^5 o 10^6 UFC de *Salmonella* ser. Typhimurium permitieron una sobrevida de 80%, 0% y 0%, respectivamente, en ratones C57BL/6. Asimismo la dependencia de la sobrevida con la edad fue también informada por Ren y col. (2009) en ratones C57BL/6, donde ratones de 22-24 meses de edad fueron más sensibles a una infección con *Salmonella* que ratones de 4-6 meses de edad. Utilizando ratones machos BALB/c de 7-8 semanas pero otra cepa de *Salmonella* ser. Typhimurium, Zoumpopoulou y col. (2008) hallaron una sobrevida de 30% en ratones infectados con 5×10^4 UFC del patógeno. Truusalu y col. (2008) informaron una sobrevida de 91% en una línea de ratones Swiss NIH de 4-6 semanas desafiados con 5×10^4 UFC/ratón. Trabajando con la misma cepa de *Salmonella* utilizada en este trabajo, Silva y col. (2004) y Martins y col. (2005) reportaron sobrevidas de 0% y 20%, respectivamente, en ratones control Swiss NIH convencionales que recibieron 10^5 UFC o 10^4 UFC/ratón del enteropatógeno. En otro estudio donde también se utilizó la cepa de *Salmonella* de este trabajo, se informó una sobrevida del 40% en ratones control Swiss NIH convencionales para una dosis infectiva de 10^4 UFC/ratón (Martins y col., 2009). Finalmente, de Moreno de Leblanc y col. (2010), utilizando ratones BALB/c de 5-6 semanas y una cepa de *Salmonella* ser. Typhimurium aislada localmente, reportaron una sobrevida del 30% al día 10 post-infección en ratones desafiados con 10^7 CFU del patógeno. Cuando se consideran todos estos reportes juntos, se puede observar que la dosis de *Salmonella* capaz de inducir una infección leve en ratones está altamente condicionada por factores relacionados al enteropatógeno disponible (cepa y dosis) y a los animales utilizados (cepa, sexo, edad). Por lo tanto, esto indicaría la importancia de ajustar la dosis infectiva de la cepa de *Salmonella* a utilizar previo a realizar un estudio para ver los efectos de los probióticos frente a infecciones entéricas. En este estudio se seleccionó la mayor dosis (10^6 UFC de *Salmonella*) que llevó a una sobrevida del 50% para evaluar el efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. En el segundo ensayo, el período de administración de 10 días con la bifidobacteria se seleccionó de acuerdo a los resultados detallados en el capítulo IIIb en el cual se observó su efectividad para la proliferación de células productoras de IgA en la mucosa de intestino delgado y grueso. En el tercer ensayo, se

observó un aumento significativo en la sobrevida para este período. Tomando en cuenta los tres ensayos independientes de mortalidad realizados, es importante resaltar que la misma dosis infectiva de la misma cepa de Salmonella (10^6 UFC/ratón) indujo distintos porcentajes de sobrevida a la infección en los animales control (50%, 40% ó 0%, en los ensayos de mortalidad 1, 2 y 3, respectivamente) y la sobrevida alcanzó un estado estacionario al día 12 (ensayo 1) o al día 9 (ensayos 2 y 3). Si bien las razones de esta variabilidad no se conocen, ya que la cepa y los animales fueron manipulados bajo las mismas condiciones en los tres ensayos, esto podría deberse al hecho de que el proceso infectivo de Salmonella en ratones es considerado un proceso dinámico y heterogéneo y dependiente de múltiples variables que afectan al hospedador (Watson y Holden, 2010). Incluso Bellet y col. (2013) han descrito la influencia de los ritmos circadianos en la respuesta inmune frente a la infección con Salmonella, debido a la expresión diferencial de genes con los ciclos de luz y oscuridad. Además, no se puede descartar cierta variabilidad debido a la posible contaminación cruzada con Salmonella debido a la coprofagia en los ratones albergados en la misma jaula luego de la infección. Esta variabilidad en la sobrevida de los grupo control (animales que recibieron sólo Salmonella) fue también observada en ratones libres de gérmenes y convencionales en este modelo de infección (Silva y col., 1999, Maia y col., 2001, Lima-Filho y col., 2004, Silva y col., 2004, Martins y col., 2005, Martins y col., 2007, Martins y col., 2009, Martins y col., 2010).

La IgA es la principal inmunoglobulina en el epitelio intestinal donde su función es ejercer la exclusión inmune de bacterias patogénicas o virus en íntima cooperación con los mecanismos de la inmunidad innata no específica (Brandtzaeg y col., 1987). Por esto, como característica funcional, la capacidad de aumentar la IgA en la mucosa intestinal luego de una administración oral, es un atributo deseable en bacterias probióticas (Galdeano y col., 2009) y en trabajos previos esta característica ha sido ligada a la protección frente a una infección con Salmonella (Vinderola y col., 2007). Si consideramos los resultados obtenidos en ratones BALB/c relacionados a la capacidad inmunomoduladora de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (capítulo IIIb, sección 3.2.) y los datos obtenidos en esta parte del estudio, se podría asumir que un período de

alimentación de 10 días con 10^9 UFC/día/ratón de la bifidobacteria podría ser efectivo aumentando la IgA intestinal y disminuyendo la mortalidad y la severidad de una infección con *Salmonella*. Teniendo en cuenta que la muerte de los ratones ocurre como resultado de una gran carga bacteriana en hígado y bazo (Watson y Holden, 2010), se decidió cambiar de un modelo de mortalidad a uno de translocación, donde los niveles de infección de hígado y bazo (normalmente estériles) son estudiados posterior al desafío con el patógeno (Bao y col., 2000, Vinderola y col., 2007) en lugar de esperar la muerte o sobrevida del animal. Como en los experimentos de mortalidad la sobrevida llegó a un estado estacionario (sin muertes) entre los días 9 y 12, se decidió realizar el ensayo de translocación al día 5 post-infección. El ensayo de translocación mostró que la administración preventiva, pero no así la preventiva terapéutica de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 durante 10 días, disminuyó tanto la incidencia como la severidad de la infección con *Salmonella* (Fig. 49). Vale la pena notar que la administración de la bifidobacterias luego del desafío no contribuyó a aumentar la protección contra la translocación. En este sentido, un aumento en translocación seguido a la administración de prebióticos se observó en ratones (Petersen y col., 2009) y ratas (Bovee-Oudenhoven y col., 2003, Ten Bruggencate y col., 2003) y se hipotetizó que un aumento en la acidificación intestinal podría estar relacionada con la translocación durante el período post-infección. Tal vez entonces se podría especular que la actividad metabólica de las bifidobacterias a lo largo del tránsito intestinal puede inducir un efecto similar teniendo en cuenta estudios previos. Esta hipótesis necesita de estudios adicionales para ser justificada. Por otro lado, podría suceder también que la inmunoestimulación inducida por las bifidobacterias, sumado a la respuesta inflamatoria desencadenada por *Salmonella*, podrían ocasionar una inmunoestimulación general exacerbada que comprometería la integridad de la barrera intestinal y la contención intestinal del patógeno, lo cual podría ser una limitación de este modelo para estudios del tipo preventivo-terapéutico con probióticos.

Si bien en estos ensayos se utilizó una cepa isogénica de ratones (clones endogámicos de individuos genéticamente idénticos), es interesante notar que no todos los animales desafiados en el grupo control resultaron infectados por *Salmonella*. Si se

considera que la muerte de los animales ocurre cuando grandes cantidades del patógeno colonizan el hígado y bazo (Watson y Holden, 2010), se podría pensar que los ratones que sobreviven en los ensayos de mortalidad son aquellos que no se mostraron infectados por Salmonella en el ensayo de translocación al día 5 post desafío con el patógeno. En este trabajo, 1/6 y 5/7 de los animales de los grupos control y preventivo respectivamente, no fueron infectados por Salmonella en el ensayo de translocación, por lo que podría esperarse, probablemente, una sobrevivencia de 17% y 70% si el ensayo hubiera sido de mortalidad. Así, el uso de ensayos de translocación en lugar de ensayos de mortalidad acortaría experimentos y disminuiría el sufrimiento en los animales letalmente infectados. Aún más, la información que puede obtenerse de un ensayo de translocación es mayor (proporciones de animales infectados/no infectados, órganos y tejidos para determinar niveles de colonización y parámetros inmunes) comparado a los ensayos de mortalidad (sólo % de animales que sobreviven una infección). Acortar los tiempos de manipulación y maximizar la información obtenida proveniente de animales son hechos acordes a las disposiciones de la guía ARRIVE para la investigación con animales del National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (Kilkenny y col., 2010). Sin embargo, más estudios son necesarios para proponer el uso del ensayo de translocación como alternativa al ampliamente usado modelo de mortalidad para el estudio de la capacidad protectora de los probióticos frente a infecciones por patógenos entéricos.

