



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de *Helicobacter pylori*

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

P R E S E N T A :

M. EN C. ALICIA CERVANTES ELIZARRARÁS

No. de cuenta 185363

Directores:

Dr. Javier Piloni Martini
Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., julio de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

ICSa-DCASH-2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Alicia Cervantes Elizarrarás con número de cuenta 185363, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado "Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de *Helicobacter pylori*", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 12 de junio de 2019. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. JAVIER PILONI MARTINI
Director de tesis

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
Codirectora

DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO

DR. LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ OLIVARES

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 24 de junio de 2019
"Amor, Orden y Progreso"

M.C.Esp. Adrián Moya Escalera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa

M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Esther Ramírez Moreno
Coordinadora del Programa Educativo
Director of Graduate Studies



Dedico este trabajo a Edy y Emi con todo mi amor, sé que llegarán muy lejos con la voluntad de Dios, y quiero estar ahí, junto con su padre. Nada me importa más que su felicidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por la vida, por los medios y por las personas que ha puesto en mi camino.

A toda mi familia, en especial a mis amados padres, hermanos y sobrinos, por todo el amor y enseñanzas, por su apoyo y toda la confianza depositada en mí, por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí.

A mi amado marido, Edgar, por todo tu apoyo, amor y paciencia, por ser el mejor compañero de vida, y a mi pequeño Edy, porque a tu corta vida me has dado grandes enseñanzas y satisfacciones.

A la familia Covarrubias Cervantes, Covarrubias Guasso y Covarrubias Burgstaller, mi segunda familia. Gracias por todo su cariño y apoyo.

A los miembros del comité, Dra. Esther, Dr. Guillermo, Dra. Nelly y Dr. Piloni, muchas gracias por las lecciones, sin duda de gran valor para mi crecimiento personal y profesional.

A la Dra. Nelly, por sus enseñanzas y sobre todo por su confianza y amistad.

A mis compañeros del doctorado, en especial a Orquídea, Emmanuel, Enrique y Quinatzin, quien ha sido para mí una gran amiga, gracias a todos por los momentos agradables.

A mis compañeros del laboratorio de Tecnofuncionalidad, Chava, Mariel, Liz, Lili, Eli, Gloria, Luis y Bety, gracias por hacer amena la estancia.

Con cariño a la Dra. Norma Velázquez y el Biólogo Juan Carlos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, gracias por todas sus enseñanzas que han sido clave en mi desarrollo profesional y la realización de una parte importante de este trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada para la obtención de este grado académico.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Infecciones por <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.1.1 Etiología de la enfermedad	5
2.1.2 Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i>	7
2.2 Probióticos	10
2.2.1 Efecto de los probióticos en la salud humana	11
2.3 Efecto de las bacteriocinas en los procesos antimicrobianos de probióticos	17
2.4 Efecto de bacterias probióticas sobre el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	19
2.5 Evaluación de las propiedades probióticas	20
2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 General	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Obtención de las muestras	28
5.2 Aislamiento y selección de las bacterias ácido lácticas	28
5.2.1 Selección	28
a) Prueba de catalasa	29
b) Tinción de Gram	29
5.3 Identificación de las bacterias aisladas	29
5.3.1 Extracción del DNA genómico	29
5.3.2 Amplificación mediante PCR del gen 16s ARNr	30
5.3.3 Secuenciación	30

5.4 Evaluación de la capacidad probiótica	31
5.4.1 Resistencia a condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	31
5.4.2 Capacidad antimicrobiana	32
5.4.3 Resistencia a antibióticos	32
5.5 Efecto de las bacterias aisladas frente a <i>Helicobacter pylori</i>	33
5.6 Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 Aislamiento y selección	35
6.1.1 Caracterización morfológica de las bacterias ácido lácticas aisladas	36
6.2 Identificación de género y especies	38
6.3 Evaluación de la capacidad probiótica in vitro	43
6.3.1 Resistencia a antibióticos: determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	43
6.3.2 Resistencia a las condiciones gastrointestinales	45
6.3.3 Actividad antimicrobiana	49
6.4 Efecto sobre el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	51
7. CONCLUSIONES	56
8. REFERENCIAS	57
ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción continental de resistencia de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> frente a claritromicina, metronidazol y levofloxacin.....	9
Figura 2. Guía para la evaluación de microorganismos probióticos	22
Figura 3. Esquema metodológico del aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas, su capacidad probiótica y de inhibición <i>in vitro</i>	27
Figura 4. Árbol filogenético de las bacterias aisladas pertenecientes al género de <i>Lactobacillus</i>	38
Figura 5. Árbol filogenético del aislado A2-1 de aguamiel, perteneciente al género de <i>Pediococcus</i>	39
Figura 6. Árbol filogenético del aislado Z24-4 de zarzamora, perteneciente al género de <i>Enterococcus</i>	40
Figura 7. Resistencia <i>in vitro</i> de las bacterias ácido lácticas a condiciones de acidez (pH 2) y presencia de pepsina al 1% por 2 horas.....	46
Figura 8. Resistencia de las bacterias ácido lácticas a jugo intestinal.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectividad de la terapia triple contra infecciones por <i>Helicobacter pylori</i>	8
Tabla 2. Uso de probióticos en el tratamiento y control de diversas enfermedades.	10
Tabla 3. Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales	24
Tabla 4. pH y sólidos solubles de las muestras de aguamiel, pulque y zarzamora ..	35
Tabla 5. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a partir de aguamiel, pulque y zarzamora.....	36
Tabla 6. Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas de aguamiel, pulque y zarzamora.....	37
Tabla 7. Identificación de las bacterias aisladas por amplificación del ARNr 16S	41
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacterias aisladas.....	44
Tabla 9. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las bacterias ácido lácticas aisladas...	50
Tabla 10. Efecto de las bacterias ácido lácticas sobre <i>Helicobacter pylori</i>	52

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos que pueden brindar un beneficio a la salud del hospedero, entre estos microorganismos se encuentran algunas bacterias ácido lácticas (BAL). Dentro de los beneficios a la salud destaca la disminución de los niveles séricos de colesterol, mejora de la respuesta inmune y tiene efecto sobre el crecimiento, desarrollo y acumulación de algunos microorganismos patógenos. Uno de estos es el *Helicobacter pylori*, el cual se ha estudiado ampliamente por ser considerado un carcinógeno tipo I. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias ácido lácticas, a partir de fuentes vegetales, y evaluar su capacidad probiótica y el efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori*. Las BAL fueron aisladas de pulque, aguamiel y zarzamora. El aislamiento se realizó en medio MRS y fueron identificadas por sus características macroscópicas y microscópicas, así como la ausencia de catalasa. La capacidad probiótica fue evaluada *in vitro* con una prueba de la resistencia a condiciones gastrointestinales, actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y se evaluó la resistencia a antibióticos. Con el objetivo de evaluar el efecto sobre el desarrollo de *H. pylori*, se evaluó el efecto de las BAL sobre el crecimiento de tres cepas clínicas y dos cepas de referencia, así como el efecto sobre la ureasa.

Se aislaron 14 bacterias: 12 pertenecientes al género de *Lactobacillus*, 1 de *Enterococcus* y 1 de *Pediococcus*. Todos los aislados fueron sensibles a los antibióticos evaluados, con excepción de la vancomicina, y los niveles de viabilidad a las pruebas de digestión *in vitro* estuvieron en un rango de 63.2 - 96.3%. Dos bacterias aisladas de pulque fueron las más resistentes (95 y 96% de supervivencia), sin embargo, la resistencia a sales biliares y pancreatina fue de 52 - 69%. Por otro lado, solo el 60% de las bacterias aisladas inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que todos los aislados inhibieron la actividad de la ureasa y el crecimiento de *H. pylori* ATCC 43504. Las cepas clínicas fueron inhibidas sólo por 2 cepas de zarzamora. Debido a la potencial capacidad probiótica *in vitro* mostrada por las BAL aisladas y por su efecto sobre la inhibición del desarrollo de *H. pylori*, éstas podrían ser una opción para propiciar una relación benéfica entre el huésped y *H. pylori*, favoreciendo la salud humana.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that can provide health benefits, being some microorganisms from the group of lactic acid bacteria (BAL). Probiotics may beneficially affect the host by the decrease in serum cholesterol levels, modulating immune responses and prevents infections by some pathogenic microorganisms, such as *Helicobacter pylori*, which has been widely studied due to it is categorized as a carcinogen class I. For this reason, the objective of this study was to isolate and identify lactic acid bacteria from vegetable sources, and evaluate their probiotic properties and their effect on *H. pylori* growth. BAL of aguamiel, pulque, and blackberry were isolated in MRS medium and were selected according to their morphology, Gram stain and catalase test. The *in vitro* probiotic properties was evaluated based on their resistance to gastrointestinal conditions, antimicrobial activity (*E. coli* and *S. aureus*), and antibiotics resistance. In order to evaluate the effect on the growth of *H. pylori*, the effect of the BAL on the growth of three clinical strains and two reference strains was evaluated, as well as the effect on the urease activity.

14 strains were selected: 12 were belonging to the genus of *Lactobacillus*, 1 to *Enterococcus* and 1 to *Pediococcus*. All the strains were sensitive to the antibiotics evaluated, except to vancomycin, which is a common characteristic in this group of bacteria. The viability of the BAL to gastric juice was from 63.2-96.3%. Two strains isolated from pulque showed a survival of 95 and 96.3%, nevertheless, the survival percentage to bile salts and pancreatin was from 52-69%. On the other hand, 60% of the strains inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus* and all of them showed a suppressive effect on the activity of urease and the growth of *H. pylori* ATCC 43504. The clinical strains were inhibited by all the evaluated strains. Due to the potential probiotic of the isolated LAB and their effect on *H. pylori* growth, these could be an option to promote a beneficial relationship between the host and *H. pylori*, favoring human health.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos probióticos han sido considerados como ingredientes funcionales, que son utilizados en alimentos como una alternativa de promoción a la salud humana (García-Ruiz et al., 2014; Tripathi & Giri, 2014). Los géneros más estudiados como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Chen et al., 2010; Papadopoulou, Argyri, Varzakis, Tassou, & Chorianopoulos, 2018). Estos se encuentran de manera natural en la microbiota humana y de animales; pero forman parte también aquella contenida en productos lácteos, bebidas fermentadas y en algunos vegetales (Argyri et al., 2013; Papadopoulou et al., 2018; Pieniz, Andreatza, Anghinoni, Camargo, & Brandelli, 2014; Thapa & Tamang, 2015). Así, los probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped" (FAO & WHO, 2006). La modulación de la respuesta inmune, la mejora del metabolismo de sales biliares y lactosa, y la producción de vitaminas y compuestos con actividad antimicrobiana, son algunos de los beneficios asociados a los microorganismos probióticos (Amara & Shibl, 2015; Angmo, Kumari, Savitri, & Bhalla, 2016; Caggia, De Angelis, Pitino, Pino, & Randazzo, 2015; Guo, Kim, Nam, Park, & Kim, 2010; Pieniz et al., 2014). Así mismo, otro beneficio es la inhibición de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium fimi* (Bao et al., 2010; Cats et al., 2003a; Guo et al., 2010; N. K. Lee, Lee, & Paik, 2013; Pieniz et al., 2014) y *Helicobacter pylori* (Cats et al., 2003; Chen et al., 2010; Du et al., 2012).

H. pylori es considerado como un carcinógeno tipo I, por lo que se han empleado terapias de erradicación, que consisten en la aplicación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y uno o dos antibióticos como claritromicina y amoxicilina. Sin embargo, debido a la alta resistencia a antibióticos y los efectos secundarios que ejercen estos, aunado a tasas de erradicación inferiores al 70% (Du et al., 2012), se han empleado a los probióticos como alternativa y coadyuvante en la terapia de erradicación. Con esta alternativa se han demostrado efectos positivos en el tratamiento al aumentar la tasa de erradicación y disminución de los efectos adversos asociados a los antibióticos (De Vrese, Kristen, Rautenberg, Laue, & Schrezenmeir,

2011; Emara, Elhawari, Yousef, Radwan, & Abdel-Aziz, 2016; Goderska, Agudo Pena, & Alarcon, 2018; Westerik, Reid, Sybesma, & Kort, 2018).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Infecciones por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un microorganismo patógeno distribuido a nivel mundial, causando infecciones alrededor del 50% de la población. La infección por *H. pylori* está asociada con enfermedades del tracto gastrointestinal, como gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica, cáncer gástrico (Cats et al., 2003b; Demir et al., 2008; Sgouras, Trang, & Yamaoka, 2015) y cáncer de colon (Díaz & Zuleta, 2014). Además, se ha descrito que genera mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y neurológicas, así como trastornos hematológicos (Demir et al., 2008).

En México se han realizado estudios de prevalencia de *H. pylori*, entre los que destacan el de Porras et al. (2017), quienes encontraron una prevalencia del 70 y 84.7% en las ciudades de Tapachula y Oregón, México, respectivamente, con una prevalencia mayor en hombres (80.9%) que en mujeres (78.4%). Por otro lado, Alvarado-Esquivel (2013) realizó un estudio en la ciudad de Durango, y encontraron que la seroprevalencia fue igual en hombres y mujeres; además, el 67% de los colaboradores de este estudio tenían anticuerpos IgG contra *H. pylori*, mostrando que la prevalencia de *H. pylori* y los niveles de anticuerpos aumenta significativamente con la edad, bajo nivel de educación y empleo, y mujeres con historia de aborto.

Actualmente el género *Helicobacter* alberga a más de 15 especies, la mayoría aisladas a partir de mucosa gástrica de diferentes mamíferos; sin embargo, también se han aislado de vías hepáticas e intestinales de diversos animales (Sgouras et al., 2015). Se ha sugerido que además del estómago la cavidad oral podría tener las condiciones necesarias para hospedar a *H. pylori* y favorecer la transmisión oral-oral y fecal-oral (Sierra, Forero, & Rey, 2014).

2.1.1 Etiología de la enfermedad

La infección por *H. pylori* se da en dos fases; en la fase aguda hay una intensa proliferación bacteriana con el inicio de una inflamación gástrica que en ocasiones se acompaña de la aparición de algunos síntomas. Después de algunas semanas, la respuesta inflamatoria disminuye en intensidad y se establece una gastritis superficial crónica difusa. Al mismo tiempo el pH gástrico regresa a sus valores normales (luego de un estado de hipoclorhidria).

La infección por *H. pylori* causa gastritis en casi todos los pacientes infectados, aunque la mayoría de ellos permanece asintomática, debido a factores que pueden influir en el desarrollo de un tipo u otro de enfermedad. Los factores pueden ser ambientales, condiciones socioeconómicas, consumo de tabaco o la dieta (la ingestión de sal actúa como factor agresivo de la mucosa mientras que el consumo de alimentos antioxidantes actúa como factor protector). Por otro lado, la patogenicidad de la bacteria puede tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad. Los factores de virulencia causantes de ulceración por *H. pylori* son la ureasa bacteriana, adhesinas, hemaglutininas y la producción de una toxina vacuolizante (Rivas-Traverso & Hernández, 2000; Sgouras et al., 2015).

La producción de ureasa (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, neutralizando el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas. Dichas reacciones generan un aumento del pH, lo que explica la asociación de la bacteria con daño histopatológico del epitelio gástrico (Sachs, Scott, & Wen, 2011). El amonio por sí solo no es tóxico, sin embargo, el ion hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua es el que genera daño. Éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente, para ganar los espacios intercelulares. Además, el gradiente de bicarbonato que protege la mucosa del ácido se pierde, contribuyendo a la génesis de la gastritis, aunada a que las células G de la mucosa liberarán gastrina para la producción de ácido al detectar un pH neutro, generando hipergastrinemia e hiperacidez gástrica, lo que agrava la lesión inicial.

La actividad de la ureasa también es causante del daño tisular, mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos, donde dichas células son capaces de producir y liberar especies reactivas de oxígeno, tales como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, que colaboran con el proceso inflamatorio. El potencial de virulencia de esta ureasa se refleja en la respuesta de inmunoglobulinas séricas, en pacientes con gastritis activa por *H. pylori* (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

La colonización de la mucosa por *H. pylori*, es debida a una alta capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio gástrico, mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular (Kao, Sheu, & Wu, 2016). De tal manera que las lesiones inducidas por la adherencia son de tipo adhesión-efacelación, caracterizadas por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión (Moss, 2017; Sgouras et al., 2015).

Una vez que *H. pylori* coloniza en la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico, las adhesinas protegen a las bacterias del desplazamiento del estómago por fuerzas como las generadas por la peristalsis y el vaciamiento gástrico, y libera toxinas provocando daño a las células huésped. Entre las adhesinas más estudiadas son la proteína A de unión a antígeno en sangre (babA) y la adhesina de unión a ácido siálico (sabA), la proteína activadora de neutrófilos (NAP) y proteína de choque térmico 60 (Hsp60) (Kao et al., 2016).

Además, debido a la presencia de hemaglutininas (adhesina ácido siálico dependiente; sHA), *H. pylori* es capaz de aglutinar eritrocitos por interacción con glucosaminas de grupos sanguíneos, algunos de los cuales también se expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica una función adherente. Aunque las úlceras pépticas son más frecuentes en pacientes con el grupo sanguíneo O y el cáncer gástrico en aquellos del grupo A, los perfiles de HA no presentan sesgos en relación con los grupos humanos ABO, lo cual es consistente con la pobre asociación entre el estado secretor o no de los grupos sanguíneos y la infección con *H. pylori* (Rivas-Traverso & Hernández, 2000)

Uno de los efectos de la infección por *H. pylori*, es que ésta posee la habilidad de producir la citotoxina vacuolizante VacA, que es el factor de virulencia responsable de la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas. Esta toxina es codificada por el gen *vacA* y produce diferentes efectos que pueden contribuir a la persistencia de *H. pylori* en el nicho gástrico. Esta citotoxina forma poros en las membranas de las células epiteliales y permite la salida de aniones y urea; esto es importante pues la hidrólisis de la urea, catalizada por la ureasa, protege a la bacteria de la acidez gástrica (Kao et al., 2016; Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Asimismo, se ha sugerido que la VacA tiene efecto en la supresión de la respuesta inmune específica, mediante la inhibición de la maduración de los fagosomas en los macrófagos, la inhibición selectiva de la presentación de los antígenos a las células T, y el bloqueo de la proliferación de dichas células. Igualmente, se ha visto que induce cambios en el citoesqueleto, apoptosis y supresión de la proliferación y migración de las células epiteliales.