Algunos parámetros inmunes fueron determinados a nivel intestinal en los animales del ensayo de translocación. Se observó un aumento en la S-IgA en contenido de intestino delgado y en los niveles de IL-10 en intestino grueso de los animales del grupo preventivo (Tabla 15). En estudios previos, se relacionó un aumento en la S-IgA mucosa con mayor sobrevivencia a la infección con Salmonella (Vinderola y col., 2007). Si bien se sabe que la S-IgA puede proteger al epitelio intestinal de patógenos entéricos y toxinas, sorprendentemente, no existe mucha información sobre los mecanismos moleculares involucrados (Mantis y Forbes, 2010). Un mecanismo propuesto es la inhibición de la movilidad del enteropatógeno y su entrada a las células epiteliales, que fue reportado como una capacidad previamente desconocida de la S-IgA para

“desarmar” los patógenos microbianos en las superficies de la mucosa y así prevenir la colonización e invasión del epitelio intestinal (Forbes y col., 2008). Otro mecanismo que puede haber contribuido al aumento en la protección es mediado por IL-10 en intestino grueso, citoquina conocida por sus efectos regulatorios y anti-inflamatorios (Paul y col., 2012).

Finalmente, se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) para obtener una mejor idea de la distribución de los datos y la relación entre ellos (Fig. 50). Las respuestas individuales de los animales del grupo preventivo se observaron dispersas en el gráfico mientras que las respuestas de los grupos control y preventivo-terapéutico resultaron mucho más agrupadas. Una interpretación “biológica” simplificada de este movimiento de variables podría ser que en animales control infectados, las variables o parámetros biológicos se mueven en la misma dirección y se agrupan (adquieren valores similares), es decir, estarían todos con un gran grado de similitud en su condición de infectados. Por el contrario, en los animales que fueron protegidos de la infección, sus variables biológicas se “dispararían” en diferentes direcciones, con una elevada variabilidad entre individuos, tratando de combatir esa infección, cada individuo a su modo. La infección “homogenizaría” las variables entre individuos, mientras que en la protección las variables individuales se “dispersarían”. Este agrupamiento de las respuestas en animales infectados fue previamente reportado al usar Análisis de Componentes Principales por Gerritsen y col. (2011) cuando correlacionaron la terapia con probióticos con una pancreatitis aguda asociada a microbiota en ratas. Putaala y col. (2010) también demostraron un mayor agrupamiento de las respuestas individuales en células Caco-2 infectadas con *Escherichia coli* O157:H7 comparado con las respuestas individuales de las células Caco-2 desafiadas con probióticos. Las respuestas individuales que se agrupan y forman grupos relativamente pequeños sugieren que la respuesta es consistente y homogénea (Putaala y col., 2010). Además, la segunda componente también indica que el movimiento de las variables en intestino delgado fue en dirección opuesta al movimiento de las variables en intestino grueso, lo que podría estar relacionado con el hecho de que las respuestas inmunes están compartimentalizadas en la mucosa intestinal (Macpherson y

col., 2012). Esto se observó para las tres variables medidas (células productoras de IgA, IL-10 e IFN- γ). La longitud de las flechas y la posición de los puntos finales son similares para las variables dentro de cada grupo, lo que indica que esas variables estuvieron altamente correlacionadas y se comportaron de manera similar en cada ratón. Una interpretación biológica del movimiento de los datos a lo largo del gráfico de Componentes Principales sugeriría que la segunda componente fue eficiente en diferenciar el grupo control del preventivo, mientras que el grupo preventivo-terapéutico permaneció entre estos dos grupos. El agrupamiento o dispersión de las respuestas inmunes individuales en animales infectados o no infectados, respectivamente, puede ser una herramienta útil provista por PCA para caracterizar el efecto mitigante de los probióticos en infecciones con Salmonella. Más estudios involucrando el estudio de otros parámetros inmunes son necesarios para ahondar en este aspecto.

5. Conclusiones parciales.

La modulación de la respuesta inmune del hospedador y la protección frente a enfermedades infecciosas se encuentran entre los beneficios más distintivos de las bifidobacterias. En este trabajo se utilizó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como candidato potencial para una aplicación probiótica y se planteó como objetivo estudiar, utilizando dos cepas de ratones, la capacidad protectora de la bifidobacteria frente a una infección con *Salmonella* ser. Typhimurium. En un modelo de salmonelosis donde se utilizaron ratones Swiss, se observó que la administración durante 10 días de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 como cultivo fresco redujo algunos indicadores de daño inflamatorio a nivel de íleon e hígado, atenuando la respuesta inflamatoria, y activando una respuesta inmune mediada por S-IgA e IFN- γ en los primeros 10 días posteriores a la infección. Cuando la bifidobacteria fue sometida previamente a tratamientos tecnológicos, el efecto protector prácticamente se mantuvo para la cepa en su forma de secado spray, pero su funcionalidad resultó afectada en el caso de la cepa liofilizada. Si bien retuvo la capacidad de inducir un aumento en los niveles de S-IgA posterior a la infección, el estado histopatológico de los tejidos sumado a la secreción de la citoquina proinflamatoria fue similar a la del grupo control. Estos resultados sumado a lo observado durante los ensayos de inmunomodulación plantean la hipótesis de que, si bien *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 es muy resistente a la liofilización y se obtienen altos niveles de viabilidad tanto durante el proceso como durante el almacenamiento posterior de los cultivos liofilizados, las células podrían sufrir modificaciones durante el proceso de congelación/deshidratación que afectarían a su funcionalidad en relación a los parámetros estudiados. Dado que la liofilización es la tecnología de deshidratación instalada a nivel industrial mundial para la producción de cultivos starter y/o probióticos, si bien estos resultados son preliminares, debería ahondarse en el estudio de este proceso de deshidratación y en la búsqueda de nuevas estrategias y condiciones de liofilizado para *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. La adaptación del secado spray como tecnología para la producción de cultivos microbianos deshidratados se encuentra aún en fase de desarrollo. Sin embargo, la notable resistencia de la cepa al secado spray y el mantenimiento de sus propiedades

funcionales, sumado a que el secado spray como tecnología está ampliamente instalado en nuestro país, hace que esta combinación sea de interés para un futuro escalado de la producción del cultivo deshidratado por secado spray.

Por su parte, los resultados obtenidos en el modelo de salmonelosis en ratones BALB/c demostraron que la administración preventiva durante 10 días de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 redujo tanto la incidencia como la severidad de la infección con *Salmonella* (expresado en la proporción de animales infectados y en los niveles de colonización de hígado y bazo, respectivamente). Varios mecanismos y células estarían involucrados en el efecto protector contra *Salmonella*, particularmente la inducción de la respuesta secretoria de IgA. El efecto positivo fue asociado a un aumento de los niveles de S-IgA en contenido de intestino delgado así como a un aumento en los niveles intestinales de IL-10, lo que indica un efecto anti inflamatorio asociado. Aún se necesitan estudios adicionales para proponer al modelo de translocación como alternativa al modelo de mortalidad para el estudio de propiedades protectoras de los probióticos contra patógenos, pero debido a que brinda mayor información y a sus ventajas desde el punto de vista ético (mejor aprovechamiento del animal y sus tejidos), podría recomendarse su empleo frente a los estudios de sobrevida.