Las cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos, probablemente relacionados con diversas enfermedades gastroduodenales (Sgouras et al., 2015). La búsqueda de una respuesta para la citotoxicidad y la presencia del gen *vacA*, llevó al hallazgo del gen *cagA*, cuya presencia se relaciona con la expresión del gen *vacA* y por lo tanto con la toxigenicidad. Este gen *cagA* se encuentra presente sólo en las cepas aisladas de pacientes sintomáticos. En los países desarrollados el 60% de las cepas son *cagA+*; siendo mayor el porcentaje en los países en vías de desarrollo. Las cepas *cagA+* son más virulentas y se asocian con ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma e inflamación profunda con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces la inducida por cepas *cagA-* (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

2.1.2 Tratamiento de la infección por *H. pylori*

La erradicación de la infección por *H. pylori* se asocia con una reducción significativa de la atrofia gástrica, y sería una opción para disminuir la aparición de cáncer gástrico y úlcera péptica; por lo que en México dicha erradicación se ha tratado de lograr por medio de terapias triples, que consisten en medicamentos inhibidores de la bomba de protones (IBP) y antibióticos, como claritromicina y amoxicilina o metronidazol, durante

7 - 14 días (Martínez et al., 2014; Soto-Molina et al., 2016). La efectividad de esta terapia se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 1. Efectividad de la terapia triple contra infecciones por *Helicobacter pylori*

Parámetro	Efectividad (%)
Porcentaje de éxito del tratamiento triple	82.2
Tasa de cáncer en pacientes tratados por <i>H. pylori</i>	1.6
Tasa de cáncer en pacientes no tratados por <i>H. pylori</i>	2.4
Tasa de reinfección anual por <i>H. pylori</i>	11.5
Recurrencia de cáncer gástrico (2 - 3 años)	70.0
Mortalidad por úlcera péptica perforada	10.0
Mortalidad por cáncer gástrico	8.0
Porcentaje de pacientes con <i>H. pylori</i> y úlcera péptica complicada	4.0
Tasa de recurrencia anual de úlcera péptica en pacientes tratados por <i>H. pylori</i>	15.0
Tasa de recurrencia anual de úlcera péptica en pacientes no tratados por <i>H. pylori</i>	52.0
Probabilidad de tener úlcera péptica perforada anual	<0.1

Modificado de Soto-Molina et al. (2016)

Independientemente del tratamiento, en gran parte del mundo las tasas de mejoría se consideran inaceptables, incluso con esquemas de segunda y tercera línea que incluyen antibióticos como levofloxacina. La resistencia bacteriana es la principal causa del fracaso de las terapias antimicrobianas.

Se ha demostrado que la resistencia *in vitro* al metronidazol fue 65.7%, 6.5% a la amoxicilina, 14% a claritromicina, 8.3% a tetraciclina, 39% a la levofloxacina y 6.9% a furazolidona (M. Martínez et al., 2014). En la Figura 2 se muestra la situación general

de la distribución continental (América, Europa y Asia) de resistencia a los antibióticos más utilizados en la terapia de erradicación de *H. pylori*.

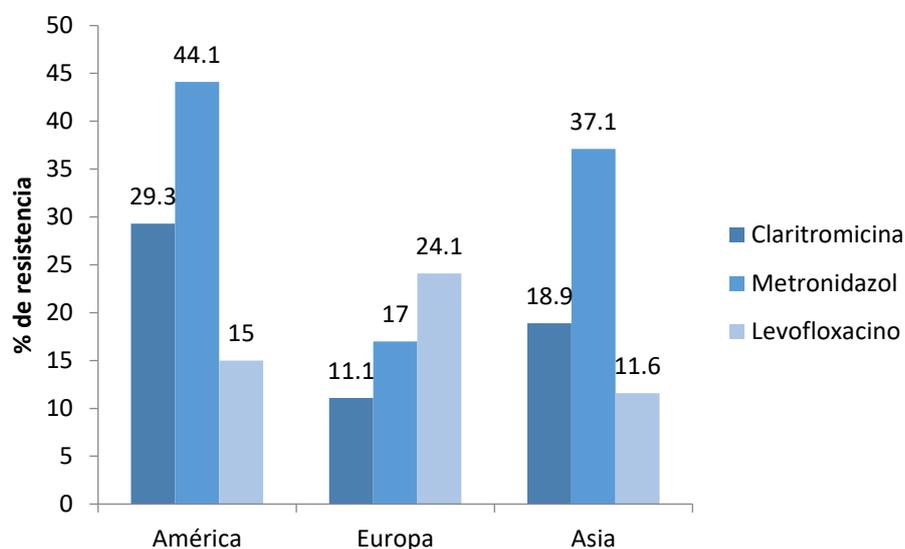


Figura 1. Proporción continental de resistencia de cepas de *Helicobacter pylori* frente a claritromicina, metronidazol y levofloxacina.

Modificado de Papastergiou (2014)

La resistencia desarrollada por *H. pylori* se debe a mutaciones cromosomales (Papastergiou, Georgopoulos, & Karatapanis, 2014) y se transmite en forma vertical con un aumento progresivo de la resistencia. También se genera resistencia por transmisión a través de plásmidos (difusión en forma horizontal) (Pajares García, Pajares-Villarroya, & Gisbert, 2007).

La resistencia a los antimicrobianos constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial, ya que compromete la prevención y el tratamiento eficaz de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos (OMS, 2018a). El uso inmoderado de antimicrobianos ha contribuido al aumento en la resistencia bacteriana, ya que las bacterias se adaptan rápidamente a las condiciones de su medio. Además, los antibióticos alteran la microbiota natural del cuerpo y del medio externo (Benavides-Plascencia, Aldama-Ojeda, & Vázquez, 2005). Por tal motivo, la Organización Mundial de Salud (OMS) propuso la adopción de medidas para limitar el uso indiscriminado de antibióticos (OMS, 2001). Algunas terapias proponen el uso de coadyuvantes para elevar las tasas de efectividad en el control de la infección por *H. pylori*, entre las que se encuentra el uso de

microorganismos benéficos de la microbiota intestinal como son las bacterias ácido lácticas.

2.2 Probióticos

Los probióticos se han definido como microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidad adecuada confieren un efecto benéfico sobre la salud del huésped (Amara & Shibl, 2015; FAO & WHO, 2006; Sanders, 2008). Los microorganismos utilizados como probióticos son diversos, y se han utilizado para el tratamiento y control de diversos padecimientos (Tabla 2), siendo *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* los géneros más estudiados (Amara & Shibl, 2015; Goldberg, 2012). Las bifidobacterias, junto con *Eubacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*, son las especies predominantes en el colon. Las bifidobacterias representan del 3 al 6% de la flora fecal adulta, y su presencia se ha asociado con efectos beneficios a la salud, como la prevención de la diarrea, la mejora de la intolerancia a la lactosa o la inmunomodulación (Schell et al., 2002).

Tabla 2. Uso de probióticos en el tratamiento y control de diversas enfermedades.

Enfermedad	Probiótico
Eczema	<i>Escherichia coli</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Alergias alimentarias	<i>Escherichia coli</i>
Inmunidad	<i>Bacillus circulans</i> P B7 <i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 12028
Efectos secundarios de antibióticos	<i>Enterococcus mundtii</i> ST4SA <i>Lactobacillus plantarum</i> 423 <i>Lactobacillus brevis</i> KB290 <i>Lactobacillus strains</i> <i>Bifidobacterium strains</i>
Gastroenteritis	<i>Lactobacillus casei</i>
Hipersensibilidad intestinal	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP299
Candidiasis vaginal	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14

Infecciones del tracto urinario	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14
Intolerancia a la lactosa	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Síndrome de intestino irritable	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624 <i>Escherichia coli</i> DSM17252
Diarrea del viajero	<i>Lactobacillus</i> GG <i>Lactobacillus plantarum</i>
Prevención de cáncer de colon	<i>Enterococcus faecium</i> M-74
Colitis ulcerativa	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>Bifidobacterium</i>
Úlcera péptica	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares	<i>Enterococcus faecium</i> M-74 <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> PH04

Modificado de Amara and Shibl (2015)

2.2.1 Efecto de los probióticos en la salud humana

Los microorganismos probióticos actúan de distintas maneras en el organismo para producir efectos benéficos a la salud del hospedero. A continuación, se describen algunos de ellos.

Asimilación de nutrimentos

Se han reportado efectos nutricionales derivados del metabolismo de los probióticos, como la asimilación de nutrientes a partir de compuestos complejos no digeribles en la parte superior del tracto gastrointestinal, dentro de los cuales se encuentran la mayoría de polisacáridos comestibles. Asimismo, los probióticos incrementan la biodisponibilidad aminoácidos y péptidos debido a su acción proteolítica y favorecen

la conversión de amoniaco a ion amonio, debido a la acidificación del medio generada por su metabolismo. Este proceso impide la uremia ya que se facilita la excreción fecal del ion amonio. Otro efecto importante en la asimilación de nutrientes es la mejora en el metabolismo de lípidos. Esto se da debido a la inhibición de la transformación de las sales biliares primarias en secundarias. Esto último es considerado uno de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon (Parra-Huertas, 2010; Rodríguez-Carvajal et al., 2008; Shehata, El Sohaimy, El-Sahn, & Youssef, 2016; Thapa & Tamang, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que el metabolismo de algunos probióticos aporta nuevas vitaminas, como ácido fólico, riboflavina y cobalamina (de Moreno de LeBlanc, Levit, de Giori, & LeBlanc, 2018). Además las producción de ácidos grasos de cadena corta favorecen la absorción de calcio, hierro y magnesio (González-Martínez, Gómez-Treviño, & Jiménez-Salas, 2003; Tonello, 2012) debido a la reducción del pH luminal, que aumenta su solubilidad y favorece su absorción por difusión pasiva. Posiblemente, la absorción de calcio también se favorece por la vía transcelular, ya que los ácidos grasos de cadena corta estimulan la expresión de las proteínas de unión a calcio implicadas en su transporte (Tonello, 2012).

Reducción de compuestos perjudiciales o antinutrientes

Dentro de los beneficios que aporta el consumo de probióticos, está también la reducción de compuestos perjudiciales o antinutrientes, como el colesterol y los fitatos, por asimilación, degradación o inhibición de la síntesis endógena. El mecanismo tiene que ver con que algunas cepas probióticas tienen la capacidad de producir la hidrolasa responsable de la desconjugación de sales biliares en circulación entero-hepática, reduciendo la biosíntesis de colesterol en el hígado (Bosch et al., 2014). Aunado a esto, mejoran la digestión y biodisponibilidad de nutrientes de la dieta, como la lactosa, mediante el aporte de enzimas o la estimulación de las actividades endógenas relacionadas con su utilización. Se ha mostrado una disminución de la intolerancia a la lactosa y mejora de su digestibilidad, disminuyendo a su vez la predisposición a osteoporosis por disminución en el consumo de calcio y vitamina D en lácteos (Famularo, Simone, Matteuzzi, & Pirovano, 1999). Además, las bacterias probióticas podrían aportar la enzima diamino oxidasa que metaboliza la histamina exógena y

reduce los síntomas asociados la intolerancia de esta amina (Smolinska, Jutel, Cramer, & O'Mahony, 2014).

Disminución de peso

Recientemente se ha señalado que la microbiota que coloniza el intestino humano puede jugar un papel importante en el desarrollo de la obesidad, ya que existen diferencias en la microbiota intestinal y sus genes, en individuos delgados y obesos, tanto en modelos animales y humanos (Macin, Demir, Özen, Yüce, & Akyön, 2015). Los géneros *Blautia* spp., *Coprococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Fecalibacterium* spp., *Lachnospiraceae* y *Roseburia* spp. han mostrado mayor capacidad para recuperar energía de la dieta, al poseer mayor capacidad de fermentación del almidón resistente y éstos están más aumentados con respecto a pacientes con un peso saludable.

Por otro lado, se ha demostrado que la administración de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus ingluviei* se ha asociado con el aumento de peso, mientras que la administración de *L. plantarum* y *Lactobacillus gasseri* se asocia con la pérdida (Million & Raoult, 2013). Así, la modulación de la microbiota intestinal puede mejorar las condiciones asociadas con la obesidad y ayudar a mantener un peso saludable (Ley, 2010; Wu et al., 2015).

Mejoramiento del sistema inmune

El mejoramiento del sistema inmune puede ser debido a la activación de las células en el sistema, o por el efecto fagocítico e inhibitorio de las bacterias probióticas (Manzano, Estupiñán, & Poveda, 2012). Además, también está relacionado por una inhibición de las respuestas anormales y excesivas del sistema inmune, teniendo un efecto inhibitorio contra infecciones, enfermedades inflamatorias, alergias y enfermedades autoinmunes (Ashraf, Vasiljevic, Day, Smith, & Donkor, 2014; Ashraf & Shah, 2014). Al respecto, se ha demostrado que el consumo de probióticos puede ayudar a disminuir y aliviar síntomas de alergias alimentarias y dermatitis atópica, a través de la modificación de la microbiota intestinal que modula el sistema inmune (Thomas and Greer, 2010).

Algunas cepas como *Streptococcus thermophilus* St1275, *Bifidobacterium longum* BL536 y *B. lactis* B94, tienen la capacidad de inducir diferenciación de las células T, mientras que *L. acidophilus* LAVRI-A1 y *L. rhamnosus* GG producen citoquinas (Donkor et al., 2012), que son las proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune (de Roock, 2012).

Algunas bacterias como *L. casei* Shirota han demostrado actividad anticancerígena y aumento en la función de macrófagos, células T y células natural killer. Por otro lado, los probióticos generan incremento en la producción de IgA e interleucinas (IL-1, IL-6, g-interferón) (de Roock, 2012) y disminución en las actividades enzimáticas de la β -glucuronidasa y β -glucosidasa, asociadas con la síntesis de procarcinógenos. De este modo, se genera un efecto inmunopromotor y propiedades antitumorales por reducción en la concentración de los marcadores en la inflamación intestinal (Bhaswati, 2015; Rocha-Ramírez et al., 2017)

Al respecto, se ha demostrado que las proteinasas de la pared de ciertos lactobacilos contribuyen a explicar el efecto antiinflamatorio, debido a la actividad de las proteinasas prtP (prtR1 y prtR2) que generan una inactivación de la quimioquina proinflamatoria IP10 (perteneciente a la familia de citoquinas) en cultivos celulares (Bäuerl et al., 2013; De Kwaadsteniet, Todorov, Knoetze, & Dicks, 2005).

Además, los probióticos tienen efecto benéfico sobre la evolución de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Ashraf & Shah, 2014) y los efectos persisten más allá de la duración de la colonización de la cepa probiótica, generando una modulación de la secreción intestinal de inmunoglobulinas y el control de la respuesta inflamatoria, contribuyendo así la función inmune general (Isakow, Morrow, & Kollef, 2007).

Efecto antimicrobiano

Cuando el sistema digestivo es colonizado por bacterias patógenas, estas pueden fermentar los alimentos en formas incorrectas generando toxinas. El tratamiento de dichas infecciones con antibióticos genera destrucción de la microbiota benéfica. Sin embargo, el uso de probióticos resulta una buena opción para revertir cierto daño, ya que se ha demostrado que son capaces de regenerar la microbiota benéfica del

sistema digestivo, además tienen efecto inhibitorio sobre algunos microorganismos patógenos, favoreciendo así la correcta fermentación de los alimentos y mejorando la salud gastrointestinal (Amara & Shibl, 2015).

A continuación, se describen algunos microorganismos patógenos que han sido inhibidos por la presencia de cepas probióticas.

a) *Campylobacter pylori*. Esta bacteria ha sido causante de gastritis, asociada a úlcera péptica. Algunas BAL, como *Lactobacillus acidophilus*, han demostrado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dicha bacteria, por producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y otros antimicrobianos, reduciendo la incidencia de úlcera péptica y diarrea (Bhatia, Kochar, Abraham, Nair, & Mehta, 1989).

b) *Campylobacter jejuni*. Es una de las causas bacterianas más comunes de gastroenteritis en todo el mundo, que a menudo se asocia con complicaciones post-infecciosas graves, como la artritis reactiva, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de intestino irritable y antecedente asociado de la campilobacteriosis. Para combatir este patógeno, se ha evaluado el uso de *Lactobacillus plantarum* 0407 y *Bifidobacterium bifidum* Bb 12 en la inhibición del crecimiento de *C. jejuni*, mostrando ser un tratamiento efectivo junto con prebióticos (oligofructosa y xilooligosacáridos) (Fooks & Gibson, 2003). Wagner et al. (2009) también demostraron una efectiva inactivación de *C. jejuni* al administrar una combinación de lactobacilos y bifidobacterias (1 x 10⁸ UFC/mL) en ratones infectados.

c) *Cronobacter sakazakii*. En recién nacidos (>36 semanas) con bajo peso, son comunes las enfermedades como meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante provocada por *C. sakazakii*, un patógeno oportunista (Awaisheh, Al-Nabulsi, Osaili, Ibrahim, & Holley, 2013; García-Iborra, Peso-Echarri, González-Bermúdez, & Martínez-García, 2013). Algunos estudios han demostrado que los probióticos *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus rhamnosus* logran inhibir el crecimiento de este patógeno, en una concentración de 10⁷ UFC/mL a 37°C (Candel-Pérez et al., 2013; García-Iborra et al., 2013)

d) *Listeria monocytogenes*. La listeriosis es una enfermedad bacteriana invasiva, producida por *L. monocytogenes*, misma que se ha logrado inhibir por medio de

bacterias probióticas, como *L. plantarum* y se ha asociado con la presencia de los ácidos orgánicos producidos por las mismas (Dos Santos et al., 2011; Gómez, Ramiro, Quecan, & de Melo Franco, 2016).

e) *Salmonella typhimurium* y *Salmonella tiphy*. Algunas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus paracasei* y *L. plantarum* han demostrado inhibir el crecimiento in vitro de muchas bacterias entéricas, incluyendo *S. typhimurium* (Bermudez-Brito et al., 2015; Li, Yu, Ye, Wang, & Yang, 2015; Murry, Hinton, & Morrison, 2004). Las diferentes especies de *Salmonella* se han encontrado a menudo en pollos y huevos. Este microorganismo es causante de diarrea, dolor abdominal, vómito y náuseas, que suelen durar unos siete días si no es tratada (OMS, 2018b), en seres humanos. También se ha observado una inhibición del crecimiento de *Salmonella* en ratones inmunodeficientes con la adición de lactobacilos y bifidobacterias en una concentración de 10⁸ UFC/mL, generando un aumento de los linfocitos frente a los antígenos de *Salmonella* (Wagner et al., 2009)

f) *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. Estudios han demostrado efecto benéfico en la salud al inhibir algunas bacterias entéricas, causantes de trastornos gastrointestinales, como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. Dicha inhibición está relacionada con la producción de ciertas sustancias metabólicas, como ácidos grasos volátiles de cadena corta y ácidos orgánicos producidos por *Lactobacillus salivarius* y *L. plantarum* (Murry et al., 2004). *E. coli* también presentó una inhibición en su crecimiento cuando se administró una mezcla de cepas probióticas y prebióticos (*L. plantarum* 0407, *B. bifidum* Bb 12, oligofruktosa y xilooligosacáridos) (Eggers et al., 2018; Gómez et al., 2016; York, 2018).

g) *Helicobacter pylori*. Se asocia a enfermedades del tracto gastrointestinal (TGI) (Aiba, Suzuki, Kabir, Takagi, & Koga, 1998), la cual afecta al menos al 50% de la población humana, provocando inflamación y úlceras gástricas y duodenales en un 10 - 15% y, carcinoma gástrico o linfoma en tejidos linfoides (Sachs et al., 2011; D. N. Sgouras et al., 2015). Un estudio reciente realizado por Pan et al. (2016), demostró que el pretratamiento durante 3 semanas con *L. plantarum* ZDY 2013, impidió el aumento de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, IL-1 β y IFN- γ) y la infiltración de

células inflamatorias en la lámina propia gástrica inducida por infección por *H. pylori*. Además, se evitó la inflamación de la mucosa y la alteración de la microbiota gástrica post-infección con *H. pylori*, favoreciendo la microbiota benéfica.