En su conjunto, y a pesar de ciertas variabilidades observadas, los resultados de este capítulo sugieren un efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en un modelo de salmonelosis, lo que refuerza su potencial como cepa probiótica, de acuerdo a los requerimientos de FAO (2002). El estudio en detalle de los mecanismos inmunes que llevan al mismo escapan a los fines de esta tesis y a las posibilidades de infraestructura y conocimientos, si bien la perspectiva en un futuro es continuar avanzando en el análisis funcional de la cepa, empleando técnicas de avanzada que permitan analizar un mayor número de parámetros y analitos. El hecho de que, ante la gran diversidad de resultados reportados en la bibliografía, se haya demostrado el efecto protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en dos modelos de salmonelosis, utilizándose cepas de ratón distintas, una de ratones outbred derivada de ratones libres de gérmenes (Swiss) y la otra de ratones inbred convencionales (BALB/c), tanto a nivel histopatológico como inmunológico, y en diferentes sitios anatómicos (intestinos

grueso y delgado, hígado y bazo), refuerza el rol protector de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Esto, sumado al hecho de que se trata de una cepa aislada a partir de leche materna humana y con robustez tecnológica (resistencia al secado spray) presenta una posibilidad prometedora para su aplicación en un producto funcional orientado a infantes, el grupo etario más susceptible a infecciones por *Salmonella*.

El presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo aislar, a partir de leche materna, y caracterizar, desde el punto de vista tecnológico y funcional, microorganismos de interés industrial para su aplicación en alimentos, haciendo especial énfasis en bifidobacterias. A partir de muestras de este fluido biológico donadas por madres de la ciudad de Santa Fe, se obtuvieron aislamientos de lactobacilos y de 3 especies de bifidobacterias: *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* y *B. dentium*. Cuando se compararon los diferentes aislamientos, se observaron comportamientos diferenciales especie y cepa-dependientes, demostrando los miembros del grupo *B. animalis* subsp. *lactis*, en general, un mayor potencial de transferencia a la industria de alimentos por su facilidad de manejo y desarrollo en distintos medios de cultivo, aptitudes tecnológicas (resistencia a liofilización y almacenamiento) y performance en diversos ensayos de funcionalidad in vitro (resistencia a DGS, producción de derivados de CLA y CLNA).

En particular, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostró ser una cepa robusta, capaz de desarrollar en medios comerciales y formulados a partir de ingredientes económicos a escala laboratorio, de ser producida en grandes volúmenes (producción de 600 L por una empresa italiana especializada en cultivos para la industria láctea) y de ser deshidratada a través de tecnologías convencionales y alternativas, con sobrevidas satisfactorias. La estabilidad de los cultivos deshidratados dependió fuertemente de las condiciones evaluadas, pero aún en condiciones no adecuadas, se obtuvieron altos niveles de viabilidad para todos los casos, luego del almacenamiento. Cuando se analizó en particular el secado spray, tecnología de deshidratación ampliamente instalada a nivel nacional, y se realizaron ensayos preliminares a nivel industrial (en leche descremada como matriz), se obtuvieron polvos con contenido de humedad y sobrevida satisfactorios.

Respecto a los estudios funcionales, *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 demostró ser capaz de inhibir in vitro a un amplio número de microorganismos patógenos. Cuando se la utilizó en ensayos in vivo en distintos modelos experimentales, demostró ser capaz de resistir el tránsito intestinal (detección de bifidobacterias presuntivas en heces) y

estimular el sistema inmune de la mucosa intestinal a través de la inducción de la producción y secreción de IgA, manteniéndose el efecto, en diferentes grados, cuando la cepa fue sometida a tratamientos tecnológicos. También demostró ser capaz de proteger frente a un modelo de infección por *S. enterica* ser. Typhimurium, atenuando la respuesta inflamatoria, disminuyendo la incidencia y severidad de la infección, y modulando los niveles de IgA e IFN- γ . Este efecto también se observó para el cultivo secado spray.

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, una cepa aislada de leche materna humana, posee el potencial tecnológico y funcional para ser considerada una cepa probiótica y avanzar así con estudios clínicos en humanos con vista a su potencial transferencia a la industria para su utilización en la producción de alimentos funcionales. La tecnología de secado spray resultaría una buena opción para la producción del cultivo deshidratado a gran escala.

En la presente Tesis Doctoral se avanzó en el conocimiento sobre el potencial de microorganismos aislados de leche materna de ser utilizados en la industria de alimentos funcionales. Se analizaron aspectos tecnológicos y funcionales, y se obtuvieron resultados alentadores para la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Las perspectivas o temáticas sobre las cuales se pretende avanzar son:

- 1) Avanzar en el escalado industrial de la producción de biomasa de la cepa en medios de cultivo económicamente factibles.
- 2) Profundizar los estudios de producción de biomasa deshidratada y de estabilidad durante el almacenamiento, mediante la aplicación de secado spray a nivel industrial.
- 3) Avanzar en el estudio de las propiedades antiinflamatorias a nivel intestinal de la cepa, como cultivo fresco y secado spray, en un modelo de colitis aguda y crónica inducida por TNBS, para el cual se obtuvieron recientemente resultados alentadores a través de un proyecto en vigencia CONICET-CNRS (Instituto Pasteur de Lille, Francia).
- 4) Avanzar en la búsqueda de herramientas financieras y de grupos de profesionales para la realización de estudios clínicos en humanos relacionados a la capacidad de la cepa de contribuir a la salud intestinal (aumento de defensas intestinales, prevención de infecciones y de estados inflamatorios).

- Adeyeni, O.O., Akindele, A.J., Ogunleye, E.A. 2009. Evaluation of the antidiarrhoeal effect of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae) root extract. *J Ethnopharmacol*, 123:459-63.
- Adhikari, K., Mustapha, A, Grün, I.U., Fernando L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci*, 83:1946-51.
- Agbor, T.A., Demma, Z., Mrsny, R.J., Castillo, A., Boll, E.J., McCormick, B.A. 2014. The oxido-reductase enzyme glutathione peroxidase 4 (GPX4) governs *Salmonella* Typhimurium-induced neutrophil transepithelial migration. *Cell Microbiol*, 16(9):1339-53.
- Amagase, H. 2008. Current marketplace for probiotics: a Japanese perspective. *Clin Infect Dis*, 46:S73-75; discussion S144-151.
- Amine, K.M., Champagne, C.P., Raymond, Y., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M. 2014. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*, 37(1):193-9.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*, 24(6):559-70.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J., Margolles, A., Mayo, B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 14:6-15.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J*, 15:399–409.
- Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Gueimonde, M. 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol*, 149(1):28-36.

- Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M., Finlay, B. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol*, 5:427.
- Bao, S., Beagley, K.W., France, M.P., Shen, J., Husband, A.J., 2000. Interferon-gamma plays a critical role in intestinal immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *Immunol*, 99(3):464-72.
- Basu, S., Paul, D.K., Ganguly, S., Chatterjee, M., Chandra, P.K. 2009. Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol*, 43(3):208-13.
- Bauer, S.A.W., Schneider, S., Behr, J., Kulozik, U., Först, P. 2012. Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low temperature vacuum drying. *J Biotechnol*, 159(4):351–7.
- Ben Amor, K., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., Vos WM de, Abee T. 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol*, 68(11):5209-16.
- Bergström, A., Skov, T.H., Bahl, M.I., Roager, H.M., Christensen, L.B., Ejlerskov, K.T., Mølgaard, C., Michaelsen, K.F., Licht, T.R. 2014. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol*, 80(9):2889-900.
- Binnendijk, K.H., Rijkers, G.T. 2013. What is a health benefit? An evaluation of EFSA opinions on health benefits with reference to probiotics. *Benef Microbes*, 4(3):223-30.
- Blum, S., Alvarez, S., Haller, D., Perez, P., Schiffrin, E.J. 1999. Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1): 199-205.
- Bosscher, D., Breynaert, A., Pieters, L., Hermans, N. 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol*, 60(6):5-11.
- Bovee-Oudenhoven, I.M., Ten Bruggencate, S.J., Lettink-Wissink, M.L., van der Meer, R. 2003. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *Salmonella* in rats. *Gut*, 52(11):1572-8.