La eficacia antimicrobiana de los probióticos se puede explicar por varios mecanismos: producción de ácidos orgánicos (sobre todo de cadena corta), competencia por nutrientes, debido a auxotrofías propias de este tipo de microorganismos, y por la producción de compuestos antagonistas como son inhibidores del sistema nervioso y digestivo, principalmente en la motriz intestinal (Zoghi, Khosravi-Darani, & Sohrabvandi, 2014).

Los probióticos tienen un efecto sobre infecciones virales. Se ha reportado la promoción de una respuesta a nivel de inmunoglobulinas (IgM e IgA) específica contra rotavirus a nivel local y sistémico, lo cual trae consigo un efecto directo en varias afecciones a la salud.

Asimismo, se ha revelado la presencia de genes en el probiótico *L. pentosus* MP-10 que codifican para las proteínas de superficie, implicadas en la adherencia a la mucosa intestinal, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la cual le confiere habilidades para sobrevivir y colonizar el intestino. Otro mecanismo de adherencia es la formación de un pili en *L. plantarum* JDM1, debido a la proteína prepilina tipo 4, así como a exoproteínas en *L. gasseri* 202-4 (Abriouel et al., 2016). Este mecanismo de adherencia genera un efecto de “barrera” ante bacterias potencialmente patógenas, reflejándose en la disminución de infecciones gastrointestinales y la duración de diarrea. Este beneficio se le atribuye también a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Guo et al., 2010; Y. Zhang et al., 2011).

2.3 Efecto de las bacteriocinas en los procesos antimicrobianos de probióticos

Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias como las del grupo de las BAL, que tienen un efecto directo sobre la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos (Dridier, Bendali, Naghmouchi, & Chikindas, 2016; Nes, Brede, & Diep, 2013; Silva, Silva, & Ribeiro, 2018). Son moléculas catiónicas termoestables que tienen hasta 60 residuos de aminoácidos (Silva et al., 2018) Se

creo que las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato, cargados negativamente en las membranas celulares, contribuyen a la unión inicial de la bacteriocina. Esto provoca la formación de poros, la posterior activación de autolisina que digiere la pared celular de microorganismos patógenos y consecuente muerte celular, confiriendo gran capacidad bacteriostática sobre bacterias del género Gram positivo y daño celular de algunas bacterias del género Gram negativo (Silva et al., 2018).

Dada su naturaleza proteica, las bacteriocinas son fácilmente degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal no son dañinas con células eucariotas, no son tóxicas ni causan reacciones inmunológicas y sus determinantes genéticos están situados generalmente en el plásmido, lo que facilita la manipulación genética para aumentar la variedad de análogos de péptidos naturales (Juodeikiene et al., 2012). Aunque no todos los microorganismos probióticos son capaces de inhibir a todas las bacterias patógenas, muchos de ellos si son productores de bacteriocinas, ventaja que ha sido utilizada en el control de la infección por *H. pylori*.

2.4 Efecto de bacterias probióticas sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

Varios investigadores han evaluado el efecto del consumo de bacterias probióticas como alternativa o coadyuvante al uso de antibióticos para la erradicación de *H. pylori* (X. Chen et al., 2010; De Vrese et al., 2011; Du et al., 2012). Cats et al. (2003), realizaron un estudio *in vitro* evaluando el efecto de *L. casei* en leche fermentada sobre *H. pylori*, demostrando un efecto inhibitor en su crecimiento y una disminución de la enzima ureasa en el 64% de los individuos evaluados. Tal efecto fue atribuido a la *L. casei* crecida en leche, ya que demostró un mejor efecto que la cepa crecida en el medio MRS. Por otro lado, el ácido láctico producido por la bacteria no fue suficiente para inhibir a *H. pylori*, por lo que concluyeron que las cepas probióticas deben estar vivas para poder ejercer un efecto inhibitor.

Un estudio similar demostró una inhibición *in vitro* de *H. pylori* por *L. casei* Shirota, así como disminución de la ureasa en medio MRS a pH de 4.5. Sin embargo, a pH de 6.5 no se mostró un efecto favorable en la inhibición de *H. pylori*. En este estudio el ácido láctico producido, en una concentración >15 mM, mostró un efecto favorable sobre la disminución de ureasa. Aunado a esto, en el modelo *in vivo*, el tratamiento con *Lactobacillus* resultó en una reducción significativa de los niveles de colonización por *H. pylori* en el antro y mucosa del cuerpo del estómago. Esta reducción fue acompañada por una disminución significativa en la inflamación de la mucosa gástrica crónica asociada y activa, además de una disminución de la respuesta inmunológica anti-*H. pylori* (D. Sgouras et al., 2004).

Además, se ha evaluado que la suplementación con probióticos disminuye los efectos adversos asociados a la terapia de erradicación (De Vrese et al., 2011; Emara et al., 2016; Goderska et al., 2018; Westerik et al., 2018).

Los estudios han demostrado que el efecto que ejercen los probióticos sobre la inhibición de *H. pylori*, está relacionado con el hecho de que las bacterias probióticas sobrevivan a las condiciones gastrointestinales y puedan colonizar el tracto gastrointestinal. Es por ello que los estudios *in vitro* son una alternativa para verificar tanto el potencial probiótico como el probable efecto inhibitor.

2.5 Evaluación de las propiedades probióticas

Con la finalidad de que las cepas utilizadas en la industria alimentaria no causen efectos adversos a la salud del consumidor, la FAO/WHO (2002) proporcionan una guía para evaluar las propiedades de los alimentos probióticos de forma sistemática (Figura 3), la cual recomienda:

a) Identificación de género, especie y cepa probiótica; para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo y seguro, denominado GRAS (Generally Regarded As Safe).

b) Estudios *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos:

- *Resistencia a la acidez gástrica y sales biliares*; ya que es necesario que lleguen vivos al final del intestino para ejercer efectos inmunomoduladores.
- *Adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales*; para que el probiótico sea efectivo y desarrolle sus efectos inmunomoduladores, reduzca la adhesión de microbiota competitiva y desarrolle la actividad antimicrobiana sobre microorganismos patógenos.

c) Seguridad de los probióticos; empleando el sistema GRAS para evaluar la seguridad de los microorganismos empleados. Sólo los microorganismos identificados a nivel de cepa, y cuyo uso histórico haya sido seguro, pueden recibir la denominación de probiótico, de lo contrario se debe recurrir a estudios clínicos y de toxicidad.

Este último punto es de suma importancia, ya que se requiere de especial cuidado en las poblaciones vulnerables, como recién nacidos, pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades críticas. Para tal finalidad se recomiendan las siguientes pruebas de caracterización:

- Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles.
- Actividades metabólicas perjudiciales.
- Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.

- Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica.
- Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos (FAO/WHO, 2002).

d) Estudios *in vitro* e *in vivo*; para identificar los mecanismos de acción de los probióticos y cómo estos pueden llegar a afectar los diferentes alimentos en los que se introducen (Jankovic, Sybesma, Phothirath, Ananta, & Mercenier, 2010).

e) Viabilidad de las cepas declaradas en productos probióticos comerciales; es imprescindible mantener la viabilidad de los microorganismos en un producto probiótico durante toda la vida útil porque condiciona su actividad.

f) Etiquetado; se recomienda que un producto probiótico incorpore la siguiente información en la etiqueta: género, especie y nombre de la cepa, número mínimo de células viables, dosis recomendada, condiciones de almacenamiento, datos de contacto y los efectos benéficos a la salud.

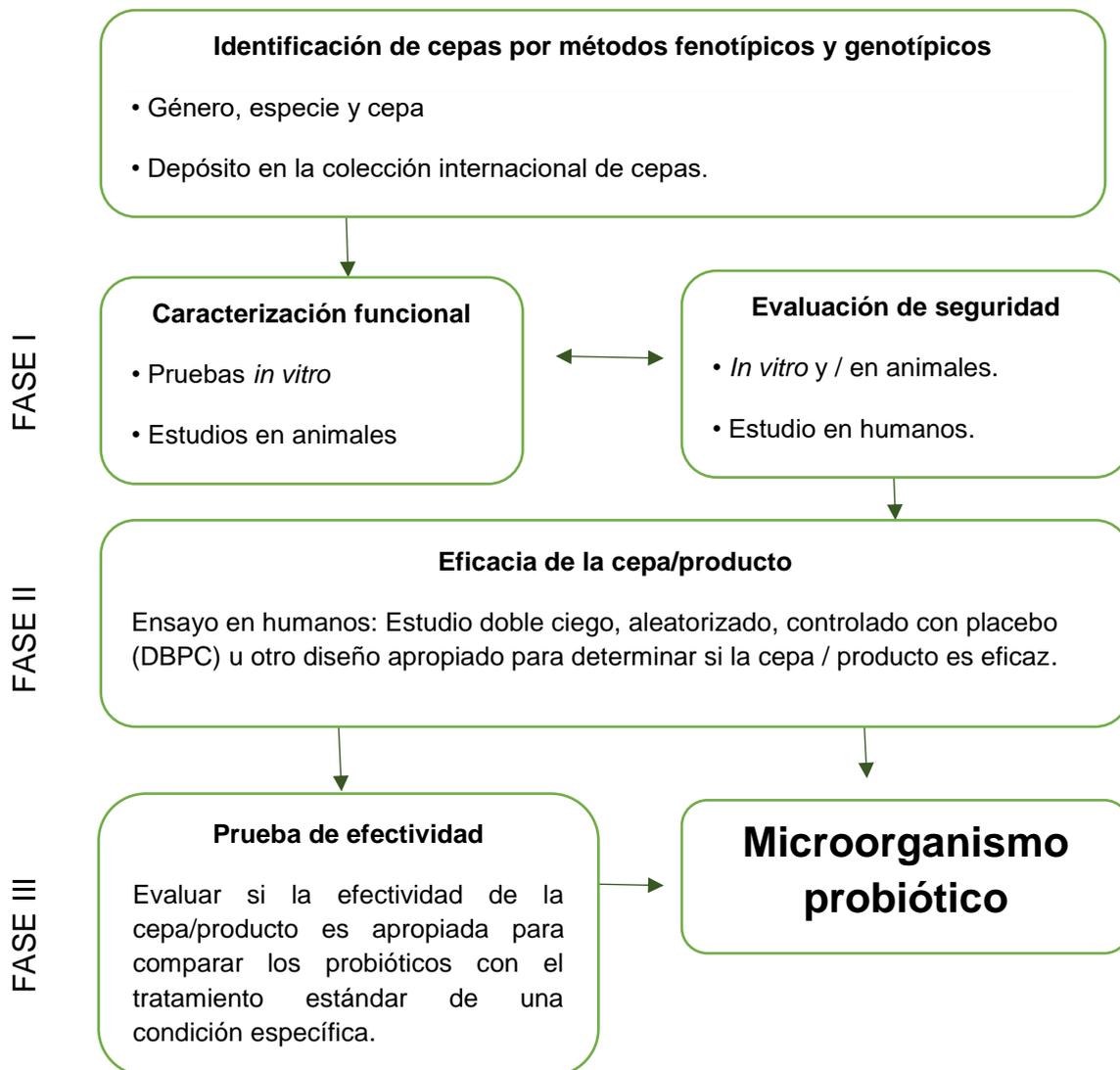


Figura 2. Guía para la evaluación de microorganismos probióticos

2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)

El grupo de las BAL está conformado por los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weisella* (Axelson, 2004; Holzapfel & Stiles, 1997; Tamang, Thapa, Tamang, Rai, & Chettri, 2015), siendo los últimos 4 géneros heterofermentativos. La clasificación es de acuerdo con sus similitudes en las características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, a su crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración *L* (-) y *D* (+) del ácido láctico producido, su capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sales y a la tolerancia ácido-base (Axelsson, 2004; Holzapfel & Stiles, 1997).

Las BAL son bacilos o cocos Gram positivos, no esporulados, anaerobios y/o aerotolerantes. Este grupo de bacterias responde a la prueba de catalasa negativamente, ya que carece de esta enzima. La ausencia de citocromos en este grupo de bacterias, brinda la característica de formación de colonias color blanco lechoso (Axelsson, 2004). Pueden ser mesofílicos o termofílicos, según las temperaturas óptimas de desarrollo; y homofermentativos (producción de ácido láctico) o heterofermentativos (producción de ácido láctico, acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato) según las características de su metabolismo fermentativo (Figura 1) (Holzapfel & Stiles, 1997).

Este grupo de bacterias se encuentra como parte de la microbiota natural de mucosas de mamíferos como boca, tracto nasofaríngeo, gastrointestinal y vagina; leche y derivados; productos cárnicos (Amara and Shibl, 2015; Bengoa et al., 2018a; Shehata et al., 2016; Thapa and Tamang, 2015); vegetales, como frutas (Di Cagno, Coda, De Angelis, & Gobbetti, 2013), cereales (Tamang et al., 2015); bebidas vegetales como aguamiel y bebidas fermentadas, como el pulque (Escalante et al., 2008; Giles-Gómez et al., 2016; Torres-Maravilla et al., 2016). En la Tabla 3 se describen algunas especies del grupo de las BAL aisladas de fuentes vegetales.

Tabla 3. Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales

Producto	Materia prima	Especies
Pozol	Maíz	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>
Tepache	Maíz, piña, manzana o naranja	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. lactis ssp. lactis</i> , <i>L. salivarius ssp.</i>
Oiji	Pepino, sal, agua	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Ped. cerevisiae</i>
Aceitunas	Aceituna	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> ; <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. vaccinostercus</i> , <i>L. suebicus</i>
Sunki	Nabo	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. kisonensis</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>L. rapi</i> , <i>L. sunkii</i>
Kimichi	Col, cebolla verde, pimienta picante, jengibre	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc. gasicomitatum</i> , <i>Leuc. kimchii</i> , <i>Leuc. inhae</i> , <i>W. koreensis</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Ped. acidilactici</i> , <i>Ped. Pentosaceus</i>
Aguamiel	Agave	<i>Leuc. citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. kimchi</i>
Pulque	Aguamiel/Agave	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>

(Escalante et al., 2008; Martínez et al., 2013; Tamang et al., 2015)

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es un microorganismo carcinógeno tipo I, que afecta alrededor del 70 % de la población a nivel mundial. Es el agente causal de diversas enfermedades del tracto gastrointestinal, que van desde gastritis aguda y crónica hasta adenocarcinoma y linfoma gástrico, y el riesgo aumenta cuando la infección ocurre en la infancia.

Debido a esto se han diseñado diversos esquemas de tratamiento que incluyen antibióticos, cuya finalidad es erradicar a este microorganismo. Sin embargo, el tratamiento de erradicación, además generar reacciones adversas en los pacientes, puede tener una eficacia inferior al 80% debido a cepas resistentes a los antibióticos, por lo que la Organización Mundial de Salud ha propuesto la adopción de medidas para limitar el desarrollo de resistencia a antimicrobianos.