- Brandtzaeg, P., Bjerke, K., Kett, K., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., Sollid, L.M., Valnes, K. 1987. Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 59:21-39.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. 2000. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol*, 38(7):2465-7.
- Bruno, F.A., Shah, N.P. 2003. Viability of two freeze-dried strains of Bifidobacterium and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. *J Food Sci*, 68:2336-9.
- Bunthof, C.J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F.M., Abee, T. 2001. Flow cytometry assessment of the viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 67:2326-35.
- Burns, P., Lafferriere, L., Vinderola, G., Reinheimer, J. 2014. Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. *Int J Dairy Technol*, 67:448-57.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, 96(3):544-51.
- Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., Fornasari, M.E., Reinheimer, J.A., Guglielmotti, D.M. 2011. Adventitious dairy Leuconostoc strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Sci Technol*, 91(4):457-70.
- Cárdenas, N, Martín, V, Delgado, S, Rodríguez, JM, Fernández, L. 2014. Characterisation of *Lactobacillus gastricus* strains isolated from human milk. *Int Dairy J*, 39(1):167-77.
- Castillo, N.A., Perdígón, G., de LeBlanc, A. 2011. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol*, 11:177.
- Celik, O.F., O'Sullivan, D.J. 2013. Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *J Dairy Sci*, 96:3506-16.

- Cerutti, A., Rescigno, M. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28(6):740-50.
- Champagne, C., Gardner, N. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45:61-84.
- Champagne, C.P., Roy, D., Lafond, A. 1997. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnol Tech*, 11:567-9.
- Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D., Longo, K.A., Govek, E.K., Nolan, A., Gagne, S., Morgan, K., Hixon, J., Flynn, N., Murphy, B.J., Hernández, A.S., Li, J., Tino, J.A., Gordon, D.A., DiStefano, P.S., Geddes, B.J. 2009. Enhanced gastrointestinal motility with orally active ghrelin receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 329:1178-86.
- Chassard, C., de Wouters, T., Lacroix, C. 2014. Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Curr Opin Biotechnol*, 26:141-7.
- Chen, Y.C., Chien, Y.W., Chang, P.J., Hsieh, W.S., Chen, P.C. 2012. Probiotic supplement use among young children in Taiwan: a prospective cohort study. *PLoS One*, 7(9):e43885.
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J.R., Balbarie, P., Ramón, D., Genovés, S. 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 77(4):1335-43.
- Cherbut, C. 2002. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *Br J Nutr*, 87(2):S159-62.
- Choi, K., Ryu, J., Kwak, H. 2010. Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. *Food Sci. Biotechnol.*, 19:957-65.
- Chouraqui, J.P., Dupont, C., Bocquet, A., Bresson, J.L., Briend, A., Darmaun, D., Frelut, M.L., Ghisolf, J., Girardet, J.P., Goulet, O., Putet, G., Rieu, D., Rigo, J., Turck, D., Vidailhet, M. 2008. Feeding during the first months of life and prevention of allergy. *Arch Pediatr*, 15(4):431-42.

- Corre, C., Madec, M.N., Boyaval, P. 1992. Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J Chem Tech Biotechnol* 53:189–94.
- de Jong, H.K., Parry, C.M., van der Pol, T., Wiersinga, W.J. 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog*, 8(10):e1002933.
- de Kivit, S., Tobin, M.C., Forsyth, C.B., Keshavarzian, A., Landay, A.L. 2014. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Front Immunol*, 5:60. doi: 10.3389/fimmu.2014.00060.
- de La Cochetière, M.F., Rougé, C., Darmaun, D., Rozé, J.C., Potel, G., Gras Leguen, C. 2007. Intestinal microbiota in neonates and preterm infants: a review. *Curr Pediatr Rev*, 3, 21-34.
- de Moreno de LeBlanc, A., Castillo, N.A., Perdígón, G. 2010. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Int J Food Microbiol*, 138(3):223-31.
- de Moreno de LeBlanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., Weill, R., Antóine, J., Perdígón, G. 2008. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiol*, 213(2):97-108.
- Degnan, F.H. 2008. The US Food and Drug Administration and probiotics: regulatory categorization. *Clin Infect Dis*, 46:S133-S136.
- Dekker, J.W., Wickens, K., Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E.A., Fitzharris, P., Tannock, G.W., Purdie, G., Crane, J. 2009. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0–2 years. *Int Dairy J*, 19:149-54.
- del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol*, 31(6):438-42.
- Doleyres, Y., Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int Dairy J*. 15: 973–88.

- Doleyres, Y., Paquin, C., LeRoy, M., Lacroix, C. 2002. Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 60:168–73.
- Domínguez, J.M. 2011. Drying. En: Moo-Young, M. *Comprehensive Biotechnology*, 2^o edición (p.727-35). Burlington: Academic Press.
- Duan, X., Zhang, M., Mujumdar, A.S. y Wang, S. 2010. Microwave freeze drying of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *J Food Eng*, 96(4): 491-7.
- Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde, M., Bottger, E. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–53.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2008. Technical guidance on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J*, 732:1-15.
- EFSA. 2012. Scientific opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J*. 10: 2740.
Eng, 49:185e191.
- Ezendam, J., van Loveren, H. 2008. *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice. *Br J Nutr*, 99: 83–90.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group report. Available at <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> Accessed 23 Juny 2014.
- Feng, H., Tang, J. 1998. Microwave finish drying of diced apples in a spouted bed. *J. Food Sci*, 63(4):679-83.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J.M. 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*, 69(1):1-10.
- Fischer, K. 1935. Neues verfahren zur maßanalytischen bestimmung des wassergehaltes von flüssigkeiten und festen körpern. *Angewandte Chemie*, 48:394–6.

- Floch, M.H. 2014. Recommendations for probiotic use in humans: a 2014 update. *Pharmaceuticals*, 7(10):999-1007.
- Foligné, B., Daniel, C., Pot, B. 2013. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr Op Microbiol*, 16(3):284-92.
- Fouhy, F., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Cotter, P.D. 2012. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*. 3(3):203-20.
- Fu, N., Chen, X.D. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process. *Food Res Int*, 44:1127-49.
- Fu, W.Y., Suen, S.Y., Etzel, M.R. 1994. Injury to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 during spray-drying. En: Rudolph, V. y Keey, R.B. *Drying 94 vol. B, proceedings international drying symposium* (p. 785-92). Gold Coast, Australia.
- Fuller, R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*, 66:365-78.
- Funkhouser, L.J., Bordenstein, S.R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*, 11(8):e1001631.
- Galdeano, C.M., de Moreno de Leblanc, A., Carmuega, E., Weill, R., Perdigon, G. 2009. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *J Dairy Res*, 76:446-54.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol*, 66:2605-12.
- Gehrmann, D., Zank, J., Kempkes, D.I. 2004. Gentle drying methods in the pharmaceutical and food industry. En: Eikevik, T.M (p. 38). *Dewatering Laboratory NTNU – SINTEF*. Trondheim, Norway.
- Gerritsen, J., Timmerman, H.M., Fuentes, S., van Minnen, L.P., Panneman, H., Konstantinov, S.R., Rombouts, F.M., Gooszen, H.G., Akkermans, L.M., Smidt, H., Rijkers, G.T. 2011. Correlation between protection against sepsis by probiotic therapy and stimulation of a novel bacterial phylotype. *Appl Environ Microbiol*, 77(21): 7749-56.

- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125(6):1401-12.
- Gill, H.S., Shu, Q., Lin, H., Rutherfurd, K.J., Cross, M.L. 2001. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med Microbiol Immunol*, 190:97-104.
- Giraffa, G., Andrighetto, G., Antonello, C., Gatti, M., Lazzi, M., Marcazzan, G., Lombardi, A., Neviani, E. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int J Food Microbiol*. 91, 129–139.
- Gleeson, M., Cripps, A.W. 2004. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 42(1):21-33.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol*, 10:139-57.
- González de Dios, J., González Muñoz, M. 2013. Probiotics and necrotizing enterocolitis in preterm infants: to NEC or not to NEC?, this is the question. *Nutr Hosp*, 28(6):2115-23.
- Grimm, V., Westermann, C., Riedel, C.U. 2014. Bifidobacteria-host interactions: an update on colonisation factors. *Biomed Res Int*, 2014:960826. doi: 10.1155/2014/960826.
- Grimont, P.A.D, Weill, F-X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars (9 edición). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, Francia.
- Grönlund, M.M., Grześkowiak, Ł., Isolauri, E., Salminen, S. 2011. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes*, 2(4):227-33.
- Grönlund, M.M., Gueimonde, M., Laitinen, K., Kociubinski, G., Grönroos, T., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 37(12):1764-72.
- Guarner, F. 2007. Prebiotics in inflammatory bowel diseases. *Br J Nutr*, 98(1):S85-9.