En respuesta a esta problemática mundial, en el presente estudio se evaluaron a las bacterias ácido lácticas (BAL) como posibles probióticos ya que se han propuesto como alternativas y coadyuvantes en el tratamiento de erradicación, debido a que han demostrado eficacia en el control de *H. pylori*, favoreciendo el balance de la microbiota humana y la regulación del sistema inmune. Las bacterias ácido lácticas pueden ser utilizadas para el consumo humano, debido a la inocuidad demostrada, y pueden ser aisladas de fuentes vegetales, como la zarzamora, el aguamiel y el pulque, donde habitan de manera natural

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos, de bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales a través de ensayos *in vitro* para su probable uso como parte del tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar el aislamiento de bacterias ácido lácticas de matrices vegetales a través del uso de un medio específico para su selección morfológica.
- Analizar genéticamente las secuencias de los aislados bacterianos mediante la amplificación y secuenciación génica del ARNr 16S, para la identificación del género, especie y cepa aislada.
- Evaluar la resistencia de las bacterias ácido lácticas a las condiciones gastrointestinales, resistencia a antimicrobianos y capacidad antimicrobiana mediante pruebas *in vitro*, para determinar su capacidad probiótica.
- Evaluar el efecto de las bacterias probióticas sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*, mediante pruebas de inhibición *in vitro*, para determinar su capacidad inhibitoria.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

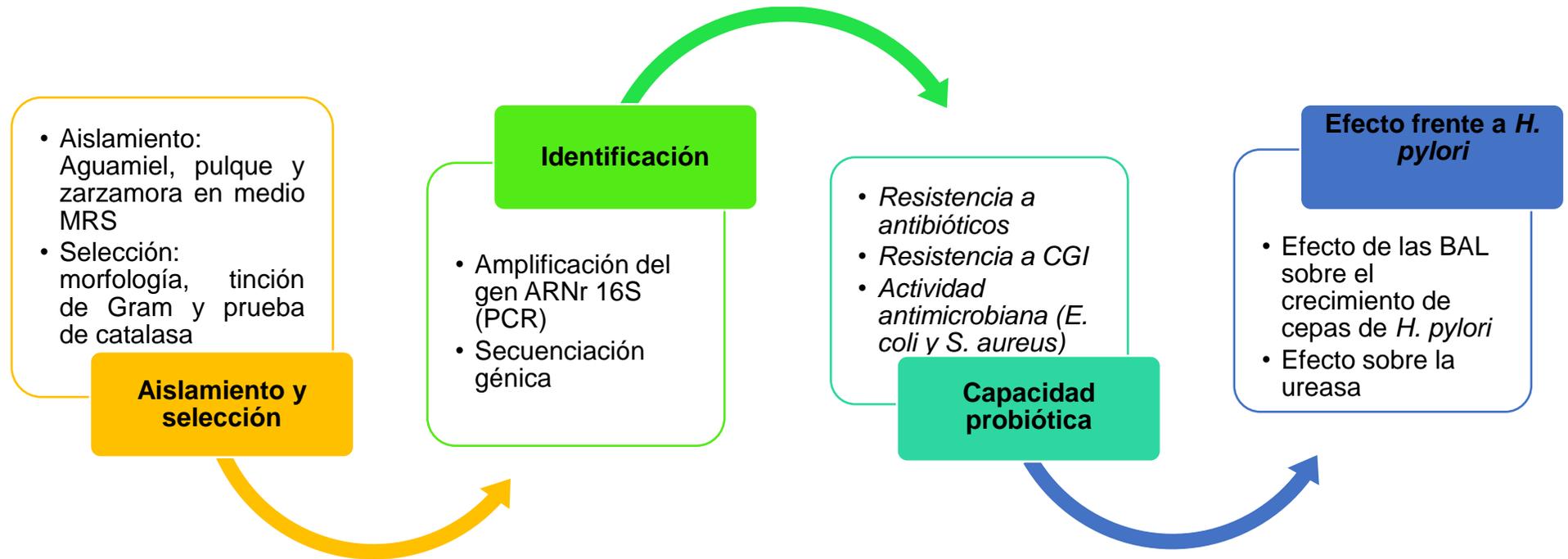


Figura 3. Esquema metodológico del aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas, su capacidad probiótica y de inhibición *in vitro*

5.1 Obtención de las muestras

Las muestras de aguamiel y pulque se obtuvieron de la comunidad de “El Venado”, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. Las muestras se trasladaron en frascos estériles al laboratorio de Tecnofuncionalidad de alimentos del Instituto de Ciencias de la Salud de esta Universidad y se almacenaron a 4°C durante 12 h. Posteriormente se tomaron por triplicado alícuotas de 1 mL para realizar el recuento de células viables, 20 mL para medir pH (AOAC 981.12) y 5 mL para sólidos solubles totales (AOAC 932.14C). Las muestras de zarzamora fueron obtenidas de la Central de abasto de la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo, México. Estas fueron molidas y almacenadas en frasco estériles a 30°C durante 24h. Posteriormente se realizaron los mismos análisis mencionados para las muestras de pulque y aguamiel.

5.2 Aislamiento y selección de las bacterias ácido lácticas

Para el aislamiento de las BAL, con una pipeta y punta estéril se tomó 1 mL de cada una de las muestras (aguamiel, pulque y zarzamora), y se inocularon en matraces con caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) previamente esterilizado a 121°C por 15 min (autoclave AESA, CV300, México) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas por duplicado, de 10^{-1} hasta 10^{-7} en caldo peptona. Con la ayuda de una pipeta, se inocularon 200 μ L de cada una de las diluciones en cajas Petri y se extendieron por la técnica de barrido en placa en agar MRS, incubando a 37°C durante 24 h. Una vez transcurrido el periodo de incubación se aislaron las colonias con morfología típica del grupo de BAL y se purificaron mediante 3 resiembras con el método de estriado en cajas de Petri (Harrigan, 1998). La pureza de los aislados se comprobó mediante una tinción Gram y observación por microscopio.

Para el almacenamiento, se obtuvo la biomasa de cada una de las cajas Petri y se depositaron en viales con agua desionizada, previamente esterilizados, y se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 10,000 rpm, repitiendo este proceso tres veces. Las bacterias purificadas fueron almacenadas a -70°C en glicerol al 50% (v/v) con caldo MRS. Para la realización de las pruebas posteriores, las bacterias se reactivaron en placas Petri por la técnica de resiembra por microgota (Atlas, 2010).

5.2.1 Selección

Se seleccionaron colonias con forma redonda de color blanco-beige y aspecto cremoso, de 1 a 2 mm de diámetro, con superficie convexa y bordes enteros. Se realizaron las pruebas de catalasa y tinción de Gram, y se seleccionaron las bacterias catalasa negativas y Gram positivas (Holzapfel & Stiles, 1997).

a) Prueba de catalasa

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen los microorganismos “catalasa positivos” de desdoblar el H_2O_2 , en agua y oxígeno. Para la realización de esta prueba se utilizó el método del portaobjetos. Con el asa bacteriológica se tomó una colonia pura y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Se agregó una gota de H_2O_2 al 3% y se observó la formación (resultado positivo) o ausencia (resultado negativo) de burbujas (Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

b) Tinción de Gram

Esta tinción permite la clasificación de las bacterias en Gram positivas y negativas, según la composición de su pared celular. Sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se colocó una gota de agua desionizada. Se tomó una colonia del cultivo y se mezcló en la gota de agua para formar una suspensión bacteriana homogénea. Se dejó secar al aire y se fijó en la flama de un mechero. Las células fijadas se tiñeron con una solución de cristal violeta dejándola reposar por 1 min. El exceso de colorante se eliminó lavando con agua desionizada. El portaobjetos se cubrió después con Lugol y se dejó reaccionar por 1 min, volviendo a eliminar el exceso de solución con agua. Posteriormente se realizó una decoloración, agregando con un gotero una mezcla de alcohol-acetona (50:50) y se lavó con agua. Finalmente se agregó una solución de safranina y se dejó reaccionar durante 1 min y se eliminó el exceso de colorante con agua. Las bacterias Gram positivas se tiñeron de púrpura por el cristal violeta y las Gram negativas de rojo con la safranina (Fernández-Olmos et al., 2010).

5.3 Identificación de las bacterias aisladas

5.3.1 Extracción del DNA genómico

Las bacterias aisladas se descongelaron a 4°C y sembraron en agar MRS incubando durante 24 h a 37°C. La biomasa obtenida se suspendió en viales con agua

desionizada previamente esterilizados, y se llevaron a una turbidez aproximada de 2×10^9 UFC. Se realizó una centrifugación a 7,500 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener la biomasa. Ésta fue suspendida en 180 µL de buffer enzimático con proteinasa y lisozima en una concentración de 10 mg/mL para la lisis de las bacterias, y se incubó a 37°C durante 50 minutos. Posteriormente se realizó la extracción del ADN bacteriano utilizando el kit DNeasy blood and tissue (Qiagen, Valencia, CA), con las indicaciones del fabricante (ANEXO 1).

La concentración y pureza del DNA genómico de cada una de las bacterias se evaluó espectrofotométricamente empleando un cuantificador Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

5.3.2 Amplificación mediante PCR del gen 16s ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó en un termociclador Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) con un volumen final de mezcla de reacción de 50 µL. La mezcla de reacción contenía 200 ng del ADN genómico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.3 µM de desoxirribonucleótidos trifosfato dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.3 µM de cada uno de los iniciadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad California).

5.3.3 Secuenciación

Para la secuenciación del ADN se solicitaron los servicios del Laboratorio de Servicios Genómicos del Langebio, Cinvestav; en donde emplean el método del dideoxi-terminal, desarrollado por Frederick Sanger (1977).

5.4 Evaluación de la capacidad probiótica

5.4.1 Resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro*

La resistencia de las bacterias aisladas a las condiciones gastrointestinales se determinó siguiendo el método descrito por Lee et al. (2013), Lin et al. (2007) y Pieniz et al. (2014) mediante una fase de simulación de digestión gastrointestinal. Como cepas probióticas de referencia, en todas las determinaciones posteriores se utilizaron *Lactobacillus casei* Shirota (LCS) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LRGG).

5.4.1.1 Resistencia a jugo gástrico

El caldo MRS se ajustó a un pH de 2.0 con HCl 6 M y se separó en tubos de ensayo con 9 mL para someterse a esterilización. Posteriormente, a los tubos se les agregó 1 mL de una concentración de BAL de 1×10^8 UFC y una solución de pepsina a una concentración del 1% en HCl 0.1 M. Los tubos fueron incubados en una incubadora con agitación a 37°C por 2 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-9} y se inocularon en agar, almacenando a 37°C por 24 h para observar el crecimiento de las bacterias. 1 mL de la muestra restante se depositó en viales estériles y se sometió a 3 lavados con agua estéril mediante centrifugación a 4°C y 10000 rpm durante 10 min. El pellet obtenido se depositó en viales con 1 mL de caldo MRS estéril para ser utilizado en la siguiente etapa de resistencia a jugo intestinal.

Como muestra control, en tubos se inocularon las BAL sin adición de enzimas ni acidificación del medio y se incubaron a las mismas condiciones. El recuento se reportó como UFC/mL y porcentaje de supervivencia.

5.4.1.2 Resistencia a jugo intestinal

Para la prueba de resistencia al jugo intestinal, se adicionaron a los tubos con caldo MRS sales biliares (ácido cólico y desoxicólico, 50:50) en una concentración final del 0.3% y se sometieron a esterilización. Posteriormente, se agregó pancreatina en una concentración del 1% en NaHCO_3 0.1 M y se adicionó el inóculo sometido a condiciones de jugo gástrico y se incubaron a 37°C por 24 h.

Para evaluar la resistencia de los aislados se realizaron diluciones seriadas en caldo peptona (10^{-1} hasta 10^{-9}) y se realizó la siembra en agar MRS por el método de

microgota, incubando a 37°C por 24 h. Como muestra control, en tubos se inocularon las BAL sin adición de enzimas ni acidificación del medio y se incubaron a las mismas condiciones. El recuento se reportó como UFC/mL y porcentaje de supervivencia.

5.4.2 Capacidad antimicrobiana

Para evaluar la capacidad antimicrobiana de las bacterias aisladas, se usaron cepas puras de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -) y *Staphylococcus aureus* ATCC 1654 (Gram +). Se realizó la prueba a través del método de doble capa (Zhao, Doyle, & Zhao, 2004), el cual consiste en poner en una placa Petri con agar MRS solidificado una concentración conocida de cada una de las BAL en un área de 1 cm de ancho a lo largo de la caja. Se mantuvo una temperatura de 37°C por 24 h, durante todo el proceso de incubación. Una vez terminado el tiempo de desarrollo de la bacteria ácido láctica, se vertió agar soya tripticaseína a una temperatura cercana a 30°C sobre las placas con las BAL desarrolladas. Al solidificar el agar, las cepas patogénicas se sembraron con ayuda de un hisopo estéril con el cual se extendió el inóculo sobre toda la superficie de la caja. Nuevamente se incubó a 37°C por 24 h. Los halos de inhibición que se obtuvieron, fueron medidos y reportados como centímetros de inhibición.

5.4.3 Resistencia a antibióticos

Se evaluó la susceptibilidad de las bacterias aisladas frente a antibióticos utilizados comúnmente (amoxicilina, amicacina, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacino, espectinomicina, tetraciclina y vancomicina), mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para este ensayo se empleó el método de microdilución en placa, siguiendo lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Se prepararon diferentes concentraciones (500 a 1 µg/mL) de los antibióticos en caldo Müeller-Hinton. El inóculo de las BAL se ajustó a una turbidez equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). El ensayo se realizó en placas estériles de 96 pocillos, colocando 100 µL de caldo con cada una de las concentraciones de antibióticos. Posteriormente se adicionaron 10 µL del inóculo en cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 24 h. La CMI se definió como la concentración más baja de antibiótico que da una inhibición completa

del crecimiento visible, en comparación con un pozo de control sin antibióticos y uno sin inóculo.

5.5 Efecto de las bacterias aisladas frente a *Helicobacter pylori*

Las cepas de *Helicobacter pylori* fueron donadas por el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), México. Se utilizaron las cepas ATCC 43504 y ATCC 700392 y 3 cepas clínicas (1L, 1b y 2) *cagA*, *babA2* y *vacA* positivas, aisladas de pacientes pediátricos del HIMFG.

Para la reactivación de las cepas, estas fueron sembradas en agar Casman con sangre de caballo al 10% y se incubaron a 37°C por 72h en atmósfera parcial de CO₂ (5%) y se comprobó su morfología (circulares, elevadas, borde entero, grisáceas como “gotas de rocío”). Las bacterias fueron teñidas con la tinción de Gram y se comprobó su morfología microscópica (bacilo Gram negativo con forma característica de “ala de gaviota” o en forma de “s”). Posteriormente se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa, y de ureasa con medio de urea (anexo), inoculando cada una de las cepas en los tubos, observando el cambio de color del indicador rojo de fenol de ácido (amarillo) a alcalino (rosa mexicano), indicativo de la hidrólisis de la urea por la enzima ureasa de *H. pylori* (Mendoza-Elizalde, 2010).

Para la prueba de inhibición se empleó el método de doble capa (Zhao et al., 2004). En la primera capa se solidificó agar MRS y con la ayuda de hisopos estériles se inocularon las BAL aisladas, en una concentración equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de MacFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y se incubaron a 37°C por 24h en condiciones de microaerofilia (5% CO₂).

Posteriormente se agregó una segunda capa de agar Müeller Hinton suplementado con sangre de carnero desfibrinada, a una temperatura alrededor de 30°C y se solidificó a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar. Una vez solidificado el agar, se inocularon las cepas de *H. pylori* en gotas de 20 µL, con una concentración equivalente al tubo N° 2 de la escala de MacFarland (6×10^8 UFC/mL). Las cajas se incubaron a las condiciones mencionadas anteriormente durante 72 h. Como control negativo se incubaron las placas sin inóculo de BAL y como control positivo se determinó la CMI con claritromicina (0.015 - 12 µg/mL), incubando bajo las mismas

condiciones. Para comprobar la actividad de la urea se utilizó la prueba de la ureasa mencionada anteriormente.

5.6 Análisis estadístico

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Para las determinaciones de resistencia a condiciones gastrointestinales y actividad antimicrobiana, se realizó un análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS v. 25.

Para el análisis de las secuencias de ARNr se utilizó el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), comparando con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando el método de neighbor joining (Saitou & Nei, 1987). Las distancias filogenéticas se determinaron utilizando el modelo del parámetro de Kimura 2, utilizando el software Mega v. 7.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento y selección

Las BAL tienen la capacidad de crecer en diversos medios, como el tracto gastrointestinal, productos lácteos y vegetales, debido a sus requerimientos ambientales y nutricionales: son anaerobias aerotolerantes, mesófilas (5-45 °C), acidotolerantes (pH 3-9) y obtienen energía a partir del metabolismo de azúcares fermentables (Holzapfel & Stiles, 1997). De acuerdo con la evaluación fisicoquímica de las fuentes de aislamiento, se puede observar en la Tabla 4 que la zarzamora presentó el menor pH, así como la mayor cantidad de sólidos solubles totales en comparación con las muestras de aguamiel y pulque. Estos datos son de utilidad, ya que indican las condiciones a las que están adecuadas las bacterias objeto de este estudio. Se ha demostrado que algunas especies de las BAL, como *Lactobacillus plantarum*, presentes en las bebidas vegetales, tienen la capacidad de acidificar el medio, característica por la cual han sido de utilidad en la conservación de alimentos y aplicaciones farmacéuticas antimicrobianas (Thapa & Tamang, 2015).

Tabla 4. pH y sólidos solubles de las muestras de aguamiel, pulque y zarzamora

Muestra	pH	Sólidos solubles (°Brix)
Aguamiel	5.6±0.02	8.2±0.05
Pulque	3.8±0.02	3.2±0.01
Zarzamora	3.15±0.06	10.75±0.50

En la Tabla 5 se muestran los resultados del recuento y aislamiento de las bacterias ácido lácticas a partir de las muestras de aguamiel, pulque y zarzamora. Como se puede observar, la muestra de pulque mostró mayor crecimiento de colonias con características similares a las del grupo de BAL (colonias pequeñas de color blanco-beige y consistencia cremosa), mientras que las muestras de zarzamora mostraron un menor crecimiento. Se obtuvieron 60 colonias puras, de las cuales se seleccionaron 14 (2 de aguamiel, 8 de pulque y 4 de zarzamora) Gram positiva y

catalasa negativa. El resto de los aislados fueron descartados debido a que no cumplieron con las características del grupo de las BAL.

Tabla 5. Crecimiento de bacterias ácido lácticas a partir de aguamiel, pulque y zarzamora.

Muestra	Recuento (log 10 UFC/mL)	Número de colonias puras
Aguamiel	6.33×10^6	20
Pulque	7.38×10^6	20
Zarzamora	8.87×10^2	20

UFC: Unidades formadoras de colonia.

El resultado positivo a la prueba de catalasa, por parte de algunas bacterias con morfología similar a la de las BAL, pudo ser debido a que, de acuerdo a lo señalado por Presscot et al. (1999), algunas bacterias ácido lácticas han demostrado la presencia de pseudocatalasas. Por otro lado, se encontraron aislados de las muestras de pulque y zarzamora con morfología típica de las levaduras al observarse al microscopio (anexo), observando algunas células en proceso de gemación. Al respecto, se ha descrito que en las bebidas fermentadas de origen vegetal es común encontrar bacterias ácido lácticas y levaduras, aumentando la cantidad de estas últimas conforme avanza el proceso de fermentación (Thapa & Tamang, 2015).