- Gueimonde, M., Flórez, A.B., van Hoek, A.H., Stuer-Lauridsen, B., Strøman, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. 2010. Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *App Environ Microbiol*, 76:3364-9.
- Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. 2009. Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Appl Environ Microbiol*, 75(10):3153-60.
- Gueimonde, M., Noriega, L., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S. 2005. Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol*, 101(3):341-6.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1):64-6.
- Guimarães, P.M., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28(3):375-84.
- Gunasekaran, S. 1999. Pulsed microwave-vacuum drying of food materials. *Drying technol*, 17(3):395-412.
- Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P. 1999. Cytokine secretion by stimulated monocytes depends on the growth phase and heat treatment of bacteria: a comparative study between lactic acid bacteria and invasive pathogens. *Microbiol Immunol*, 43:925-35.
- Han, Y.R., Youn, S.Y., Ji, G.E., Park, M.S. 2014. Production of α - and β -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD47. *J Microbiol Biotechnol*, 24(5):675-82.
- Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A., Knight, S.C., Stagg, A.J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53(11):1602-9.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. 2001. Starter cultures and their use. En: Marth, E.H., Steele, J.L. *Applied dairy microbiology*, 2^o edición (p.151-206). New York: Marcel Dekker.
- Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, 95:471-8.

- Heithoff, D.M., Shimp, W.R., House, J.K., Xie, Y., Weimer, B.C., Sinsheimer, R.L., Mahan, M.J. 2012. Intraspecies variation in the emergence of hyperinfectious bacterial strains in nature. *PLoS Pathogens*, 8(4):e1002647.
- Heller, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr*, 73:374S-379S.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*, 41:85–101.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Lee, S.L., Chou, C.C. 2007. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. *Int J Food Microbiol*. 116(1):186-9.
- Hu, J., Gao, W.-Y., Ling, N.-S., Liu, C.-X. 2009. Antidiarrhoeal and intestinal modulatory activities of Wei-Chang-An-Wan extract. *J. Ethnopharmacol*, 125:450-5.
- Huang, X.Z., Zhu, L.B., Li, Z.R., Lin, J. 2013. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. *World J Clin Pediatr*, 2(4):46-53.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol*, 46:205–29.
- Huebner, J., Wehling, R.L., Parkhurst, A., Hutkins, R.W. 2008. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *Int Dairy J*, 18:287–93.
- Hughes, D.B., Hoover, D.G. 1995. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *J Dairy Sci*, 78(2):268-76.
- Hurley, D., McCusker, M.P., Fanning, S., Martins, M. 2014. Salmonella-host interactions: modulation of the host innate immune system. *Front Immunol*, 5:481.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2004. Probiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, 18:299-313.
- Jeon, S.G., Kayama, H., Ueda, Y., Takahashi, T., Asahara, T., Tsuji, H., Tsuji, N.M., Kiyono, H., Ma, J.S., Kusu, T., Okumura, R., Hara, H., Yoshida, H., Yamamoto, M., Nomoto, K., Takeda, K. 2012. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog*, 8(5):e1002714.

- Jeurink, P.V., van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L.M.J., Fernández, L., Garsen, J., Knol, J., Rodríguez, J.M., Martín, R. 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*, 4:17-30.
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*, 159(3):187-93.
- Johansson, M.A., Saghafian-Hedengren, S., Haileselassie, Y., Roos, S., Troye-Blomberg, M., Nilsson, C., Sverremark-Ekström, E. 2012. Early-life gut bacteria associate with IL-4-, IL-10- and IFN- γ production at two years of age. *PLoS One*, 7(11):e49315.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C.P., Rochat, F., Chassard, C. 2014. Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol Environ Microbiol*, 16(9):2891–2904.
- Kato, L.M., Kawamoto, S., Maruya, M., Fagarasan, S. 2014. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev*, 260(1):67-75.
- Kaur, N., Gupta, A.K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci*, 27(7):703-14.
- Kekkonen, R.A., Lummela, N., Karjalainen, H., Latvala, S., Tynkkynen, S., Jarvenpaa, S., Kautiainen, H., Julkunen, I., Vapaatalo, H., Korpela, R. 2008. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol*, 14(13):2029-36.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G. 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8(6):e1000412.
- Klare, I., Konstabel, C., Müller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., Witte, W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 71(12):8982-6.
- Kolida, S., Gibson, G.R. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J Nutr*, 137(11): 2503-6.

- Korbekandi, H., Mortazavian, A.M., Iravani, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. En: Shah, N.P. Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to the human health (p.121–46). USA: Nova Science Publishing Ltd.
- Kukkonen, K., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M. 2008. Long-term safety and impact on infection rates of postnatal probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, 122(1):8-12.
- Kurtmann, L., Skibsted, L.H., Carlsen, C.U. 2009. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem*, 57(15):6736-41.
- Langlands, S.J., Hopkins, M.J., Coleman, N. & Cummings, J.H. 2004. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*, 53(11):1610-6.
- Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., Vinderola, G. 2014. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *J Dairy Res*, 81(3):267-74.
- Le Thomas, I., Mariani-Kurkdjian, P., Collignon, A., Gravet, A., Clermont, O., Brahimi, N., Gaudelus, J., Aujard, Y., Navarro, J., Beaufiles, F., Bingen, E. 2001. Breast milk transmission of a Panton-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strain causing infantile pneumonia. *J Clin Microbiol*, 39(2):728-9.
- Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol*, 98:1303-15.
- Lee, S.J., Rosenberg, M. 2000. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensm -Wiss. Technol.* 33: 80-8.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y. 2002. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *Br J Nutr*, 88(1):S101-8.
- Lee, Y.K., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics, 2° edición. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc.
- Lembo, A., Camilleri, M. 2003. Chronic Constipation. *N Engl J Med*, 349:1360-8.

- Lian, W.C., Hsiao, H.C., Chou, C.C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol*, 74 (1-2):79-86.
- Lima-Filho, J.V., Vieira, L.Q., Arantes, R.M., Nicoli, J.R. 2004. Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. *Braz J Med Biol Res*, 37(7):1005-13.
- Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., Spiller, R.C. 2006. Functional bowel disorder. *Gastroenterol*, 130(5):1480-91.
- López, J., Martínez, A.B., Luque, A., Pons, J.A., Vargas, A., Iglesias, J.R., Hernández, M. Villegas, J.A. 2008. Efecto de la ingesta de un preparado lácteo con fibra dietética sobre el estreñimiento crónico primario idiopático. *Nutrición Hospitalaria*, 23(1):12-9.
- Luoto, R., Ruuskanen, O., Waris, M., Kalliomäki, M., Salminen, S., Isolauri, E. 2014. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*, 133(2):405-13.
- Maassen, C.B., Boersma, W.J., van Holten-Neelen, C., Claassen, E., Laman, J.D. 2003. Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine*, 21:2751-7.
- Macpherson, A.J., Geuking, M.B., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D. 2012. The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunol Rev*, 245:132–46.
- Macpherson, A.J., Geuking, M.B., McCoy, K.D., 2012. Innate and adaptive immunity in host-microbiota mutualism. *Frontiers in Bioscience* 4, 685-98.
- Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., Lamarre, A. 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection*, 3: 1021-35.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., Girardin, S.E. 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, 19(2):106-15.
- Maia, O.B., Duarte, R., Silva, A.M., Cara, D.C., Nicoli, J.R. 2001. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged

- with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. *Vet Microbiol*, 79(2):183-9.
- Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E.R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol*, 99(3):287-96.
- Maisonneuve, S., Ouriet, M.F., Duval-Iflah, Y. 2002. Interrelationships between dairy product intake, microflora metabolism, faecal properties and plasmid dissemination in gnotobiotic mice. *Br J Nutr*, 87:121-9.
- Malafrente, L., Lamberti, G., Barba, A.A., Raaholt, B., Holtz, E., Ahrné, L. 2012. Combined convective and microwave assisted drying: Experiments and modeling. *J Food Eng*, 112(4):304-12.
- Maldonado Galdeano, C., de Moreno de Leblanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M. E., Perdígón, G. 2007. A proposal model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vacc Immunol*, 14:485-92.
- Mantis, N.J., Forbes, S.J. 2010. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Investigations*, 39(4-5):383-406.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci*, 80(6):1031-7.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.W., Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 75:965-9.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Inter J Food Microbiol*, 112:35-43.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*, 143:754-8.