6.1.1 Caracterización morfológica de las bacterias ácido lácticas aisladas

En la Tabla 6 se muestra la caracterización de las 14 bacterias seleccionadas y la nomenclatura designada, iniciando con “A” las bacterias aisladas de aguamiel, con “P” las aisladas de pulque y con “Z” las aisladas de zarzamora. Se puede apreciar que la mayoría de las colonias mostraron una morfología macroscópica similar (colonias redondas, convexas, de bordes enteros, consistencia cremosa-lechosa y un color blanco-beige). Por otro lado, en cuanto las características microscópicas, se observa una diferenciación en la forma de las bacterias, ya que el aislado de aguamiel A2-1 y el de zarzamora Z24-4 mostraron forma de coco, mientras que las demás presentaron forma bacilar (anexo).

Tabla 6. Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas de aguamiel, pulque y zarzamora.

Cepa	Forma colonia	Borde	Elevación	Superficie	Color	Luz transmitida	Forma	Gram	Catalasa
P24-1	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Blanca	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-2	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-3	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-4	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-5	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-6	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-7	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
P24-8	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
A1-2	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Blanca	Opaca	Bacilo corto	+	-
A2-1	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Blanca	Opaca	Coco	+	-
Z24-1	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Blanca	Opaca	Bacilo corto	+	-
Z24-2	Redonda	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-
Z24-3	Redonda	Entero	Elevada	Lisa	Beige	Opaca	Coco	+	-
Z24-4	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Beige	Opaca	Bacilo corto	+	-

6.2 Identificación de género y especies

Los métodos moleculares son importantes para la identificación bacteriana y quizás más precisos para las LAB que los métodos fenotípicos convencionales (Shehata et al., 2016). A través de la identificación de las especies bacterianas aisladas en este estudio, se encontró que los lactobacilos eran en su mayoría *Lactobacillus plantarum*, excepto la P24-8 que mostró mayor similitud con *Lactobacillus brevis*, mientras que la A2-1 fue similar a *Pediococcus acidilactici*, y la Z24-4 presentó similitud con *Enterococcus faecalis*, como se muestra en sus árboles filogenéticos (Figura 5, 6 y 7 respectivamente).

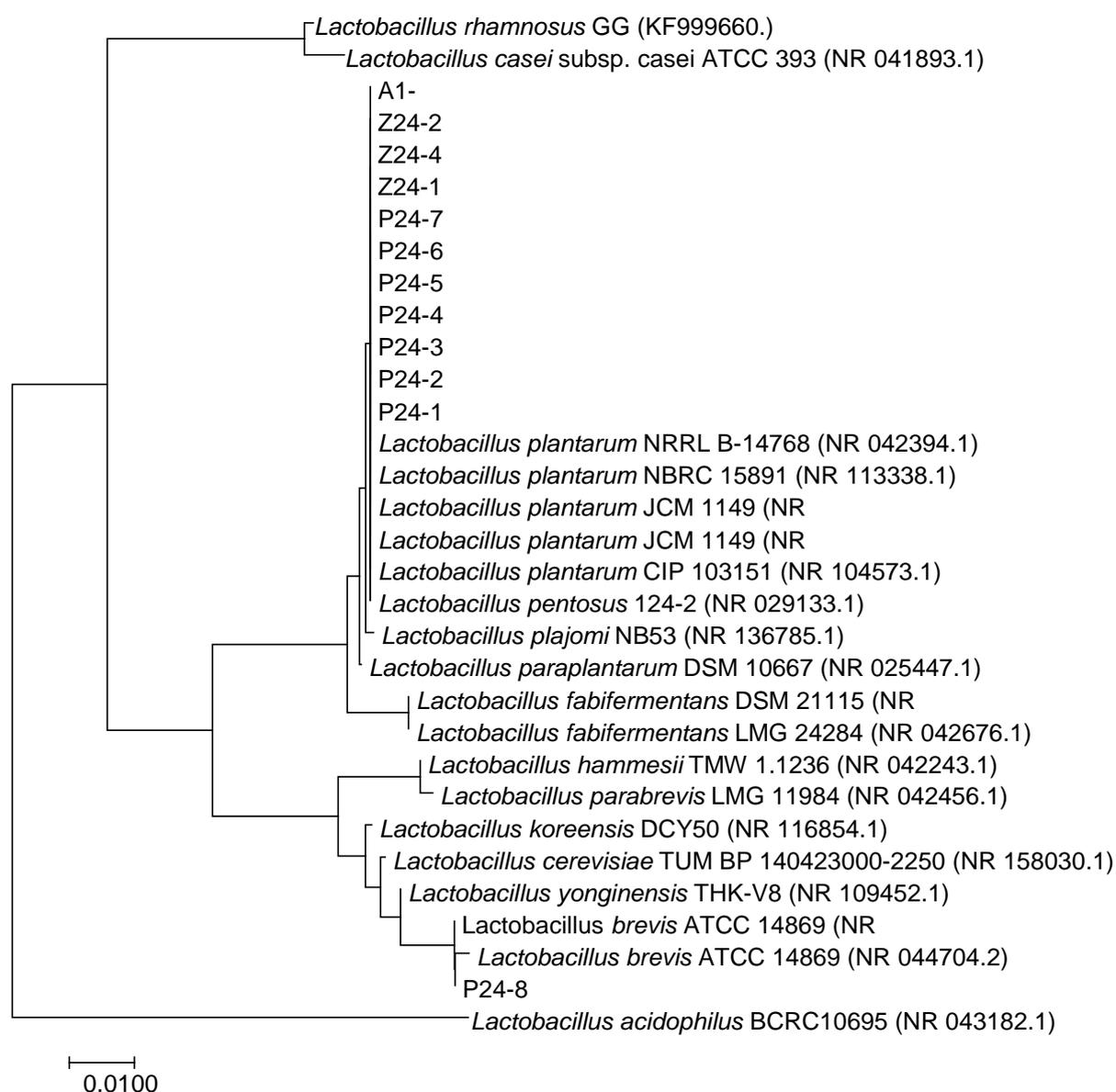


Figura 4. Árbol filogenético de las bacterias aisladas pertenecientes al género de *Lactobacillus*

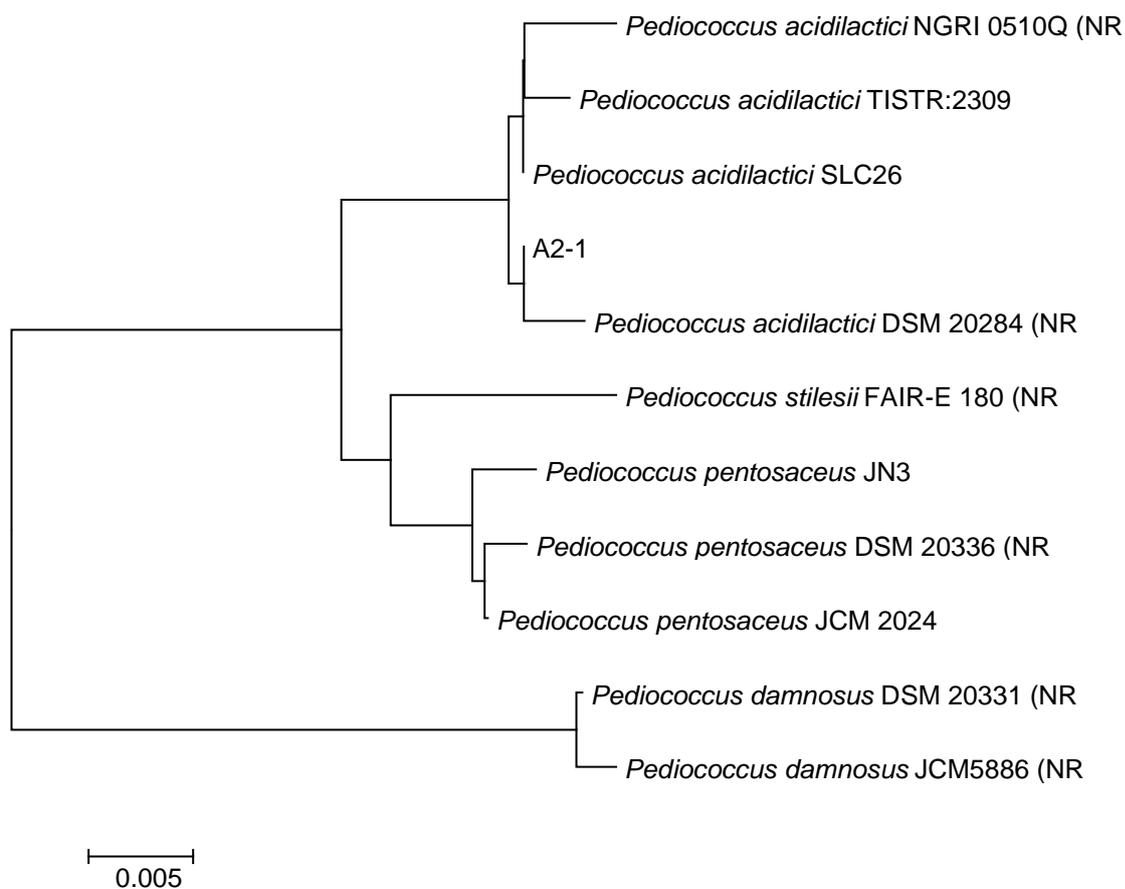


Figura 5. Árbol filogenético del aislado A2-1 de aguamiel, perteneciente al género de *Pediococcus*

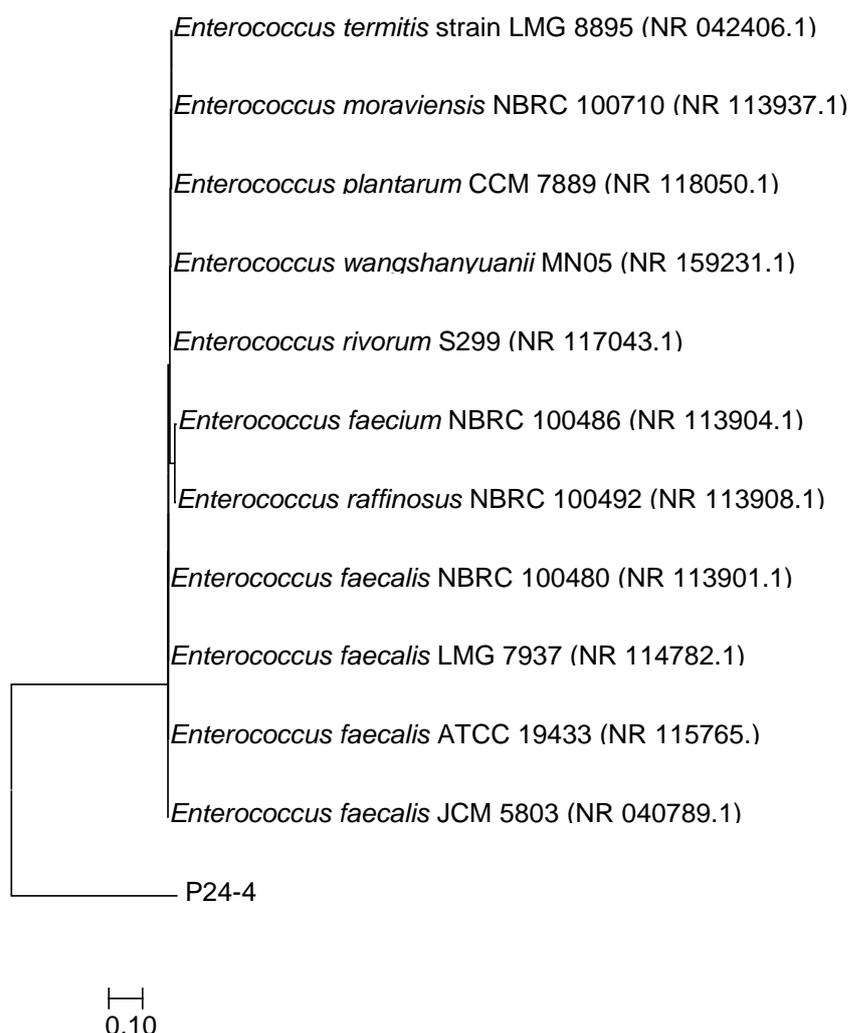


Figura 6. Árbol filogenético del aislado Z24-4 de zarzamora, perteneciente al género de *Enterococcus*

El análisis filogenético de las secuencias de 16S ARNr demostró una alta similitud de hasta el 98% con aislados obtenidos previamente de diversas fuentes y depositados en la base de datos GenBank (Tabla 7). La gran variedad de microorganismos involucrados en la producción del pulque a partir del aguamiel, es debida a que este proceso se lleva a cabo bajo condiciones no asépticas; por lo tanto, la fermentación se produce por los microorganismos presentes de manera natural en el maguey y los que se incorporan durante la recolección, transporte, inoculación y manipulación del aguamiel (Escalante et al., 2008). Es por ello que el aislamiento de microbiota de pulque ha sido complicada pero se han recuperado cepas de lactobacilos,

leuconostoc, estreptococos, pediococos y diversas levaduras (Escalante et al., 2008, Escalante et al., 2004)

Tabla 7. Identificación de las bacterias aisladas por amplificación del ARNr 16S

Bacteria	Especie identificada	Similitud	Núm. acceso
P24-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	99%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	99%	NR_113338.1
P24-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	99%	NR_117813.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-14768	99%	NR_042394.1
P24-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	100%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	99%	NR_113338.1
P24-4	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	100%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	99%	NR_113338.1
P24-5	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	100%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	99%	NR_113338.1
P24-6	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	98%	NR_104573.1
	<i>Lactobacillus plajomi</i> NB53	98%	NR_136785.1
P24-7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151	100%	NR_104573.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	99%	NR_117813.1
P24-8	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	99%	NR_116238.1
	<i>Lactobacillus yonginensis</i> THK-V8	97%	NR_109452.1
A1-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151	99%	NR_104573.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	99%	NR_117813.1
A2-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99%	NR_042057.1

	<i>Pediococcus acidilactici</i> NGRI 0510Q	98%	NR_041640.1
Z24-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	100%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	98%	NR_113338.1
Z24-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	99%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	98%	NR_113338.1
Z24-4	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480	99%	NR_104573.1
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	99%	NR_115765.1
Z24-8	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	100%	NR_115605.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	98%	NR_113338.1

En la mayoría de las fermentaciones espontáneas, es común que las BAL se encuentren en mayor concentración inicialmente, seguidas de varias especies de levaduras (Thapa & Tamang, 2015). Tal es el caso del estudio de Di Cagno et al. (2011) quienes aislaron e identificaron 10 cepas de *Weissella cibaria* en zarzamora. Además, se ha descrito que *L. plantarum* se encuentra frecuentemente en la fermentación de vegetales ricos en taninos (Reverón et al., 2017), como el caso de la zarzamora (Van de Velde, Pirovani, & Drago, 2018). Dichos compuestos tienen efecto antimicrobiano, sin embargo, *L. plantarum* posee las enzimas tanasa y galato descarboxilasa, que tienen la capacidad de degradarlos a pirogalol, el cual es menos tóxico para las células microbianas (Reverón et al., 2017).

Este lactobacilo ha sido de gran utilidad en la industria para la producción de vitaminas, bacteriocinas, probióticos, antifúngicos y posibles agentes anticaries (Evanovich, Jeanne, Mendonça, & Guerreiro, 2019; Thapa & Tamang, 2015), y los análisis genómicos han demostrado la ausencia de factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos, por lo que se han reconocido en los Estados Unidos como seguros, GRAS (Generally Recognized as Safe), para su aplicación en productos de consumo humano (Evanovich et al., 2019).

Asimismo, las cepas de *L. brevis* han sido aisladas de vinos, vegetales y productos lácteos (Calasso & Gobbetti, 2011; Thapa & Tamang, 2015). Estas cepas tienen el estatus GRAS y se han empleado en productos probióticos (Rönkä et al., 2003). Mientras que *P. acidilactici* ha sido aislada de productos fermentados de origen vegetal y productos lácteos y es utilizada en la fermentación de productos alimenticios, así como en la sacarificación y fermentación para la producción de ácido láctico (Thapa & Tamang, 2015; K. Zhao et al., 2013).

Por otro lado *E. faecalis* ha demostrado un doble papel en la salud humana, habitando la cavidad oral y el tracto gastrointestinal y urogenital de mamíferos. Este puede infectar el tracto urinario, el torrente sanguíneo, el endocardio, el abdomen, el tracto biliar, las heridas por quemaduras y los dispositivos extraños que residen en el lugar, considerándose un patógeno oportunista (Cebrián et al., 2012; Kayaoglu, 2004). Sin embargo, también se ha aislado a partir de productos fermentados de origen animal (lácteos) y vegetal (aceitunas y soya), demostrando efectos benéficos a la salud, actuando como probióticos (Cebrián et al., 2012; Thapa & Tamang, 2015).

6.3 Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro*

6.3.1 Resistencia a antibióticos: determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La resistencia a antimicrobianos es un parámetro de gran importancia que se debe evaluar en las cepas que serán destinadas para consumo, ya que se debe evitar que las bacterias probióticas tengan la capacidad de transferir genes resistencia a los antibióticos, debido al posible impacto en la salud humana (D'Aimmo, Modesto, & Biavati, 2007). Las bacterias se consideran "sensibles" cuando presentan una CMI <8 µg/mL, "moderadamente resistentes" de 8 µg/mL y "resistentes" >328 µg/L (Walsh et al., 2003). Como se puede apreciar en la Tabla 8, las BAL fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos evaluados, excepto para los aislados P24-6, P24-7 y P24-8, que fueron moderadamente resistentes a la levofloxacina y P24-8 a la tetraciclina. La bacteria Z24-1 fue moderadamente resistente a la espectinomicina, amikacina, cloranfenicol, gentamicina y tetraciclina. Por otro lado, todos los aislados fueron

resistentes a la vancomicina, incluyendo las cepas de referencia, siendo las bacterias Z24-1, Z24-4 y LCS las que mostraron una CMI mayor (≥ 250).

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacterias aisladas.

Bacteria	CMI ($\mu\text{g/ml}$)								
	Amk	Amx	Clr	Esp	Gnt	Lvf	Mtr	Ttr	Vnc
P24-1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-2	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-3	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-4	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-5	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-6	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-7	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 100
P24-8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 100
A1-2	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 100
A2-1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 100
Z24-1	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 25	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≥ 250
Z24-2	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100
Z24-4	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≥ 250
Z24-8	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 100
LCS*	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≥ 250
LRGG*	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 100

**L. casei* Shirota; LRGG: *L. rhamnosus* GG

Zonenschain et al. (2009) encontraron genes de resistencia a la tetraciclina y eritromicina en cepas de *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. brevis* aisladas de salsas vegetales fermentadas. Lee et al. (2016) evaluaron la resistencia antimicrobiana de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y *L. plantarum* aisladas de kimichi, una bebida

a base de col fermentada, encontrando una resistencia a la vancomicina en una concentración de 2048 mg por disco.

Por otro lado, análisis previos en 6 cepas de *L. casei* aisladas de yogurt, presentaron una CMI₉₀ de 1000 µg/mL, mayor que las cepas de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* (D'Aimmo et al., 2007). Rönkä et al. (2003) encontró resistencia a diversos antibióticos por parte de cepas de *L. brevis*, entre ellos vancomicina y penicilina, evidenciando nula inhibición.

Algunas especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han presentado resistencia a la vancomicina, y este fenotipo es común en el grupo de las BAL (Fraqueza, 2015; S. Zhang, Oh, Alexander, özçam, & van Pijkeren, 2018). Esta resistencia podría explicarse por la afinidad de la vancomicina a la terminación del peptidoglicano, ya que la vancomicina se une a la terminación de D-alanil-D-ala del peptidoglicano, inhibiendo su síntesis, sin embargo, se une débilmente a la terminación de D-alanil-D-lac, como es el caso de algunas BAL (Deghorain et al., 2007; S. Zhang et al., 2018).

Anteriormente se identificaron los genes de resistencia a la vancomicina en cromosomas de las especies de *L. plantarum* y *Leu. mesenteroides*, sin embargo, no se mostraron signos de intercambio lateral reciente, ni se vieron inmersos en el genoma, por lo tanto, se considera que estos genes no son transferibles (Deghorain et al., 2007; Elisha & Courvalin, 1995).

6.3.2 Resistencia a las condiciones gastrointestinales

Resistencia al jugo gástrico

En la Figura 9 se pueden apreciar los resultados correspondientes a la supervivencia de las BAL aisladas a las condiciones del jugo gástrico *in vitro*. El pH del jugo gástrico se mantuvo a pH 2.0 durante 2h para simular las condiciones en el estómago. Se pudo observar que, en condiciones de acidez y presencia de pepsina, las cepas presentaron una supervivencia desde 63.2 hasta 96.3%. Las bacterias P24-7 y P24-8 fueron las más resistentes (95 y 96% de supervivencia, respectivamente). Al comparar entre los

probióticos de referencia, LCS mostró mayor reducción (51.4% de supervivencia) comparado con LRGG (69.6%) ($p < 0.05$).

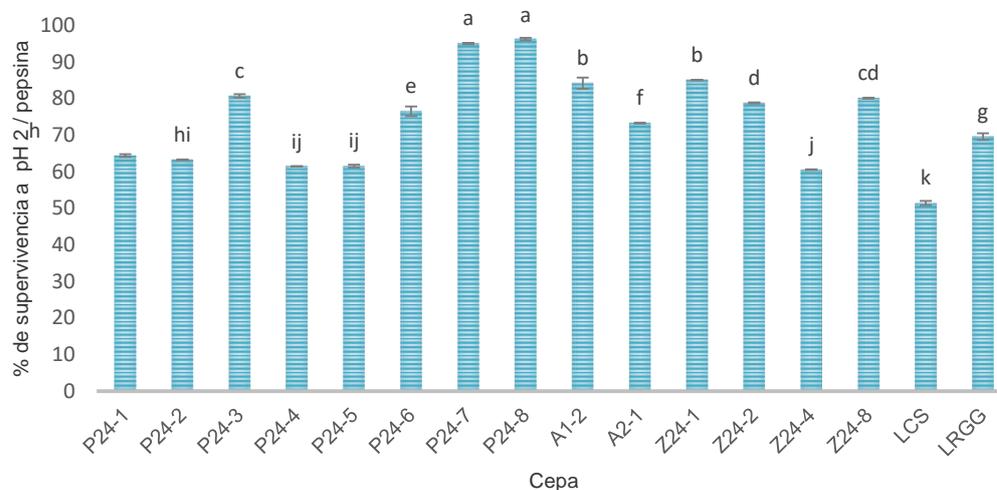


Figura 7. Resistencia *in vitro* de las bacterias ácido lácticas a jugo gástrico.

En un estudio donde se evaluaron 44 cepas de *Lactobacillus spp*, se demostró que sólo 29 de ellas sobrevivieron a un pH de 2.5 después de 4 h de exposición (Jacobsen, Nielsen, Hayford, & Møller, 2015). Mientras que Bao et al. (2010), observaron que sólo una cepa de las 11 evaluadas de *L. fermentum*, mostró una buena tolerancia a pH 2.0 con una tasa de supervivencia del 53.7%.

Otros estudios informan un porcentaje igual de viabilidad de cepas de *Lactobacillus* a pH 3 en comparación con pH 7, pero describen una disminución significativa en la tasa de supervivencia a pH 2 (Angmo et al., 2016; Guo et al., 2010). *Enterococcus durans* LAB18s mostró una alta capacidad de supervivencia en jugo gástrico simulado con pepsina a pH 3.0, sin embargo, la viabilidad celular disminuyó por debajo del límite de detección cuando se expuso a pH 2.0 (Pieniz et al., 2014).

La resistencia a condiciones ácidas podría deberse a que las bacterias mantienen la homeostasis del pH descargando H^+ de la célula a través de la membrana, debido a la H^+ -ATPasa (Booth, 2003; Matsumoto, Ohishi, & Benno, 2004), y esta actividad enzimática es mayor en bacterias tolerantes al ácido (Miwa, Esaki, Umemori, & Hino, 1997). Algunos lactobacilos como *L. pentosus* y *L. reuteri* utilizan otras respuestas para resistir condiciones estomacales hostiles, como la reparación de proteínas por

daño en el ADN y cambios en la envoltura celular y metabolismo alterado (Casado Muñoz et al., 2016; Pérez Montoro et al., 2018).

Además, la pre-exposición de cepas de lactobacilos a ambientes ácidos como el estómago o las matrices de alimentos, podría mejorar su desempeño como cepas probióticas, al mejorar su adhesión a las células de la mucosa y así aumentar la colonización de bacterias en el intestino (Bengoia et al., 2018b; Pérez Montoro et al., 2018).

Resistencia al jugo intestinal

Para que las cepas probióticas puedan ejercer un efecto benéfico a la salud, éstas deben de sobrevivir a las condiciones de acidez del estómago y a la presencia de enzimas y sales biliares secretadas por el páncreas (Greppi, Saubade, Botta, Guyot, & Cocolin, 2017). En la prueba de simulación del jugo intestinal, el porcentaje de supervivencia fue desde 52.5% en la P24-7 hasta 66.9% en la Z24-2. LCS mostró mayor reducción al exponerse a dichas condiciones (58.3% de supervivencia) comparado con las bacterias aisladas y LRGG (60%) ($p < 0.05$) (Figura 10).

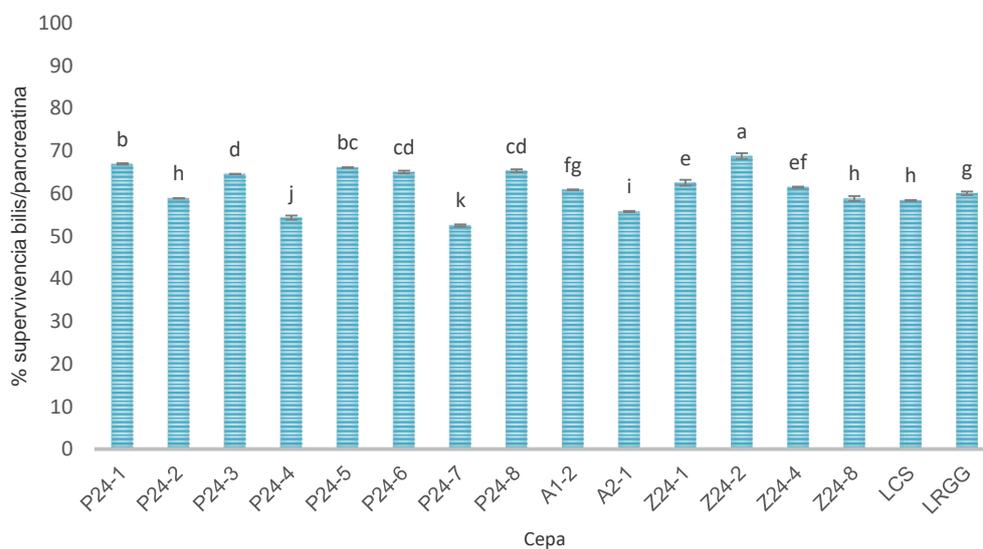


Figura 8. Resistencia de las bacterias ácido lácticas a jugo intestinal

En este estudio, el 50% de las bacterias aisladas mostraron resistencia a sales biliares y pancreatina, incluso mayor que los probióticos de referencia. Lin et al. (2007) encontraron una alta tolerancia de *L. fermentum* SGM3, a una concentración de 0.3% de sales biliares, con un 100% de supervivencia con respecto a las cepas crecidas en condiciones normales (medio MRS sin adición de sales biliares, pH 7.0). Del mismo modo, Pieniz et al. (2014) informaron sobre la supervivencia de *Enterococcus durans* LAB18 a concentraciones de sales biliares mayores a 1.5% (en comparación con las cepas crecidas en MRS sin sales biliares).

La tolerancia a las sales biliares es una característica importante conocida del género de *Lactobacillus*, que permite que la bacteria sobreviva, crezca y ejerza su acción en el tránsito gastrointestinal. Estos compuestos funcionan como detergentes biológicos que ejercen efectos en el metabolismo de las grasas, así como un efecto inhibitorio sobre la mayoría de bacterias Gram positivas y negativas, debido a que puede alterar la membrana plasmática con pérdida de material intracelular (Begley, Hill, & Gahan, 2006).

La resistencia a estas condiciones puede atribuirse a la enzima responsable de la desconjugación de sales biliares, una hidrolasa de sales biliares (SBH) presente en algunas LAB (Bustos, Saavedra, de Valdez, Raya, & Taranto, 2012; Sánchez, 2018), como *L. reuteri* (Bustos et al., 2017), *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* (Kim et al., 1999), *L. brevis*, *L. gasserii*, *L. johnsonii* (Begley et al., 2006) y *E. faecalis* (Shankar, Baghdayan, & Gilmore, 2002). Sin embargo, se ha reportado que esta enzima está ausente en microorganismos que no han estado en contacto con sales biliares (Begley et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que la SBH es específica para uno o más ácidos biliares, por ejemplo, *L. buchneri* JCM1069 tiene actividad frente al ácido taurodeoxicólico, pero no frente al ácido taurocólico (Moser & Savage, 2001).

La SBH también está asociada con la reducción del colesterol sérico y la toxicidad y efectos secundarios de las sales biliares (Bao et al., 2010; Margolles, García, Sánchez, Gueimonde, & de los Reyes-Gavilán, 2003; Shehata et al., 2016), como la inflamación crónica provocada por el ácido cólico, un ácido biliar que es metabolizado por las bacterias probióticas, evitando su efecto adverso en el colon y disminuyendo el riesgo de cáncer colorrectal (Sánchez, 2018).

6.3.3 Actividad antimicrobiana

La producción de sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y péptidos de bajo peso molecular, es una de las principales propiedades para la selección de cepas probióticas (Guo et al., 2010). En este estudio, el 50% de los aislados tuvieron actividad inhibitoria contra *E. coli* y *S. aureus*. El aislado P24-4 tuvo el efecto inhibitorio más bajo contra *E. coli*, pero el más alto en *S. aureus*. El aislado P24-2 mostró mayor actividad antimicrobiana contra ambos patógenos, mientras que la cepa de referencia LCS inhibió el crecimiento de *E. coli* pero no el de *S. aureus*, y LRGG inhibió el crecimiento de ambas ($p < 0.05$) (Tabla 9).

La actividad antibacteriana de las BAL podría resultar de la producción de una gran variedad de compuestos, incluidos los catabolitos de azúcar (por ejemplo, ácido láctico y ácido acético); catabolitos de oxígeno (como el peróxido de hidrógeno); compuestos proteicos (por ejemplo, bacteriocinas, otros péptidos de baja masa molecular y péptidos / proteínas antifúngicas); metabolitos de grasas y aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, ácido feniláctico y ácido OH-feniláctico); y otros como la reuterina y la reuterinciclina (Makras et al., 2006).

La producción de bacteriocinas es otro mecanismo importante en la inhibición de microorganismos. Estas pueden actuar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Cl. botulinum*, *Pseudomonas*, *Ent. Fecalis* y *Salmonella* spp (Heredia-Castro, Hernández-Mendoza, González-Córdova, & Vallejo-Cordoba, 2017).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las bacterias ácido lácticas aisladas.

Bacteria	Actividad antimicrobiana (cm de inhibición)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
P24-1	2.90±0.21 ^{abc}	2.60±0.20 ^{abc}
P24-2	3.33±0.35 ^a	2.83±0.25 ^a
P24-3	2.83±0.28 ^{abc}	2.43±0.15 ^{abc}
P24-4	1.90±0.68 ^d	2.87±0.15 ^a
P24-5	-	-
P24-6	-	-
P24-7	-	-
P24-8	-	-
A1-2	3.00±0.54 ^{ab}	2.23±0.40 ^{bc}
A2-1	2.40±0.16 ^{bcd}	2.17±0.32 ^d
Z24-1	-	-
Z24-2	-	-
Z24-4	-	-
Z24-8	-	-
LCS	2.23±0.15 ^{cd}	-
LRGG	2.37±0.21 ^{bcd}	2.30±0.20 ^{bc}

-. Sin inhibición; LCS: *L. casei* Shirota; LRGG: *L. rhamnosus* GG. ^{abc} Diferentes letras indican diferencia significativa entre bacterias ($p < 0.05$).

En un estudio realizado con cepas de *L. fermentum*, se observó que *S. aureus* expresó mayor resistencia con respecto a *E. coli* (Lin et al., 2007), un efecto similar al observado en LCS en este estudio. Por otro lado, Bao et al. (2010) observaron una inhibición de *E. coli* O157 882364 por el 45% de las cepas de *L. fermentum* evaluadas, mientras que el 100% de estas inhibieron a *S. aureus*, evidenciando distinta actividad antimicrobiana incluso entre cepas de la misma especie. Gutiérrez et al. (2016) demostraron que *Lc. lactis* y *L. rhamnosus* inhibieron a *E. coli* en un 31 y 12% respectivamente, no obstante, no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Se ha evidenciado que cepas de *E. coli* tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes moderadamente ácidos que contienen ácidos orgánicos producidos en la fermentación, así como en ambientes extremadamente ácidos (pH 2.4 - 3), generando una respuesta de tolerancia al ácido, la cual se adquiere después de haber sido expuestas a pH moderadamente ácido (Barua et al., 2002; Hirshfield, Terzulli, & O'Byrne, 2003).

Por otro lado, Karska-Wysocki et al. (2010) encontraron que tanto la mezcla de *L. acidophilus* y *L. casei*, así como individualmente, inhiben el crecimiento de cepas de *S. aureus* multiresistentes a antibióticos, produciendo múltiples antimicrobianos sólo cuando crecieron en el mismo medio, mientras que *Lactococcus cremoris* no tuvo este efecto sobre *S. aureus*. La resistencia de *S. aureus* a la acción de algunas BAL, podría ser explicada por las diferencias en el metabolismo de estas, ya que la producción de otros ácidos, diferentes al ácido láctico, como ácido acético, propiónico y butírico pudieran tener mayor efecto inhibitorio sobre este microorganismo (Charlier, Cretenet, Even, & Loir, 2009). Además, se ha demostrado que los carotenoides producidos por *S. aureus* le ayudan a sobrevivir a condiciones hostiles, como el estrés oxidativo causado por la producción de peróxido de hidrógeno (Liu et al., 2005; Mishra et al., 2016).

6.4 Efecto sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

La colonización por *H. pylori* puede ir seguida de una inflamación de la capa de moco gástrico, y es un factor de riesgo en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Amieva & Peek, 2016). Se evaluaron 3 cepas clínicas aisladas de pacientes pediátricos, las cuales presentaron los genes *babA2*, *vacA* y *cagA*.

Como se muestra en la Tabla 10, todas las bacterias aisladas inhibieron a *H. pylori* ATCC 43504, siendo las bacterias P24-2, P24-6, P24-8, P24-4, P24-8, Z24-4 y Z24-8, las que tuvieron una inhibición total. Estas dos últimas bacterias tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de las 5 cepas evaluadas, mostrando mismo efecto que el probiótico de referencia *L. rhamnosus* GG. La CMI de claritromicina fue menor para la cepa ATCC 43504 (0.03 µg/mL) con respecto a las demás (1.0 µg/mL). Por otro

lado, se obtuvo una inhibición en la actividad de la ureasa de las 5 cepas de *H. pylori* al exponerse con las BAL.

Tabla 10. Efecto de las bacterias ácido lácticas sobre *Helicobacter pylori*.

Bacteria	<i>Helicobacter pylori</i>					
	ATCC 43504	ATCC 700392	1L	1B	2	
P24-1	±	-	-	-	-	
P24-2	++	-	-	-	-	
P24-3	±	-	-	-	-	
P24-4	±	-	-	-	-	
P24-5	±	-	-	-	-	
P24-6	++	-	++	-	-	
P24-7	±	-	-	-	-	
P24-8	++	-	-	-	-	
A1-2	±	-	±	-	-	
A2-1	±	-	-	-	-	
Z24-1	±	-	-	-	-	
Z24-2	±	-	-	-	-	
Z24-4	++	++	++	++	++	
Z24-8	++	++	++	++	++	
LCS*	±	-	-	-	-	
LRGG*	++	++	++	++	++	

**L. casei* Shirota; LRGG: *L. rhamnosus* GG

- sin inhibición; ± parcial inhibición; ++ total inhibición

A pesar de que el aislado Z24-4 tuvo un importante efecto inhibitorio sobre *H. pylori*, esta pertenece al género de *Enterococcus*, y de acuerdo a la FAO/OMS, no pueden considerarse como probióticos destinados al consumo humano, debido a su alta resistencia a la vancomicina, así como su alta predisponibilidad a adquirir dichos genes de resistencia. Además, las cepas de este género, con resistencia a la vancomicina, se han asociado con la adquisición de infecciones nosocomiales (FAO/WHO, 2002).

Los mecanismos de inhibición de *H. pylori* por parte de las bacterias probióticas son diversos: mejoran en la resistencia de la barrera mucosa, la competencia por la

adhesión, los mecanismos inmunomoduladores (Papastergiou et al., 2014), la competencia por el sustrato y los sitios de unión (Westerik et al., 2018), y la producción de compuestos antimicrobianos (De Vrese et al., 2011). Westerik et al. (2018) encontraron que *Lactobacillus rhamnosus* yoba 2012 suprimió el crecimiento de *H. pylori* compitiendo por el sustrato y los sitios de unión, así como por la producción de compuestos antimicrobianos como el ácido láctico, sin embargo, no pudo inhibir completamente su crecimiento. Se ha demostrado que la producción de ácido láctico durante la fermentación por *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium lactis* BB-12, provocaron una disminución de la actividad de *H. pylori* (entre un 18 y un 45%) en sujetos infectados (De Vrese et al., 2011).

También se observó una disminución del 75% en la duración de diarrea durante la terapia de erradicación de *H. pylori*, al ser comparada con leche acidificada con ácido láctico y con el producto lácteo fermentado y pasteurizado. Estos efectos pudieron ser inducidos por la modulación de la microbiota intestinal, al suprimir un aumento excesivo de *Clostridium difficile* y una estimulación de los mecanismos de defensa del cuerpo a través de bacterias probióticas vivas (De Vrese et al., 2011).

Si bien se ha descrito que *H. pylori* tiene mecanismos que le permiten soportar la acidez del estómago, el efecto de los ácidos orgánicos es diferente, ya que estos no solo atraviesan la membrana celular y acidifican el pH del citoplasma, sino que además acumula aniones dentro de la célula (Barua et al., 2002; Guchte, Serror, Chervaux, Smokvina, & Stanislav, 2002). La mayoría de los microorganismos neutrófilos mantienen un gradiente de pH a través de sus membranas citoplasmáticas, con el interior más alcalino que el exterior, resultando en una acumulación de altos niveles de ácidos débiles cargados en el citoplasma (Hirshfield et al., 2003), como en el caso de *H. pylori*. Por otro lado, se ha demostrado que las cepas de laboratorio son más susceptibles que las cepas denominadas “silvestres” (Barua et al., 2002), como es el caso de las cepas clínicas utilizadas en este estudio.

La suplementación con probióticos puede coadyuvar en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*, sin embargo, no hay estudios concluyentes en humanos que demuestren que la suplementación tenga este efecto por sí sola. No obstante, al verse afectada la actividad de la ureasa, la probabilidad de supervivencia de *H. pylori* podría verse

disminuida, ya que la característica de sobrevivir a la acidez del estómago es por esta enzima que puede modificar el pH de su microentorno, volviéndolo neutro (Kao et al., 2016).

Además, otros beneficios derivados de la inhibición de la ureasa son la disminución de la inflamación de la mucosa gástrica y las lesiones de la misma, debido a que esta enzima es responsable en parte del reclutamiento inicial de monocitos y neutrófilos, de una mayor activación y estimulación del sistema inmune, así como de la licuefacción del moco gástrico, lo que expone la mucosa a la acción del pH ácido del estómago (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Otros de los beneficios del consumo de probióticos por personas infectadas son la prevención de la inflamación de la mucosa gástrica y la alteración de la microbiota por el consumo de *L. plantarum* ZDY 2013 en una concentración de 1×10^9 UFC/mL previo a la infección (Pan et al., 2015) y este efecto inmunomodulador también se han observado en modelos con colitis al suplementar con *L. plantarum* Lp91 (Duary, Bhausheb, Batish, & Grover, 2012).

Además, la supresión de *H. pylori* puede disminuir el riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer de estómago (Goderska et al., 2018; Yang, Lu, & Lin, 2014) Y algunos estudios han referido que la terapia de erradicación de este microorganismo, en conjunto con los probióticos, tienen un mejor efecto, ya que se ha logrado disminuir los efectos adversos de los medicamentos (náuseas, vómito y diarrea) y se ha logrado aumentar la tasa de erradicación (Chen et al., 2010; Goderska et al., 2018; D. Sgouras et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Estos efectos han sido mejores cuando se utilizan inhibidores de la bomba de protones (IBP) en el tratamiento, sin embargo, el uso a largo plazo de IBP puede presentar efectos secundarios como incremento en el riesgo de sufrir osteoporosis y fractura ósea, debido a la malabsorción de vitamina B12 e inhibición de la H⁺-ATPasa de osteoclastos (Jo et al., 2015), hipomagnesemia, deficiencia de vitamina B₁₂, anemia por deficiencia de hierro, neumonía y sobrecrecimiento *Clostridium difficile* en intestino delgado (Shin et al., 2016).

Si bien, al erradicar a *H. pylori* se asume que se eliminaría una de las principales causas de muerte por cáncer gástrico, es importante considerar otros factores para determinar si esto prevendrá el cáncer o solo reducirá su riesgo. Además, se ha propuesto que la infección por *H. pylori* proporciona algunos beneficios, como reducir los riesgos de obesidad (Graham, 2015), asma infantil, alergias (Chen & Blaser, 2007; Graham, 2015) y reflujo gastroesofágico (Abadi, 2014).

Esto conlleva a considerar otro posible efecto benéfico del consumo de las bacterias probióticas, ya que, como se demostró en este estudio, las bacterias no inhiben totalmente el crecimiento de *H. pylori*, sin embargo, tienen un efecto supresor y modulador en la actividad de la ureasa, y sería interesante realizar futuros estudios acerca de su actividad en modelos *H. pylori* positivos y su respuesta frente a los diversos marcadores de estas patologías.

7. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este estudio sugieren que el aguamiel, el pulque y la zarzamora son fuentes importantes de bacterias ácido lácticas. Con excepción del aislado con similitud génica a *Enterococcus faecalis*, estas bacterias presentan propiedades probióticas incluso mejores que los probióticos de referencia *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* Shirota, por lo que podría evaluarse la posibilidad de incluirse en productos probióticos destinados al consumo humano.

Las bacterias aisladas tienen la capacidad de suprimir el crecimiento de las cepas de *Helicobacter pylori* evaluadas, e inhibir la actividad de la ureasa, lo que podría reducir la posibilidad de supervivencia en las condiciones ácidas del estómago, generando un efecto favorable en el sistema inmune al modular su actividad y patogenicidad. Sin embargo, se necesitan más pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para verificar la actividad de estas frente a *H. pylori*, así como los posibles efectos benéficos a la salud del huésped.

8. REFERENCIAS

- Abadi, A. T. B. (2014). Helicobacter pylori: a beneficial gastric pathogen? *Frontiers in Medicine*, 1(26), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00026>
- Alvarado-Esquivel, C. (2013). Seroepidemiology of Helicobacter pylori Infection in Tepehuanos Aged 15 Years and Older in Durango, Mexico . *Journal of Pathogens*, 2013(January 2010), 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/243246>
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>
- Amieva, M., & Peek, R. M. (2016). Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*, 150(1), 64–78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.004>
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Ashraf, R., Vasiljevic, T., Day, S. L., Smith, S. C., & Donkor, O. N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.006>
- Ashraf, Rabia, & Shah, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.619671>
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media* (4th ed.).

<https://doi.org/https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>

- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid bacteria: classification and physiology* (Third). Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=P0p5_uXL9uQC&lpg=PP1&hl=es&pg=PA4#v=onepage&q&f=false
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. (S. Salmien, Ed.). New York: Marcel Dekker.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., ... Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>
- Barua, S., Yamashino, T., Hasegawa, T., Yokoyama, K., Torii, K., & Ohta, M. (2002). Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 43(3), 629–640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02768.x>
- Bäuerl, C., Coll Marqués, J. M., Monedero, V., Zúñiga, M., Hörmannspenger, G., Haller, D., & Pérez Martínez, G. (2013). La proteinasa de pared celular de *Lactobacilos* es un factor de supervivencia con actividad antiinflamatoria. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 13–21.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>
- Benavides-Plascencia, L., Aldama-Ojeda, A. L., & Vázquez, H. J. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 47(3), 219–226.
- Bengoa, Ana A., Llamas, M. G., Iraporda, C., Dueñas, M. T., Abraham, A. G., & Garrote, G. L. (2018). Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from

- kefir grains. *Food Microbiology*, 69, 212–218.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.012>
- Bengoa, Ana Agustina, Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., Serradell, M. de los Á., ... Abraham, A. G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, 103(September 2017), 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.093>
- Bhaswati, R. Das. (2015). Anti-Inflammatory and Regenerative Potential of Probiotics to Combat Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2155-952x.1000181>
- Booth, I. A. N. R. (2003). *Microbiol Rev 1985 Booth*. 49(4), 20. Retrieved from <papers3://publication/uuid/943ECA5D-AFC3-41FF-A7F0-2658B2C80BB1>
- Bosch, M., Fuentes, M. C., Audivert, S., Bonachera, M. A., Peiró, S., & Cuñé, J. (2014). *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: Probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 803–809. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6467>
- Bustos, A Y, Faddas, S., Font de Valdez, G., Raya, R., & Taranto, M. P. (2017). Mecanismos involucrados en la resistencia a bilis en *Lactobacillus reuteri*, una bacteria probiótica. *Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica Para La Competitividad Territorial*, (6), 5–20.
- Bustos, Ana Yanina, Saavedra, L., de Valdez, G. F., Raya, R. R., & Taranto, M. P. (2012). Relationship between bile salt hydrolase activity, changes in the internal pH and tolerance to bile acids in lactic acid bacteria. *Biotechnology Letters*, 34(8), 1511–1518. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0932-5>
- Caggia, C., De Angelis, M., Pitino, I., Pino, A., & Randazzo, C. L. (2015). Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiology*, 50, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.010>

- Calasso, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus spp.: Other Species. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00265-X>
- Casado Muñoz, M. del C., Benomar, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Lavilla Lerma, L., Knapp, C. W., ... Abriouel, H. (2016). Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic Lactobacillus pentosus MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.012>
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Kusters, J. G. (2003a). Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17(3), 429–435. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01452.x>
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Kusters, J. G. (2003b). Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17(3), 429–435. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01452.x>
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-pulido, R., Martínez-bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional , safety , and probiotic properties of Enterococcus faecalis UGRA10 , a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, 30(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., & Loir, Y. Le. (2009). International Journal of Food Microbiology Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria : An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.032>
- Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H.-P., Zhang, H., & Chen, W. (2010). In vitro screening of lactobacilli with antagonistic activity against Helicobacter pylori

- from traditionally fermented foods. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5627–5634.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3449>
- Chen, Y., & Blaser, M. J. (2007). Inverse Associations of *Helicobacter pylori* With Asthma and Allergy. *Arch Intern Med*, 167(8), 821–827.
<https://doi.org/doi:10.1001/archinte.167.8.821>
- CLSI. (2015). (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ed. by Wayne, P.A.24th informational supplement. CLSI M100-S24,35(3):168-170.*
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.003>
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H., & Dicks, L. M. T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 433–444.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.021>
- de Moreno de LeBlanc, A., Levit, R., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. (2018). Vitamin Producing Lactic Acid Bacteria as Complementary Treatments for Intestinal Inflammation. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 17(1), 50–56. <https://doi.org/10.2174/1871523017666180502170659>
- de Roock, S. (2012). *Immune regulation in gut and cord opportunities for directing the immune system.*
- De Vrese, M., Kristen, H., Rautenberg, P., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2011). Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 396–403.
<https://doi.org/10.1017/S002202991100063X>

- Deghorain, M., Goffin, P., Fontaine, L., Mainardi, J., Daniel, R., Errington, J., ... Hols, P. (2007). *Selectivity for D -Lactate Incorporation into the Peptidoglycan Precursors of Lactobacillus plantarum: Role of Aad* ,. 189(11), 4332–4337. <https://doi.org/10.1128/JB.01829-06>
- Demir, M., Gokturk, H. S., Ozturk, N. A., Kulaksizoglu, M., Serin, E., & Yilmaz, U. (2008). Helicobacter pylori prevalence in diabetes mellitus patients with dyspeptic symptoms and its relationship to glycemic control and late complications. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(10), 2646–2649. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0185-7>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Díaz, J. U., Regino, W. O., & Zuleta, M. G. (2014). *A Review of Helicobacter Pylori and Colon Cancer*. 250–255.
- Donkor, O. N., Ravikumar, M., Proudfoot, O., Day, S. L., Apostolopoulos, V., Paukovics, G., ... Gill, H. (2012). Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. *Clinical and Experimental Immunology*, 167(2), 282–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04496.x>
- Du, Y. Q., Su, T., Fan, J. G., Lu, Y. X., Zheng, P., Li, X. H., ... Li, Z. S. (2012). Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for Helicobacter pylori infection. *World Journal of Gastroenterology*, 18(43), 6302–6307. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i43.6302>
- Duary, R. K., Bhusaheb, M. A., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic Lactobacillus plantarum Lp91 in colitis mouse model. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4765–4775. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1269-1>
- Elisha, B. G., & Courvalin, P. (1995). *Analysis of genes encoding D-alanine : D-alanine ligase-related enzymes in Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus spp* .

152, 79–83.

- Emara, M. H., Elhawari, S. A., Yousef, S., Radwan, M. I., & Abdel-Aziz, H. R. (2016). Emerging Role of Probiotics in the Management of Helicobacter Pylori Infection: Histopathologic Perspectives. *Helicobacter*, 21(1), 3–10. <https://doi.org/10.1111/hel.12237>
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Evanovich, E., Jeanne, P., Mendonça, D. S., & Guerreiro, J. F. (2019). *Comparative Genomic Analysis of Lactobacillus plantarum : An Overview*. 2019.
- Famularo, G., Simone, C. De, Matteuzzi, D., & Pirovano, F. (1999). *Traditional and High Potency Probiotic Preparations for Oral Bacteriotherapy*. 12(6), 455–470.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. In *Report of a Joint FAO/WHO Working Group* (Vol. 21, pp. 1–11). London Ontario, Canada.
- FAO, & WHO. (2006). Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutritional Paper*, pp. 278–283. <https://doi.org/10.1109/ISI.2013.6578843>
- Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015>
- Giles-Gómez, M., Sandoval García, J. G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- Goderska, K., Agudo Pena, S., & Alarcon, T. (2018). Helicobacter pylori treatment: antibiotics or probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8535-7>
- Goldberg, I. (2012). *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. <https://doi.org/10.1360/zd-2013-43-6-1064>
- González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas De Probióticos. *Revista Salud Publica y Nutricion*, 4(2), 8. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2008/rmq084c.pdf>
- Graham, D. Y. (2015). Helicobacter pylori update: Gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*, 148(4), 719-731.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.040>
- Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Guyot, J., & Cocolin, L. (2017). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. 62, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.016>
- Guchte, M. Van De, Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., & Stanislav, D. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. 187–216.

- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.03.006>
- Gutiérrez, S., Martínez-Blanco, H., Rodríguez-Aparicio, L. B., & Ferrero, M. A. (2016). Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2654–2665. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10439>
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* (3rd ed.). San Diego, California, USA: Gulf Professional Publishing.
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340–346.
- Hirshfield, I. N., Terzulli, S., & O'Byrne, C. (2003). Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, 86(Pt 4), 245–269. <https://doi.org/10.3184/003685003783238626>
- Holzapel, W. H., & Stiles, M. E. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.
- Isakow, W., Morrow, L. E., & Kollef, M. H. (2007). Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: Review of current evidence and recommendations. *Chest*, 132(1), 286–294. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2156>
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., & Møller, P. L. (2015). *Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans* Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus. 65(August), 4949–4956.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010).

- Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.009>
- Jo, Y., Park, E., Ahn, S. B., Jo, Y. K., Son, B., Kim, S. H., ... Kim, H. J. (2015). A proton pump inhibitor's effect on bone metabolism mediated by osteoclast action in old age: A prospective randomized study. *Gut and Liver*, 9(5), 607–614. <https://doi.org/10.5009/gnl14135>
- Kao, C. Y., Sheu, B. S., & Wu, J. J. (2016). Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>
- Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Microbiological Research*, 165(8), 674–686. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>
- Kayaoglu, G. (2004). VIRULENCE FACTORS OF ENTEROCOCCUS FAECALIS : RELATIONSHIP TO ENDODONTIC DISEASE. 15(5), 308–320.
- Lázara ayala, R., Bocourt, R., Castro, M., Martínez, M., & Herrera, M. (2015). Efecto del aditivo probiótico de Bacillus subtilis y sus endosporas en la producción láctea y la respuesta inmune de cerdas lactantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 49(1), 71–74. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/1930/193036208012/index.html>
- Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. K., Heo, H. J., Kim, H. J., Ham, K. S., & Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.029>
- Lee, N. K., Lee, E. K., & Paik, H. D. (2013). Potential probiotic properties of phytase-producing Lactobacillus salivarius FC113. *Annals of Microbiology*, 63(2), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0503-y>

- Ley, R. E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(1), 5–11. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328333d751>
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., & Tsen, H. Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3–4), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.04.006>
- Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., ... Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. 202(2), 209–215. <https://doi.org/10.1084/jem.20050846>
- Macin, S., Demir, H., Özen, H., Yüce, A., & Akyön, Y. (2015). Determination of helicobacter pylori antibiotic resistance patterns in pediatric gastroenterology patients: The hacettepe experience. *Turkish Journal of Pediatrics*, 57(3), 254–257.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., ... De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157(3), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.09.002>
- Manzano, C. A., Estupiñán, D. G., & Poveda, E. E. (2012). Qué Dice La Evidencia Clinical Effects of Probiotics : What Does the Evidence Says. *Revista Chilena de Nutrición*, 39, 98–110.
- Margolles, A., García, L., Sánchez, B., Gueimonde, M., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2003). Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate - A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00261-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00261-1)
- Martínez, M., David, J., Henao, R., Consuelo, S., Lizarazo, R., & Iván, J. (2014). *Resistencia antibiótica del Helicobacter pylori en América Latina y el Caribe Antibiotic Resistance of Helicobacter pylori in Latin America and the*
- Martínez, V., Alvarado, G., Borrás, M., Montalvo, C., Soriano, E., & Galindo, S. I.

- (2013). Análisis de tepache producido en el municipio de Puebla para la identificación y aislamiento de microorganismos de interés biotecnológico en la industria alimentaria. In R. M. & V. Aguilera (Eds.), *Ciencias Naturales y Exactas, Handbook* (pp. 24–26).
- Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009>
- Mendoza-Elizalde, S. (2010). *Diversidad genotípica de Helicobacter pylori en pacientes pediátricos*. Instituto Politécnico Nacional.
- Million, M., & Raoult, D. (2013). Species and strain specificity of *Lactobacillus* probiotics effect on weight regulation. *Microbial Pathogenesis*, 55(1), 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.09.013>
- Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., Mckinnell, J., & Bayer, A. S. (2016). *Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts Staphylococcus aureus Susceptibility to Host Defense Peptides*. 55(2), 526–531. <https://doi.org/10.1128/AAC.00680-10>
- Miwa, T., Esaki, H., Umemori, J., & Hino, T. (1997). Activity of H⁺-ATpase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2155–2158.
- Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001). *Bile Salt Hydrolase Activity and Resistance to Toxicity of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties in Lactobacilli*. 67(8), 3476–3480. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3476>
- Moss, S. F. (2017). The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cmgh*, 3(2), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.001>
- Pajares García, J. M., Pajares-Villarroya, R., & Gisbert, J. P. (2007). *Helicobacter pylori*: Resistencia a los antibióticos. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 99(2), 63–70.
- Pan, M., Wan, C., Xie, Q., Huang, R., Tao, X., Shah, N. P., & Wei, H. (2015). Changes

- in gastric microbiota induced by *Helicobacter pylori* infection and preventive effects of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 against such infection. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 970–981. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10510>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E. E., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. G. (2018). Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. *Food Microbiology*, 74, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- Papastergiou, V., Georgopoulos, S. D., & Karatapanis, S. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Meeting the challenge of antimicrobial resistance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(29), 9898–9911. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9898>
- Parra-Huertas. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 93–105.
- Pérez Montoro, B., Benomar, N., Caballero Gómez, N., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., ... Abriouel, H. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. *Food Microbiology*, 72, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.006>
- Pieniz, S., Andreatza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37(1), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>
- Porras, C., Nodora, J., Sexton, R., Ferreccio, C., Jimenez, S., Dominguez, R. L., ... Herrero, R. (2017). Public Access NIH Public Access. *PLoS ONE*, 32(7), 736–740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Reverón, I., Jiménez, N., Curiel, J. ntonio, Peñas, E., López de Felipe, F., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2017). Differential gene expression by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in response to phenolic compounds reveals new gwnwa involved in tannin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), 1–11.

- Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000). Helicobacter pylori: Factores de virulencia , patología y diag-. *Biomed*, 11(3), 187–205. Retrieved from <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb001136.pdf>
- Rocha-Ramírez, L. M., Pérez-Solano, R. A., Castañón-Alonso, S. L., Moreno Guerrero, S. S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., & Eslava, C. (2017). Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4607491>
- Rodríguez-Carvajal, M. A., Ignacio Sánchez, J., Campelo, A. B., Martínez, B., Rodríguez, A., & Gil-Serrano, A. M. (2008). Structure of the high-molecular weight exopolysaccharide isolated from Lactobacillus pentosus LPS26. *Carbohydrate Research*, 343(18), 3066–3070. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.08.028>
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-koski, M., Arnikunnas, J., & Palva, A. (2003). Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis. 83, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00315-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00315-X)
- Sachs, G., Scott, D. R., & Wen, Y. (2011). Gastric infection by Helicobacter pylori. *Current Gastroenterology Reports*, 13(6), 540–546. <https://doi.org/10.1007/s11894-011-0226-4>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sánchez, B. (2018). Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis: A role for bifidobacteria and lactobacilli? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(4), 205. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2018.23>
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S58–S61. <https://doi.org/10.1086/523341>
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., ... Arigoni,

- F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(22), 14422–14427. <https://doi.org/10.1073/pnas.212527599>
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., ... Mentis, A. (2004). In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(1), 518–526. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.518-526.2004>
- Sgouras, D. N., Trang, T. T. H., & Yamaoka, Y. (2015). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, *20*(1), 8–16. <https://doi.org/10.1111/hel.12335>
- Shankar, N., Baghdayan, A. S., & Gilmore, M. S. (2002). Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, *417*(6890), 746–750. <https://doi.org/10.1038/nature00802>
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., & Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, *61*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.03.001>
- Shin, C. M., Kim, N., Kim, Y. S., Nam, R. H., Park, J. H., Lee, D. H., ... Jung, H. C. (2016). Impact of Long-Term Proton Pump Inhibitor Therapy on Gut Microbiota in F344 Rats: Pilot Study. *Gut and Liver*, *10*(6), 896–901. <https://doi.org/10.5009/gnl15529>
- Sierra, F., Forero, J. D., & Rey, M. (2014). Ideal treatment for *Helicobacter pylori*: A systematic review. *Revista de Gastroenterología de México*, *79*(1), 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.03.003>
- Smolinska, S., Jutel, M., Cramer, R., & O'Mahony, L. (2014). Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *69*(3), 273–281. <https://doi.org/10.1111/all.12330>
- Soto Molina, H., Sandoval, A. E. C., Azamar Alonso, A., García, J. G. R., del Valle

- Laisequilla, C. F., & Azamar Alonso, A. (2016). Análisis coste-efectividad del triple esquema para erradicación de *Helicobacter pylori* como profilaxis al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico en México. *Pharmacoeconomics - Spanish Research Articles*, 13(1), 9–15. <https://doi.org/10.1007/s40277-015-0047-1>
- Tamang, J. P., Thapa, N., Tamang, B., Rai, A., & Chettri, R. (2015). Microorganisms in Fermented Foods and Beverages. In *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages* (pp. 1–110). <https://doi.org/10.1201/b18279-2>
- Thapa, N., & Tamang, J. P. (2015). Functionality and therapeutic values of fermented foods. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*, 111–168. <https://doi.org/10.1201/b18279>
- Thomas, D. W., & Greer, F. R. (2010). Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. *Pediatrics*, 126(6), 1217–1231. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2548>
- Tonello, A. (2012). Consumo de alimentos prebióticos y probióticos y resultados intrínsecos de su consumo en mujeres de 30 a 40 años que asisten a un gimnasio de la ciudad del Rosario (Universidad Abierta Interamericana Sede). Retrieved from <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC111885.pdf>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., ... Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Van de Velde, F. Van, Pirovani, M. E., & Drago, S. R. (2018). Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.05.007>
- Walsh, S. E., Maillard, J., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., &

- Bartolo, R. G. (2003). *Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility*. 6701, 98–107. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(03\)00240-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(03)00240-8)
- Westerik, N., Reid, G., Sybesma, W., & Kort, R. (2018). The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* for alleviation of helicobacter pylori-associated gastric pathology in East Africa. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01873>
- Wu, C.-C., Weng, W.-L., Lai, W.-L., Tsai, H.-P., Liu, W.-H., Lee, M.-H., & Tsai, Y.-C. (2015). Effect of *Lactobacillus plantarum* Strain K21 on High-Fat Diet-Fed Obese Mice . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/391767>
- Yang, J. C., Lu, C. W., & Lin, C. J. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5283–5293. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5283>
- Zhang, S., Oh, J. H., Alexander, L. M., özçam, M., & van Pijkeren, J. P. (2018). D-Alanyl-D-alanine ligase as a broad-host-range counterselection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 200(13). <https://doi.org/10.1128/JB.00607-17>
- Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., ... Yang, L. (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 167(1), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.02.006>
- Zhao, K., Qiao, Q., Chu, D., Gu, H., Dao, T. H., Zhang, J., & Bao, J. (2013). Bioresource Technology Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*, 135, 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.063>
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental*

Microbiology, 70(7), 3996–4003. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3996-4003.2004>

Zonenschain, D., Rebecchi, A., & Morelli, L. (2009). *Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages*. 107, 1559–1568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04338.x>

ANEXOS

I. Medio de urea

Disolver 0.6 g de agar bacteriológico en 85 mL de agua destilada, calentar a ebullición hasta su disolución completa, adicionar 5 mL de rojo de fenol 0.1%, mezclar perfectamente y ajustar al pH 6.0. Esterilizar el medio a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 45°C y agregar 10 mL de urea esterilizada por filtración. Verter 2 mL en viales.

II. Protocolo para la extracción de ADN bacteriano (Kit DNeasy Blood & Tissue)

1. Recolectar células (máximo 2×10^9 células) en un tubo de microcentrifuga centrifugando durante 10 minutos a 7500 rpm. Desechar el sobrenadante.
2. Resuspender el sedimento bacteriano en 180 μ l de tampón de lisis enzimática.
3. Incubar durante al menos 30 minutos a 37°C.
4. Agregar 25 μ l de proteinasa K y 200 μ l de Tampón AL (sin etanol). Mezclar por vórtice.
5. Incubar a 56°C durante 30 min.
6. Agregar 200 μ l de etanol (96–100%) a la muestra, y mezclar bien con vórtex.
7. Pipetear la mezcla (incluido cualquier precipitado) en la columna de centrifugado DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min. Desechar el tubo.
8. Colocar la columna de centrifugado DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, agregar 500 μ l de tampón AW1 y centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm. Desechar el tubo.
9. Colocar la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, agregar 500 μ l de Tampón AW2 y centrifugar durante 3 minutos a 14,000 rpm para secar la membrana DNeasy. Desechar el tubo.

10. Colocar la columna de centrifugado DNeasy Mini en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml o 2 ml, y pipetear 200 μ l de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm para eluir.

11. Repetir el paso 10 para un rendimiento máximo de ADN

III. Microorganismos aislados de las muestras de aguamiel, pulque y zarzamora

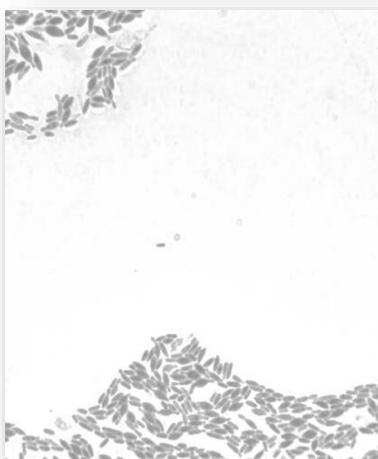
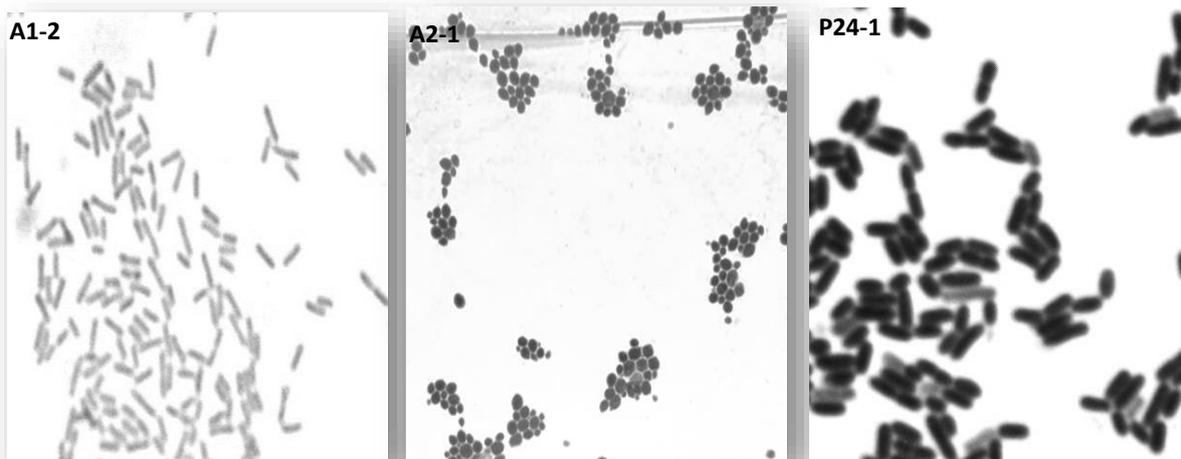
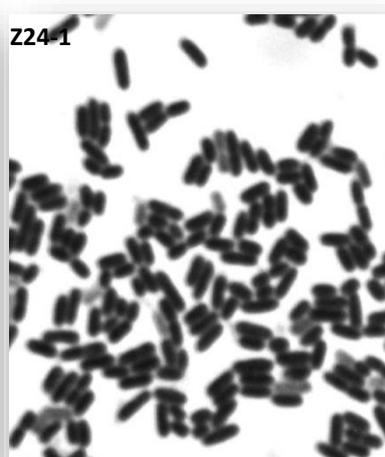
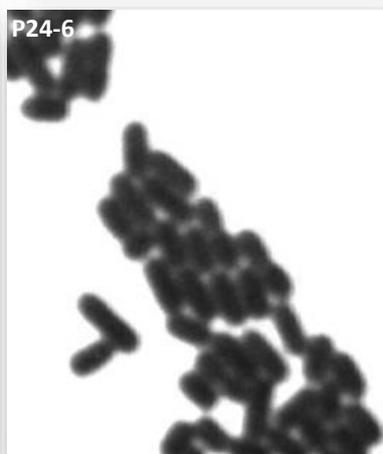
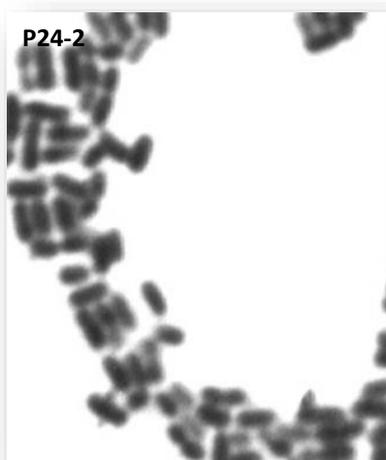


Ilustración 1. Levaduras aislados de zarzamora: a)A2-1, b) A1-1 y c) levaduras





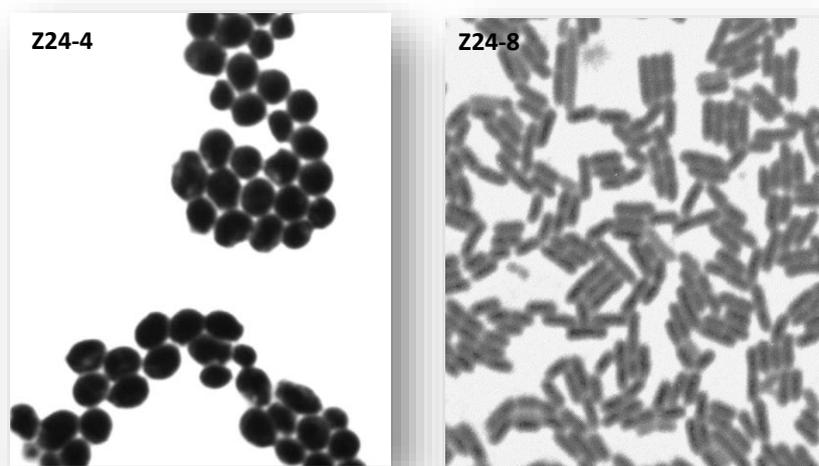


Ilustración 2. Microscopía de las bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel (A), pulque (P) y zarzamora (Z).

Article

In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens

Alicia Cervantes-Elizarrarás ¹, Nelly del Socorro Cruz-Cansino ¹, Esther Ramírez-Moreno ¹, Vicente Vega-Sánchez ², Norma Velázquez-Guadarrama ³ , Quinatzin Yadira Zafra-Rojas ¹ and Javier Piloni-Martini ^{2,*}

¹ Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Ex Hacienda La Concepción S/N, Carretera Pachuca-Actopan, San Agustín Tlaxiaca 42160, Hidalgo, Mexico; alicia_cervantes@uaeh.edu.mx (A.C.-E.); ncruz@uaeh.edu.mx (N.d.S.C.-C.); esther_ramirez@uaeh.edu.mx (E.R.-M.); zafhry@hotmail.com (Q.Y.Z.-R.)

² Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad Km 1, Rancho Universitario, Tulancingo 43600, Hidalgo, Mexico; vicente_vega11156@uaeh.edu.mx

³ Laboratorio de Infectología, Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Col. Doctores, Delegación: Cuauhtémoc, Ciudad de México 06720, Mexico; normave@himfg.edu.mx

* Correspondence: chipiloni@hotmail.com; Tel.: +52-1-55-2432-2089

Received: 18 January 2019; Accepted: 8 February 2019; Published: 12 February 2019



Abstract: Probiotics can act as a natural barrier against several pathogens, such *Helicobacter pylori*, a bacterium linked to stomach cancer. The aim of the present study was to isolate and identify lactic acid bacteria (LAB) from pulque and aguamiel, and evaluate their probiotic potential and antimicrobial effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Helicobacter pylori*. Ten isolates were selected and evaluated for in vitro resistance to antibiotics and gastrointestinal conditions, and antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* and the effect on *H. pylori* strains. 16S rRNA identification was performed. Ten potential probiotic isolates were confirmed as belonging to the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*. All the strains were susceptible to clinical antibiotics, except to vancomycin. Sixty percent of the isolates exhibited antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*. The growth of *H. pylori* ATCC 43504 was suppressed by all the LAB, and the urease activity from all the *H. pylori* strains was inhibited, which may decrease its chances for survival in the stomach. The results suggest that LAB isolated from pulque and aguamiel could be an option to establish a harmless relationship between the host and *H. pylori*, helping in their eradication therapy.

Keywords: antimicrobial activity; gastrointestinal conditions; *Helicobacter pylori*; *Lactobacillus*; *Pediococcus*; urease

1. Introduction

Pulque is a viscous, non-distilled alcoholic beverage produced and consumed in Mexico, obtained by the fermentation of maguey sap (aguamiel) from the species *Agave atrovensis* and *A. americana*. Typically, fermentation occurs under non-aseptic conditions, which promotes the presence of a great variety of microorganisms including those naturally present in the aguamiel and those incorporated during collection, transport, inoculation, and manipulation [1,2]. Several studies describe the presence of *Saccharomyces cerevisiae*, species of *Kluyveromyces*, *Zymomonas*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* [1,3,4]. These microorganisms in fermented products are associated with human health benefits and probiotic potential. Research suggests that probiotics improve immune modulatory properties and lactose tolerance, decrease serum cholesterol, and increase utilization of nutrients [5–7]. Furthermore,