- Martin-Dejardin, F., Ebel, B., Lemetais, G., Nguyen Thi Minh, H., Gervais, P., Cachon, R., Chambin, O. 2013. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: interest of flow cytometry. *Eur J Pharm Sci*, 49(2):166-74.
- Martins, A.K., Martins, F.S., Gomes, D.A., Elian, S.D., Vieira, A.T., Teixeira, M.M., Cara, D.C., Nardi, R.M., Nicoli, J.R. 2010. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. *Archives of Microbiology* 192(12), 995-1003.
- Martins, F.S., Nardi, R.M., Arantes, R.M., Rosa, C.A., Neves, M.J., Nicoli, J.R. 2005. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol* 51(2):83-92.
- Martins, F.S., Rodrigues, A.C., Tiago, F.C., Penna, F.J., Rosa, C.A., Arantes, R.M., Nardi, R.M., Neves, M.J., Nicoli, J.R. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J Med Microbiol*, 56:352-9.
- Martins, F.S., Veloso, L.C., Arantes, R.M., Nicoli, J.R., 2009. Effects of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium in mice. *Lett Appl Microbiol*, 49(6):738-44.
- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., Huys, G. 2007. In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. *J Dairy Sci*, 90:3572-8.
- Mastroeni, P., Sheppard, M. 2004. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes and Infection*, 6(4):398-405.
- Mata, L.J., Wyatt, R.G.. 1971. Host resistance to infection. *Am J Clin Nut*, 24:976-86.

- Matar, C., Valdez, J.C., Medina, M., Rachid, M., Perdigon, G. 2001. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res*, 68:601-9.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol*, 93:109-13.
- Mättö, J., Alakomi, H.L., Vaari, A., Virkajarvi, I., Saarela, M. 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int. Dairy J*, 16:1029–37.
- Mättö, J., Malinen, E., Suihko, M.L., Alander, M., Palva, A., Saarela, M. 2004. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *J Appl Microbiol*, 97(3):459–70.
- Mättö, J., van Hoek, A.H., Domig, K.J., Saarela, M., Flórez, A.B., Brockmann, E., Amtmann, E., Mayo, B., Aarts, H.J., Danielsen, M. 2007. Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the Etest method. *Int. Dairy J*, 17:1123-31.
- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem*, 106(4):1406-16.
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., Rescigno, M. 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One*, 4(9):e7056.
- Mitsuoka, T. 2014. Development of functional foods. *Biosci Microbiota Food Health*, 33(3):117-28.
- Moreno Villares, J.M. 2008. Probióticos en las fórmulas para lactantes. ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *An Pediatr (Barc)*, 68(3):286-94.
- Moriya, R., Fujikawa, T., Ito, J., Shirakura, T., Hirose, H., Suzuki, J., Fukuroda, T., MacNeil, D.J., Kanatani, A. 2010. Pancreatic polypeptide enhances colonic muscle contraction and fecal output through neuropeptide Y Y4 receptor in mice. *Eur. J. Pharmacol*, 627:258-64.

- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt. *Int J Dairy Technol*, 59:123–7.
- Mugambi, M.N., Musekiwa, A., Lombard, M., Young, T., Blaauw, R. 2012. Probiotics, prebiotics infant formula use in preterm or low birth weight infants: a systematic review. *Nutr J*, 11:58.
- Novak, F.R., Da Silva, A.V., Hagler, A.N., Figueredo, M.S. 2000. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Med Microbiol*, 49:1109-17.
- O'Hara, A.M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7(7):688-93.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Rodríguez, J.M., Xaus, J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol*, 101(1):72-9.
- Orsat, V., Yang, W., Changrue, V., Raghavan, G.S.V. 2007. Microwave-Assisted drying of biomaterials. *Food Bioprod Process*, 85(3):255-63.
- O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C. 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*, 152(3):189-205.
- O'Sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F. 2005. Probiotics: an emerging therapy. *Curr Pharm Des*, 11:3-10.
- Paéz, R., Lavari, L., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J., Vinderola, G. 2013. Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli *Int J Dairy Technol*, 66:155-61.
- Páez, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J. 2012. Effect of spray drying on the viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion in lactobacilli *Food Res Int*, 48:748–54.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*, 100(6):1171-85.

- Passot, S., Cenard, S., Douania, I., Tréléa, I.C., Fonseca, F. 2012. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem* 132, 1699–1705.
- Patel, S., McCormick, B.A. 2014. Mucosal inflammatory response to *Salmonella typhimurium* infection. *Front Immunol*, 5:311.
- Paul, G., Khare, V., Gasche, C. 2012 Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest*, 42(1):95-109.
- Pei, F., Shi, Y., Gao, X., Wu, F., Mariga, A.M., Yang, W., Zhao, L., An, X., Xin, Z., Yang, F., Hu, Q. 2014. Changes in non-volatile taste components of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during different stages of freeze drying and freeze drying combined with microwave vacuum drying. *Food Chem*. 165:547-54.
- Perdigón, G., Maldonado Galdeano, C., Vinderola, C.G., de Moreno, A., Medici, M., Bibas Bonet, M.E. 2005. Immunomodulation of mucosal immune response by probiotics. *Curr. Trends Immunol*, 6:69-85.
- Pérez Guerra N, Fajardo Bernárdez P, Méndez J, Cachaldor P, Pastrana Castro L. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol*, 134:89–107.
- Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J., Donnet-Hughes, A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3):e724-32.
- Peters, R.H. 2005. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *Int Dairy J*, 15:537–45.
- Petersen, A., Heegaard, P.M., Pedersen, A.L., Andersen, J.B., Sørensen, R.B., Frøkiaer, H., Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Poulsen, M., Licht, T.R. 2009. Some putative prebiotics increase the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol*, 9:245.
- Peterson, L.W., Artis, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3):141-53.

- Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Fontana, L., Gil, A. 2014. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol*, 20(42):15632-49.
- Pontier-Bres, R., Munro, P., Boyer, L., Anty, R., Imbert, V., Terciolo, C., André, F., Rampal, P., Lemichez, E., Peyron, J.F., Czerucka, D. 2014. *Saccharomyces boulardii* modifies *Salmonella typhimurium* traffic and host immune responses along the intestinal tract. *PLoS One*, 9(8):e103069.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2012. Cheese whey management: a review. *J Environ Manage*, 110:48-68.
- Putaalaa, H., Barrangou, R., Leyer, G.J., Ouwehand, A.C., Hansen, E.B., Romero, D.A., Rautonen, N. 2010. Analysis of the human intestinal epithelial cell transcriptional response to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium lactis* and *Escherichia coli*. *Beneficial Microbes*, 1(3):283-95.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. y col. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nat*, 464:59-65.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., Adams, M.C. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int*:43,1-7.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.C., Bouix, M. 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiol*, 55(1):35-43.
- Rautava, S., Arvilommi, H., Isolauri, E. 2006. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr Res*, 60(2):221-4.
- Rautava, S., Isolauri, E. 2002. The development of gut immune responses and gut microbiota: effects of probiotics in prevention and treatment of allergic disease. *Curr Issues Intest Microbiol*, 3:15-22.
- Ren, Z., Gay, R., Thomas, A., Pae, M., Wu, D., Logsdon, L., Meccas, J., Meydani, S.N. 2009. Effect of age on susceptibility to *Salmonella Typhimurium* infection in C57BL/6 mice. *J Med Microbiol*, 58:1559-67.

- Repa, A., Thanhaeuser, M., Endress, D., Weber, M., Kreissl, A., Binder, C., Berger, A., Haiden, N. 2015. Probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) prevent NEC in VLBW infants fed breast milk but not formula. *Pediatr Res*, 77(2):381-8.
- Rescigno, M. 2013. Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27(1):17-24.
- Roberfroid, M.B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr*, 93(1), S13–S25.
- Roberfroid, M.B. 2008. General Introduction: Prebiotics in Nutrition. *Handbook of Prebiotics*, 1: 1-13.
- Roberfroid, M.B., Van Loo J.A.E., Gibson, G.R. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr*, 128(1):11-9.
- Rodrigues, A.C., Cara, D.C., Fretez, S.H., Cunha, F.Q., Vieira, E.C., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q. 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol*, 89(3):404-14.
- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J Appl Microbiol*, 98:1410-7.
- Ross, R.P., Mills, S., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2010. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. *Int Dairy J*, 20:269–76.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol*, 71(10):6150-8.
- Rowe, S.Y., Rocourt, J.R., Shiferaw, B., Kassenborg, H.D., Segler, S.D., Marcus, R., Daily, P.J., Hardnett, F.P., Slutsker, L. 2004. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Breast-feeding decreases the risk of sporadic salmonellosis among infants in FoodNet sites. *Clin Infect Dis*, 38(3):S262-70.
- Russell, D.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*, 149(1):88-105.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT Food Sci Technol*, 50:1-16.

- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T., Mättö, J. 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J Appl Microbiol*, 99:1330-9.
- Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H.L., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J. 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *Int. Dairy J*, 16:1477–82.
- Saarela, M.H., Alakomi, H.L., Puhakka, A., Mättö, J. 2009. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J. Appl Microbiol*, 106:1204-12.
- Sabikhi, L., Kumar, M.H., Mathur, B.N. 2014. *Bifidobacterium bifidum* in probiotic Edam cheese: influence on cheese ripening. *J Food Sci Technol*, 51(12):3902-9.
- Sainte-Marie, G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem*, 10:250–6.
- Saito, T., Mizutani, F., Iwanaga, Y., Morikawa, K., Kato, H. 2002. Laxative and anti-diarrheal activity of polycarbophil in mice and rats. *Jpn. J. Pharmacol*, 89:133-41.
- Sakai, F., Hosoya, T., Ono-Ohmachi, A., Ukibe, K., Ogawa, A., Moriya, T., Kadooka, Y., Shiozaki, T., Nakagawa, H., Nakayama, Y., Miyazaki, T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One*, 9(8):e105370.
- Salazar, N., Arboleya, S., Valdés, L. Stanton, C., Ross, P., Ruiz, L., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G. 2014. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet*, 5:406.
- Salazar-Lindo, E., Miranda-Langschwager, P., Campos-Sanchez, M., Chea-Woo, E., Sack, R.B. 2004. *Lactobacillus casei* strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial [ISRCTN67363048]. *BMC Pediatr*, 2:4-18.

- Salzman, N.H. 2011. Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Curr Opin Microbiol*, 14:99–105.
- Salzman, N.H., Underwood, M.A., Bevins, C.L. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*, 19(2):70-83.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3^o edición. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. 2006. The F₁F₀-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environ Microbiol*, 8(10):1825-33.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Först, P. 2006. Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Lett Appl Microbiol*, 42:271–6.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Först, P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog*, 23(4):302-15.
- Santos, R.L. 2014. Pathobiology of *Salmonella*, intestinal microbiota, and the host innate immune response. *Front Immunol*, 5:252.
- Sashihara, T., Sueki, N., Furuichi, K., Ikegami, S. 2007. Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes. *Int J Food Microbiol*, 120, 274-81.
- Saulnier, D.M., Spinler, J.K., Gibson, G.R., Versalovic, J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol*, 20(2):135-41.
- Saxelin, M. 2008. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: an European perspective. *Clin Infect Dis*, 46:S76-S79.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol*, 16(2):204-11.

- Schiffmann, R.F. 2007. Microwave and dielectric drying. En: Mujumdar, A.S. Handbook of industrial drying, 3^o edición (p. 285-305). (ed.). Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis.
- Schmid, K., Schlothauer, R.C., Friedrich, U., Staudt, C., Apajalahti, J., Hansen, E.B. 2006. Development of probiotic food ingredients. En: Goktepe I, Juneja VK, Ahmedna M. Probiotics in food safety and human health, 1^o edición (p. 35-66). Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis.
- Schuck, P., Dolivet, A., Méjean, S., Hervé, C., Jeantet, R. 2013. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. *Int Dairy J*, 31:12-7.
- Selmer-Olsen, E., Sorhaug, T., Birkeland, S. E., Pehrson, R. 1999. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 23(2):79-85.
- Shakirova, L., Grube, M., Gavare, M., Auzina, L., Zikmanis, P. 2013. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 40(1):85-93.
- Silva, A.M., Bambirra, E.A., Oliveira, A.L., Souza, P.P., Gomes, D.A., Vieira, E.C., Nicoli, J.R. 1999. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol*, 86(2):331-6.
- Silva, A.M., Barbosa, F.H., Duarte, R., Vieira, L.Q., Arantes, R.M., Nicoli, J.R. 2004. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *J Appl Microbiol*, 97(1):29-37.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol*, 99(3):493-501.
- Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., Giudici, P. 2014. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. *Food Microbiol*, 38:240-9.

- Sousa, S., Gomes, A.M., Pintado, M.M., Silva, J.P., Costa, P., Amaral, M.H., Duarte, A.C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T.A.P., Freitas, A.C. 2015. Characterization of freezing effect upon stability of probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food Bioprod Process*, 93:90–7.
- Spees, A.M., Kingsbury, D.D., Wangdi, T., Xavier, M.N., Tsohis, R.M., Bäumlner, A.J. 2014. Neutrophils are a source of gamma interferon during acute *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun*, 82(4):1692-7.
- Stadhouders, J., Janson, L.A., Hup, G. 1969. Preservation of starters and mass production of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J*, 23:182-99.
- Stecher, B., Hardt, W.D. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 14(1):82-91.
- Suitso, I., Jõgi, E., Talpsep, E., Naaber, P., Lõivukene, K., Ots, M.L., Michelson, T., Nurk, A. 2010. Protective effect by *Bacillus smithii* TBM12 spores of *Salmonella* serotype enteritidis in mice. *Beneficial Microbes*, 1(1): 37-42.
- Sung, V., Hiscock, H., Tang, M.L., Mensah, F.K., Nation, M.L., Satzke, C., Heine, R.G., Stock, A., Barr, R.G., Wake, M. 2014. Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomised trial. *BMJ*, 348:g2107.
- Suzuki, K., Ha, S.A., Tsuji, M., Fagarasan, S. 2007. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol*, 19(2):127-35.
- Tabbers, M.M., Milliano, I., Roseboom, M.G., Benninga, M.A. 2011. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *J Nutr*, 10–19.
- Ten Bruggencate, S.J., Bovee-Oudenhoven, I.M., Lettink-Wissink, M.L., Van der Meer, R. 2003. Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of *Salmonella* in rats. *J Nutr*, 133(7): 2313-18.
- Torringa, E., Esveld, E., Scheewe, I., van den Berg, R., Bartels, P. 2001. Osmotic dehydration as a pre-treatment before combined microwave-hot-air drying of mushrooms. *J Food*

- Tripathi, M.K., Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods*, 9:225-41.
- Truusalu, K., Mikelsaar, R.H., Naaber, P., Karki, T., Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M. 2008. Eradication of *Salmonella Typhimurium* infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. *BMC Microbiol*, 8:132.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int J Food Microbiol*, 60:75-81.
- van Nieuwenhove, C., Terán, V., Gonzalez, S.N. 2012. Conjugated linoleic and linolenic acid production by bacteria: development of functional foods. En: Rigobelo, E.C. *Probiotics*. ISBN: 978-953-51-0776-7, InTech, DOI: 10.5772/50321.
- Vega, C., Roos, Y.H. 2006. Spray-dried dairy and dairy-like emulsions: compositional considerations. *J Dairy Sci*, 89(2):383-401.
- Ventura, M., Turróni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F. y col. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genet*, 5(12):e1000785.
- Vieira, A.T., Teixeira, M.M., Martins, F.S. 2013. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol*, 4:445.
- Vinderola G, Zacarías MF, Bockelmann W, Neve H, Reinheimer J, Heller KJ. 2012. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiol*. 30(1):274-80.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. 2000b. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int*, 33:97-102.
- Vinderola, C.G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., Matar, C. 2005. Immunomodulating capacity of kefir. *J. Dairy Res*, 72:195–202.

- Vinderola, C.G., Medici, M., Perdigón, G. 2004. Relationships between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell-wall protein profiles in lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, 96(2):230-43.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int*, 36(9–10):895-904.
- Vinderola, CG, Prosello, W., Ghiberto, D. Y Reinheimer, J. 2000a. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci*, 83:1905-11.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J. 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT Food Sci Technol*, 41:1678-88.
- Vinderola, G., Matar, C., Perdigón, G. 2007. Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice. *Immunobiol*, 212:107–18.
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol*, 5:494. doi: 10.3389/fmicb.2014.00494.
- Wall, R., Ross, R.P., Ryan, C.A., Hussey, S., Murphy, B., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2009. Role of gut microbiota in early infant development. *Clin Med Pediatr*, 3:45-54.
- Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X.M., Zhang, H.P. 2009. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *J. Dairy Sci*, 92:2468–76.
- Watson, K.G., Holden, D.W. 2010. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cel Microbiol*, 12(10):1389-97.
- Wendy, K.W.Y., Suhaila, M., Mohammad H.J., Meyer. D., Yazid A. M. 2008. Changes in infants faecal characteristics and microbiota by inulin. *JCB J Clin Biochem Nutr*, 43:159-66.
- Weng, M., Walker, W.A. 2013. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J Dev Orig Health Dis*, 4(3):203-14.

- Wershil, B.K, Furuta, G.T. 2008. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 121(2): S380-3.
- West, P.A., Hewit, J.H., Murphy, O.M. 1979. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol*, 46:269-77.
- Whelan, K. 2013. Mechanisms and effectiveness of prebiotics in modifying the gastrointestinal microbiota for the management of digestive disorders. *Proc Nutr Soc*, 72:288–98.
- Wickens, K., Stanley, T.V., Mitchell, E.A., Barthow, C., Fitzharris, P., Purdie, G., Siebers, R., Black, P.N., Crane, J. 2013. Early supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* HN001 reduces eczema prevalence to 6 years: does it also reduce atopic sensitization? *Clin Exp Allergy*, 43(9):1048-57.
- Wijburg, O.L., Uren, T.K., Simpfendorfer, K., Johansen, F.E., Brandtzaeg, P., Strugnell, R.A. 2006. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med*, 203(1): 21-6.
- Wu, H.W., Tao, Z., Chen, G.H., Deng, H.W. 2004. Conjugate heat and mass transfer process within porous media with dielectric cores in microwave freeze drying. *Chem Eng Sci*, 59(14):2921e2928.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., Fisk, I. 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *J Funct Foods*, 6(100):205-14.
- Young, S.L, Sarda, X., Rosenberg, M. 1993. Microencapsulating properties of whey proteins. Combination of whey proteins with carbohydrates. *J Dairy Sci*, 76:2878-85.
- Zacarías, M.F. 2010. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de leche materna. Evaluación del potencial de empleo como probióticos. Tesina correspondiente a la carrera de Lic. En Biotecnología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.
- Zacarías, M.F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J. y Vinderola, G. 2009. Leche materna como fuente de bifidobacterias. Aislamiento, identificación y caracterización tecnológica preliminar de cepas. Proceedings of the III International Congress of Food

Science and Technology, Córdoba, Argentina, Abril 15-17, 2009. ISBN: 978-987-24620-1-7.

Zacarías, M.F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., Vinderola G. 2011. Preliminary technological and probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *Int Dairy J*, 21:548-55.

Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Granette, C., Pot, B., Tsakalidou, E. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int J Food Microbiol*, 121(1):18-26.

Medios de cultivo utilizados:

- Composición caldo MRS* (Biokar Diagnostics, Beauvis, Francia):

Fórmula	g/L
Tripteína	10,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de carne	10,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1,08
pH final= 6,4 ± 0,2	

- Agar MRS*: caldo MRS (Biokar) adicionado de 13 g/L de agar bacteriológico (Britania, Buenos Aires, Argentina).

*Estos medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min y posteriormente se adicionó L-cisteína (Britania) filtrada, en una concentración final 0,1% (p/v). Salvo que se indique lo contrario este medio se utilizó para el desarrollo de toda la tesis.

- Composición medio de cultivo MRS-SQ*:

Fórmula	g/L
Suero de quesería (SQ) en polvo**	50,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa***	10,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1,08

*Este medio se autoclavó a 121°C, 15 min, y posteriormente se adicionó L-cisteína (Merck) filtrada, en una concentración final 0,1% (p/v).

**El SQ fue sometido a una digestión con tripsina pancreática en una relación 0,3%(p/p) previo a la esterilización del medio de cultivo.

***La glucosa se autoclavó por separado y fue agregada antes de comenzar la fermentación.

- Composición del medio de cultivo MRS modificado, según Bauer y col. (2012) *

Fórmula	g/L
Peptona de caseína	10,0
Extracto de carne	2,0
Extracto de levadura	7,0
Glucosa	7,0
Maltosa	14,0
Gluconato de sodio	2,0
Fosfato dipotásico	2,5
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	5,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,1
Sulfato de hierro	0,05
Tween 80	1,00
L-cisteína	0,5

*Este medio se autoclavó a 121°C, 15 min.

- Caldo LSM*: 90% de caldo Iso-sensitest (Oxoid) + 10% de caldo MRS (Oxoid).
- Agar LSM*: 90% de agar Iso-sensitest (fórmula idéntica a la del caldo Iso-sensitest + 8 g/L de agar; Oxoid) + 10% de caldo MRS (Oxoid) adicionado de 13 g/L de agar bacteriológico (Oxoid).

*Estos medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

- Medio selectivo para recuento de bifidobacterias en heces (según de Moreno de Leblanc y col., 2008)

Fórmula	g/L
Reinforced Clostridium Medium (RCM, Biokar)	38
Cloruro de Litio	2
Colistina*	0,004
Azul de anilina*	10,0
Agar-Agar	26
pH final = 5,00 (se ajusta después de autoclavar con ácido acético)	

*Este medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min y posteriormente se adicionaron las soluciones concentradas y filtradas de colistina y azul de anilina de manera de obtener las concentraciones finales descritas en la tabla, y la L-cisteína (Britania) en una concentración final 0,1% (p/v).

Carta entregada a las madres participantes del muestreo de leche materna

Santa Fe, Febrero de 2010

Estimada Mamá:

Somos un grupo de investigadores del Instituto de Lactología de la Facultad de Ingeniería Química, en la Universidad Nacional del Litoral.

Hay estudios científicos recientes que consideran que, en la leche materna, además de los nutrientes y defensas para el bebé, habría también bacterias benéficas que la mamá le pasaría a su bebé durante la lactancia, las cuales son importantes para que el bebé desarrolle su propio sistema inmunitario. Estamos empezando estudios para determinar qué tipo de bacterias hay y cuales son sus propiedades benéficas para la salud del bebé, por lo que necesitamos de tu colaboración. Estarías de acuerdo en donarnos muestras de leche materna? sólo unas pocas gotas, una vez por semana durante los dos primeros meses de lactancia.

Tu contribución será muy importante para ayudarnos a estudiar y comprender los efectos benéficos de la leche materna. Si te interesa participar, contactate con nosotros (un email, un mensaje de texto), te proveeremos el material para recolectar la muestra y coordinaremos para pasar a retirarlas por tu domicilio. Gracias desde ya!



Dr. Gabriel Vinderola
Instituto de Lactología Industrial
Facultad de Ingeniería Química
1° de Mayo 3250, primer piso, Santa Fe
Email gvinde@fiq.unl.edu.ar
Tel. : 4530302 interno 3
Celular : 156 311 943

Encuesta realizada a las madres participantes del muestreo de leche materna:

NOMBRE COMPLETO:

DOMICILIO:

TELÉFONO: e-MAIL:

FECHA DEL PARTO (nacido a término ó prematuro):

TIPO DE PARTO: natural – cesárea

CONSUMO DE PROD. COMERCIALES CON PROBIÓTICOS DURANTE EL
EMBARAZO:

Actimel:

Activia:

Yogs:

Otros:

OBSERVACIONES: