



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**

TESIS DOCTORAL

Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas de
Enterococcus lactis y *Lacticaseibacillus paracasei* con
prebióticos contra *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter
pylori*

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
Y SALUD HUMANA**

PRESENTA

M. en C. Brenda Esmeralda Jiménez Villeda

DIRECTOR

Dr. Javier Castro Rosas

CO-DIRECTORA

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. México, Enero 2024.

OFICIO DE IMPRESIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
Área Académica de Nutrición

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., 22 de enero 2024
ICSa-DCASH-enero 2024
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la M. en C. Brenda Esmeralda Jiménez Villeda con número de cuenta 196877, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana ha terminado el trabajo de tesis titulado "Evaluación de la actividad antimicrobiana de cepas de *Enterococcus lactis* y *Lactocaseibacillus paracasei* con prebióticos contra *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento en extenso propuesto por la estudiante después de haber sido revisado, analizado y evaluado de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 73, VI del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Lo anterior, en función de que, la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 19 de enero 2024.

Por tal motivo, solicitamos 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 Castro Rosas
Director de tesis

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés
Codirectora

Dra. Eva María Santos López
Asesora

Dra. Raquel Cariño Cortés
Asesora

ATENTAMENTE

Pachuca, Hidalgo, 22 de enero de 2024

"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Enrique Espinosa Aquino,
Director del Instituto de Ciencias de la Salud,
Dean



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

TRH/COIN



CALLE DE LA UNIVERSIDAD 100, PACHUCA, HGO.
CALLE DE LA UNIVERSIDAD 100, PACHUCA, HGO.
CALLE DE LA UNIVERSIDAD 100, PACHUCA, HGO.
CALLE DE LA UNIVERSIDAD 100, PACHUCA, HGO.
CALLE DE LA UNIVERSIDAD 100, PACHUCA, HGO.

www.usah.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este proyecto:

A mi director y co-directora de tesis, Dr. Javier Castro Rosas y Dra. Nallely Falfán Cortés, por su orientación experta, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso académico. Sus conocimientos y consejos han sido invaluable para mi formación académica.

Agradezco sinceramente a mis asesoras Dra. Eva María Santos López y Dra. Raquel Cariño Cortés, quienes brindaron valiosas sugerencias y comentarios constructivos que mejoraron la calidad de mi trabajo y de mi persona.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi compañero de vida Erik. Gracias por siempre estar cuando más necesito de ti. Gracias por tu infinito amor y paciencia. Te amo

Keny y Zuly gracias por ser mi motor más grande de vida. Gracias por compartir de su tiempo para la realización de este proyecto.

Quiero expresar mi reconocimiento a mis compañeros y amigos del laboratorio de microbiología de alimentos y fisicoquímica de alimentos I: Astrid, Etna, Rubén, Edna, Ari y Miguel porque más allá de un laboratorio se convirtió en mi segundo hogar. Con su compañía todo se tornó más ameno.

A mis papás, agradezco su amor incondicional y respaldo constante. Su apoyo emocional y comprensión han sido pilares clave durante este viaje académico.

Gracias Doña Lulú por el apoyo incondicional, por todas las palabras de aliento. Por ser mi red de apoyo más grande.

A ti Mami porque siempre estas pendiente de nosotros y dispuesta a apoyar. Te quiero mucho mi segunda mamá.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a este proyecto y a mi crecimiento académico. Este logro no habría sido posible sin su colaboración y apoyo.

Gracias a todos por ser parte integral de este importante capítulo académico en mi vida.

Mi gratitud se extiende al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt), por la beca otorgada.

DEDICATORIAS

A mis amadas hijas Keny y Zuly, y a mi amado esposo Erik,

Dedico con todo mi corazón este logro a ustedes. Cada página de esta tesis lleva impreso no solo mi esfuerzo, sino también el amor y la inspiración que ustedes han infundido en cada paso de esta travesía académica. Agradezco profundamente el privilegio de compartir mi vida y este logro con ustedes mi familia, mi pilar fundamental. Que este logro sea también un testimonio del amor, crecimiento, y el trabajo en equipo de nuestra familia.

Con profundo amor

Brenda

A mis amados padres Carmen y Fermín

Dedico con todo mi corazón este logro a ustedes porque creyeron en mí incluso cuando dudaba de mí misma, por ser mi guía en los momentos difíciles y por celebrar cada logro, grande o pequeño. Este trabajo no solo es mío, sino también de ustedes, quienes me han guiado con amor y paciencia.

Con profundo amor y respeto

Brenda

A mí querida suegra Lulú

Quiero que sepa que su constante aliento, sabiduría y generosidad han sido una fuente inagotable de inspiración. Su amor y apoyo han contribuido significativamente a mi éxito, y esta tesis es un testimonio de la influencia positiva que ha tenido en mi vida. Agradezco sinceramente su presencia y contribución a mi crecimiento personal y académico.

Con cariño y reconocimiento

Brenda

ÍNDICE

RESUMEN	11
1. ANTECEDENTES	12
1.1 Incidencia de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Helicobacter pylori</i> en humanos....	12
1.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	13
1.1.2 <i>Helicobacter pylori</i>	14
1.2 Tratamientos para combatir <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	16
1.2.1 Tratamientos farmacológicos para combatir <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	16
1.2.2 Tratamiento coadyuvante con probióticos contra <i>C. jejuni</i>	18
1.2.3 Tratamiento coadyuvante con probióticos contra <i>H. pylori</i>	19
1.3 Probióticos	20
1.3.1 Selección de probióticos	21
1.3.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	23
1.4 Efectos benéficos en la salud del huésped tras la administración de probióticos	24
1.4.1 Metabolitos producidos por bacterias probióticas con efectos benéficos a la salud	26
1.5 Estimulación del sistema inmune por probióticos	27
1.5.1 Mecanismos inducidos por los probióticos para estimular el sistema inmunológico.....	27
1.6 Prebióticos	30
1.6.1 Metabolismo de prebióticos	31
1.6.2 Algunos de los prebióticos más comunes	32
1.6.2.1 Fructooligosacaridos (FOS).....	32
1.6.2.2 Inulina.....	33
1.6.2.3 Galactooligosacáridos	33
1.7 Efecto sinérgico de prebióticos y probióticos como inhibidores de <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	34
1.8 Microencapsulación de probióticos	36
1.8.1 Microencapsulación de simbióticos.....	37
1.8.2 Técnicas de encapsulamiento	38
1.8.2.1 Secado por aspersion.....	38
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	42

4.1	Objetivo general	42
4.2	Objetivos específicos	42
5.	METODOLOGÍA.....	43
5.1	Material biológico	45
5.2	Identificación molecular de las cepas de BAL T33, T38 y T39	45
5.3	Crecimiento de las 4 cepas de BAL en medio de cultivo con prebióticos	45
5.4	Resistencia de <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i> a antibióticos de uso común	46
5.5	Efecto inhibitorio de BAL con y sin prebióticos contra <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	47
5.6	Efecto sinérgico de las mezclas de cepas BAL con y sin prebiótico contra <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	48
5.7	Efecto inhibitorio de la combinación de BAL con antibióticos contra <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	48
5.8	Detección de la presencia de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos en los cultivos de las BAL	49
5.9	Propiedades de adherencia <i>in vitro</i> de las BAL.....	50
5.9.1	Autoagregación de cepas de BAL <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	50
5.9.2	Coagregación de BAL con <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	51
5.9.3	Hidrofobicidad de la superficie celular de BAL con <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	51
5.10	Efecto inhibitorio de BAL sobre la actividad de la ureasa producida por <i>H. pylori</i>	52
5.11	Microencapsulación de <i>L. paracasei</i> T40 y <i>E. lactis</i> cepas T33, T38 y T39	53
5.11.1	Secado por aspersion.....	53
5.11.2	Eficiencia de encapsulación de <i>L. paracasei</i> T40 y <i>E. lactis</i> cepas T33, T38 y T39	53
5.11.3	Morfología de las microcápsulas.....	54
5.11.4	Contenido de humedad.	54
5.11.5	Actividad de agua.	55
5.11.6	Resistencia de BAL encapsuladas a pH similar al estomago.....	55
5.11.7	Resistencia a sales biliares.....	55
5.11.8	Viabilidad de BAL microencapsuladas con y sin prebióticos en condiciones controladas de temperatura y humedad	56
5.12	Evaluación <i>in vivo</i> el efecto inhibitorio de <i>E. lactis</i> cepas T33, T38 y T39 en mezcla, con y sin prebióticos encapsuladas contra <i>C. jejuni</i>	58
5.12.1	Declaración de ética.	58
5.12.2	Animales.....	58

5.12.3	Grupos experimentales.....	58
5.12.4	Protocolo de estudio <i>in vivo</i>	59
5.12.5	Análisis inmunológicos	59
5.12.6	Análisis microbiológico	59
5.13	Análisis estadístico.....	60
6.	RESULTADOS.....	62
6.1	Identificación molecular de las cepas de BAL T33, T38 y T39	62
6.2	Crecimiento bacteriano de las BAL en medio con y sin prebiótico.....	64
6.3	Resistencia de <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i> a antibióticos de uso común	66
6.4	Actividad antimicrobiana de las cepas de BAL con prebiotico contra <i>C. jejuni</i>	70
6.5	Actividad antimicrobiana de las cepas BAL con prebiotico contra <i>H. pylori</i>	73
6.6	Efecto antimicrobiano de mezclas de BAL en medios con prebióticos	76
6.7	Sinergismo entre BAL y antibióticos contra <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	78
6.8	Detección de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos presentes en cultivos de BAL.....	81
6.9	Propiedades de adherencia de las bacterias probióticas.....	83
6.9.1	Autoagregación de las cepas de BAL y de patógenos <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	84
6.9.2	Coagregación de BAL con <i>C. jejuni</i> y <i>H. pylori</i>	86
6.9.3	<i>Hidrofobicidad de la superficie celular</i>	87
6.10	Efecto de las cepas de BAL sobre la actividad de la ureasa producida por <i>H. pylori</i>	89
6.11	Caracterización de los microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión	92
6.11.1	Eficiencia de encapsulación (%)	92
6.11.2	Actividad de agua (a_w) y contenido de humedad de los encapsulados.....	94
6.11.3	Caracterización morfológica de las microcápsulas (MEB).....	96
6.11.4	Tolerancia de las cepas BAL encapsuladas a pH ácido 2 y 3	100
6.11.5	Tolerancia de las cepas BAL encapsuladas a sales biliares	104
6.11.6	Viabilidad de las BAL microcápsulas con y sin prebióticos durante el almacenamiento.....	107
6.11.7	Morfología de microcápsulas de cepas BAL con y sin prebióticos después del almacenamiento.....	114

6.12	Evaluación <i>in vivo</i> el efecto inhibitorio de <i>E. lactis</i> cepas T33, T38 y T39 en mezcla, con y sin prebióticos encapsuladas contra <i>C. jejuni</i>	120
6.12.1	Distribucion de ratones por grupo y condiciones de experimentación.....	120
6.12.2	Adherencia de BAL en intestinos de ratón BALB/c	122
6.12.3	Adherencia de <i>C. jejuni</i> en intestinos de ratón BALB/c	125
6.12.4	Translocación de <i>C. jejuni</i> en hígado y bazo de ratón BALB/c.....	127
7.	CONCLUSIONES.....	131
8.	Referencias	132
9.	ANEXOS	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la ureasa (Cervantes-García, 2016).	15
Figura 2. Enfoques de selección utilizados para la caracterización de las cepas de probióticos según la OMS/FAO y otros estudios de Divya et al. (2012); Fiorda et al. (2016); Luna & Foster (2015); Maragkoudakis et al. (2006) y Yang & Chang (2010).	22
Figura 3. Mecanismos inmunomoduladores ejercidos por las bacterias probióticas en la mucosa intestinal (Maldonado et al., 2019)	28
Figura 4. Esquema general del secador por aspersion de laboratorio Buchi B 191 Labortechnik AG (Flawil, Suiza).	39
Figura 5. Descripción general de la metodología realizada. (HP: <i>H. pylori</i> , CJ: <i>C. jejuni</i> , Aw: Actividad de agua)	43
Figura 6. Dendograma de similitud de la secuencia consenso del fragmento 16S ribosomal de las cepas T33, T38 y T39 con un total de 1448 posiciones de nucleótidos por medio del algoritmo de Neighbor-Joining (3-Tamura) y valores de Bootstrap con 1000 repeticiones	63
Figura 7. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de las cepas BAL T33, T38, T39 y T40 después de crecer a 37 °C durante 48 h en caldo MRS con diferentes concentraciones de fructooligosacaridos (FOS).	64
Figura 8. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de las cepas BAL T33, T38, T39 y T40 después de crecer a 37 °C durante 48 h en caldo MRS con diferentes concentraciones de inulina.....	65
Figura 9. Metabolismo de FOS en <i>L. paracasei</i> . (Tomado y modificado de Cui & Qu, 2021).....	72
Figura 10. Efecto inhibitorio de cepas BAL sobre la actividad de la ureasa producida por <i>H. pylori</i> a pH 2-5.	91
Figura 11. Microfotografías (1000x) de las microcápsulas de cepas BAL con y sin prebiótico:f(a) <i>E. lactis</i> cepa T33 sin prebiótico; (b) <i>E. lactis</i> cepa T33 con 0.6% de	

inulina; (c) *E. lactis cepa* T38 sin prebiótico; (d) *E. lactis cepa* T38 con 0.6% de inulina; (e) *E. lactis cepa* T38 con 0.6% de FOS (continuación Figura12). 98

Figura 12. Microfotografías (1000x) de las microcápsulas de cepas BAL con y sin prebiótico: (f) *E. lactis cepa* T39 sin prebiótico; (g) *E. lactis cepa* T39 con 0.6% de inulina y FOS; (h) *L. paracasei cepa* T40 sin prebiótico; (i) *L. paracasei cepa* T40 con 0.6% de FOS..... 99

Figura 13. Sobrevivencia de BAL encapsuladas con y sin prebióticos a pH 2 a tiempo 0, 1.5 y 3 h 102

Figura 14. Sobrevivencia de BAL encapsuladas con y sin prebióticos a pH 3 a tiempo 0, 1.5 y 3 h 103

Figura 15. Viabilidad de BAL libres, encapsuladas, encapsuladas con y sin prebióticos a sales biliares al 0.3% a tiempo 0, 1.5 y 3 h 105

Figura 16. Sobrevivencia de T33 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y C, aw = 0.32. 108

Figura 17. Sobrevivencia de T38 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y C, aw = 0.32. 109

Figura 18. Sobrevivencia de T39 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y C, aw = 0.32. 111

Figura 19. Sobrevivencia de T40 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y C, aw = 0.32. 112

Figura 20. Micrografías de microcápsulas de T38 con inulina y FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 (T 0) y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 7 °C..... 116

Figura 21. Micrografías de microcápsulas de T38 con inulina y FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 (T0) y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 30 °C.....	117
Figura 22. Micrografías de microcápsulas de T40 con FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 7 °C y 30 °C.....	118
Figura 23. Distribución de ratones BALB/c en jaulas.....	120
Figura 24. Elementos de recreación incluidos en jaulas de ratones	121
Figura 25. Administación intragástrica de los diferentes tratamientos	122
Figura 26. Adherencia de BAL en intestinos de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de BAL gastrointestinales mediante cultivo después del sacrificio (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o <i>C. jejuni</i> ; Positivo: <i>C. jejuni</i> (10 ⁸ UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i> ; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i> ; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i>	124
Figura 27. Adherencia de <i>C. jejuni</i> en intestinos de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de <i>C. jejuni</i> gastrointestinales mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o <i>C. jejuni</i> ; Positivo: <i>C. jejuni</i> (10 ⁸ UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i> ; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i> ; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de <i>C. jejuni</i>	126
Figura 28. Translocación de <i>C. jejuni</i> en hígado de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de <i>C. jejuni</i> en bazo mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de	

unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni* 128

Figura 29. Translocación de *C. jejuni* en bazo de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de *C. jejuni* en bazo mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni* 129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de BAL y bifidobacterias comunmente empleadas como probióticas.	24
Tabla 2. Antibióticos empleados para la evaluación	47
Tabla 3. Antibióticos a los que las BAL mostraron resistencia	49
Tabla 4. Tratamientos experimentales.....	58
Tabla 5. Resistencia a antibióticos presentada por <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	67
Tabla 6. Efecto inhibitorio (mm) <i>in vitro</i> de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivados en caldo MRS con y sin inulina contra <i>C. jejuni</i>	71
Tabla 7. Efecto inhibitorio (mm) <i>in vitro</i> de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivados en caldo MRS con y sin fructooligosacaridos contra <i>C. jejuni</i>	71
Tabla 8. Efecto inhibitorio (mm) <i>in vitro</i> de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivadas en caldo MRS con y sin inulina contra <i>H. pylori</i>	74
Tabla 9. Efecto inhibitorio (mm) <i>in vitro</i> de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivadas en caldo MRS con y sin fructooligosacaridos contra <i>H. pylori</i>	75
Tabla 10. Halos de inhubición (mm) de cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 crecidas individualmente y en mezclas en caldo MRS con y sin inulina contra <i>H. pylori</i>	76
Tabla 11. Halos de inhibición (mm) de cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 crecidas individualmente y en mezclas en caldo MRS con y sin inulina contra <i>C. jejuni</i>	77
Tabla 12. Efecto inhibitorio de mezclas de BAL con antibióticos contra <i>C. jejuni</i> . 78	
Tabla 13. Efecto inhibitorio de mezclas de BAL con antibióticos contra <i>H. pylori</i> . 80	
Tabla 14. Compuestos antimicrobianos producidos por cepas BAL T33, T38 y T39 contra <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	82
Tabla 15. Porcentaje de autoagregación de BAL cepas T33, T38, T39, T40, <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	85
Tabla 16. Porcentaje de coagregación de cepas BAL T33, T38, T39 and T40 con <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	86

Tabla 17. Porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas BAL T33, T38, T39, T40, <i>H. pylori</i> y <i>C. jejuni</i>	88
Tabla 18. Eficiencia de encapsulación (% EE), contenido de humedad (%), actividad de agua, para los tratamientos de BAL con y sin prebióticos.	93

RESUMEN

En este trabajo se evaluó *in vitro* la capacidad inhibitoria de *Lactocaseibacillus paracasei* T40 y *Enterococcus lactis* cepas T33, T38 y T39 libres, en mezclas y encapsuladas y en combinación con inulina y fructooligosacáridos (FOS) contra *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* los mejores resultados fueron evaluados *in vivo*. El efecto inhibitorio de las BAL contra los patógenos de estudio se realizó mediante la técnica de difusión en pozos, el encapsulamiento de las BAL se realizó empleando un secador por aspersion. Las microcápsulas fueron caracterizadas mediante la determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación, morfología (MEB), actividad de agua y humedad (%). También, se evaluó la viabilidad de las BAL encapsuladas con y sin prebiótico a condiciones controladas de almacenamiento por 30 días. Por otro lado, se evaluó la resistencia de las BAL encapsuladas con y sin prebióticos a pH similar al del estómago (pH 2 y 3) y al 0.3% de sales biliares concentración similar hallada en el intestino humano. Finalmente, las BAL encapsuladas con y sin prebiótico que presentaron el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni*, y la mejor resistencia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (TGI) fueron administradas durante 21 días a ratones BALB/c, que posteriormente fueron infectados con una dosis única de *C. jejuni*. Las cuatro BAL presentaron efecto inhibitorio *in vitro* contra *C. jejuni* y *H. pylori*, con zonas de inhibición de 6.92 ± 0.20 mm a 20.67 ± 1.89 mm. Su efecto de vio potencializado en presencia de inulina o FOS como prebióticos. Por otro lado, al exponer las BAL microencapsuladas a pH 2 por 3h, la cepa T39 con inulina más FOS fue quien mantuvo la mayor sobrevivencia (8 Log UFC/g) y a pH 3 la cepa T38 con inulina fue quien presentó la mejor concentración (7 Log UFC/g). Lo mismo ocurrió cuando se expusieron estas dos cepas a sales biliares. Las tres cepas microencapsuladas de *E. lactis* con y sin prebiótico mantuvieron la viabilidad de sus células superior a 8 Log UFC/g después de 30 días de almacenamiento a 7 °C con $aw=0.32$ y $aw=0.75$ y a 30 °C con una $aw=0.32$. Las cepas de *E. lactis* T33 con inulina, T38 con inulina y T39 presentaron el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni* y resistieron las condiciones adversas de TGI *in vitro*. Por tanto, estas cepas microencapsuladas fueron administradas en ratones. Después del sacrificio se realizó el recuento de BAL y *C. jejuni*. Evidenciando la adherencia (~ 4 Log UFC/g) en los intestinos de los roedores de cada una de las cepas BAL administradas, lo que podría contrarrestar la infección causada por *C. jejuni*. Los roedores infectados con *C. jejuni* y previamente administrados con antibiótico (5 mg/K de oxitetraciclina) presentaron un recuento de ~ 4 Log UFC/g de este patógeno en intestinos. En contraste, los ratones infectados y administrados previamente con BAL no presentaron evidencia de *C. jejuni* en intestinos. Los resultados evidencian que la microencapsulación y los prebióticos protegen a las BAL cuando son expuestas a condiciones adversas del TGI en comparación con los tratamientos sin encapsular y sin prebiótico. Por otro lado, las cepas T33, T38, y T39 presentaron un alto potencial para ser empleadas con coadyuvante en el tratamiento contra *C. jejuni*. No obstante, es necesario realizar estudios en humanos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Incidencia de *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* en humanos

Campylobacter es una de las principales causas de la gastroenteritis bacteriana más frecuente en humanos. Los patógenos entéricos *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* representan alrededor del 90% de las infecciones por *Campylobacter* en humanos (Elhadidy et al., 2020). El aumento alarmante en la incidencia de la campilobacteriosis en América del Norte, Europa y Australia es preocupante. Los datos de Asia, África y Medio Oriente indican que la campilobacteriosis se ha vuelto endémica en estas áreas, especialmente en niños pequeños (Kaakoush et al., 2015). En el 2021 se reportaron 220,682 casos confirmados de campilobacteriosis humana (EFSA, 2021). No obstante, es probable que los casos reportados de infecciones causadas por *C. jejuni* y *C. coli*, represente solo una pequeña proporción debido a la falta de notificación; por tanto, el número de infecciones por *Campylobacter* muy probablemente está subestimado (Johnson et al., 2017; Wyszynska & Godlewska, 2021). En 2019 en la Unión Europea (UE). En los Estados Unidos la infección por *Campylobacter* ha sido la enfermedad gastrointestinal transmitida entre animales y seres humanos más reportada desde el 2005, implicando costos socioeconómicos asociados calculados en varios miles de millones de dólares al año ya que en promedio cuesta más de 2,000 dólares el tratamiento de un caso (Liberia et al., 2022; Maue et al., 2014). Los pacientes infectados con este patógeno presentan gastroenteritis de diversos grados que van desde malestar leve y diarrea acuosa hasta colitis ulcerosa grave con diarrea inflamatoria y sangre (Kist & Bereswill, 2001).

Por otra parte, actualmente se ha comprobado que infección causada por *Helicobacter pylori* es uno de los factores determinantes en la incidencia del cáncer gástrico (CG) (Abdi et al., 2019). El CG se considera uno de los cánceres más comunes y se encuentra relacionado con infecciones bacterianas, se sabe que más del 60 % de los casos de CG están relacionados con una infección de *H. pylori* (Parkin, 2006). El CG ocupa el tercer lugar entre la mortalidad relacionada con el

cáncer, lo que significa más de 700,000 muertes por año en todo el mundo (Bakhti et al., 2020).

La prevalencia de la infección causada por *H. pylori* se ha considerado como una de las infecciones más comunes tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados, con un estimado de 4,400 millones de casos notificados en 2015 (Almashhadany et al., 2023). La incidencia de este patógeno en Asia, América del Sur y en el sur y el este de Europa es del 50 %. En África el 100 % de los habitantes son portadores de *H. pylori*. Por otro lado, se ha reportado que solo un tercio de la población de América del Norte y Europa del Norte podría estar infectado (Ma & Wang, 2013).

La infección por *H. pylori* es un fenómeno de carácter mundial, la prevalencia de la infección por *H. pylori* oscila entre el 50 y el 92.0 % puede variar entre países y entre poblaciones dentro del mismo país; dicha prevalencia está relacionada de manera importante con condiciones socioeconómicas, el origen étnico y geográficas de las personas infectadas, la coevolución entre *H. pylori* y su huésped humano, la susceptibilidad del huésped y factores ambientales (Abdi et al., 2019; Khalil et al., 2015).

Debido a las patologías tan severas que pueden causar *C. jejuni* y *H. pylori* es importante conocer aspectos generales de estas bacterias, así como el mecanismo de acción que emplean para causar enfermedad en el humano.

1.1.1 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter es una bacteria Gram negativa, aerobia, microaerófila, móvil (Hernández-Cortez et al., 2013). La gastroenteritis causada por *C. jejuni* es el síndrome más común en los humanos, siendo el consumo de carne de ave contaminada la principal vía de infección (Balta et al., 2022; Hernández, 1990). La enfermedad puede complicarse en colitis ulcerativa aguda, artritis reactiva, artritis séptica y meningitis. Por otro lado, *C. jejuni* es uno de los agentes más importantes causantes de diarrea del viajero (Schrotz-King et al., 2007).

Los mecanismos que permiten a esta especie bacteriana colonizar a sus huéspedes y causar enfermedades aún no se conocen por completo. Sin embargo, se ha identificado que los flagelos, la composición de lipooligosacáridos y la cápsula son esenciales para la colonización, la invasión y la supervivencia dentro de los huéspedes (Balta et al., 2022). De forma general, *C. jejuni* ingresa al intestino del huésped y coloniza la capa mucosa que recubre el epitelio del íleon distal y el colon, (Ketley, 1997). Cuando coloniza intestinos, *C. jejuni* expresa varios factores de virulencia, como quimiotaxis y proteínas de choque térmico (Snelling et al., 2005; van Vliet & Ketley, 2001). *C. jejuni* penetra en la capa mucosa que cubre las células intestinales utilizando sus flagelos polares y su movimiento en forma de "sacacorchos" (Snelling et al., 2005). La adhesión y la invasión dependen tanto de la motilidad como de la expresión flagelar, ya que los mutantes de *C. jejuni* con motilidad disminuida debido a flagelos paralizados muestran una adhesión reducida o ninguna invasión, lo que indica que mientras los flagelos están involucrados en la adherencia, otras adhesinas están involucradas en la internalización (Kumar et al., 2016).

1.1.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, curva, espiriforme, móvil, no fermentadora y no oxidante mide de 2.5 a 4 μm de longitud por 0.5 a 1 μm de ancho, con un conjunto de flagelos (de 4 a 8) en uno de sus extremos. Además, esta bacteria es considerada como el primer carcinógeno bacteriano reconocido formalmente y es uno de los patógenos que infecta en mayor medida a los humanos, ya que más de la mitad de la población mundial está colonizada con esta bacteria Gram negativa. A menos que se trate, la colonización suele persistir toda la vida (Krzyzek & Gościński, 2018).

La infección por *H. pylori* se inicia con una gastritis crónica, que puede originar complicaciones como el desarrollo de úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico; estos dos últimos se desarrollan en una minoría en personas infectadas por la bacteria y predominan en hospederos adultos (Sgouras et al., 2015).

El hábitat natural de *H. pylori* se encuentra en el estómago, por debajo de la capa mucosa gástrica, donde el pH se aproxima a la neutralidad. El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que hidroliza la urea, presente en el estómago, en amonio y dióxido de carbono (Figura 1). El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 en su entorno y neutralizando el ácido clorhídrico del estómago, lo que ocasiona aclorhidria transitoria, con un pH gástrico neutro; propiciando un microambiente que le permite sobrevivir mientras se mueve para llegar al epitelio gástrico (Cervantes-García, 2016).

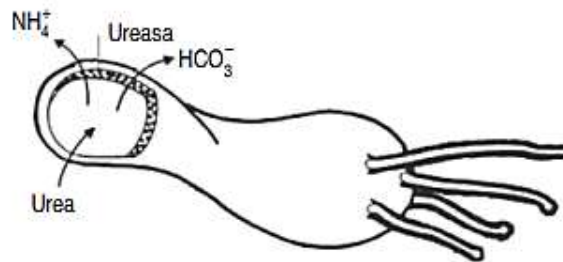


Figura 1. Mecanismo de acción de la ureasa (Cervantes-García, 2016).

Por otro lado, la ureasa y el amonio tienen una función importante en la respuesta inmune del hospedero debido a que el amonio actúa de manera quimiotáctica activando los monocitos y linfocitos polimorfonucleares e induciendo la liberación de citosinas, lo que ocasiona una respuesta inflamatoria que contribuye al daño del epitelio gástrico (Mobley, 1996).

Además, el amonio (NH_4^+) liberado produce una serie de daños que afectan la microcirculación a las células epiteliales superficiales y originan necrosis del tejido profundo. Así mismo, colabora en el desarrollo de la gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis (Bauerfeind et al., 1997).

La bioquímica de la enzima ureasa revela una extraordinaria eficacia hidroeléctrica que le permite actuar aún con las escasas concentraciones de urea que existe en el estómago. Además, en el año 2000, se describió una proteína que fue nombrada

ure1, miembro de las amidoporinas, que regula la transferencia de urea externa del epitelio gástrico, hacia el citoplasma de la bacteria, mediante canales o compuertas transportadoras específicas que atraviesan la membrana celular, de tal manera que cuando el medio externo es excesivamente ácido, los canales incrementan notablemente la entrada de urea al citoplasma bacteriano, aumentando la producción de amonio para neutralizar el periplasma; de esta manera disminuye la capacidad de la bacteria para llevar a pH neutro al propio periplasma (Hong et al., 2018).

1.2 Tratamientos para combatir *C. jejuni* y *H. pylori*

La infección causada por *C. jejuni* y *H. pylori* afecta hasta el 50% de la población a nivel mundial, y especialmente a países subdesarrollados, la preocupación creciente por erradicar estos microorganismo patógenos es prevalente ya que puede alcanzar una prevalencia hasta del 90% en la población adulta (Sierra et al., 2014). Se han establecido diversos tratamientos farmacológicos que permitan disminuir la incidencia de estos patógenos en humanos. En los apartados siguientes se describen parte de los tratamientos empleados.

1.2.1 Tratamientos farmacológicos para combatir *C. jejuni* y *H. pylori*

Las infecciones por *Campylobacter* requieren tratamiento con antibióticos. Los macrólidos (como la azitromicina y la eritromicina) son los fármacos de elección para el tratamiento clínico de *C. jejuni* (Wieczorek & Osek, 2013). Se han sugerido tetraciclinas y fluoroquinolonas (ciprofloxacina) como fármacos alternativos en el tratamiento de la campilobacteriosis clínica, y es posible que se requiera una inyección intravenosa de aminoglucósidos (gentamicina) en casos sistémicos más graves de campilobacteriosis (Alfredson & Korolik, 2007; Elhadidy et al., 2020).

En los últimos años, en todo el mundo se ha informado de un aumento en la resistencia de *Campylobacter* spp. a los antibióticos producida mediante mutaciones espontáneas y transferencia horizontal de genes a través de la transformación, transducción y conjugación naturales (Hlashwayo et al., 2020; Kumar et al., 2016). Los factores que contribuyen a este aumento podrían ser el uso

veterinario de antibióticos como profilaxis o para el tratamiento de enfermedades animales (Marshall & Levy, 2011).

La aparición de estas cepas resistentes en alimentos de origen animal es una importante amenaza para la salud pública (Elhadidy et al., 2020). En diversos estudios se ha revelado que los pacientes infectados con especies de *Campylobacter* resistentes a los antibióticos sufren una diarrea de mayor duración, en comparación con aquellos que están infectados con cepas sensibles a los antibióticos (Nelson et al., 2004).

Por otro lado, existen diferentes terapias para el tratamiento de *H. pylori* entre las que destacan la terapia triple estándar, constituida sobre todo por un inhibidor de bomba de protones (BIP) además de 2 a 3 antibióticos (amoxicilina o claritromicina o metronidazol/tinidazol), la terapia cuádruple con bismuto (BIP, bismuto, tetraciclina y metronidazol), la triple con levofloxacino (BIP, levofloxacino y amoxicilina), la terapia secuencial (BIP más amoxicilina seguido de BIP, claritromicina y metronidazol o tinidazol) y la terapia concomitante o cuádruple sin bismuto, constituida por BIP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol (O'Morain et al., 2018). Actualmente, existe una disminución constante en las tasas de erradicación de *H. pylori* empleando la triple terapia estándar en poblaciones adultas y pediátricas que van de 75 al 55% entre 2009 y 2014 (Kutluk et al., 2014).

Con la disminución de las tasas de erradicación de *H. pylori*, se están estudiando y evaluando nuevas alternativas terapéuticas. Recientemente, se ha propuesto el uso de suplementos probióticos para prevenir y tratar diversas afecciones gastrointestinales, incluidos los efectos secundarios inducidos por antibióticos, como diarrea. Y que a su vez los probióticos puedan actuar como coadyuvantes a los tratamientos terapéuticos además de aumentar la tolerabilidad de la medicación y el cumplimiento del paciente (Lau et al., 2016).

Una variedad de bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. así como *Bifidobacterium* spp. han mostrado actividad inhibitoria contra cepas de *C. jejuni* mediante experimentos de cocultivo (Santini et al., 2010).

En otro estudio *in vitro*, el probiótico *Lactobacillus* spp. produjo ácido láctico que suprime a *C. jejuni* (Neal-McKinney et al., 2012).

1.2.2 Tratamiento coadyuvante con probióticos contra *C. jejuni*

La infección de *C. jejuni* en humanos puede ocurrir después de la ingestión de tan solo 500 células de *Campylobacter* (Robinson, 1981). Según una encuesta de las infecciones por el género *Campylobacter* en Inglaterra y Gales, *C. jejuni* es responsable de aproximadamente el 90% de los casos de campilobacteriosis y *C. coli* es responsable del 10% restante (Gillespie et al., 2002).

Si bien, la ingestión de aves de corral contaminadas es la principal vía de infección en países considerados desarrollados, la ingestión de agua contaminada es comúnmente responsable de las infecciones por *Campylobacter* en países considerados en desarrollo (Kaakoush et al., 2015).

Las aves son una fuente importante de infecciones humanas, se ha propuesto que para disminuir la incidencia de campilobacteriosis, se debe combatir la colonización aviar (Meunier et al., 2016). Dado que se ha predicho que la disminución de la colonización en aves de corral por *Campylobacter* en $2 \log_{10}$ reducirá las infecciones humanas en 30 veces, muchas investigaciones se han centrado en comprender la colonización de aves de corral por *Campylobacter*, ya que incluso una pequeña reducción podría tener un impacto enormemente positivo en la salud de los humanos (Rosenquist et al., 2003). Derivado de esta problemática, es importante la búsqueda de nuevos tratamientos que ayuden a combatir a *C. jejuni* tanto en aves como en humanos.

Thomrongsuwannakij et al. (2016) postularon que *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium* eran los mejores candidatos probióticos para combatir *C. jejuni*. Otro grupo de investigadores (Wine et al., 2009) reportó que la cepa R0052 de *Lactobacillus helveticus* redujo la invasión de *C. jejuni* 81-176 y *C. jejuni* 11168 de las células T84 en un 41 y 35%, respectivamente. En esta investigación se observó que *L. helveticus* se adhirió a las células epiteliales, lo que sugiere que la exclusión competitiva puede haber contribuido a la reducción de la invasión de *C. jejuni* (Wine et al., 2009). Otro estudio informó que múltiples cepas

de *Lactobacillus* inhibieron el crecimiento de *C. jejuni in vitro* debido a la producción de ácido orgánico por estos microorganismos (Bratz et al., 2015).

Según un meta-análisis realizado con 34 estudios aleatorios, de doble ciego y controlados con placebo, la administración de probióticos redujo la diarrea causada por *C. jejuni* en un 52%, efecto beneficioso que también se demostró en la diarrea “del viajero”, en donde el riesgo de padecerla se redujo en un 8%. Además, todas las cepas evaluadas (*S. boulardii*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*), tanto en combinación como por separado, mostraron un efecto similar (Allen et al., 2011).

Los ejemplos anteriores sugieren que el uso de probióticos parecer ser una terapia prometedora para combatir a *H. pylori* y *C. jejuni*.

1.2.3 Tratamiento coadyuvante con probióticos contra *H. pylori*

Aunque se han estudiado una gran variedad de especies de BAL con potencial probiótico, los géneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces* siguen siendo los más comúnmente estudiados (Homan & Orel, 2015). Los probióticos actúan en numerosas vías, y se han documentado algunos mecanismos inmunitarios como no inmunitarios (Ruggiero, 2014).

Gong et al. (2015), indicaron probabilidades más bajas de erradicación de *H. pylori* con la terapia triple sola, en comparación con la terapia triple con suplementos de probióticos. También se observaron reducciones significativas de los efectos secundarios, como náuseas, vómitos, distensión abdominal, dolor epigástrico, diarrea, estreñimiento, distorsión del gusto y erupción cutánea.

Lactobacillus spp. se recomienda como un complemento al tratamiento estándar para combatir a *H. pylori*, ya que es posible mejorar la adaptabilidad del paciente al tratamiento debido a que se reducen los efectos secundarios de los agentes antibacterianos sintéticos (Franceschi et al., 2007; Kim et al., 2008). En un estudio realizado por Hong et al. (2018) evidenciaron que la bacteria ácido láctica *Lactobacillus paracasei* HP7 aislada de kimchi (un platillo de verduras fermentadas

ampliamente consumido en Corea), tenía efectos inhibidores contra *H. pylori* tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo*.

1.3 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos viables (bacterias o levaduras) que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, ejercen diversos efectos benéficos en la salud del huésped. Entre los microorganismos probióticos conocidos, se encuentran los géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) como, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* además de *Bifidobacterium*. Estas bacterias tienen un largo historial de uso seguro (Doron & Snyderman, 2015; Maria Rosa Machado, 2015). Los probióticos poseen la capacidad de soportar condiciones poco favorables en el cuerpo humano (por ejemplo, enzimas salivales, bajo pH y jugos gástricos), siendo capaces de colonizar las células epiteliales del intestino y contribuir a la salud del huésped (Marchesi et al., 2016; Ooi & Liong, 2010; Zoumpopoulou et al., 2017). Aunque en todo el mundo se han empleado diversas BAL probióticas en alimentos funcionales fermentados, el mercado de productos biofuncionales necesita continuamente la aplicación y la diversificación de los productos disponibles. Con este fin, se han realizado un número creciente de estudios científicos orientados a la selección de nuevas cepas con propiedades funcionales diferentes y específicas. Continuamente se identifican nuevos microorganismos como levaduras, y BAL con elevado potencial probiótico. En la actualidad se están utilizando nuevas fuentes de aislamiento de microorganismos probióticos, como diferentes productos lácteos, frutas, cereales y de los desechos agroindustriales (Vinícius et al., 2018).

Debido a la gama de funciones y aplicaciones tecnológicas de los probióticos, la selección y evaluación de nuevos candidatos a probióticos requiere un enfoque integral que incluya múltiples pasos. Antes del 2002, no existía ninguna reglamentación internacional para evaluar y respaldar la eficacia y la seguridad de los microorganismos probióticos, debido a ello, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) publicaron las "Directrices para la evaluación de los probióticos en los

alimentos", en las que se establecían normas de seguridad y eficacia para los probióticos (Pineiro & Stanton, 2007). En esta directriz se sugieren varios criterios para la selección de probióticos, entre ellos la resistencia a las condiciones desfavorables presentes en el cuerpo humano, la capacidad de adhesión al epitelio, la actividad antimicrobiana y la evaluación de la seguridad.

En los últimos años se han desarrollado pruebas para demostrar la relación de los microorganismos probióticos con aspectos integrales de la salud y el bienestar de los seres humanos, llevando así a nuevas estrategias para la selección de probióticos (Vinícius et al., 2018). Entre estas pruebas destacan algunos métodos para evaluar las propiedades biológicas de los probióticos, como diversos efectos anticancerígenos, antidepresivos, antiobesidad, antidiabéticos y la regulación de los niveles de colesterol, así como aspectos de seguridad relativos a la virulencia, toxicidad, y resistencia a los antibióticos y la transferencia de esta resistencia (Hanchi et al., 2018).

1.3.1 Selección de probióticos

Para la selección de microorganismos probióticos se requiere un enfoque crítico y sistemático utilizando una estrategia similar a la que se muestra en la Figura 2. En la mayoría de los estudios, debido al gran número de cepas aisladas es necesario utilizar un "enfoque por etapas", que consiste en una secuencia de pruebas para reducir progresivamente el número de candidatos a probióticos. Al final de este procedimiento, las cepas que presentan el mayor número de propiedades funcionales simultáneamente, sin ningún rasgo negativo, se seleccionan como probiótico (Vinícius et al., 2018).

El microorganismo en cuestión debe estar perfectamente caracterizado a nivel de género, especie y cepa, también deberá depositarse en una colección de cultivos internacionales reconocidos (Felis et al., 2009). Además de cumplir con algunas otras características como: 1) ser seguro para el hospedador, determinado mediante ensayos *in vitro* y/o en animales de experimentación si es necesario, 2) ser microorganismos viables en el momento de su consumo, aunque se ha reconocido

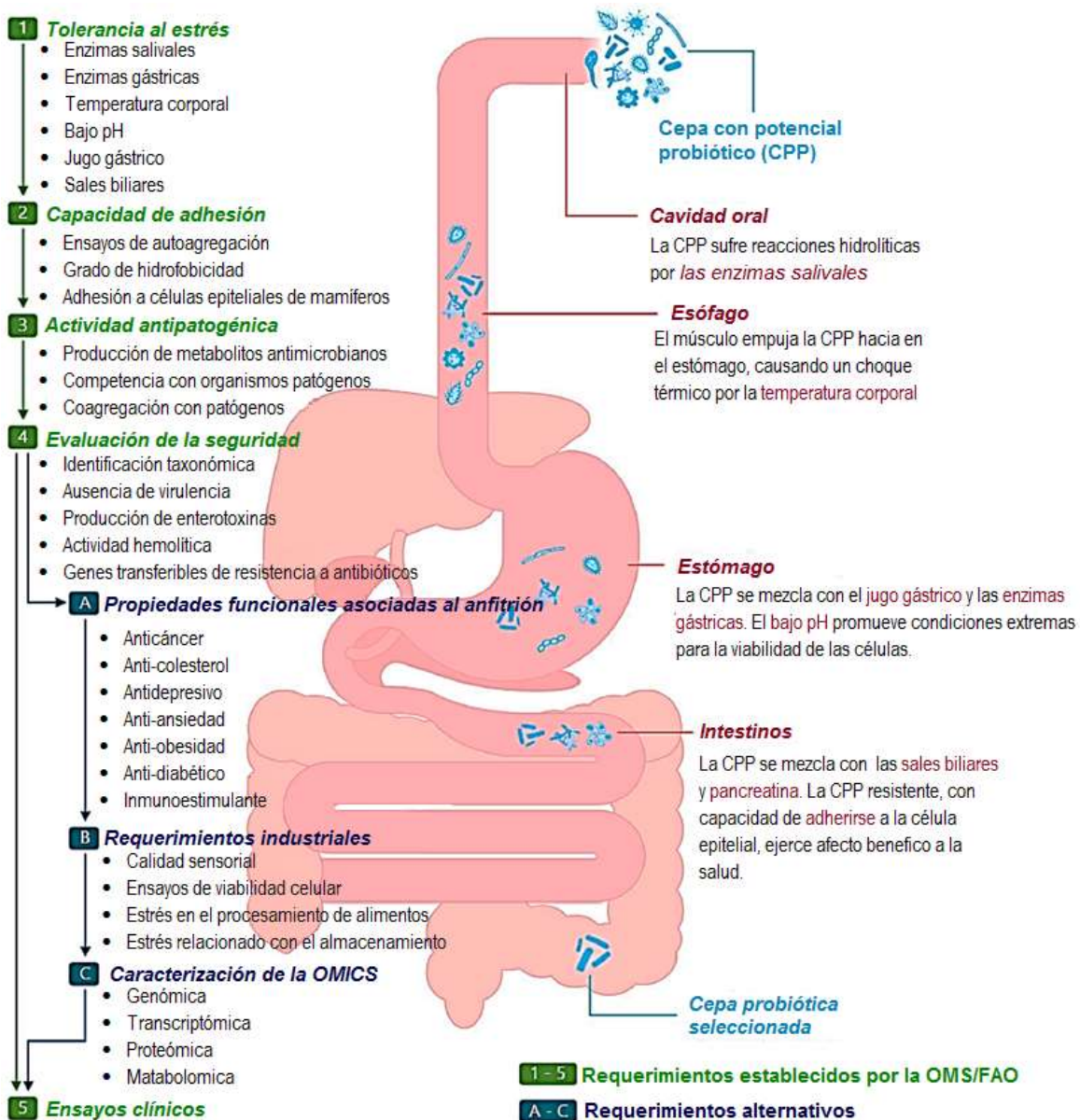


Figura 2. Enfoques de selección utilizados para la caracterización de las cepas de probióticos según la OMS/FAO y otros estudios de Divya et al. (2012); Fiorda et al. (2016); Luna & Foster (2015); Maragkoudakis et al. (2006) y Yang & Chang (2010).

que las células no viables pueden mediar algunos efectos beneficiosos a nivel fisiológico, 3) ser capaz de sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal, determinándolo mediante una serie de pruebas estándar; resistencia al pH gástrico y a sales biliares, 4) capacidad de adhesión a la mucosa y/o células epiteliales humanas, de líneas celulares o de animales de experimentación, 5) deben

proporcionar algún beneficio fisiológico demostrado directamente en animales o en el humano (Figuroa-González et al., 2011).

Dentro los microorganismos considerados como probióticos en mayor medida encontramos aquellos que pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas o BAL. En el apartado siguiente se describen algunas características de estas BAL.

1.3.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas se encuentran entre los grupos de bacterias más relacionadas con los humanos; se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y en numerosos hábitats ricos en nutrientes, como plantas, suelo, animales y humanos (Ashaolu & Reale, 2020). También se pueden encontrar formando parte de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI), donde fermentan diversas fuentes de carbono provenientes de los alimentos (Ashaolu et al., 2019). En la actualidad el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de matrices crudas como granos y cultivos así como de alimentos naturalmente fermentados (productos lácteos, cereales, frutas y verduras) está bien documentado (Tamang et al., 2016).

Se ha informado el hallazgo de numerosos géneros/especies de BAL en relación con diversos alimentos y bebidas fermentadas en todo el mundo, que han demostrado tener potencial probiótico (Fenster et al., 2019).

La mayoría de las bacterias probióticas que se utilizan hoy en día (Tabla 1) pertenecen al grupo de BAL destacando los géneros *Lactobacillus* (clasificación antigua), y *Streptococcus* (Kechagia et al., 2013; Marco et al., 2006). Por otro lado, el género de *Bifidobacterium* también ha destacado por sus diferentes cepas probióticas. Sin embargo, existen productos probióticos que contienen cepas BAL de otros géneros como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Ashaolu & Reale, 2020; Ouwehand et al. 2002).

A continuación, se describen algunas de las cepas BAL y bifidobacterias comúnmente empleadas como probióticos.

Tabla 1. Especies de BAL y bifidobacterias comunmente empleadas como probióticas.

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		<i>S. salivarius</i>
<i>Ent. faecium</i>			
<i>L. delbrueckii ssp.</i> <i>(bulgaricus)</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			

Fuente: Parvez et al., 2006

Gracias al conocimiento de la secuencia genética de estos microorganismos se ha podido determinar los genes involucrados en procesos tan relevantes como la resistencia a patógenos, su capacidad de colonización y adhesión al epitelio intestinal o el mecanismo por el cual producen una reducción en situaciones de intolerancia a la lactosa (Sebastián Domingo, 2017).

El género que ha sido más estudiado como probióticos de este grupo (Tabla 1) es *Lactobacillus*. Se han desarrollado diversas pruebas para determinar sus efectos benéficos.

1.4 Efectos benéficos en la salud del huésped tras la administración de probióticos

Al pasar de los años, se ha atribuido a los microorganismos probióticos propiedades beneficiosas sobre el ser humano, por ejemplo, sobre el tracto gastrointestinal, el sistema inmune, el sistema cardiovascular y/o el tracto urogenital. Es importante destacar que estos efectos benéficos dependen de la cepa empleada, por lo tanto, no existe una cepa universal que proporcione todos los efectos esperados, hasta

incluso distintas cepas dentro de la misma especie pueden presentar variaciones en los efectos sobre el hospedador (Vasiljevic & Shah, 2008).

Uno de los beneficios al huésped tras la administración de probióticos es la reducción de la intolerancia a la lactosa, ya que reduce los síntomas de inflamación o hinchazón, posiblemente como consecuencia de la presencia de la lactasa presente en las bacterias ácido lácticas, mejorando así la digestión de la lactosa (de Melo Pereira et al., 2018).

Dentro de los beneficios que aportan los probióticos está mitigar la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, enfermedades en donde la microbiota intestinal juega un papel importante en los periodos inflamatorios, en cuyo caso un tratamiento probiótico podría remediar la inflamación a través de su interacción con la microbiota autóctona. De esta manera los probióticos estimulan la motilidad intestinal, facilitando con ello la expulsión de bacterias, enzimas, y moléculas procarcinogénicas, favoreciendo condiciones saludables y reduciendo el riesgo de padecer infecciones y cáncer (Reyes Esparza & Rodríguez Fragoso, 2012). (Allen et al., 2011; Vasiljevic & Shah, 2008)

Por otro lado, las cepas de probióticos han demostrado ejercer efectos anticancerígenos por múltiples mecanismos, entre ellos: i) la producción de compuestos con actividad anticancerígena, ii) la unión y degradación de los posibles mutágenos, iii) la reducción de la actividad de las enzimas que intervienen en la formación de carcinógenos, iv) la reducción de las micotoxinas genotóxicas, inmunosupresores y nefrotóxicas, v) la inhibición de la proliferación de células tumorales, y vi) la inducción de la apoptosis en las células cancerosas (Commane et al., 2005; Ewaschuk et al., 2006; Kumar et al., 2013).

Los microorganismos probióticos también están dirigidos al control de patógenos gastrointestinales como *H. pylori* y *C. jejuni* algunos de sus mecanismos empleados incluyen: estimulación del sistema inmune; competición por los receptores o sitios de adhesión y los nutrientes así como factores de crecimiento; cambios en el pH del medio debido a la producción de ácidos orgánicos, además de facilitar la reparación

de la mucosa en el tracto gastrointestinal (Fooks & Gibson, 2002; Moreno et al., 2018).

1.4.1 Metabolitos producidos por bacterias probióticas con efectos benéficos a la salud

En los últimos años, se ha reconocido el importante papel de las bacterias probióticas en el mantenimiento de la homeostasis dentro de ecosistemas dinámicos como los tractos gastrointestinal y urogenital, así como en la prevención de la colonización e infección causada por microorganismos patógenos (Boris & Barbés, 2000) . Algunos lactobacilos desempeñan un papel protector al producir compuestos como peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos dentro de los que destaca el ácido láctico, diacetilo, reuterina, bacteriocinas y biosurfactantes, que inhiben el crecimiento de patógenos potenciales (Pascual et al., 2008). Además, los lactobacilos inhiben los patógenos por exclusión competitiva de los receptores presentes en la superficie de las células epiteliales y por coagregación con ellos, lo que contribuye a crear una barrera que previene la colonización por patógenos (Siedler et al., 2020; Zuo et al., 2019). En consecuencia, se ha sugerido que la capacidad de adherirse a las células epiteliales y las superficies mucosas es una propiedad importante de muchas cepas bacterianas utilizadas como probióticos (Zuo et al., 2019).

Recientemente, se ha reportado que las bacterias probióticas pueden sintetizar otros metabolitos poco conocidos. Por ejemplo, Liu et al. (2017) descubrieron una nueva sustancia antimicrobiana producida por *L. rhamnosus* LS-8 que identificaron como 4,6-dimetil-1,2,5-triazepano-3,7-diona ($C_6H_{11}N_3O_2$) presentando efecto inhibitorio significativo sobre cepas tanto Gram positivas como Gram negativas, incluidos los patógenos de resistencia a múltiples fármacos como *H. pylori* y *C. jejuni*. También mostró buena estabilidad térmica y resistencia a las enzimas proteolíticas; sin embargo, solo fue activo en condiciones ácidas. El descubrimiento agrega un nuevo tipo de compuesto antimicrobiano producido por bacterias ácido lácticas.

El interés científico que se tiene sobre el uso de probióticos, está vinculado a su efecto en el sistema inmune y los procesos biológicos y bioquímicos que ocurren en el intestino, mismos que estimulan, regulan e inducen diversos efectos biológicos en el sistema inmunológico a través de la interacción local con el tejido linfoide asociado al intestino. En este sentido, la evidencia reciente sugiere que el intestino desempeña un papel muy importante en los mecanismos de tolerancia y mantenimiento de la memoria de la respuesta inmune en el organismo (Sanders et al., 2019).

1.5 Estimulación del sistema inmune por probióticos

El efecto inmunoestimulador de los probióticos se produce al aumentar la secreción de inmunoglobulinas, fagocitosis de patógenos y/o la producción de citoquinas (Rocha-Ramírez et al., 2017). Estos mecanismos están respaldados por estudios *in vitro* y se demostraron *in vivo* tanto en animales y, en cierta medida, en los seres humanos (Marchesi et al., 2016). La inmunosupresión inducida por probióticos puede ser evaluada desde la producción de células secretoras de IgA e IgM, incluyendo IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-10, IL-12, IL-18, y TGF- β (Lammers et al., 2003).

1.5.1 Mecanismos inducidos por los probióticos para estimular el sistema inmunológico

Algunos autores han demostrado que sólo algunos fragmentos de la bacteria probiótica, y no toda la bacteria, son internalizados dentro de las células epiteliales intestinales (CEIs). Como consecuencia, las CEIs inician una compleja red de señales que estimulan las células inmunes asociadas a la lámina propia y activan principalmente la respuesta innata y liberación de citoquinas por las células T (Galdeano & Perdigón, 2004). Se ha demostrado que los probióticos fortalecen la barrera intestinal al aumentar la cantidad de células caliciformes que refuerzan la capa de moco (de Moreno et al., 2008). Además, en diversas investigaciones se ha demostrado que varias especies de *Lactobacillus* aumentan la expresión de

el espacio que queda libre mucina en líneas celulares intestinales humanas (Mack et al., 2003; Maldonado et al., 2019).

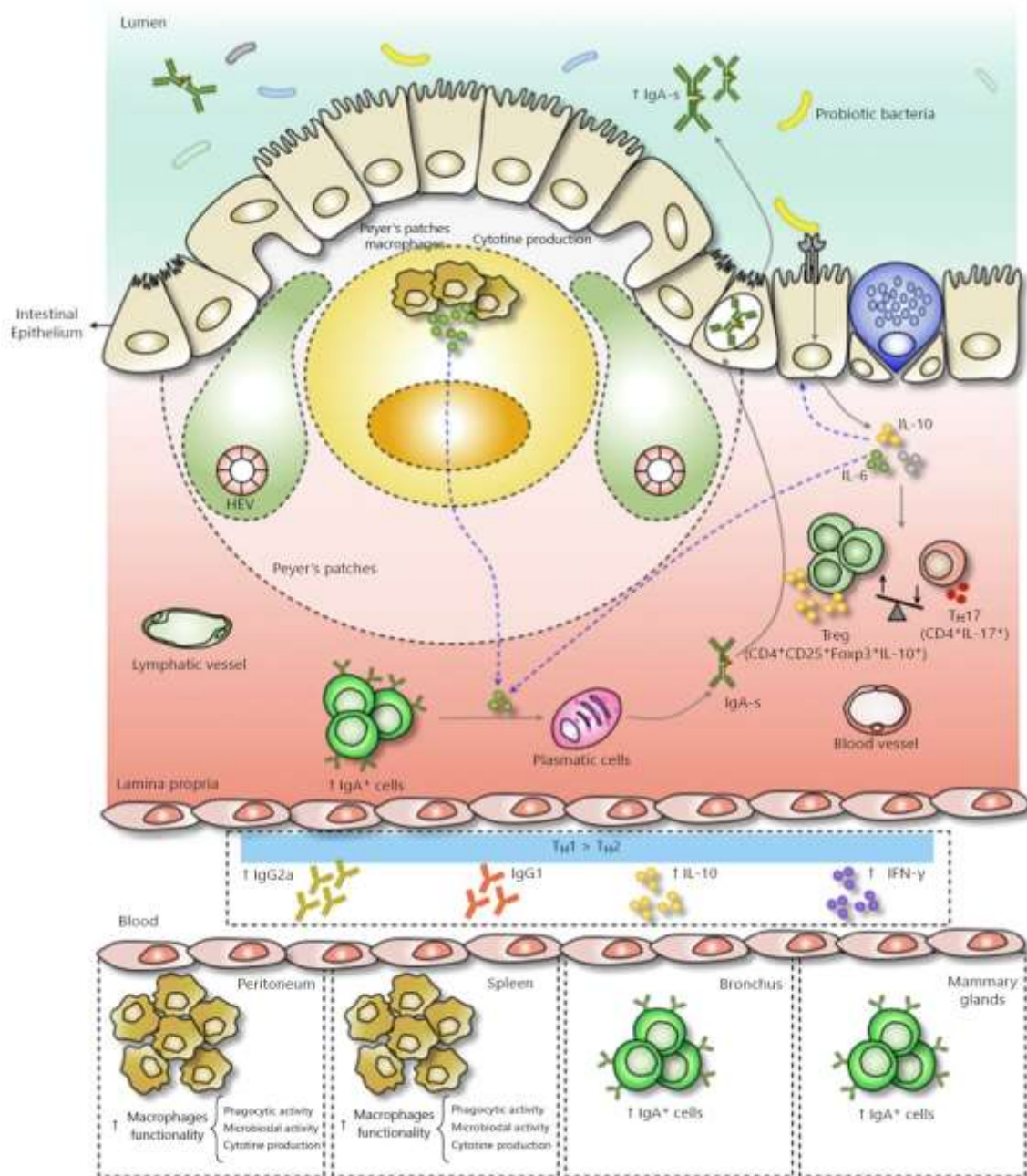


Figura 3. Mecanismos inmunomoduladores ejercidos por las bacterias probióticas en la mucosa intestinal (Maldonado et al., 2019)

Como se puede observar en la Figura 3, las bacterias probióticas se adhieren a las CELs y las activan a través de los receptores de reconocimiento de patrones. En este escenario, las CELs liberan citoquinas y quimioquinas que crean un

microambiente en la lámina propia del intestino, permitiendo la expansión clonal de las células B para producir IgA. Al mismo tiempo, las citoquinas estimuladas por las bacterias probióticas conducen a la expresión de células Treg (Foxp3+) que mantienen la homeostasis inmune en la mucosa intestinal (Aragon et al., 2015). Posteriormente, los macrófagos de las placas de Peyer (PP) liberan citoquinas después de la estimulación de la bacteria probiótica. Después de la estimulación probiótica, los macrófagos distantes del TGI como los del peritoneo y el bazo, aumentan su funcionalidad (producción de citoquinas, fagocitos y actividad microbicida) reforzando la respuesta inmune innata (Maldonado et al., 2019; Gómez et al., 2016).

Otras células importantes que juegan un papel fundamental en la barrera epitelial son las células de Paneth. Los probióticos tienen importantes efectos sobre estas células, aumentando su número en las criptas intestinales con el objetivo de reforzar la barrera epitelial (Cazorla et al., 2018).

El tiempo de permanencia de las bacterias probióticas en el lumen intestinal (72 h) es suficiente para inducir cambios en las células inmunes del intestino, aumentando el número de macrófagos y células dendríticas (CD) de la lámina propia, y mejorando su funcionalidad, lo que se refleja en la producción de citoquinas (Maldonado et al., 2019).

Es importante señalar que la activación de las células inmunitarias no altera la homeostasis intestinal, probablemente por la activación de las células reguladoras que mantienen un entorno tolerógeno. Estos hechos garantizan la seguridad del consumo de probióticos durante largos períodos de tiempo sin efectos adversos. El microambiente de citoquinas generado por las células inmunes en respuesta a los probióticos favorece un aumento de las células IgA+ intestinales (Shah & Swami, 2017).

Debido a lo expuesto anteriormente, los probióticos presentan una capacidad importante para estimular el sistema inmunológico. Por tal motivo son empleados con éxito en tratamientos profilácticos o terapéuticos de varias enfermedades referidas a trastornos gástricos, síndromes inflamatorios, síndrome del colon

irritable, cáncer gástrico o infección causadas por *H. pylori* y *C. jejuni* (García et al., 2009; Gotteland et al., 2006; Hütt et al., 2009).

Para que los microorganismos probióticos puedan ejercer eficazmente su actividad es de suma importancia considerar la adición de ciertos micronutrientes que potencialicen su actividad como lo son los prebióticos, ya que estos estimulan el crecimiento de diferentes bacterias intestinales autóctonas, así como la activación del metabolismo de la microbiota intestinal, lo que confiere un efecto benéfico para la salud del huésped. La combinación de probióticos y prebióticos puede superar algunas posibles dificultades en la supervivencia de los probióticos en el TGI además de combatir diversos enteropatógenos.

1.6 Prebióticos

Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que actúan como un sustrato nutritivo para estimular el crecimiento y metabolismo de ciertas bacterias (Ghouri et al., 2014). Mientras que los probióticos se introducen como bacterias exógenas en la microbiota del colon, los prebióticos tienen como objetivo modular la microbiota luminal endógena mediante la estimulación selectiva. Los prebióticos suelen estimular el crecimiento de bacterias promotoras de la salud ya presentes en el colon. Por ejemplo, diferentes carbohidratos digeribles, como los galactooligosacáridos (GOS), pueden estimular bifidobacterias presentes en el intestino, donde posteriormente estos microorganismos fermentarán estos azúcares produciendo diversos ácidos grasos de cadena corta (Bouhnik et al., 2004). En teoría, el resultado neto de la administración prebiótica puede ser similar al de la administración probiótica. Sin embargo, el efecto de los prebióticos puede estar presente durante varias semanas después de la administración, mientras que el efecto de los probióticos es generalmente más corto. (Ballongue et al., 1997). Actualmente existe controversia sobre qué compuestos pueden considerarse como prebióticos y cuáles no. (Bindels et al., 2015). Uno de los calificadores clave para un prebiótico es que debe cambiar selectivamente a la microbiota intestinal.

Las frutas, verduras, cereales y otras plantas comestibles son fuentes de carbohidratos que constituyen prebióticos potenciales. Se pueden mencionar las

siguientes posibles fuentes: semillas de chía, alcachofas, almendras ajo, cebolla, raíces de achicoria, vegetales verdes, legumbres, así como avena, linaza, cebada y trigo (Markowiak & Ślizewska, 2017). De estas fuentes naturales, la raíz de achicoria fresca contiene el 68% de inulina, el mucílago de chía crudo estimula el crecimiento de los microorganismos del colon, los oligómeros presentes en la alcachofa muestran un efecto prebiótico al promover el crecimiento de microbios probióticos (A. P. Kaur et al., 2021). Algunos prebióticos producidos artificialmente son: lactulosa, GOS, fructooligosacáridos (FOS), maltooligosacáridos, ciclodextrinas y lactosacarosa (Fernández et al., 2018).

1.6.1 Metabolismo de prebióticos

El intestino grueso, en comparación con otras zonas del tracto gastrointestinal, es un ecosistema muy complejo que contiene un gran número de microorganismos que se denominan microbiota intestinal. El medio es favorable para el crecimiento de bacterias (benéficas y patógenas) debido al pH cercano a la neutralidad, a la alta disponibilidad de nutrientes, así como al tránsito lento de los mismos. Dado que la microbiota puede dar lugar a compuestos benéficos para la salud, actualmente existe un gran interés en usar dietas que promuevan el crecimiento de estos grupos bacterianos (Gibson et al., 2017).

Tras la ingestión de un alimento con características prebióticas, se origina una serie de gases tales como hidrógeno (H_2), bióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) que no tienen efectos negativos, con la excepción de producir flatulencia e hinchazón; y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como acetato, butirato y propionato, principalmente, además de lactato, que son beneficiosos tanto para la microbiota intestinal (disminuyendo ligeramente el pH), como para las células intestinales (que necesitan estos AGCC para obtener energía). Ciertos componentes de la microbiota producen etanol que es metabolizado rápidamente por otras bacterias intestinales y no ejerce ningún efecto en el huésped. Además, se genera sulfuro de hidrógeno (SH_2), que puede reaccionar fácilmente y tener efectos negativos en el intestino, también se pueden producir ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) tales como isobutirato, isovalerato. También puede producirse amoníaco (NH_3), tioles,

aminas, y fenoles e indoles que son irritantes para las células intestinales, posiblemente mutagénicos o pueden tener un efecto negativo en el sistema inmune en altas concentraciones. (Corzo et al., 2015).

Se ha demostrado que los FOS, tienen la capacidad de regular la producción de mucina y aumentar el conteo de leucocitos y linfocitos tanto en la sangre periférica como en los tejidos linfoides asociados al intestino (TLAI) (Janardhana et al., 2009). Estos TLAI también contribuyen a la síntesis de la inmunoglobulina A (IgA), la cual activa directamente la acción fagocítica de los macrófagos intra-inflamatorios (Hirayama et al., 2018). Diversos estudios han destacado el potencial de los prebióticos para modular la expresión de citocinas. En un estudio realizado por Cani et al. (2009), se observó que los carbohidratos prebióticos tuvieron un efecto reducido en la expresión de marcadores de estrés oxidativo de inflamación, y un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-1a, IL-1b, IL-6 y TNF- α) en ratones obesos

1.6.2 Algunos de los prebióticos más comunes

1.6.2.1 Fructooligosacaridos (FOS)

Los FOS son oligosacáridos bien documentados con respecto a su efecto sobre las bifidobacterias intestinales y se consideran importantes prebióticos. Los FOS no se degradan o absorben en el tracto gastrointestinal humano. Como tal, entran en el colon intacto donde son susceptibles al metabolismo por la microbiota residente (Hidemasa et al., 1986). En cultivos puros, la mayoría de las especies de bifidobacterias son expertas en la utilización de estos fructanos. Muchas otras bacterias también son capaces de metabolizar estos sustratos, incluidos *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermis*, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, *Bacteroides vulgatus*, *B.thetaiotaomicron*, *B. ovatus* y *B. fragilis*, *L. acidophilus* y *Clostridium* sp.

En cuanto a su estructura, los FOS constan de cadenas lineales de fructosa (desde 2 unidades hasta 60) unidas por enlaces β (2-1), y terminan en glucosa (Mutanda et al., 2014). En la síntesis de FOS a partir de sacarosa, la enzima fructosiltransferasa juega un papel clave, mostrando actividad hidrolítica a baja concentración de

sacarosa y actividad de transfructosilación a concentraciones altas. Los FOS resultantes contienen de 2 a 4 residuos de fructofuranosilo con enlaces β -(2-1) y tienen glucosa en el extremo terminal unida por un enlace α -(1-2) (A. P. Kaur et al., 2021). Los FOS pueden ser inulina despolimerizada enzimáticamente o producidos a partir de sacarosa por transfructosilación (Carlson et al., 2018; Goh et al., 2006) esto debe ir en la introducción

Los FOS tienen aplicaciones comerciales como suplementos en alimentos, siendo considerados nutracéuticos. Además, los FOS son empleados como ingredientes funcionales en la industria ya que parecen ser una buena alternativa de ingrediente prebiótico (Rolim, 2015). También se utilizan en la producción de helados, mermeladas y productos de confitería (Mutanda et al., 2014) .

1.6.2.2 Inulina

La inulina es una mezcla de cadenas de fructanos encontrados ampliamente en la naturaleza como carbohidratos de almacenamiento de plantas y está presente en más de 36,000 especies de plantas. Químicamente, la inulina es un polidisperso β -(2,1) fructano. Las unidades de fructosa en la mezcla de polímeros de fructosa lineales y oligómeros son unidos por enlaces β -(2,1). Una molécula de glucosa típicamente reside en el final de cada cadena de fructosa y está unido por un enlace α -(1, 2), similar a la sacarosa. Las longitudes de cadena de estos fructanos varían de 2 a 60 unidades con un grado medio de polimerización de 10 (Flickinger et al., 2003). La mayoría de la inulina disponible comercialmente hoy se extrae de las raíces de achicoria (Gibson & Roberfroid, 1995).

La incapacidad del sistema digestivo humano para hidrolizar los fructanos se debe a la falta de enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces β . Sin embargo, ciertas bacterias, como *Lactobacillus*, pueden degradar estos enlaces, modulando así la composición y actividad de la microflora intestinal y promoviendo el crecimiento de bacterias bifidogénicas. (Mutanda et al., 2014).

1.6.2.3 Galactooligosacáridos

Los galactooligosacáridos (GOS) se conforman por oligolactosa, oligogalactosa y oligogalactosilactosa. La lactulosa de la leche de vaca, transformada mediante

transglicosilación e isomerización, se convierte en GOS (Martins et al., 2019). Estos actúan como prebióticos al no ser digeridos enzimáticamente por tanto son fermentados en el intestino por bifidobacterias. Los GOS se clasifican en dos subcategorías, con exceso de galactosa en C3, C4 o C6, y los sintetizados a partir de lactosa mediante transglicosilación enzimática (Torres et al., 2010). La síntesis de los GOS se puede realizar de manera electrófila y nucleofílica, este método resulta poco rentable a escala industrial. La galactosidasa y la galactosiltransferasa son enzimas operativas en la formación de GOS, siendo la galactosiltransferasa la empleada en la síntesis a gran escala (Gänzle, 2012). Sin embargo, esta vía es costosa, al requerir nucleótidos de azúcar como donantes (Weijers et al., 2008). Por ende, para reducir costos, se utilizan comúnmente oligosacáridos de leche humana y la producción de globotriosa (Corona et al., 2021). Un estudio *in vivo* reveló que el efecto de los Bimuno® GOS (B-GOS®) en las bacterias intestinales de personas mayores, mejoró sustancialmente el número de Bacteroides y bifidobacterias en el intestino (O'Callaghan & van Sinderen, 2016).

La inulina y los fructooligosacáridos (FOS) son prebióticos ampliamente estudiados y reconocidos debido a su capacidad para ser selectivamente utilizadas por la microbiota intestinal, confiriendo así beneficios a la salud. Además de los bajos costos de producción a gran escala.

1.7 Efecto sinérgico de prebióticos y probióticos como inhibidores de *C. jejuni* y *H. pylori*

Los prebióticos, como ingredientes alimentarios no digeribles que promueven el crecimiento bacteriano beneficioso en el intestino, también se han utilizado para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en el TGI de pollos de engorda. Aunque no mostraron un impacto significativo por sí mismos, los prebióticos disminuyeron significativamente la cantidad de *Campylobacter* cuando se usaron en combinación con tres especies de probióticos (Arsi et al., 2015). Estudios similares respaldaron estos resultados en los que las cargas de *Campylobacter* se redujeron en presencia de una combinación de prebióticos y probióticos (Gracia et al., 2016; Guyard-Nicodeme et al., 2016; Johnson et al., 2017; Peng et al., 2015).

Por otro lado, Arsi et al. (2015), realizaron un estudio en el que probaron la afectividad de la combinación de algunas cepas de *Bacillus* y *Lactobacillus* spp. con prebióticos como fructooligosacárido (FOS) o mananooligosacárido (MOS) para inhibir a *C. jejuni* en aves de corral, encontrando que aquellos tratamientos en los que únicamente se administraron los prebióticos no se redujo la presencia del enteropatógeno. Sin embargo, al administrar la combinación de *Bacillus*, *Lactobacillus* y MOS (0.04%) en la alimentación de las aves se redujo la concentración de *C. jejuni*. Los resultados de este estudio indican que la selección y administración de aislados bacterianos en combinación con prebióticos seleccionados puede reducir los recuentos de *Campylobacter* entérico en aves de corral.

Un estudio realizado por Lau et al. (2016), demostró que la adición de probióticos a la terapia triple se asocia con un aumento del 13.8 % en la posibilidad de erradicar la infección por *H. pylori* en comparación con la terapia triple sola. Además, los probióticos han mostrado una disminución significativa de los efectos secundarios (Gong et al., 2015).

A pesar de las mejoras en la erradicación de *H. pylori* con probióticos como coadyuvantes, se ha demostrado que el uso de probióticos como monoterapia reduce la carga bacteriana, pero no es eficaz para erradicar *H. pylori* (Namkin et al., 2016; Wang et al., 2004). Bhatia et al. (1989) descubrieron que el crecimiento de *H. pylori* se inhibía *in vitro* si *L. acidophilus* estaba presente. Michetti et al. (1999), fueron los primeros en estudiar el efecto de *L. acidophilus in vivo*, concluyendo que el probiótico disminuyó la densidad de la carga bacteriana, pero la erradicación completa no tuvo éxito. Wang et al. (2004), estudiaron a pacientes adultos que tomaban terapias probióticas multiespecíficas que incluían *L. acidophilus* y concluyeron una disminución en los valores de la prueba de aliento con urea, pero no en la erradicación completa de *H. pylori*.

Para garantizar que las bacterias probióticas lleguen integras al tracto gastrointestinal del huésped es importante hacer uso de tecnologías de encapsulación, para mantener un nivel adecuado de sobrevivencia al ser expuestas

a condiciones adversas. Además, de considerar incluir algún prebiótico que podría potencializar el efecto inhibitor de los probióticos contra microorganismos enteropatógenos como *H. pylori* y *C. jejuni*.

1.8 Microencapsulación de probióticos

Para atrapar cualquier sustancia en un material y producir partículas que tienen un diámetro de unos pocos nanómetros a unos pocos milímetros, se lleva a cabo la encapsulación. La encapsulación es un proceso fisicoquímico o mecánico (Chen & Chen, 2007) y la sustancia que está encapsulada se conoce como núcleo. El término "recubrimiento" o "cubierta" se utiliza para la matriz en que el material del núcleo se dispersa. El material de soporte es tal que puede formar una barrera para proteger la sustancia encapsulada. La encapsulación de las células probióticas suele llevarse a cabo para proteger a las células vivas contra el ambiente desfavorable o adverso (Aquino et al., 2019; Champagne et al., 2010).

Existen diferentes tipos de encapsulados, pero los dos más comunes son el tipo de depósito y el tipo matriz. En el primer tipo, hay un caparazón alrededor del material central y por lo tanto, el término "cápsula". En el segundo tipo, el agente activo se dispersa sobre el material portador que también se puede encontrar en la superficie. La encapsulación finalmente imparte una estructura, permitiendo la creación de nuevas funciones o sistemas innovadores para productos probióticos (Neufeld & Poncelet, 2004).

Al encapsular el probióticos, surgen dos tipos de problemas, uno se debe a su tamaño (generalmente con un diámetro entre 1 y 5 μm), que excluye inmediatamente las nanotecnologías. La segunda dificultad al encapsular probióticos es mantenerlos vivos o en estado viable esto se determina mediante la selección de tecnología avanzada para la microencapsulación (Aquino et al., 2019; Champagne et al., 2010). Las cápsulas producidas por diferentes tecnologías exhiben variación en el tamaño. Los microencapsulados que tienen amplio rango de tamaño (0.2–5000 μm) se producen empleando la técnica de emulsificación. Microcápsulas de tamaño pequeño (no menos de 300 μm) se producen empleando el método de extrusión (Wang et al., 2015).

Además de la protección de la célula probiótica contra el entorno desfavorable, otro objetivo importante de encapsular las células probióticas es permitir su liberación en el intestino en un estado viable y metabólicamente activo (Picot & Lacroix, 2004). Las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas determinan la viabilidad de las células probióticas. Según Chen & Chen, (2007), el parámetro indispensable que debe considerarse para que las cepas bacterianas preserven su concentración es considerar adecuadamente el material de recubrimiento, el recuento celular inicial, el tamaño de partícula. Con el fin de mantener la integridad de la microcápsula en la matriz alimentaria y en el TGI, deben ser insolubles en agua (Haffner et al., 2016).

En general, la tecnología de encapsulación se lleva a cabo en tres etapas diferentes. En la etapa inicial, el componente bioactivo es incorporado en una matriz sólida o líquida. La incorporación del componente bioactivo comprenderá una disolución o dispersión en la matriz en el caso de un núcleo líquido, mientras que será una aglomeración o una adsorción en el caso de un núcleo sólido. En el segundo paso, la dispersión de la matriz líquida se lleva a cabo por medio de una pulverización de ionización de una solución en una matriz sólida. El último paso comprende la estabilización por un proceso que podría ser físico (evaporación, solidificación y coalescencia), químico (polimerización) o fisicoquímico (gelificación) según lo informado por Neufeld & Poncelet, (2004).

1.8.1 Microencapsulación de simbióticos

La combinación sinérgica de probióticos y prebióticos da lugar al concepto de simbiótico (Moura et al., 2015). Varios informes demostraron que las microcápsulas simbióticas son más efectivas en comparación con microcápsulas de probióticos cuando se exponían a TGI simulado (Chávarri et al., 2010; Jiménez-Villeda et al., 2023; Raddatz et al., 2020; Raddatz et al., 2020). Sin embargo, pocos informes se han centrado en la simulación de microcápsulas simbióticas a lo largo de las condiciones de TGI y su aplicación en productos alimenticios, para evaluar su interacción con el medio y la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento (Hernández-López et al., 2018).

Se ha realizado la encapsulación de probióticos con inulina como prebiótico, que estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a sobrevivir e implantarse en el colon (Avila-Reyes et al., 2014). Además, de la inulina, los galactooligosacáridos (GOS) y FOS protegen a los probióticos durante la microencapsulación (Barona et al., 2016; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014).

En la actualidad, existen varias técnicas con las que se pueden microencapsular simbióticos, sin embargo, para seleccionar una de ellas, es necesario considerar factores físicos como la temperatura, humedad y agitación que afectan su supervivencia (Martinez et al., 2015). Las técnicas más citadas en la literatura para microencapsular bacterias probióticas son: gelificación iónica, extrusión, emulsificación, secado por aspersion y liofilización (Atia et al., 2016; Nunes et al., 2018; Pinto, Fritzen-freire, et al., 2015; Raddatz, Poletto, et al., 2020; Silva et al., 2018; Yoha et al., 2020).

1.8.2 Técnicas de encapsulamiento

En la actualidad, existen varias técnicas con las que se pueden microencapsular simbióticos, entre las que destacan: Gelificación iónica, emulsificación, extrusión, secado por aspersion, coacervación, liofilización, ventana de refractancia entre las que destaca ampliamente el secado por aspersion por ser un método de encapsulación económico, además de presentar rendimiento elevado del proceso fácil de llevar a gran escala (De Barros et al., 2014; S. Huang et al., 2017).

1.8.2.1 Secado por aspersion

Esta técnica consiste en formar una suspensión que contiene microorganismos y agentes de recubrimiento, la cual es nebulizada con aire caliente o nitrógeno (Encina et al. 2016). En la Figura 4 se muestra un esquema general del equipo de secado por aspersion. Este proceso es conveniente en términos de requisitos de energía, costos operativos y conduce a un alto rendimiento del proceso y a menudo se usa para la encapsulación de probióticos (Pinto, Verruck, et al. 2015). La cápsula debería ser capaz de proporcionar una buena protección contra el ácido clorhídrico, lo que conduce al daño de las células probióticas (Rodríguez, 2012). El agente de recubrimiento no debe presentar citotoxicidad y actividades antimicrobianas, y por

lo tanto comprometer la viabilidad del cultivo probiótico (Cook et al. 2012). Además, el probiótico microencapsulado debe mantener la viabilidad en el producto y su liberación en el intestino tiene que ocurrir de manera controlada (Corona-Hernández et al. 2013).

Nunes et al. (2018) microencapsularon *L. acidophilus* con inulina, trehalosa y maíz respectivamente, sin embargo, las matrices de encapsulación de inulina y maíz mostraron la mayor eficiencia de encapsulación con 93.12% y 94.26%, respectivamente, con respecto a la resistencia térmica, la matriz de encapsulación de trehalosa proporcionó la mayor protección para este microorganismo, las microcápsulas producidas con maíz mostraron la mayor viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas en las diferentes secciones del TGI como el esófago / estómago (adición de pepsina, pH ajustado a 2.0 durante 90 min), duodeno (adición de pancreatina y sales biliares, pH ajustado a 5.0 por 20 min) e íleon (pH ajustado a 7.5 por 90 min), proporcionando así una mayor protección para *Lactobacillus acidophilus* La-5. La mayor eficiencia de encapsulación se proporcionó utilizando almidón resistente (maíz alto) e inulina.



Figura 4. Esquema general del secador por aspersion de laboratorio Buchi B 191 Labortechnik AG (Flawil, Suiza).

2. JUSTIFICACIÓN

La infección causada por *C. jejuni* y *H. pylori* afecta hasta el 50% de la población a nivel mundial, especialmente a países subdesarrollados. Existe una preocupación creciente por erradicar estos microorganismos patógenos ya que pueden alcanzar una prevalencia hasta del 90% en la población adulta (Sierra et al., 2014). Se han establecido diversos tratamientos farmacológicos que permitan disminuir la incidencia de estos patógenos en humanos. Sin embargo, a través de los años las tasas de erradicación han disminuido, derivado a que dichos patógenos han adquirido resistencia a diversos antibióticos, por lo que se están estudiando y evaluando nuevas alternativas terapéuticas. Recientemente, se ha propuesto el uso de probióticos para prevenir y tratar diversas afecciones gastrointestinales, incluidos los efectos secundarios inducidos por antibióticos. Por otro lado, para que los microorganismos probióticos puedan ejercer eficazmente su actividad es de suma importancia considerar la adición de ciertos micronutrientes que potencialicen su actividad como los prebióticos, ya que estos estimulan la activación del metabolismo de la microbiota intestinal. La combinación de probióticos y prebióticos puede superar algunas posibles dificultades en la supervivencia de los probióticos en el TGI además de combatir diversos enteropatógenos. En la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Falfán-Cortés et al. (2021) aislaron diversas BAL de diferentes alimentos entre las que destacaron *L. paracasei* T40 y *Enterococcus lactis* cepas: T33, T38 y T39 por su resistencia a condiciones de pH bajo y sales biliares similares a las TGI de manera *in vitro*. Además de mostrar efecto inhibitorio contra *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga tanto en medio de cultivo como en ratones CD-1. Derivado a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inhibitorio de las BAL previamente estudiadas contra *C. jejuni* y *H. pylori* microencapsuladas con inulina y FOS (prebióticos), y evaluar su efecto inhibitorio *in vivo*.

3. HIPÓTESIS

La mezcla de *Lactiseibacillus paracasei* T40 y *Enterococcus lactis* cepas: T33, T38 y T39 encapsuladas con prebiótico presentarán un mayor efecto inhibitorio contra *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* en un modelo *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana de *Enterococcus lactis* cepas T33, T38 y T39 y *Lacticaseibacillus paracasei* T40 libres, en mezclas y encapsuladas y en combinación con agentes prebióticos contra *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto inhibitorio y el tipo de compuestos antimicrobianos *in vitro* producido por *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 y *L. paracasei* cepa T40 frente a *C. jejuni* y *H. pylori*.
- Evaluar las propiedades de adherencia (autoagregación, coagregación e hidrofobicidad celular) *in vitro* de *L. paracasei* T40, tres cepas de *E. lactis*, *C. jejuni* y *H. pylori*.
- Microencapsular *L. paracasei* T40 y tres cepas de *E. lactis* con y sin prebiótico, caracterizar las microcápsulas (viabilidad, morfología, actividad de agua, humedad, resistencia a pH bajo y sales biliares similares al estómago).
- Evaluar la viabilidad de *L. paracasei* T40 y tres cepas de *E. lactis* encapsuladas con y sin prebiótico en condiciones de almacenamiento controladas por 30 días.
- Evaluar el efecto inhibitorio de tres cepas de *E. lactis* libres, con y sin prebióticos y encapsuladas frente a *C. jejuni* en ratones BALB/c.

5. METODOLOGÍA

En la Figura 5 se muestra el diagrama general de la metodología comprendida en dos etapas. La etapa 1 y la más extensa comprende todas las pruebas *in vitro* realizadas. La etapa 2 incluye las pruebas *in vivo*. A los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Diagrama general de la metodología

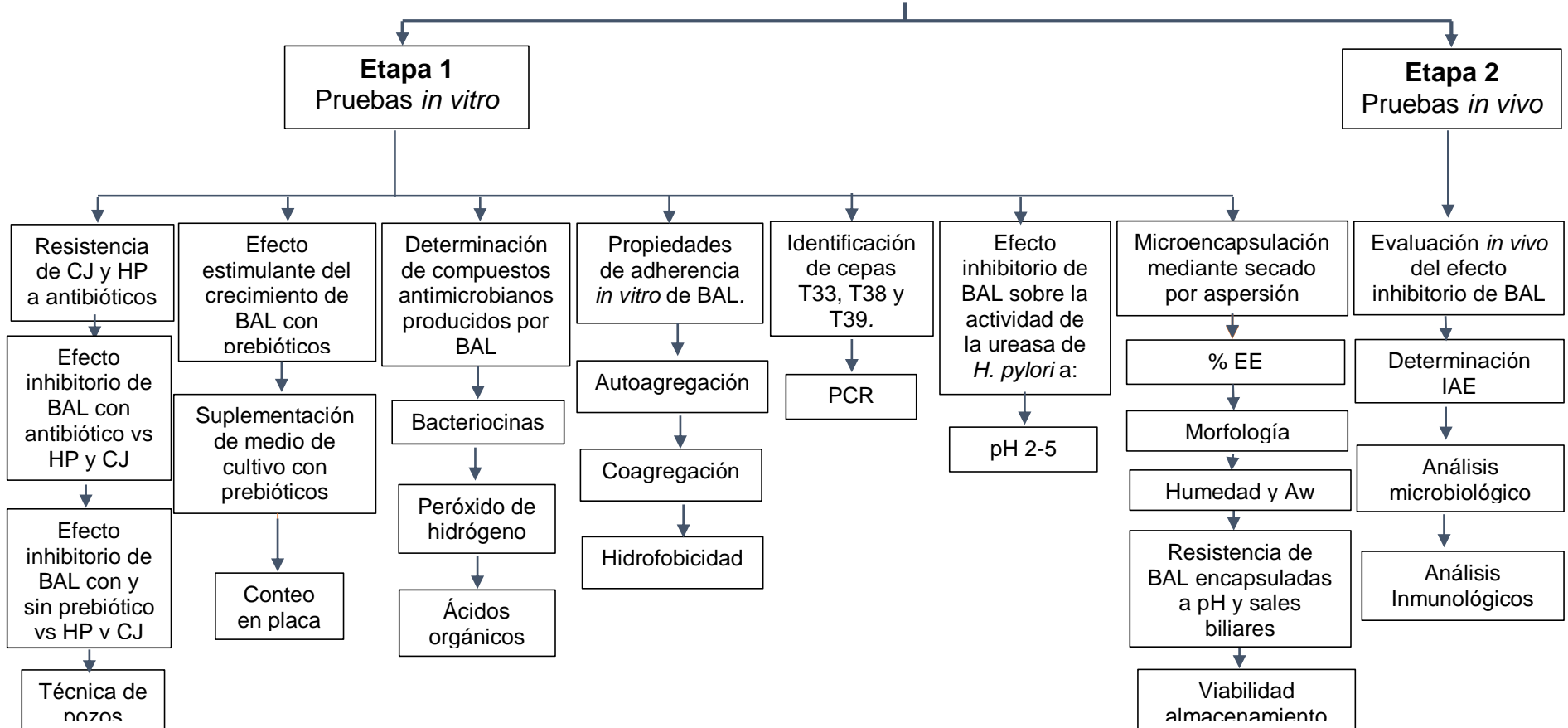


Figura 5. Descripción general de la metodología realizada. (HP: *H. pylori*, CJ: *C. jejuni*, Aw: Actividad de agua)

Metodología

Etapa 1:

Pruebas *in vitro*

5.1 Material biológico

Se utilizaron cepas de BAL *Lacticaseibacillus paracasei* cepa T40 y *Enterococcus lactis* cepas T33, T38 y T39 las cuales fueron aisladas de queso artesanales elaborados con leche no pasteurizada (Falfán-Cortés et al., 2021). Como prebióticos se utilizaron la inulina de achicoria (Sigma-Aldrich) y los fructooligosacáridos de achicoria (FOS, Sigma-Aldrich). Como patógenos se utilizó *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560.y *Helicobacter pylori* ATCC 700392.

5.2 Identificación molecular de las cepas de BAL T33, T38 y T39

Las cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) utilizadas en este estudio fueron obtenidas de quesos elaborados de forma artesanal en México. Una de las cuatro cepas de BAL fue identificada anteriormente por Falfán-Cortés et al., 2021 En ese estudio la cepa T40 fue identificada como *Lacticaseibacillus paracasei* (renombrada de *Lactobacillus paracasei* por Zheng et al., 2020) con una identidad del 100%.

En el presente trabajo se realizó la identificación molecular de las 3 cepas de BAL (T33, T38 y T39) restantes. Mediante la amplificación del gen 16s rRNA. Las secuencias consenso obtenidas para cada una de las muestras se compararon con el programa nucleotide BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para encontrar similitudes entre secuencias biológicas. Se obtuvo un dendrograma utilizando el método de Neighbor-Joining.

5.3 Crecimiento de las 4 cepas de BAL en medio de cultivo con prebióticos

Se prepararon tubos de caldo MRS (30 mL) que contenían inulina o fructooligosacáridos (FOS) en 5 diferentes concentraciones [0 %, 0.6 %, 0.8 %, 1.0 %, 1.2 % (p/v)]. Por separado, los tubos de caldo MRS con las diferentes concentraciones de los 2 prebióticos fueron inoculados con 100 µL de cultivos de las cepas BAL (T33, T38, T39 y T40) de 3 resiembras consecutivas en caldo MRS a 37 °C por 24 h. Los tubos inoculados fueron incubados a 37 °C por 48 h. Se efectuó el recuento de las 4 cepas de BAL a partir de los caldos inoculados a las 24 y 48 horas de incubación mediante la técnica de vertido en placa utilizando agar MRS e incubando a 37 °C durante 48 h.

5.4 Resistencia de *C. jejuni* y *H. pylori* a antibióticos de uso común

La técnica de difusión en disco fue empleada para la realización de esta prueba (Jiménez-Villeda, 2016). 100 µL de cultivo joven de *C. jejuni* o *H. pylori* fueron colocados sobre agar Brain Heart Infusion (BHI) (BD Bioxon, México) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) el cultivo fue distribuido sobre la superficie del agar de forma uniforme con ayuda de una varilla de vidrio hasta su completa absorción. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro en los que se depositaron 10 µL de los antibióticos a evaluar. Finalmente, las cajas Petri fueron incubadas en condiciones microaerófilas (BD GasPak® EZ) durante 24 h a 37 °C. Pasado este tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición. Los antibióticos y concentraciones utilizados para el ensayo fueron tomados del manual Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. an informational supplement for global application developed through the clinical and laboratory standards institute (CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute, 2011) y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos empleados para la evaluación

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ácido nalidíxico	30
Amikacina	30
Ampicilina	10
Amoxicilina	20
Ceftriaxona	30
Ciprofloxacina	5
Cloranfenicol	30
Colistina	10
Eritromicina	15
Estreptomicina	10
Gentamicina	10
Kanamicina	30
Neomicina	10
Penicilina	10
Rifampicina	5
Tetraciclina	30
Trimetoprima	5

(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2011)

5.5 Efecto inhibitorio de BAL con y sin prebióticos contra *C. jejuni* y *H. pylori*

Se utilizaron las cepas de *C. jejuni* y *H. pylori*, éstas se cultivaron en caldo BHI suplementado con 5% de SFB en condiciones microaerófilas (BD GasPak® EZ) durante 24 h a 37 °C. Por otro lado, cada una de las 4 cepas de BAL fueron cultivadas en caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) e incubadas a 37 °C por 24h. La actividad inhibitoria de las diferentes cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 contra los patógenos se realizó mediante la técnica de difusión descrita en el apartado 5.5. En cada uno de los pozos, por separado se colocaron alícuotas de 50 µL de los cultivos de las 4 cepas de BAL (de forma libre) adicionadas con inulina o FOS con

diferentes concentraciones (0%, 0.6%, 0.8%, 1.0 %, 1.2%, p/v). Después de que el líquido de los cultivos se absorbió, las placas se incubaron 24 h en microaerofilia (BD GasPak® EZ) a 37 °C. Se registraron los diámetros de las zonas de inhibición (milímetros) alrededor de los pozos. El estudio se realizó por triplicado.

5.6 Efecto sinérgico de las mezclas de cepas BAL con y sin prebiótico contra *C. jejuni* y *H. pylori*

Para probar el posible efecto sinérgico al combinar las cepas de BAL contra lo patógenos objeto de estudio, se llevaron a cabo cuatro mezclas distintas, detalladas a continuación:

- Mezcla 1: Las dos cepas de BAL con el mejor efecto inhibitorio
- Mezcla 2: Las dos cepas de BAL con el mejor efecto inhibitorio adicionada 0.6 % de inulina
- Mezcla 3: Las cuatro cepas BAL (T33, T38, T39 y T40)
- Mezcla 4: Las cuatro cepas BAL (T33, T38, T39 y T40) adicionada con 0.6 % de inulina

Para preparar las mezclas se tomó 1 mL de cada cepa BAL (con una concentración estimada de 9 Log UFC/mL) según a las diferentes combinaciones y se inocularon en 30 mL de caldo MRS. Posteriormente, las diferentes mezclas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La actividad inhibitoria de las mezclas de cepas BAL contra *C. jejuni* o *H. pylori* se evaluó mediante la técnica de difusión descrita en la sección 5.5.

5.7 Efecto inhibitorio de la combinación de BAL con antibióticos contra *C. jejuni* y *H. pylori*

En un estudio previo se analizó la resistencia de las BAL a diversos antibióticos, de tal forma que para el desarrollo de esta prueba se emplearon únicamente los antibióticos a los que las BAL mostraron resistencia (Tabla 3). El efecto inhibitorio de cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 en combinación con antibióticos contra *H. pylori* y *C. jejuni* se realizó mediante la técnica de difusión en pozo (Sgouras et al. 2004) con algunas modificaciones. Un cultivo de 24 h de *C. jejuni* o *H. pylori* con

una concentración final de 10^8 CFU por caja de cultivo, se sembró por vertido en placa en agar BHI (BD Bioxon, México) suplementado con 5% de suero fetal bovino y conteniendo solo 1.2% de agar-agar. El medio de cultivo inoculado se dejó solidificar y sobre el agar se realizaron pozos de 6 mm de diámetro. Por separado, en cada uno de los pozos se colocaron alícuotas de 50 μ L de los cultivos de las 4 cepas de BAL adicionando 20 μ L de antibiótico (Tabla 3). Después de que el líquido de los cultivos se absorbió, las placas se incubaron 24 h en microaerófilia (BD GasPak® EZ) por 24 h a 37 °C. Se registraron los diámetros de las zonas de inhibición (milímetros) alrededor de los pozos. El estudio se realizó por triplicado.

Tabla 3. Antibióticos a los que las BAL mostraron resistencia

Antibiótico	Concentración (μg/mL)
Ácido nalidíxico	30
Amikacina	30
Ceftriaxona	30
Ciprofloxacina	5
Colistina	10
Estreptomicina	10
Gentamicina	10
Kanamicina	30
Neomicina	10

(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2011)

5.8 Detección de la presencia de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos en los cultivos de las BAL

La detección de la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos por las cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 se realizó de acuerdo a lo descrito por Prabhurajeshwar & Chandrakanth, (2017) con algunas modificaciones. Brevemente, las cepas de BAL se cultivaron por separado en 25 mL de caldo MRS a 37 °C durante 24 h, posteriormente los cultivos se centrifugaron a $4000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante de cada cepa de BAL se esterilizó por filtración

utilizando membranas (Millipore®, Merck) de un tamaño de diámetro de poro de 0.22 µm; los cultivos filtrados se recuperaron en tubos estériles y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. Por separado, para el ensayo de la presencia de bacteriocinas, 5 mL del sobrenadante estéril fue tratado con 1 mg/mL de tripsina. Para el ensayo de ácidos orgánicos, el pH de 5 mL del sobrenadante se ajustó a pH 6.5 ± 0.1 usando NaOH 1 N y para el ensayo de peróxido de hidrógeno, otros 5 mL del sobrenadante se trataron con una suspensión de la enzima catalasa al 0.5 mg/mL. La determinación del efecto antimicrobiano de los cultivos tratados se hizo mediante la técnica de difusión en pozos como se describió en el apartado 5.5. La producción del compuesto antimicrobiano se confirmó cuando no existía halo de inhibición. Alícuotas de 50 µL de cada uno de los sobrenadantes tratados, se colocaron en pozos de agar BHI (SFB 5% y agar-agar al 1.2%) que fueron inoculadas por vertido en placa con *C. jejuni* o *H. pylori* (10^6 UFC/mL). Después de que el líquido se absorbió, las placas se incubaron 24 h en microaerofilia (BD GasPak® EZ) a 37 °C. Se registraron los diámetros de las zonas de inhibición (milímetros) alrededor de los pozos. El estudio se realizó por triplicado.

5.9 Propiedades de adherencia *in vitro* de las BAL

5.9.1 Autoagregación de cepas de BAL *C. jejuni* y *H. pylori*

El estudio de autoagregación se realizó de acuerdo a lo descrito por Prabhurajeshwar & Chandrakanth. (2017), con algunas modificaciones. Brevemente, por separado, las 4 cepas de BAL se cultivaron durante 18 h a 37 °C en caldo MRS. Por otro lado *C. jejuni* y *H. pylori* se cultivaron en caldo BHI suplementado con 5% de SFB y se incubaron en microaerofilia (BD GasPak® EZ) por 24 h a 37 °C. Después, los cultivos de BAL y de los patógenos se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (BFS) a pH 7.3 a 3100 g durante 15 min. El paquete celular obtenido de cada bacteria se resuspendió en tubos que contenían BFS para obtener una concentración de entre 10^7 - 10^8 UFC/mL [densidad óptica (DO) de 0.6 - 0.7 a una longitud de onda de 560 nm]. Cada tubo se agitó en vortex durante 10 s y se incubaron sin agitación durante 24 h a 37 °C. Periódicamente (2, 4, 18 y 24 h), se midió la DO_{560} de los tubos. El porcentaje de autoagregación se expresó como en la Ecuación (1).

$$\%Autoagregación = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100$$

Ecuación (1)

Donde A_0 representa la absorbancia a 0 h y A_t representa la absorbancia a diferentes intervalos de tiempo (2, 4, 18 y 24 h).

5.9.2 Coagregación de BAL con *C. jejuni* y *H. pylori*

El análisis de coagregación se realizó según el método modificado de Collado *et al.* (2008). Brevemente, las cuatro cepas de BAL, *C. jejuni* y *H. pylori* se cultivaron por separado a 37 °C durante 24 h en MRS y BHI suplementado con SFB, respectivamente. A partir de los cultivos, se prepararon suspensiones lavadas de cada bacteria con una concentración de entre 10^7 - 10^8 UFC/mL, tal y como se describió en el apartado 5.10.1. En tubos estériles se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de cada BAL con la suspensión del patógeno (1:1 v/v) y se incubaron a 37 °C sin agitación durante 4 h. Se midió la absorbancia (A_{560}) de cada una de las mezclas. La coagregación se expresó en porcentaje y se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% Coagregación = \left[\frac{(A_{pat} + A_{Prob})}{2} - A_{mix} \frac{(A_{pat} + A_{Prob})}{2} \times 100 \right]$$

Ecuación (2)

donde, A_{pat} , es la absorbancia del patógeno, A_{Prob} es la absorbancia del probiótico y A_{mix} es la absorbancia de la mezcla representan la absorbancia (A_{560}) del patógeno individual, bacterias probióticas y su mezcla, respectivamente. Después de la incubación durante 4 h a 37 °C.

5.9.3 Hidrofobicidad de la superficie celular de BAL con *C. jejuni* y *H. pylori*

La hidrofobicidad de la superficie celular se determinó de acuerdo a Mishra & Prasad, (2005), Padmavathi *et al.* (2018) y Prabhurajeshwar & Chandrakanth, (2017). Cada una de las 4 cepas lácticas, *C. jejuni* y *H. pylori* se cultivaron en caldo

MRS o caldo BHI suplementado con SFB, respectivamente, por 24 h a 37 °C. Se lavaron 3 veces con PBS como se describió en el apartado 5.6.1, se ajustaron a una densidad óptica de 0.6-0.7 a 560 nm (DO_{560nm}), posteriormente se mezclaron en proporción 1:1 con n-hexadecano y se agitó durante 2 min y se almacenaron a temperatura ambiente por 60 min. Finalmente se midió la DO_{560nm} de la fase acuosa. La hidrofobicidad se expresó en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \frac{DO_{560 \text{ nm}} \text{ antes de mezclar} - DO_{560 \text{ nm}} \text{ después de mezclar}}{DO_{560 \text{ nm}} \text{ antes de mezclar}} \times 100$$

Ecuación (3)

La actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como alta (51-100%), media (30- 50%) y baja (0-29 %), según lo propuesto por Nader-Macías (2011).

5.10 Efecto inhibitorio de BAL sobre la actividad de la ureasa producida por *H. pylori*

El efecto inhibitorio de las BAL sobre la actividad de la ureasa producida por *H. pylori* se realizó de acuerdo a lo descrito por Rezaee et al. (2019), con modificaciones. Las cuatro cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS y se incubaron por 24 h a 37 °C, posteriormente se obtuvo el sobrenadante libre de células (SLC) de cada una de las bacterias lácticas (T33, T38, T39 y T40), una porción del SLC de cada BAL se ajustó a pH 6.5 con NaOH 1N. Por otro lado, se cultivó *H. pylori* en caldo BHI suplementado con SFB, por 24 h a 37 °C. Se preparó caldo BHI ajustado a pH 2, 3, 4 y 5 con HCl 5N. El caldo BHI con diferentes pH fue inoculado con *H. pylori* y con el 30% de SLC de las BAL o con el 30% del SLC de las BAL ajustado a pH 6.5, estas mezclas fueron incubadas por 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. La actividad de la ureasa se determinó mediante la modificación del rojo de fenol, para ello después de la incubación, a las mezclas se les añadió tampón urea (20% p/v urea, 0.12% rojo de fenol en PBS a pH 6.5) y se incubaron a 37 °C durante 120 min. El color resultante se leyó a una longitud de onda de 550 nm.

5.11 Microencapsulación de *L. paracasei* T40 y *E. lactis* cepas T33, T38 y T39

5.11.1 Secado por aspersión

Los cultivos de *Lacticaseibacillus paracasei* T40 y *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 se obtuvieron tras la activación mediante dos transferencias sucesivas en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. Para obtener el paquete celular, la suspensión celular (con $\approx 10^9$ UFC/Lm de concentración bacteriana final) se centrifugó (Labnet Z323K Hermile, Germany) a 2250xg durante 20 min. Por otro lado, se preparó una solución al 30% de sólidos totales (100 mL) con almidón de maíz modificado (N-lok®, Ingredion) como agente encapsulante. En este punto se agregó la inulina o FOS (0.6 %): según fuera el caso (en este paso solo se agregaron 90 mL de agua estéril). La mezcla se agitó a 3500 rpm (StableTemp, Cole-Parmer, Chicago; EE.UU.) durante 6 min. Los 10 mL de agua estéril restantes se añadieron al paquete celular para homogeneizarlo y ser añadido a la solución de almidón. Finalmente, la mezcla se homogenizó a 6000 rpm durante 30 segundos en un Ultra Turrax T-Homogenizador 25-SI (IKA Works, Wilmington, NC, EE.UU.). El proceso de microencapsulación se realizó con un secador por aspersión de laboratorio marca Buchi B 191 Labortechnik AG (Flawil, Suiza). La temperatura de entrada fue de 100 °C, y la temperatura de salida fue de 62 °C \pm 2 °C. La tasa de flujo de líquido fue de 4 mL/min, y el diámetro de la boquilla fue de 0.5 mm (Hernández-López et al., 2018).

Por otro lado, se sometieron al secador por aspersión las cuatro BAL sin material pared y sin prebiótico bajo las mismas condiciones de temperatura y de alimentación. Para ello, después de obtener el paquete celular de cada una de las cepas BAL se añadieron 10 mL de agua estéril, y se homogeneizó la solución con ayuda de un Vortex-2 mixer (Genie®), para posteriormente pasar la solución por el secador.

5.11.2 Eficiencia de encapsulación de *L. paracasei* T40 y *E. lactis* cepas T33, T38 y T39

El recuento bacteriano después del proceso de encapsulamiento se realizó por el método de vaciado en placa. Para ello, se realizó una solución con el mismo contenido de sólidos totales que la solución preparada antes de ser pasada por el secador donde se liberaron las células. Se tomó 1 mL de la solución y se colocó en

9 mL de solución diluyente de peptona; se realizaron ocho diluciones y 1 mL de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} se colocó en cajas petri para luego agregarles agar MRS y homogenizarlas. Las cajas fueron incubadas (Heratherm incubator, IGS180, Germany) a 37 °C durante 48 h, posteriormente se realizó el recuento de colonias y se reportó como UFC/g encapsulado.

La eficiencia de encapsulación de las bacterias encapsuladas (% EE) es una medida combinada de la eficacia de atrapamiento y supervivencia de células viables durante el procedimiento de la microencapsulación, fue calculada de acuerdo con la ecuación 4.

$$\% \text{ EE} = \left(\frac{N}{N_o} \right) \times 100$$

Ecuación (4)

Donde la eficiencia de encapsulación (%EE), se encuentra expresada en porcentaje; N es el número logarítmico de células por mililitro después del secado; y N_o es el número logarítmico de células por mililitro antes del secado (Rajam et al., 2012).

5.11.3 Morfología de las microcápsulas

La morfología de las cápsulas se observó en un microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras secas se colocaron en un porta muestras cubierto con cinta electroconductora de carbono de doble cara y luego se recubrieron durante 3 min con una capa de oro (0,5-1 nm de espesor). Las condiciones en que se observaron fueron 15 A y 20 kV (Hernández-López *et al.*, 2018).

5.11.4 Contenido de humedad.

El contenido de humedad de las microcápsulas fue determinado acorde al método 44-15.02 (AACC, 2000), donde 2 g de muestra fueron colocados en charolas de aluminio y se secaron en una estufa a 105 °C, durante 24 h. El contenido de humedad fue calculado por diferencia de peso antes y después de secar la muestra, de acuerdo a la ecuación 5:

$$\% \text{ de humedad} = \left(\frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \right) \times 100$$

Ecuación (5)

5.11.5 Actividad de agua.

Para determinar la actividad de agua de las microcápsulas, se empleó un equipo Aqua Lab LITE (Washington, EE. UU.). Las muestras fueron colocadas en contenedores propios del equipo y la medición se realizó a temperatura ambiente (± 25 °C).

5.11.6 Resistencia de BAL encapsuladas a pH similar al estomago

Se evaluó la tolerancia de las cepas de *L. paracasei* T40 y *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 y sus respectivas mezclas a pH similar al del tracto gastrointestinal.

Las microcápsulas recién preparadas o bien las células libres (9 log UFC/mL) fueron colocadas por separado en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio apropiado ajustado a pH 2 y 3, para posteriormente incubarlos (Heratherm incubator, IGS180, Germany) a 37 °C durante 1, 2 y 3 h. El recuento de células viables se realizó con agar MRS con un pH de 6.5 con rifampicina al 1 % (Hernández-López et al., 2018; Sathyabama et al., 2014). Las bacterias libres sirvieron como control. Los resultados se expresaron de acuerdo a la ecuación 6.

$$\% \text{ Resistencia a pH 2 o 3} = \left(\frac{\text{UFC pH 2 o 3}}{\text{UFC pH 6.5 control}} \right) \times 100$$

Ecuación (6)

Donde el porcentaje de resistencia de BAL microencapsuladas a pH 2 o 3 se expresó como: *UFC pH 2 o 3* son las Unidades Formadoras de Colonias obtenidas después de la exposición de las microcápsulas de BAL a esos valores de pH y *UFC control* son las Unidades Formadoras de Colonias obtenidas del crecimiento en el medio de cultivo ajustado a pH 6.5.

5.11.7 Resistencia a sales biliares

Para este test, 1 g de microcápsulas o 1 mL de suspensión de células libres fueron transferidos en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio apropiado con 0.3

g/100 mL de sal biliar y se incubaron a 37 °C. El conteo de células viables se llevó a cabo a las 0, 1.5 y 3 h. El porcentaje de supervivencia con respecto al control se calculó con la ecuación 7 (Modificación Hernández-López et al. 2018; Lee and Heo, 2000; Sathyabama et al. 2014).

$$\% \text{ Resistencia a sales biliares} = \left(\frac{\text{UFC sales biliares}}{\text{UFC control}} \right) \times 100$$

Ecuación (7)

Donde el porcentaje de resistencia de BAL microencapsuladas sales biliares se expresó como: *UFC sales biliares* son las Unidades Formadoras de Colonias obtenidas después de la exposición de las microcápsulas de BAL en medio de cultivo (caldo MRS) con 0.3% de sales biliares y *UFC control* son las Unidades Formadoras de Colonias obtenidas del crecimiento en caldo MRS.

5.11.8 Viabilidad de BAL microencapsuladas con y sin prebióticos en condiciones controladas de temperatura y humedad

La viabilidad durante el almacenamiento se evaluó según el método propuesto por Cortés et al. (2014) con algunas modificaciones. Las células microencapsuladas se evaluaron en dos actividades de agua (*aw*) para cada temperatura (7 °C y 30 °C): 0.32 (MgCl₂) y 0.75 (NaCl). Para ello, 1 g de microcápsulas que contenían T33, T38, T39 y T40 con y sin prebióticos fueron colocadas en charolas y almacenadas en desecadores que contenían las soluciones saturadas mencionadas anteriormente. La viabilidad de las células se determinó semanalmente por cuatro semanas de almacenamiento a ambas temperaturas.

Metodología

Etapa 2:

Pruebas *in vivo*

5.12 Evaluación *in vivo* el efecto inhibitorio de *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 en mezcla, con y sin prebióticos encapsuladas contra *C. jejuni*.

5.12.1 Declaración de ética.

El cuidado, la utilización y la alimentación de los animales se realizaron de conformidad con las directrices del Comité de Bioética del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

5.12.2 Animales

Se emplearon ratones machos BALB/c de seis a ocho semanas de edad con un peso de 22.0 ± 2.0 g obtenidos en el bioterio de la UAEH. Los animales se mantuvieron en jaulas (8 animales / jaula) con temperatura controlada ($22^{\circ} \text{C} \pm 2$) con un ciclo de 12 h de luz/obscuridad con dieta estándar y agua a libertad. Los ratones permanecieron una semana en proceso de adaptación.

5.12.3 Grupos experimentales

Los tratamientos de las cepas BAL microencapsuladas con o sin prebiótico que serían administrados a ratones, se definieron de acuerdo a los resultados de efecto inhibitorio contra *C. jejuni*, las propiedades de adherencia, su resistencia a condiciones adversas similares a las de tracto gastrointestinal *in vitro*. De tal forma que, la distribución de los grupos experimentales se llevó a cabo tal cual se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos experimentales

Tratamiento	Dieta	Complemento	Días de administración del complemento	Día de infección con <i>C. jejuni</i> (10^8 UFC/mL) Única dosis.	Día de finalización de experimento
Negativo	Dieta estándar	----	----		
Positivo	Dieta estándar	----	----	21	
Antibiótico	Dieta estándar	Oxitetraciclina (5 mg/K)	4 horas después de la infección por 7 días	21	28*
T38+0.6%INU	Dieta estándar	Microcápsulas de T38 + 0.6% inulina	21	21	
T39	Dieta estándar	Microcápsulas T39	21	21	
T33+0.6%INU	Dieta estándar	Microcápsulas T33 + 0.6% inulina	21	21	

*Después del día 21 ya no se administró ningún complemento con BAL, solo el antibiótico.

5.12.4 Protocolo de estudio *in vivo*

Los ratones se dividieron en seis tratamientos anteriormente descritos (Tabla 4). El tratamiento que se llevó a cabo fue con régimen profiláctico en cual consistió en administrar por 21 días consecutivos los diferentes tratamientos encapsulados de BAL (10^8 UFC/g) vía oral con ayuda de una cánula intragástrica calibre 20. La administración se llevó a cabo por las mañanas, en condiciones de esterilidad en el laboratorio IV del bioterio de la UAEH. Los ratones fueron pesados diariamente. En el día 21 los ratones de los tratamientos 2 al 6 según la Tabla 4 fueron infectados con una dosis única de *C. jejuni* (10^8 UFC/mL). Esto se llevó a cabo mediante la administración de 100 μ L del microorganismo con la ayuda de una sonda intragástrica. Posterior a la infección los ratones se mantuvieron sin administración de BAL o patógeno hasta el día 28, día en que finalizó el experimento. Antes del sacrificio se extrajo aproximadamente 1 mL de sangre del seno retroviral de cada uno de los animales para análisis posteriores. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Fueron extraídos diversos órganos como intestinos, estómago, recto, bazo e hígado. Los intestinos, el estómago y el recto fueron lavados con buffer fosfato salino (BFS) a pH 7.3 Estéril (121 °C, 15 psi, 15 minutos). Los órganos fueron diseccionados para la realización de los análisis histológicos y microbiológicos. El resto de los órganos se procesaron ese mismo día para los análisis microbiológicos.

5.12.5 Análisis inmunológicos

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a $1000 \times g$ durante 15 min a 4 °C y el plasma aislado se almacenó a -80 °C. Los niveles de IL-6 en ratones se midieron usando el kit ELISA de interleucina 6 de ratón (R&D System, Minneapolis, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.12.6 Análisis microbiológico

Los intestinos y el estómago de los ratones se extrajeron en condiciones de esterilidad, cada uno fue colocado en una caja Petri estéril, posteriormente estos fueron lavados tres veces con Buffer Fosfato Salino (BFS) para eliminar el contenido intestinal y una vez que los órganos estuvieron libre de dicho contenido, se procedió homogeneizar adecuadamente los intestinos, para posteriormente realizar

diluciones decimales de cada una de las muestras transfiriendo 1 mL de las muestras a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de diluyente de peptona hasta llegar a la dilución 10^{-6} . De cada una de las diluciones se tomó 1 mL el cual se colocó en una caja Petri a las cuales se les vertió agar MRS con rifampicina o bien agar BHI con SFB al 5% con rifampicina para determinar BAL o *C. jejuni*. A las cepas objeto de estudio se les indujo resistencia a rifampicina previamente (Jiménez-Villeda, 2016). Las cajas petri fueron incubadas por 48 h a 37 °C, una vez concluida la incubación se procedió a realizar el conteo.

5.13 Análisis estadístico

Todos los estudios se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software Statistica v 7.0, StatSoft, 2009). Se utilizó el análisis de varianza a una vía (ANOVA), aplicando una prueba Tukey ($p < 0.05$). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar en tablas o en gráficas.

Resultados

Etapa 1:

Pruebas *in vitro*

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación se muestran en dos etapas. En la primera se presentan y discuten los resultados obtenidos de la identificación molecular de las cepas de BAL T33, T38 y T39, así como de las pruebas realizadas *in vitro* entre las que destacan: Actividad antimicrobiana de las cepas de BAL contra *C. jejuni* y *H. pylori*, efecto antimicrobiano de mezclas de BAL en medios con prebióticos, detección de la presencia de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos en los cultivos de las BAL, crecimiento bacteriano de las BAL en medio con y sin prebiótico, propiedades de adherencia de las bacterias probióticas, entre otras. En la segunda etapa se presentan los resultados obtenidos de las pruebas *in vivo* como los obtenidos de la adherencia de BAL en intestinos de ratón BALB/c, adherencia de *C. jejuni* en intestinos de ratón BALB/c, translocación de *C. jejuni* en bazo e hígado de ratón BALB/c.

6.1 Identificación molecular de las cepas de BAL T33, T38 y T39

El ADN obtenido a partir de las cepas de BAL fue de 130, 180 y 180 ng/μL para la cepa T33, T38 y T39 respectivamente. A partir de estas concentraciones se amplificó el gen 16s ARNr ribosomal, dando resultado positivo. El producto de la PCR fue secuenciado y editado, obteniendo una secuencia consenso del fragmento 16S ribosomal con un total 1471 nucleótidos para la cepa T33. Para la cepa T38 se amplificaron 1472 nucleótidos, después de su edición y consenso. Por último, para la cepa T39 se amplificaron 1477 nucleótidos. Todas las secuencias fueron idénticas, se tomó la secuencia con más nucleótidos (T39) para realizar su búsqueda BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), y la secuencia más similar fue con el género *Enterococcus* especie *lactis* cepa E843 con un numero de acceso CP082267.1 con una cobertura de la secuencia del 100% y una identidad del 100%. Se realizó un dendrograma (Figura 6) con las diferentes secuencias de las cepas aisladas (T33, T38 y T39) para observar su relación con el género *Enterococcus* especie *lactis*. El análisis de las secuencias de gen 16S ribosomal permitió establecer la relación entre las cepas de estudio, además de conocer la seguridad de estas bacterias lácticas para ser empleadas como

probióticos. Actualmente, *E. lactis* no se utiliza en algún producto alimenticio comercial, sin embargo en diferentes estudios se han reportado sus propiedades probióticas (Ben Braïek et al., 2018b; Nami et al., 2015; Sharma et al., 2021; Uymaz Tezel, 2019).

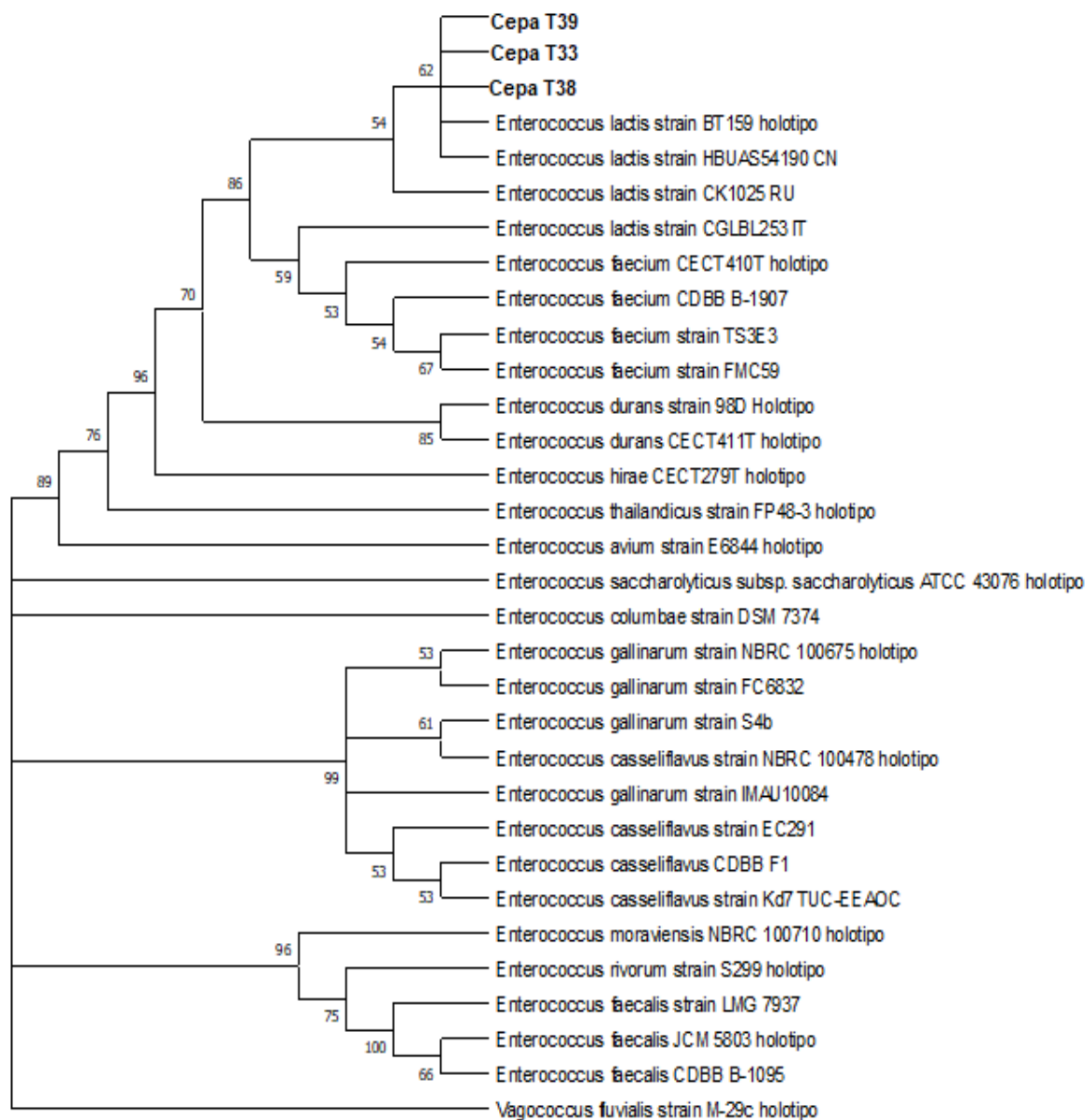


Figura 6. Dendrograma de similitud de la secuencia consenso del fragmento 16S ribosomal de las cepas T33, T38 y T39 con un total de 1448 posiciones de nucleótidos por medio del algoritmo de Neighbor-Joining (3-Tamura) y valores de Bootstrap con 1000 repeticiones

6.2 Crecimiento bacteriano de las BAL en medio con y sin prebiótico

En la Figura 7 y 8 se muestra el crecimiento de las 4 cepas de BAL en medio MRS con o sin inulina o FOS. En general, no se observó un mayor crecimiento de las cepas de BAL cuando el medio contenía FOS en las concentraciones ensayadas (Figura 7). Sin embargo, para el caso de la inulina, se observó el mayor crecimiento ($p < 0.05$) respecto al control con la cepa T40 y una concentración de inulina del 0.6% y con la cepa T33 y 0.8% de inulina (Figura 8). Kareem et al. (2014) determinaron el crecimiento de diferentes cepas de *L. plantarum* con diversas concentraciones de inulina (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0%), la cepa *L. plantarum* RS5 mostro tener el mayor crecimiento en presencia de inulina al 0.8%. Por otro lado, recientemente Renye et al. (2021) demostraron que las cepas *L. acidophilus* 1426 y *L. reuteri* 1428 fueron capaces de metabolizar la inulina y FOS en medio MRS sin glucosa y con el 1% de alguno de los 2 prebióticos. Diversos estudios han demostrado que *Lactobacillus* spp incrementa su desarrollo en presencia de inulina o FOS (Boger et al., 2018; Kaplan & Hutkins, 2000; Liong & Shah, 2005).

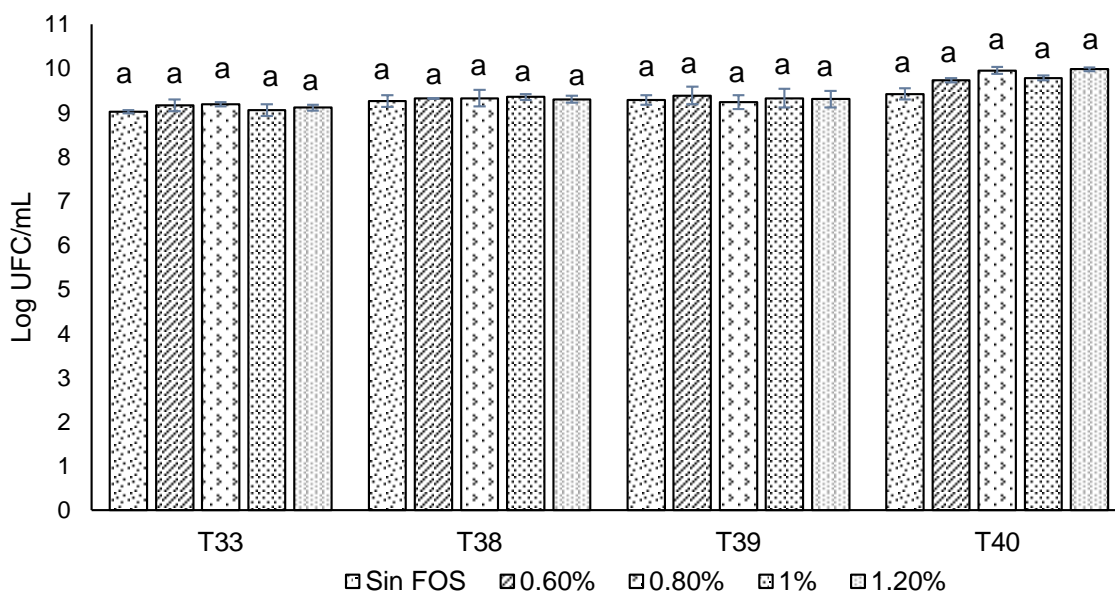


Figura 7. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de las cepas BAL T33, T38, T39 y T40 después de crecer a 37 °C durante 48 h en caldo MRS con diferentes concentraciones de fructooligosacaridos (FOS).

La inulina y los FOS son fibra dietética no digeribles por enzimas del humano y otros animales, pero sí son digeribles por algunas bacterias como las BAL, por lo que presentan actividad prebiótica (Gibson et al., 2017; Renye et al., 2021). Se ha

determinado que la ruta empleada por las especies de *L. paracasei* para degradar los FOS involucra a la enzima GH32 β -fructofuranosidasas que se encuentra anclada a la superficie de la pared celular, la cual realiza la hidrólisis extracelular de FOS (Goh et al., 2006). Los productos hidrolíticos (fructosa, sacarosa y glucosa) son captados por uno o más transportadores que los llevan al interior de la célula bacteriana (Goh & Klaenhammer, 2015). Este modo de utilización de los FOS le da a los lactobacilos una ventaja competitiva en el tracto intestinal porque el sustrato se transporta a la célula antes de la hidrólisis, lo que reduce la posibilidad de que los carbohidratos individuales se conviertan en fuente de carbono fermentable para las cepas competidoras en el ambiente intestinal (Petrova & Petrov, 2017).

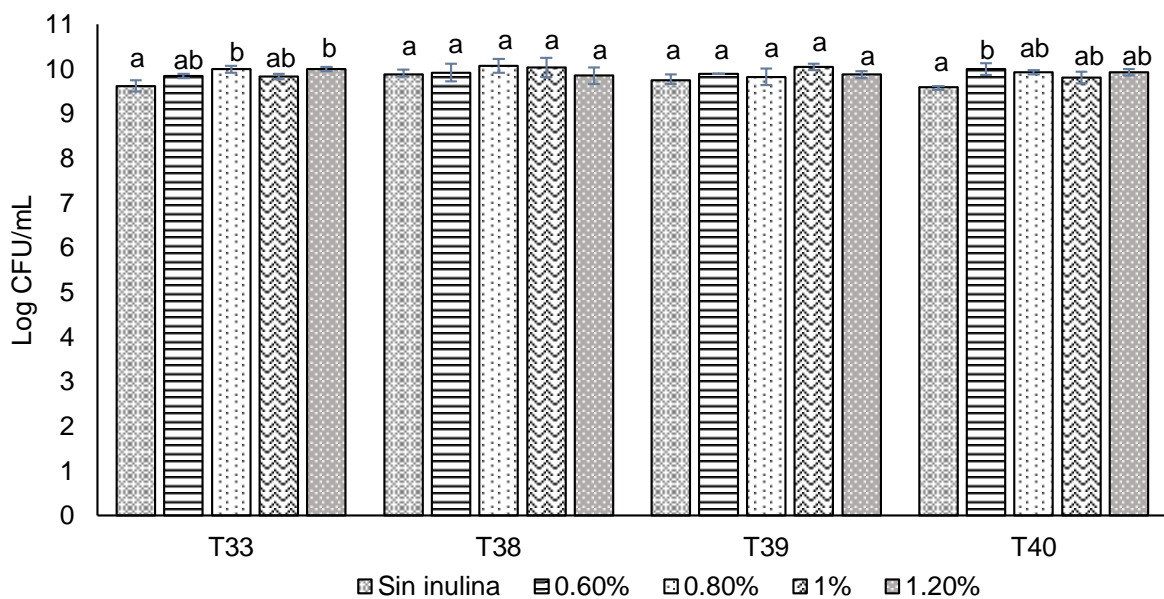


Figura 8. Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de las cepas BAL T33, T38, T39 y T40 después de crecer a 37 °C durante 48 h en caldo MRS con diferentes concentraciones de inulina.

En nuestro estudio las cuatro cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 fueron capaces de crecer en presencia de los prebióticos (Figura 7 y 8), sin embargo, no existió diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al crecimiento de las 4 cepas de BAL en el caldo MRS sin inulina o FOS con respecto al crecimiento en el mismo caldo de

cultivo que contenía a los prebióticos. No obstante, es importante señalar que, en un estudio posterior, las cuatro cepas de BAL fueron cultivadas en caldo MRS que se elaboró con todos los ingredientes excepto el azúcar de la formulación original, en su lugar se incorporó la inulina o los FOS; en este caldo de cultivo las 4 cepas de BAL crecieron alcanzando niveles cercanos a los alcanzados en el caldo MRS comercial sin prebióticos (datos no mostrados). Esto sugiere que las 4 cepas de BAL son capaces de metabolizar la inulina o los FOS a 37 °C lo que podría ser una ventaja de su desarrollo dentro del colon y, posiblemente incrementar su beneficio para la salud del huésped (Renyé et al., 2021). En contraste, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) cuando se cultivaron en caldo MRS solo, en comparación con caldo MRS enriquecido con inulina o fructooligosacáridos (FOS). Esto se debe a que el caldo comercial utilizado ya contenía un 20 % de glucosa, y la adición de prebióticos generó un exceso de fuente de energía, lo que impidió la evidencia del aprovechamiento de los prebióticos

6.3 Resistencia de *C. jejuni* y *H. pylori* a antibióticos de uso común

Se evaluó la resistencia de *C. jejuni* y *H. pylori* a diecisiete antibióticos de uso común, entre los antimicrobianos analizados incluyeron inhibidores de la síntesis de pared celular (ampicilina), inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclina, eritromicina, estreptomicina, cloranfenicol, kanamicina) e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (ácido nalidíxico). Los resultados de las pruebas de sensibilidad/resistencia se expresan en la Tabla 5.

El manual Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2011) clasifica la resistencia microbiana en tres niveles: Sensible (S), Sensibilidad Intermedia (SI) y Resistente (R). De esta forma es que se obtiene el nivel de resistencia que presenta el microorganismo evaluado.

Por otro lado, la OMS (2021) ha establecido que *H. pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Campylobacter* spp son algunos de los microorganismos que en los últimos años han mostrado los niveles más altos de resistencia a diversas generaciones de

antibióticos poniendo en riesgo la salud humana. En este mismo sentido la OMS ha establecido niveles de prioridad para que estos patógenos sean considerados clave en proyectos de investigación, desarrollo e innovación de nuevos antibióticos (OMS, 2021). *H. pylori* y *Campylobacter* spp, son considerados en el nivel de Prioridad 2: Elevada. En este nivel se encuentran aquellos microorganismos cuya farmacorresistencia va incrementando con el paso del tiempo y que además están relacionados con muchos casos de enfermedades. Por ejemplo, *H. pylori* está asociado con casos de ulcera gástrica, gastritis crónica, linfoma tipo MALT y cáncer

Tabla 5. Resistencia a antibióticos presentada por *H. pylori* y *C. jejuni*

Antibiótico	Cepas	
	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>
Ácido nalidíxico	R	R
Amikacina	R	R
Ampicilina	R	R
Amoxicilina	R	R
Ceftriaxona	R	R
Ciprofloxacina	R	R
Cloranfenicol	R	R
Colistina	R	R
Eritromicina	R	R
Estreptomicina	R	R
Gentamicina	R	R
Kanamicina	R	R
Neomicina	R	R
Penicilina	R	R
Rifampicina	R	R
Tetraciclina	R	R
Trimetoprima	R	R
Porcentaje de resistencia	100%	100%

R: Resistente, SI: Sensibilidad intermedia, S: Sensible

gástrico. Por otro lado, *Campylobacter* spp está asociado con diarrea del viajero e infecciones gastrointestinales invasivas. Además de la resistencia creciente a los antibióticos, su diagnóstico es complejo, pues necesita requerimientos específicos para cultivo (OMS, 2021).

Actualmente, el tratamiento farmacológico para contrarrestar infecciones causadas por *H. pylori*, constan de más de tres fármacos entre los que destacan inhibidores de la bomba de protones. Sin embargo, existe evidencia científica que demuestra que estas terapias no garantizan la erradicación de este microorganismo alcanzando únicamente porcentajes de erradicación entre 55 y 77% (Kutluk et al., 2014). Por otro lado, *C. jejuni* en los últimos años ha reportado un incremento en la resistencia a antibióticos como eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina por mencionar algunos debido a las mutaciones espontáneas y transferencia horizontal de genes (Elhadidy et al., 2020; Hlashwayo et al., 2020; Kumar et al., 2016; Wieczorek and Osek, 2013).

Nishizawa and Suzuki, (2014) reportaron los mecanismos de resistencia de *H. pylori* a fármacos como macrólidos, nitroimidazol, β -lactámicos, claritromicina y tetraciclina llevándose a cabo mediante mutaciones en la región peptidiltransferasa codificada en el ARNr 23S, además de diversas mutaciones relacionadas con el gen *rdxA*, varias mutaciones en el gen *pbp* que codifica la proteína de unión a penicilina, y a la generación de β -lactamasa y alteraciones en el gen 16S rRNA, respectivamente.

Por otro lado, Coticchia et al. (2006) cuantificaron la densidad de biopelícula producida por *H. pylori* en la superficie de la mucosa gástrica humana en pacientes con ureasa positiva y negativa hallando que los pacientes que dieron positivo en la prueba de ureasa para *H. pylori*, el porcentaje promedio de superficie total cubierta por biopelículas fue del 97.3% mientras que los pacientes que dieron negativo tuvieron una cobertura de superficie promedio de sólo el 1.64%. Estos resultados sugieren la prevalencia de biopelículas de *H. pylori* en la mucosa gástrica humana. Más tarde Yonezawa et al. (2019) realizaron demostraron que las cepas clínicas de

H. pylori TK1402 y TK1049 podrían aumentar la tolerancia a la claritromicina, amoxicilina y metronidazol después de la formación de biopelículas.

Dado que *C. jejuni* puede experimentar transformación de manera natural, es probable que se adquieran genes adicionales que confieren resistencia a los antibióticos. Las fluoroquinolonas (FQ) incluyen los antibióticos más utilizados (es decir, ciprofloxacina) para tratar la diarrea bacteriana aguda, aunque los macrólidos son el fármaco de elección si se sospecha fuertemente de campilobacteriosis (Guerrant et al., 2001).

En *Campylobacter*, se han identificado dos mecanismos ampliamente reconocidos que explican la resistencia a las FQ: (1) la desactivación del sitio de acción de las FQ y (2) la expulsión de las FQ. Estos dos mecanismos colaboran de manera sinérgica (Yan et al., 2006). En términos generales, los dos sitios enzimáticos intracelulares de las FQ son la ADN girasa, cuyos componentes son codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*, y la topoisomerasa IV, que guarda similitud estructural y cuyos componentes son codificados por los genes *parC* y *parE* (Wieczorek & Osek, 2013).

Derivado a los resultados hallados en la presente investigación en donde se reporta un 100% de resistencia en *H. pylori* y *C. jejuni* cuando fueron expuestos a 17 antibióticos diferentes, además de los reportes de otras investigaciones demostrando está misma resistencia y aunado a esto las recomendaciones emitidas por la OMS se evidencia la importancia que merece la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos.

Por esta razón, el enfoque de la presente investigación se centró en evaluar el efecto antimicrobiano de diversas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) enriquecidas con inulina y fructooligosacáridos (FOS) encapsulados. El propósito de esto es buscar otras alternativas para el tratamiento de infecciones provocadas por los patógenos anteriormente mencionados

6.4 Actividad antimicrobiana de las cepas de BAL con prebiótico contra *C. jejuni*

Solo tres de las cuatro cepas de BAL presentaron efecto sinérgico contra *C. jejuni* cuando fueron cultivadas en MRS sin prebiótico como en medio suplementado con alguno de los dos prebiótico ensayados con diámetros de las zonas de inhibición de entre 8 a 13.5 mm (Tablas 6 y 7). La cepa T39 mostró el mayor efecto antagónico y la T40 no mostró efecto (Tablas 6 y 7). En general, los prebióticos a las concentraciones evaluadas no incrementaron el efecto sinérgico de las BAL contra *C. jejuni* (Tablas 6 y 7). Solo en algunos casos se observó un incremento significativo en el efecto antimicrobiano de las cepas de BAL contra *C. jejuni* atribuido a alguno de los dos prebióticos de estudio (Tablas 6 y 7).

Es importante señalar que recientemente se evaluó la actividad antimicrobiana de las mismas cepas de la presente investigación (T33, T38, T39 y T40) contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *S. Typhimurium* hallando zonas de inhibición de entre 9 a 19 mm. Contra esos patógenos, la cepa T40 fue la que presentó el mayor efecto inhibitorio (Falfán-Cortés et al. 2022). Sin embargo, en el presente estudio, esta cepa no tuvo efecto contra *C. jejuni*. Estos resultados en el efecto inhibitorio sugieren que la cepa T40 podría producir alguna bacteriocina que tiene efecto contra *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* pero que no afecta a *C. jejuni*. Es sabido que las bacteriocinas inhiben solo especies estrechamente relacionadas o a algunos microorganismos grampositivos (Helander, et al., 1997).

Tabla 6. Efecto inhibitorio (mm) *in vitro* de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivados en caldo MRS con y sin inulina contra *C. jejuni*.

Inulina	Cepas BAL			
	T33	T38	T39	T40
0 %	8.2 ± 1.0 ^a	9.7 ± 0.7 ^a	13 ± 0.0 ^c	N/E
0.6 %	10.8 ± 1.3 ^b	9.8 ± 1.0 ^a	9.7 ± 0.3 ^{ab}	N/E
0.8 %	10.0 ± 0.0 ^{ab}	9.8 ± 0.3 ^a	12.2 ± 0.3 ^c	N/E
1.0 %	10.3 ± 0.3 ^b	9.7 ± 0.6 ^a	9.1 ± 0.1 ^a	N/E
1.2 %	10.7 ± 0.6 ^b	10.3 ± 0.3 ^a	10.3 ± 0.6 ^b	N/E

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar.
^{a, b, c.} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. N/E: Efecto inhibitorio no observado. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Fooks and Gibson (2002) determinaron el efecto inhibitorio de *L. plantarum* y *L. pentosus* frente a *C. jejuni* empleando como única fuente de carbono FOS observando zonas de inhibición de entre 5 mm y 8 mm, respectivamente. En el presente estudio las zonas de inhibición contra *C. jejuni* obtenidas fueron superiores a los reportados por esos investigadores utilizando FOS como única fuente de carbono. Se ha reportado que los principales productos metabólicos finales de las fermentaciones de *Lactobacillus* y *Enterococcus* que disminuyen el pH del medio es principalmente el ácido láctico. (Gänzle, 2015).

Tabla 7. Efecto inhibitorio (mm) *in vitro* de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivados en caldo MRS con y sin fructooligosacaridos contra *C. jejuni*.

FOS	Cepas BAL			
	T33	T38	T39	T40
0 %	8.9 ± 0.2 ^a	10.4 ± 0.5 ^{ab}	10.9 ± 0.3 ^b	N/E
0.6 %	10.7 ± 0.2 ^b	10.9 ± 0.2 ^b	9.9 ± 0.3 ^a	6.9 ± 0.4
0.8 %	11.3 ± 0.3 ^c	10.6 ± 0.4 ^{ab}	10.1 ± 0.3 ^a	N/E
1.0 %	11.6 ± 0.7 ^c	10.7 ± 0.8 ^{ab}	10.8 ± 0.2 ^b	N/E
1.2 %	11.2 ± 0.4 ^{bc}	10.0 ± 0.7 ^a	10.8 ± 0.3 ^b	N/E

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar.
^{a, b, c.} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. N/E: Efecto inhibitorio no observado. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Hasta ahora, se han identificado tres vías metabólicas de FOS en los lactobacilos: Los operones *mma* (metabolismo de múltiples azúcares), *fos* y *ptsBCA*. (Altermann et al., 2003; C. Chen et al., 2015; Goh et al., 2006; Yong et al., 2007). Se halló que los *L. paracasei* y *L. casei*, presentan una forma distinta a *L. acidophilus* y *L. plantarum* para llevar a cabo la hidrólisis de FOS. *L. paracasei* y *L. casei* realizan la hidrólisis de FOS fuera de la célula y los productos hidrolíticos correspondientes se transportan al interior de la célula (Figura 9)(Cui & Qu, 2021). Los experimentos transcripcionales y funcionales han demostrado que un operón *fosRABCDXE* desempeña un papel importante en el metabolismo de FOS por parte de *L. paracasei* cepa 1195, que contiene fructosa/glucosa PEP dependiente-PTS (PEP: fosfoenolpiruvato; PTS: sistema fosfotransferasa) relacionados con genes *fosABCD*, *fosE* gen precursor de β -fructosidasa, un gen *fosR* regulador transcripcional y un gen *fosX* codificador de proteínas (Goh et al., 2006). *FosE* está a cargo de la hidrólisis extracelular de FOS, ubicándose en la membrana celular mediante una unión con la región C-terminal (Cui & Qu, 2021).

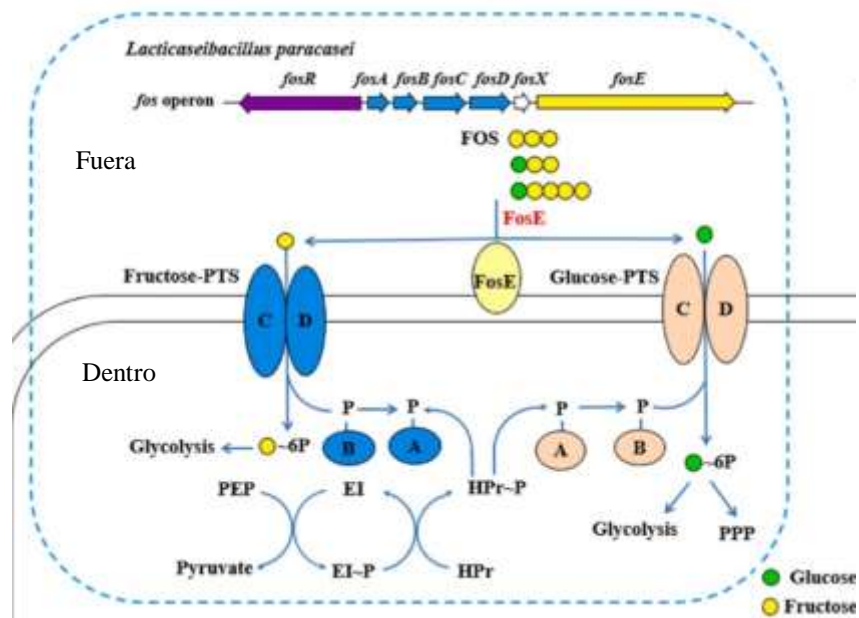


Figura 9. Metabolismo de FOS en *L. paracasei*. (Tomado y modificado de Cui & Qu, 2021) Los FOS, la inulina, la sacarosa o la fructosa podrían inducir la actividad de la β -fructosidasa, pero la glucosa no. Además, la expresión de genes inducidos por FOS fue reprimida por la adición de glucosa, lo que indica que el metabolismo de FOS

está sujeto a regulación catabólica (Goh et al., 2006). Algunos de los compuestos generados después del metabolismo que podrían atribuir al efecto inhibitorio son sobre todo ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y ácido propiónico (Luyao et al., 2024).

En la actualidad no se ha descrito a detalle el metabolismo de *Enterococcus lactis*. Sin embargo, se sabe que los *Enterococcus* llevan a cabo el metabolismo de los carbohidrato mediante tres rutas: la glucólisis, también conocida como ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Entner-Doudoroff y la pentosa fosfato (Ramsey et al., 2014) .

Sabe que la degradación del piruvato sigue varias vías que conducen a al menos cinco productos finales de la fermentación, dependiendo de las condiciones de crecimiento: lactato, acetoína, formiato, etanol y acetato (Snoep et al., 1991). Se sabe que el lactato es el producto final de la fermentación predominante y es uno de los iones más abundantes secretados por los enterococos en condiciones anaeróbicas con exceso de glucosa. El lactato, con una pK_a de 3,8, es aniónico en todos los valores de pH metabólico y, por tanto, no puede atravesar libremente la membrana celular (Ramsey et al., 2014).

En investigaciones recientes se ha evidenciado la presencia de diversos genes en los *E. lactis* entre los que destacan *AcAcm* y *SgrA* que están relacionados con la adhesión bacteriana *BopD* es un regulador transcripcional de unión a azúcar *clpP*, *cpsA* y *hasC* están asociados con el metabolismo bacteriano. El gen *bsh* codifica la hidrolasa de sales biliares (Fu et al., 2022). Probablemente la producción de los diversos compuestos, aunado a la expresión de diversos genes hagan que presente buenas propiedades probióticas, entre las que destaca el efecto inhibitorio.

6.5 Actividad antimicrobiana de las cepas BAL con prebiótico contra *H. pylori*

Como se aprecia en las Tablas 8 y 9 las cuatro cepas de BAL (T33, T38, T39 y T40) con prebiótico (inulina o FOS) presentaron efecto sinérgico inhibitorio contra *H. pylori* con diámetros de las zonas de inhibición de entre 6.9 a 20.7 mm. La cepa T39

con 1% de inulina mostró el menor efecto antagónico y la T38 con 0.6% de inulina mostró el mayor efecto. En general, los prebióticos a las concentraciones ensayadas lograron incrementar el efecto sinérgico de las BAL contra *H. pylori* (Tablas 8 y 9). Las cepas T33 y T38 con inulina y FOS, respectivamente mostraron un incremento significativo p (<0.05) en el efecto antimicrobiano contra *H. pylori* atribuido a los prebióticos de estudio.

Tabla 8. Efecto inhibitorio (mm) *in vitro* de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivadas en caldo MRS con y sin inulina contra *H. pylori*

Inulina	Cepas BAL			
	T33	T38	T39	T40
0 %	10.6 ± 0.4^a	10.9 ± 0.1^a	8.0 ± 0.5^b	8.5 ± 0.5^a
0.6 %	14.2 ± 1.1^b	20.7 ± 1.9^c	8.3 ± 0.3^{bc}	8.2 ± 0.3^a
0.8 %	13.6 ± 0.7^b	19.9 ± 1.0^{bc}	8.8 ± 0.3^c	8.0 ± 0.3^a
1.0 %	13.6 ± 0.8^b	18.9 ± 0.8^b	6.9 ± 0.2^a	8.3 ± 0.4^a
1.2 %	13.8 ± 0.3^b	11.3 ± 0.5^a	7.3 ± 0.5^a	7.8 ± 1.0^a

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) \pm desviación estándar.

^{a, b, c, d}Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Estos resultados indican que la producción de compuestos antimicrobianos por las cepas T33, T38, T39 y T40 puede ser modulada por la fuente de carbono. En algunas investigaciones se ha evidenciado que algunas cepas de BAL como *Enterococcus lactis* producen diversos compuestos antibacterianos (ácido láctico y peróxido de hidrógeno) entre los que destacan las enterocinas, ya que presentan termoestabilidad y son activas en un rango de pH de 4.0 a 9.0 (Ben Braïek et al., 2017, 2018a, 2018b; Sharma et al., 2021).

Además, existen reportes que indican que algunas cepas de BAL como *L. plantibacillus* y *Levilactobacillus* (S27, S42 y S61) cambiaron la producción de ácidos orgánicos (ácidos láctico, oxálico y málico) al cambiar los prebióticos FOS o xilooligosacáridos (XOS). En presencia de XOS los ácidos orgánicos eran más diversos y con mayor contenido, mientras que en presencia de FOS estaban

altamente dominados por los ácidos oxálico y láctico, respectivamente. Cuando las cepas S27, S42 y S61 fueron adicionadas con FOS no presentaron efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* ATCC 19117 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. Sin embargo, en presencia de XOS, los rangos de zonas de inhibición obtenidos contra las bacterias patógenas fueron de 20.77 a 22.27 mm. (Abouloifa et al., 2020). Podría ser que, las cepas BAL objeto del presente estudio también estén experimentando un cambio de producción de metabolitos al adicionar un prebiótico diferente (inulina o FOS) evidenciándose en los diferentes niveles de inhibición contra *H. pylori* obtenidos.

Tabla 9. Efecto inhibitorio (mm) *in vitro* de cepas BAL T33, T38 y T39 y T40 cultivadas en caldo MRS con y sin fructooligosacaridos contra *H. pylori*

FOS	Cepas BAL			
	T33	T38	T39	T40
0 %	19.5 ± 0.5 ^a	11.6 ± 0.4 ^a	12.7 ± 0.4 ^b	8.5 ± 0.7 ^a
0.6 %	10.8 ± 0.3 ^c	13.1 ± 0.4 ^b	12.5 ± 0.5 ^{ab}	9.4 ± 0.2 ^{bc}
0.8 %	11.1 ± 0.5 ^c	12.8 ± 0.2 ^b	12.2 ± 0.4 ^a	9.8 ± 0.3 ^c
1.0 %	10.0 ± 0.1 ^{ab}	13.0 ± 0.4 ^b	12.3 ± 0.4 ^{ab}	9.0 ± 0.0 ^b
1.2 %	10.5 ± 0.4 ^{bc}	13.0 ± 0.1 ^b	12.0 ± 0.0 ^a	9.7 ± 0.4 ^c

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar.

^{a, b, c, d}Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40, FOS=fructooligosacáridos.

Sun et al. (2018) determinaron que cuatro cepas de *Lactobacillus* sin la adición de prebióticos inhibieron el crecimiento de *H. pylori*. Por otro lado, Zheng et al. (2016) evaluaron el efecto inhibitorio de la cepa *L. pentosus* LPS16 sin prebiótico contra *H. pylori* ATCC43505 y J99 mostrando zonas de inhibición de alrededor 15 mm. En nuestro estudio las zonas de inhibición contra *H. pylori* obtenidas por la cepa T38 fueron superiores a lo reportado por los investigadores cuando se suplemento el medio de cultivo con inulina

El impacto antimicrobiano exhibido por las cepas T33 y T38 fue más pronunciado con inulina en comparación con FOS. Esto podría atribuirse a que son fuentes de

carbono distintas, lo que podría ocasionar una modificación en la producción de ciertos compuestos antimicrobianos. Estos cambios podrían tener un efecto más mayor o menor en la actividad antimicrobiana contra *H. pylori*.

6.6 Efecto antimicrobiano de mezclas de BAL en medios con prebióticos

Diversos productos probióticos comerciales están elaborados a partir de mezclas de distintas cepas entre las que destacan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, y *Streptococcus* (Fenster et al. 2019), sin embargo, en la mayoría de los casos, estos productos que contienen una mezcla de bacterias, no han sido evaluados. Regularmente, se analiza el efecto inhibitorio de cada cepa de manera individual y por separado, en lugar de considerar la mezcla en conjunto. A menudo se asume que la combinación de todas las BAL o probióticos que han demostrado un efecto inhibitorio o beneficioso de manera individual se mantendrá e incluso se sumará en la mezcla; sin embargo, esta suposición posiblemente no sea así. Se observó que ninguna de las mezclas de las BAL presentó mayor efecto inhibitorio ($p < 0.5$) contra *H. pylori* o *C. jejuni* que el que mostró cada una de las cepas individuales (Tabla 10 y 11), ni tampoco se vio estimulado su crecimiento bacteriano en comparación con las BAL de manera individual (datos no mostrados).

Tabla 10. Halos de inhibición (mm) de cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 crecidas individualmente y en mezclas en caldo MRS con y sin inulina contra *H. pylori*

Inulina	Cepas BAL					
	T33+T38	T33+T38+T39+T40	T33	T38	T39	T40
0 %	9.0 ± 0.6 ^b	7.5 ± 0.8 ^a	7.5 ± 0.5 ^a	8.7 ± 0.5 ^b	9.0 ± 0.0 ^b	7.0 ± 0.6 ^a
0.6 %	9.3 ± 0.5 ^b	6.5 ± 0.4 ^a	9.3 ± 0.3 ^b	10.7 ± 0.5 ^c	10.2 ± 0.4 ^c	6.8 ± 0.3 ^a

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar.

^{a, b}, Valores con letras minúsculas diferentes en la misma fila expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Es posible que al mezclar las BAL, una de ellas inhiba la actividad de la otra o de las otras, de tal manera que el efecto inhibitorio de la mezcla sea el resultado de una sola bacteria; o de la mezcla, pero con un efecto disminuido por la inhibición mutua entre las cepas de BAL. Otra posibilidad es que, al estar presentes más de

una cepa, la cantidad de fuente de carbono disponible sea insuficiente para el desarrollo de todas las cepas, es decir, que la disponibilidad de la fuente de energía sea limitada.

Tabla 11. Halos de inhibición (mm) de cepas de BAL T33, T38, T39 y T40 crecidas individualmente y en mezclas en caldo MRS con y sin inulina contra *C. jejuni*.

Inulina	Cepas BAL					
	T33+T38	T33+T38+T39+T40	T33	T38	T39	T40
0 %	N/E	6.3 ± 0.4 ^a	7.9 ± 0.9 ^b	10.2 ± 0.9 ^c	12.1 ± 0.6 ^d	N/E
0.6 %	6.2 ± 0.4 ^a	N/E	10.6 ± 0.4 ^c	10.9 ± 0.6 ^c	9.2 ± 0.3 ^b	N/E

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma fila expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. N/E: Efecto inhibitorio no observado. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40

Myllyluoma et al. (2008) evaluaron el efecto de las mezclas de diferentes bacterias tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* Js y *Bifidobacterium breve* Bb99 sobre la adhesión epitelial de *H. pylori*, observaron que con ninguna de las mezclas se presentó el efecto antiinflamatorio en comparación cuando las bacterias se evaluaron de forma individual. Por otro lado, Fooks and Gibson, (2003) demostraron que *C. jejuni* se logró inhibir solo mediante la mezcla de *Lactobacillus plantarum* 0407 y *Bifidobacterium bifidum* Bb12, junto con oligofructosa y xilooligosacáridos. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que al mezclar BAL o probióticos no se siempre se genera un efecto sinérgico inhibitorio contra microorganismos patógenos. Sin embargo, sería interesante investigar si otros efectos beneficiosos, como la estimulación del sistema inmunológico, la competencia por el sitio de acción, la coagregación con el patógeno, entre otros, podrían potenciarse al realizar la mezcla.

6.7 Sinergismo entre BAL y antibióticos contra *C. jejuni* y *H. pylori*

Se evaluó el efecto inhibitorio de BAL (T33, T38, T39 y T40) en combinación con antibióticos contra *C. jejuni* y *H. pylori*. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 12 y 13. De acuerdo a la Tabla 12, se puede apreciar que la cepa T33 no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la combinación de esta cepa con kanamicina y esta misma cepa de forma individual, siendo estos dos tratamientos los que mejor inhibieron a *C. jejuni*. En el caso de la cepa T38 las combinaciones que mejor efecto inhibitorio presentaron fue la combinación con gentamicina y kanamicina, respetivamente.

La cepa T39 presentó el mismo comportamiento que la cepa T38, es decir, el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni* lo presentó en combinación de gentamicina y kanamicina. Por último, la cepa T40 y el antibiótico de forma individual no mostraron efecto inhibitorio alguno contra *C. jejuni*.

Tabla 12. Efecto inhibitorio de mezclas de BAL con antibióticos contra *C. jejuni*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)				
	Antibiótico	T33 + Antibiótico	T38 + Antibiótico	T39 + Antibiótico	T40 + Antibiótico
Control (BAL)	---	110.89 ± 0.33 ^{de}	9.33 ± 0.13 ^{ab}	9.17 ± 0.12 ^a	N/E
Ácido nalidíxico	N/E	10.18 ± 0.22 ^{bc}	8.80 ± 0.13 ^a	9.77 ± 0.30 ^{ab}	N/E
Amikacina	N/E	9.89 ± 0.08 ^{abc}	N/E	9.74 ± 0.39 ^{ab}	N/E
Ceftriaxona	N/E	9.60 ± 0.10 ^a	8.58 ± 0.17 ^a	9.45 ± 0.04 ^a	N/E
Ciprofloxacina	N/E	N/E	8.84 ± 0.23 ^a	N/E	N/E
Colistina	N/E	10.40 ± 0.13 ^{cd}	9.12 ± 0.42 ^a	N/E	N/E
Estreptomicina	N/E	10.25 ± 0.12 ^c	9.12 ± 0.32 ^a	N/E	N/E
Gentamicina	N/E	9.67 ± 0.14 ^{ab}	9.52 ± 0.24 ^c	10.51 ± 0.55 ^b	N/E
Kanamicina	N/E	10.95 ± 0.23 ^e	9.36 ± 0.54 ^{bc}	10.52 ± 0.10 ^b	N/E
Neomicina	N/E	10.32 ± 0.22 ^c	9.00 ± 0.26 ^a	9.96 ± 0.18 ^{ab}	N/E

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b, c, d, e,}

Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. N/E: Efecto inhibitorio no observado. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Por otro lado, cuando la cepa T33 se combinó con los diferentes antibióticos se puede observar que no presentaron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la inhibición de *H. pylori*, respecto al control (únicamente la BAL) (Tabla 13). Por otro lado, la cepa T38 con ácido nalidíxico fue la combinación que presentó el mayor efecto inhibitorio contra *H. pylori* de entre las diferentes combinaciones de T38 con antibióticos. Sin embargo, esta combinación no presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con el efecto inhibitorio obtenido por la cepa T38 de forma individual. Por otra parte, la cepa T39 de forma individual mostró la mayor inhibición contra el patógeno de prueba (Tabla 13) en comparación con las diferentes combinaciones con antibióticos. Por el contrario, la cepa T40 no evidenció en ninguna de las combinaciones establecidas inhibición contra *H. pylori*. Esto mismo ocurrió cuando se probó el efecto inhibitorio que podría tener el antibiótico de forma individual contra dicho patógeno.

De esta forma se demostró que la adición de los antibióticos de prueba no presentó sinergismo con las diferentes cepas de BAL en la inhibición de *H. pylori*, patógeno objeto de estudio. Y también se reafirman los resultados obtenidos en una investigación previa (Jiménez-Villeda, 2016), en donde se demostró que las cepas T33, T38 y T39 son resistentes a los antibióticos empleados en la presente prueba.

En comparación con los resultados obtenidos en la Tabla 13 en donde se evidenció que la incorporación de antibióticos a las diferentes de cepas de BAL no incrementó su efecto inhibitorio contra *H. pylori*. Para *C. jejuni* sucedió lo contrario ya que las cepas de *E. lactis* T33, T38 y T39 en combinación con algunos antibióticos mostraron el mejor efecto inhibitorio.

Si bien la combinación de BAL con antibióticos no mostró sinergismo alguno en la inhibición de *H. pylori*. Esta combinación podría tener otros beneficios como los reportados por Wu et al. (2019) quienes suplementaron la administración de una terapia triple de fármacos con *Bacillus subtilis* y *E. faecalis* en individuos infectados con *H. pylori* y descubrieron que la suplementación con probióticos con puede inhibir la reducción de la microbiota intestinal.

Tabla 13. Efecto inhibitorio de mezclas de BAL con antibióticos contra *H. pylori*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm)				
	Antibiótico	T33 + Antibiótico	T38 + Antibiótico	T39 + Antibiótico	T40 + Antibiótico
Control (BAL)	---	9.76 ± 0.09 ^a	11.75 ± 0.00 ^{bc}	11.59 ± 0.25 ^b	N/E
Ácido nalidíxico	N/E	10.82 ± 0.33 ^a	12.10 ± 0.00 ^c	11.08 ± 0.03 ^{ab}	N/E
Amikacina	N/E	10.49 ± 0.25 ^a	N/E	11.56 ± 0.45 ^b	N/E
Ceftriaxona	N/E	9.59 ± 0.20 ^a	11.00 ± 0.44 ^{ab}	10.53 ± 0.36 ^a	N/E
Ciprofloxacina	N/E	N/E	10.89 ± 0.21 ^{ab}	N/E	N/E
Colistina	N/E	10.12 ± 0.07 ^a	10.93 ± 0.29 ^{ab}	N/E	N/E
Estreptomina	N/E	10.54 ± 0.26 ^a	10.95 ± 0.17 ^{ab}	N/E	N/E
Gentamicina	N/E	10.53 ± 0.95 ^a	10.79 ± 0.6 ^{ab}	11.51 ± 0.29 ^b	N/E
Kanamicina	N/E	10.64 ± 0.72 ^a	10.25 ± 0.50 ^a	10.98 ± 0.25 ^{ab}	N/E
Neomicina	N/E	10.82 ± 0.48 ^a	11.37 ± 0.29 ^{bc}	11.14 ± 0.03 ^{ab}	N/E

¹Promedio de tres repeticiones del diámetro de inhibición (mm) ± desviación estándar. ^{a, b, c} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. N/E: Efecto inhibitorio no observado. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

Por otro lado, la combinación de BAL con antibióticos mejoró el mejor efecto inhibitorio contra *C. jejuni*. Es decir, T33, T38 y T39 mostraron tener el potencial de actuar sinérgicamente con los antibióticos. Algunos ensayos *in vitro* han demostrado que la combinación de tetraciclina y caldo de fermentación de probióticos tiene mayores efectos antimicrobianos contra las cepas clínicamente resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* que la tetraciclina o el caldo de fermentación de probióticos por sí solos (Sumithra & Mahalakshmi, 2022).

Yang and Yang (2018) llevaron a cabo un estudio antibacteriano contra *Clostridium difficile* y los resultados mostraron que el sobrenadante de *Bifidobacterium brevis* YH68 puede mejorar el efecto sinérgico de los antibióticos.

En consecuencia, una combinación de probióticos y antibióticos puede tener un mayor efecto antibacteriano contra patógenos Gram negativos o Gram positivos (Lau et al., 2016).

6.8 Detección de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos presentes en cultivos de BAL

Respecto a la detección de bacteriocinas, peróxido de hidrogeno y ácidos orgánicos de acuerdo a la Tabla 14, las cuatro cepas de BAL ensayadas produjeron al menos un compuesto relacionado con la actividad antimicrobiana. Los ensayos sugieren que las cepas T38, T39 y T40 producen bacteriocinas, ácido orgánico y peróxido de hidrógeno y la cepa T33 solo peróxido de hidrogeno (Tabla 14).

La inhibición de *H. pylori* y *C. jejuni in vitro* por las diferentes BAL se podría tribuir a la producción de estos compuestos con efecto antibacteriano. Más específicamente, los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de BAL T38, T39 y T40 que fueron tratados con tripsina (1 mg/mL) no presentaron ningún efecto inhibitorio frente a *H. pylori* y *C. jejuni* comparado con el sobrenadante que no fue tratado con la enzima. Mientras que el sobrenadante de T33 tratado presentó efecto inhibitorio.

Esto indica que el efecto inhibitorio de las cepas T38, T39 y T40 se debe a la posible producción de bacteriocinas o enterocinas. Ya que la tripsina en una enzima proteolítica, tiene la capacidad de hidrolizar proteínas (Kaur & Singh, 2022). Al exponer los sobrenadantes libres de células a esta enzima, se persigue determinar la naturaleza proteica de las sustancias inhibidoras. La pérdida de las actividades inhibitorias después del tratamiento con estas enzimas sugiere la naturaleza proteica o peptídica de las bacteriocinas (Jawan et al., 2021).

Ben Braïek et al.(2018a) mostraron por primera vez que algunas cepas de *Enterococcus lactis* son capaces de producir enterocinas, especialmente las enterocinas A, B y P, que inhiben no solo patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, sino también hongos.

Por otro lado, los sobrenadantes de las mismas 4 cepas de BAL que fueron tratados ahora con catalasa (0.5 mg/mL) tampoco presentaron efecto inhibitorio contra *H. pylori* y *C. jejuni*, lo que indica que la inhibición también pudiera atribuirse a la producción de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el sobrenadante ajustado a pH 6.5 no mostró ningún efecto inhibidor frente a *H. pylori* y *C. jejuni* para las cepas

T38, T39 y T40, lo que sugiere que el efecto inhibitorio de estas 2 cepas sobre *H. pylori* y *C. jejuni*, podría deberse también por la producción de ácidos orgánicos (Tabla 14). No obstante, en el caso de T33 si se observó efecto inhibitorio del cultivo a pH 6.5 (Tabla 14).

Tabla 14. Compuestos antimicrobianos producidos por cepas BAL T33, T38 y T39 contra *H. pylori* y *C. jejuni*.

Cepas BAL	Compuesto antimicrobiano	Cepas patógenas	
		<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>
T33	H ₂ O ₂	+	+
	Bacteriocina	-	-
	Ácidos orgánicos	-	-
T38	H ₂ O ₂	+	+
	Bacteriocina	+	+
	Ácidos orgánicos	+	+
T39	H ₂ O ₂	+	+
	Bacteriocina	+	+
	Ácidos orgánicos	+	+
T40	H ₂ O ₂	+	+
	Bacteriocina	+	+
	Ácidos orgánicos	+	+

Prabhurajeshwar and Chandrakanth, (2017) reportaron que tres cepas de *Lactobacillus* T2, T4 y T16 inhibieron diferentes bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *S. Typhi* y *Shigella*. Probaron que el efecto inhibitorio se podría atribuir a la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno. Por otro lado, Touré et al. (2003) evaluaron la acción inhibidora de *Bifidobacterium* sp., cepas RBL67, RBL68 y RBL70, observaron que los sobrenadantes de cultivos de las cepas que fueron tratados con pronasa-E , proteinasa-K y tripsina a una concentración final de 1 mg/mL no presentaron efecto

inhibitorio contra *Listeria monocytogenes* LSD332, mientras que los sobre nadantes de los cultivos no tratados con las enzimas sí presentaron actividad antimicrobiana. Los investigadores concluyeron que el efecto antagónico de las cepas de *Bifidobacterium* sp, podría ser atribuido a la producción de bacteriocinas específicamente alguna bifidocina.

Neal-McKinney et al. (2012) reportaron que la capacidad inhibitoria de cepas de *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum* y *L. helveticus* sobre *C. jejuni*, se debió principalmente a la producción de ácido orgánicos, ya que cuando neutralizaron el pH del sobre nadante de los cultivos, estos disminuyeron de manera notable la actividad antimicrobiana sobre *C. jejuni*. Estos investigadores también determinaron la posible producción de bacteriocinas por las mismas cepas de BAL, no obstante, observaron que los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de BAL que fueron tratados con tripsina o proteinasa K no redujo su efecto antimicrobiano contra *C. jejuni* (Neal-McKinney et al., 2012). Es importante señalar que el efecto antimicrobiano de las diferentes cepas de BAL que se pueden encontrar en el medio ambiente, animales o en los alimentos no solo se debe a la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos y/o peróxido de hidrogeno, existen otros compuestos químicos como ácidos grasos de cadena corta, reuterina, etc. que son producidos por las BAL y que también tiene efecto (Reis et al., 2012).

6.9 Propiedades de adherencia de las bacterias probióticas

La capacidad de las bacterias probióticas para adherirse a las células epiteliales y su posterior colonización en el tracto gastrointestinal, es una propiedad que les confiere ventaja en el intestino, por lo que es una propiedad deseable en las BAL con potencial probiótico o en las cepas probióticas. Algo semejante ocurre con las bacterias patógenas, no obstante, para ese caso no es una propiedad deseable. En el presente estudios se determinaron 3 propiedades de adhesión *in vitro* de las 4 cepas de BAL y de patógenos *H. pylori* y *C. jejuni*.

6.9.1 Autoagregación de las cepas de BAL y de patógenos *H. pylori* y *C. jejuni*

La autoagregación de las diferentes cepas de BAL se correlaciona con la adherencia bacteriana a las células epiteliales (Collado et al., 2008; Kim et al., 2022). La autoagregación está dada por la aglomeración de bacterias de la misma cepa (Lee et al., 2014). Esta capacidad es una condición previa para la colonización y la mejora de la persistencia de las cepas bacterianas en el tracto gastrointestinal (Kim et al., 2022; Lee et al., 2014). Además, el equilibrio de la microbiota en el tracto gastrointestinal aumenta con la autoagregación (Tulumoglu et al., 2013).

En la Tabla 15 se muestran los resultados del ensayo de autoagregación de las cepas de BAL, *H. pylori* y *C. jejuni* ensayadas. Las tasas promedio de autoagregación de las cepas oscilaron entre 19 y 43 % a las 24 h de incubación. Los mayores valores en promedio se observaron con T33, seguido de T39 y T40 con 42.9, 40.4 y 36.3%, respectivamente.

La cepa T38 mostró la tasa de autoagregación más baja. *H. pylori* mostro una tasa de autoagregación del 22%. Mientras que *C. jejuni* mostró una tasa de autoagregación del 30%. Ben Braïek *et al.* (2018) hallaron tasas de 31% de autoagregación para cepas de *Enterococcus lactis* aisladas de camarones crudos. Por otro lado, Ahmadova *et al.* (2013) registraron un valor de autoagregación de *E. faecium* AQ71 de 55%.

Por otra parte, Li *et al.* (2015) reportaron valores de autoagregación para *E. faecalis* J2 y *E. faecalis* 5-5 de 16.46 y 22.80%, respectivamente. En otro estudio, Kim et al. (2022) reportaron un valor de autoagregación para *L. casei* cepa FBL6 del 30%. En general, los valores de autoagregación de cepas de BAL que se han reportado por diferentes investigadores son similares a los valores obtenidos en la presente investigación.

Tabla 15. Porcentaje de autoagregación de BAL cepas T33, T38, T39, T40, *H. pylori* y *C. jejuni*

Cepas bacterianas	Autoagregación (%)			
	2 h	4 h	18 h	24 h
T33	¹ 2.6 ± 0.3 ^a	5.8 ± 0.9 ^b	16.9 ± 0.5 ^c	42.9 ± 1.9 ^d
T38	2.3 ± 1.4 ^a	4.6 ± 1.1 ^a	15.6 ± 1.7 ^b	19.1 ± 1.7 ^b
T39	2.0 ± 0.6 ^a	2.5 ± 0.2 ^a	30.9 ± 0.1 ^b	40.4 ± 1.6 ^c
T40	8.0 ± 0.7 ^b	3.4 ± 1.3 ^a	29.6 ± 1.2 ^c	36.3 ± 2.0 ^d
<i>H. pylori</i>	2.7 ± 0.4 ^a	6.4 ± 0.7 ^b	18.5 ± 1.3 ^c	22.0 ± 1.2 ^d
<i>C. jejuni</i>	4.4 ± 1.1 ^a	13.2 ± 0.7 ^d	16.5 ± 0.3 ^b	29.8 ± 1.3 ^c

¹Promedio de tres repeticiones (%) ± desviación estándar.

^{a, b, c, d} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40.

En un estudio realizado por Yonezawa et al. (2010) hallaron que *H. pylori* cepas SS1, ATCC 43579, NCTC11638 y KR2003 presentaron una autoagregación de alrededor del 40%. Por otro lado, Attaran and Falsafi (2017) determinaron la autoagregación de dos aislados de *H. pylori* 19B y 4B hasta en un 70%. La diferencia entre los valores obtenidos en el presente estudio y los reportados en otras investigaciones podría atribuirse al tipo de cepa. Además, los autores antes mencionados describen la relación que existe entre autoagregación y la formación de biopelículas en algunas cepas de *H. pylori*, citando que a mayor autoagregación la generación de biopelículas es más evidente.

Por otra parte, se han reportado valores de autoagregación de diferentes cepas de *C. jejuni* que van desde 12 a 75% (Lee et al. 2016; Noreen et al. 2019). La diferencia en la capacidad de autoagregación de *C. jejuni* en las diferentes investigaciones y en lo hallado en la presente investigación, podría estar dada por el tipo de cepa de *C. jejuni*. Por otro lado, la capacidad de autoagregación de *C. jejuni* podría desempeñar un papel en la invasividad a las células intestinales, además la capacidad de autoagregación sirve como marcador de virulencia de muchos patógenos bacterianos entéricos Gram-negativos (Chiang et al., 1995; Menozzi et al., 1994; Salaheen et al., 2014).

6.9.2 Coagregación de BAL con *C. jejuni* y *H. pylori*

Los resultados de la coagregación de *L. paracasei* T40 y de *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 en presencia de *H. pylori* y *C. jejuni* después de 4 h a 37 °C, se muestran en la Tabla 16. La cepa T33 exhibió la mayor capacidad de coagregación (24.2 %) con *H. pylori* en comparación con las otras cepas de BAL. Por otro lado, la cepa T40 exhibió la mayor capacidad de coagregación (24.1 %) con *C. jejuni*. Los hallazgos de esta investigación son superiores a los resultados reportados por Nami et al. (2019). Estos autores reportaron valores de coagregación de *Enterococcus* con *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus subtilis* de entre 9.7 a 25 %. Por otro lado, Kim et al. (2022) reportaron que *L. casei* FBL6 mostró una tasa de coagregación con *S. Typhimurium* de alrededor del 30%.

Tabla 16. Porcentaje de coagregación de cepas BAL T33, T38, T39 and T40 con *H. pylori* y *C. jejuni*.

Cepas BAL	Coagregación (%)	
	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>
T33	¹ 24.2 ± 0.4 ^a	23.6 ± 0.6 ^a
T38	23.8 ± 0.5 ^a	23.8 ± 0.6 ^a
T39	23.7 ± 0.5 ^a	24.1 ± 0.1 ^a
T40	23.5 ± 0.4 ^a	24.1 ± 0.2 ^a

¹Promedio de tres repeticiones (%) ± desviación estándar

^{a, b, c}, Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40

Por otra parte, Juntarachot et al. (2023) reportaron que *L. paracasei* SD1 presentó una coagregación con *H. pylori* de 38.2%, sin embargo estos autores indicaron que a pH ácidos (2-3) la coagregación entre diferentes cepas de BAL y *H. pylori* se incrementaba. Campana et al. (2017) reportaron valores de coagregación de diversas cepas de BAL contra *C. jejuni* de entre 3 a 19%. También, Khan et al. (2020) observaron valores de coagregación de diferentes cepas e BAL con *C. jejuni* de entre 2.5 a 23.3 %.

La coagregación se refiere a la agrupación entre dos especies bacterianas diferentes (E. Kim et al., 2022). La capacidad de coagregación de las cepas de BAL y patógenas puede dificultar la colonización del intestino por bacterias patógenas, disminuyendo la probabilidad de infección (K. W. Lee et al., 2014). Tareb et al. (2013) mencionaron que la capacidad de las BAL para coagregarse con bacterias patógenas podría atribuirse a las interacciones entre las proteínas de la superficie celular de las BAL y los patógenos, así como a las interacciones entre los carbohidratos de ambos microorganismos. Por otro lado, Collado et al. (2008) reportaron que la capacidad de coagregación de las BAL depende del tiempo y de las características de la superficie de las cepas bacterianas.

En general, los valores de coagregación de las diferentes cepas BAL con *H. pylori* y *C. jejuni* que se reportan en la presente investigación son superiores a los reportado por otros autores.

6.9.3 Hidrofobicidad de la superficie celular

Los porcentajes de hidrofobicidad de las BAL examinadas de *H. pylori* y *C. jejuni* se muestran en la Tabla 17. Se encontraron valores de hidrofobicidad de entre 3.1 a 87 % para las diferentes BAL. El menor valor de hidrofobicidad fue para la cepa T39 y el más alto para T40. Cabe señalar que las cepas T33, T38 y T40 exhibieron mayores porcentajes de hidrofobicidad que los reportados para otras cepas de BAL (Ayyash et al. 2018, Padmavathi et al. 2018).

Algunos autores como Juntarachot et al. (2023) determinaron la hidrofobicidad de la superficie celular de *H. pylori* ATCC43504 obteniendo un porcentaje de 15.42%. Por otro lado, Liu et al. (2022) evaluaron las propiedades de adherencia de *H. pylori* entre las que destaco la prueba de hidrofobicidad superficial hallando valores de aproximados al 10%. Los valores reportados por otros autores para *H. pylori* en cuanto a hidrofobicidad se refiere se encuentran por encima de los hallados en la presente investigación. Habrá de mencionar que las diferentes propiedades celulares son inherentes de cada una de las cepas de estudio. Es por ello que, aunque estemos hablando del mismo género y especie de un microorganismo pueden existir deferencias entre sus propiedades celulares.

Tabla 17. Porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas BAL T33, T38, T39, T40, *H. pylori* y *C. jejuni*

Cepas BAL	Hidrofobicidad de la superficie celular (%)
T33	¹ 21.0 ± 0.1 ^b
T38	20.0 ± 0.8 ^b
T39	3.2 ± 0.9 ^a
T40	87.6 ± 1.1 ^d
<i>H. pylori</i>	5.37 ± 0.9 ^a
<i>C. jejuni</i>	28.7 ± 0.3 ^c

¹Promedio de tres repeticiones (%) ± desviación estándar

^{a, b, c.} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40

Por otro lado, *C. jejuni* presentó un valor de hidrofobicidad de 28.7 % (Tabla 17). Este valor es superior al reportado por otros investigadores. Tabashsum et al. (2019) reportaron un porcentaje de hidrofobicidad de *C. jejuni* de 14.5%. También, Lee et al. (2016) reportaron un valor de 10.5 % de hidrofobicidad para *C. jejuni*. En el caso de *Campylobacter*, el aumento de la hidrofobicidad y una mayor carga superficial negativa se han relacionado con una mejor unión a las células epiteliales humanas (Nguyen et al., 2011). Cabe señalar que en el presente estudio *L. paracasei* T40 mostró un porcentaje de hidrofobicidad del 87%, lo que podría significar mayor afinidad a las células epiteliales y por tanto una mejor adhesión, compitiendo de esta forma por el sitio de acción con *C. jejuni* quien presento un valor de hidrofobicidad inferior.

La hidrofobicidad es una propiedad de la superficie celular de las bacterias; esta le permite interaccionar y adherirse a superficies hidrófobas. La hidrofobicidad se correlaciona con la capacidad de adhesión de las bacterias a las células epiteliales. La mayoría de las superficies del cuerpo humano son en su mayoría de carácter hidrófobo. Esto promueve la unión de las bacterias, ya que las bacterias con superficies hidrofóbicas pueden tener una mayor afinidad por las superficies hidrofóbicas de las células epiteliales intestinales. Esta afinidad puede facilitar la

unión de las bacterias al epitelio. intestinal (Ayyash et al., 2018; Duary et al., 2011; Zuo et al., 2016). Por lo tanto, una mayor hidrofobicidad resulta en una mayor adherencia de las bacterias a las células epiteliales del intestino (Nami et al., 2019).

Es importante señalar que la adherencia bacteriana al epitelio intestinal es un proceso multifacético que involucra múltiples factores, y la hidrofobicidad es solo uno de ellos. Otros factores, como la presencia de fimbrias, pili, lectinas, y factores específicos de la bacteria y del huésped, también desempeñan un papel crucial en la capacidad de las bacterias para colonizar el tracto gastrointestinal (M. Kim et al., 2010).

6.10 Efecto de las cepas de BAL sobre la actividad de la ureasa producida por *H. pylori*

H. pylori emplea varios factores de virulencia bacteriana como la acumulación de ureasa en el citoplasma, los factores de adhesión, la citotoxina A vacuolizante y el gen A asociado a la citotoxina para invadir el estómago del huésped, causar enfermedades y evadir las defensas del huésped. La expresión de estos factores de virulencia están asociados con la patogenicidad de *H. pylori* (Sgouras et al., 2015).

Específicamente, la ureasa producida por *H. pylori* es una metaloenzima que hidroliza la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 en su entorno, neutralizando el ácido clorhídrico del estómago, lo que ocasiona aclorhidria transitoria, con un pH gástrico neutro; propiciando un microambiente que le permite sobrevivir mientras se mueve para llegar al epitelio gástrico (Cervantes-García, 2016).

La actividad ureasa se determinó en un medio que contenía tampón fosfato, urea y rojo fenol al 0.012% (como indicador de pH). El principio de este análisis fue la producción de amonio debido a la hidrólisis de la urea, determinándose mediante la absorbancia a 550 nm.

H. pylori fue crecido en medio de cultivo BHI con 5% SFB ajustado a pH 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Los diferentes ajustes de pH se realizaron con la finalidad de determinar la actividad de la ureasa. Por otro lado, se valoró la capacidad de los SLC (sobrenadante libre de células) de las cepas BAL para inhibir la actividad de la ureasa en los rangos de pH antes mencionados.

En la Figura 10 se aprecia la actividad de ureasa producida por *H. pylori* a diferentes pH, así como el efecto inhibitorio del SLC de las cepas BAL. De forma general, se observa que los SLC de T33, T38, T39 y T40 lograron inhibir la actividad de la ureasa. Por otro lado, se muestra que a medida que el pH incrementa la actividad de la ureasa también lo hace, esto se debe principalmente a que los canales *ureI* de *H. pylori* ya que se abren por completo a pH 5 (Figura 10 d), lo que permite la entrada rápida de urea en la bacteria, produciéndose cantidades inusualmente grandes de amonio (Kao et al., 2016). No obstante, la inhibición de la actividad de ureasa por parte de los SLC de las cepas BAL fue significativamente ($p < 0.5$) mejor en todos los tratamientos en comparación con los tratamientos en los el SLC fue ajustado a pH 6.5.

El efecto de inhibición de los SLC de la cepas BAL se perdió cuando este fue ajustado en pH de 6.5, lo que indica que este efecto puede estar mediado por los ácidos orgánicos presente en SLC, tal y como lo describe Rezaee et al. (2019), quienes probaron el poder inhibitorio del SLC ocho cepas de BAL hallando que cuando se ajustaba el pH del SLC a pH 7 este perdía el efecto inhibitorio frente a la actividad de la ureasa.

Esta prueba permite reafirmar los resultados obtenidos en las pruebas anteriores como la prueba de actividad antagónica de las cepas de BAL contra *H. pylori* y las propiedades de adherencia. Demostrando que las cepas T33, T38, T39 y T40 estudio podrían emplearse como coadyuvantes en tratamientos contra infecciones causadas por esta patógeno. Sin embargo, es importante mencionar que antes de aseverar dicho efecto es necesario realizar pruebas *in vivo* con animales de experimentación para posteriormente realizar pruebas en humanos.

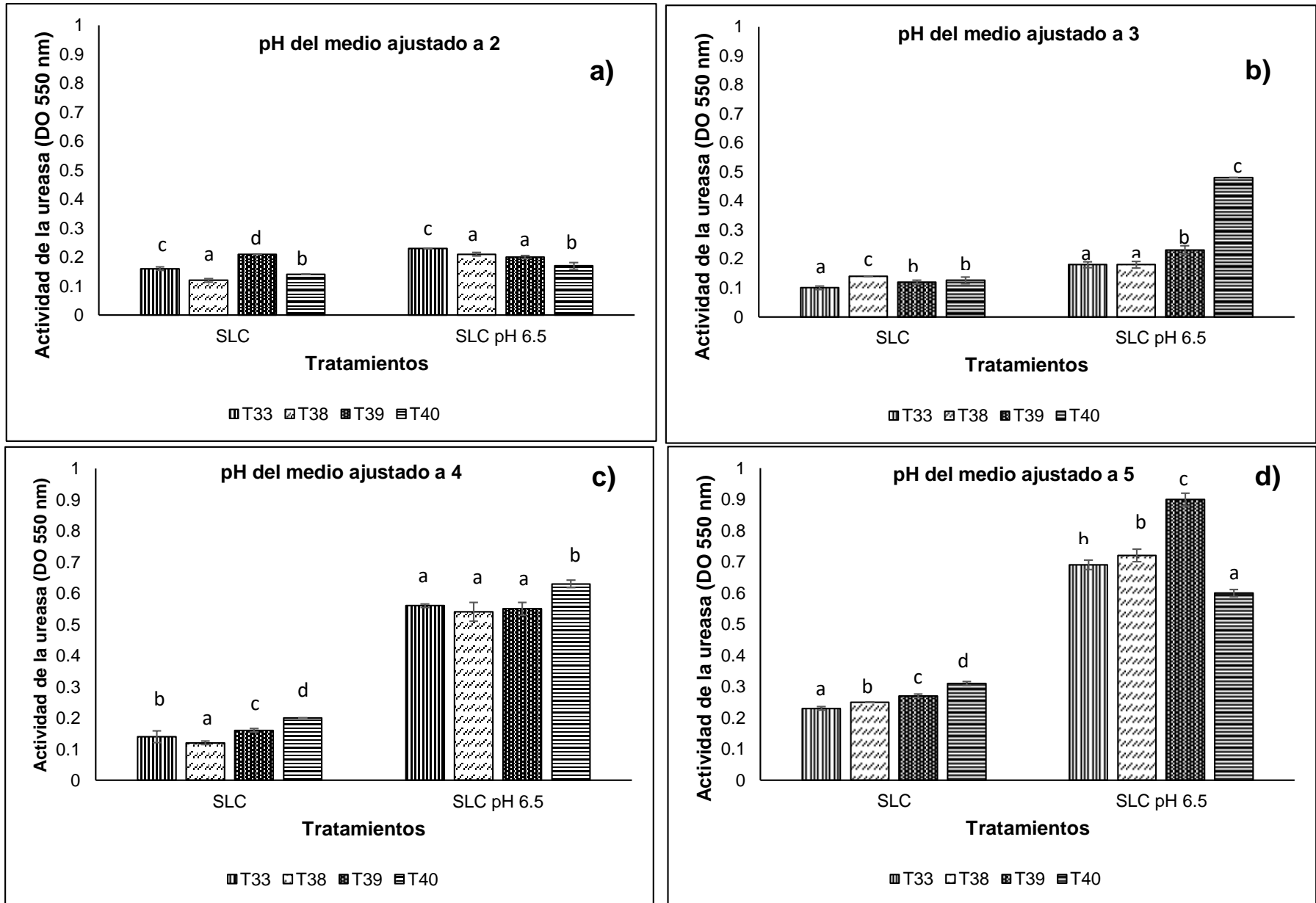


Figura 10. Efecto inhibitorio de cepas BAL sobre la actividad de la ureasa producida por *H. pylori* a pH 2-5.

6.11 Caracterización de los microencapsulados obtenidos mediante secado por aspersión

6.11.1 Eficiencia de encapsulación (%)

En su mayoría las BAL son susceptibles a variables de fabricación de alimentos, como elevadas temperaturas o temperatura ambiente, presencia de oxígeno, variaciones de pH, humedad (Santivarangkna et al., 2011). Además de ser susceptibles a las condiciones adversas del tractogastrointestinal como pH bajo, sales biliares, enzimas y la microbiota nativo. En este sentido, la industria alimentaria y farmacéutica está buscando estrategias novedosas para mantener la supervivencia de los probióticos, antes y después a su ingesta (Barajas-Álvarez et al., 2023). Estas estrategias abarcan la elección de cepas BAL resistentes a pH ácidos y bilis, la utilización de envases herméticos, la incorporación de bacterias adaptadas al estrés, la inclusión de nutrientes, y la encapsulación de los probióticos (Barajas-Álvarez et al., 2022).

En el proceso de encapsulación, se eligieron exclusivamente aquellos tratamientos que demostraron los mejores resultados en pruebas anteriores, tales como el efecto inhibitorio con y sin prebiótico frente a *C. jejuni* o *H. pylori*, la autoagregación, coagregación, la hidrofobicidad de la superficie celular y la inhibición de la actividad de ureasa producida por *H. pylori*.

Después del proceso de encapsulado se evaluó la sobrevivencia de las cepas BAL (T33, T38, T39 y T40) con y sin prebióticos (inulina o FOS) después del proceso de microencapsulación (secado por aspersión) empleando almidón modificado (N-lok®, Ingredion) como material pared, calculando el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).

En la Tabla 18, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos encapsulados. Las cuatro cepas BAL T33, T38, T39 y T40 encapsuladas en presencia de algún prebiótico (inulina o FOS) presentaron un incremento en la eficiencia de encapsulación en comparación con la bacteria sin adición del prebiótico. Específicamente, *Enterococcus lactis* cepa T40 adicionada con 0.6% de FOS fue quien obtuvo el mayor porcentaje de eficiencia de

encapsulación 99.8%. Seguida de *Enterococcus lactis* cepa T38 con inulina al 0.6% (98.4%). Es decir, el prebiótico incrementó la eficiencia de encapsulación el proceso de encapsulación.

Tabla 18. Eficiencia de encapsulación (% EE), contenido de humedad (%), actividad de agua, para los tratamientos de BAL con y sin prebióticos.

Tratamiento	Eficiencia de encapsulado (%)	Actividad de agua	Humedad (%)
T33	90.9 ± 2.9 ^a	0.319 ± 0.028 ^b	5.5 ± 0.1 ^a
T33+0.6% inulina	91.9 ± 0.4 ^a	0.247 ± 0.015 ^a	5.3 ± 0.2 ^a
T38	93.9 ± 2.7 ^a	0.299 ± 0.015 ^a	5.7 ± 0.9 ^a
T38+0.6% inulina	98.4 ± 0.8 ^c	0.266 ± 0.004 ^a	5.1 ± 0.5 ^a
T38+0.6% FOS	95.3 ± 1.1 ^{ab}	0.280 ± 0.024 ^a	7.4 ± 0.2 ^b
T39	90.8 ± 0.7 ^a	0.344 ± 0.019 ^b	5.8 ± 0.3 ^b
T39+0.6% inulina + %FOS	91.8 ± 2.2 ^a	0.226 ± 0.007 ^a	5.1 ± 0.2 ^a
T40	97.0 ± 1.80 ^a	0.268 ± 0.019 ^a	5.3 ± 0.4 ^a
T40+0.6% FOS	99.7 ± 0.7 ^b	0.310 ± 0.024 ^a	6.9 ± 0.0 ^b

¹Promedio de tres repeticiones (%) ± desviación estándar

^{a, b, c,} Valores con letras minúsculas diferentes en la misma columna expresan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), prueba de Tukey. T33, T38 y T39= *E. lactis* cepas T33, T38 y T39, respectivamente, T40= *L. paracasei* cepa T40

Se ha planteado la idea de que ciertos polisacáridos como inulina, FOS y maltodextrinas, podrían crear una película vítrea alrededor de las células, reduciendo la movilidad de los probióticos antes del proceso de secado por aspersión, lo que podría mejorar la capacidad de supervivencia de los probióticos (Archacka et al., 2019). Además que la inulina y FOS son térmicamente estables y poco solubles debido a su alto grado de polimerización, otro factor podría ser resistencia natural del microorganismo (Wada et al., 2005).

Por otro lado, debido a que el almidón, los FOS y la inulina son compuestos polihidroxilados, la combinación de almidón-FOS y almidón-inulina, pueden interactuar principalmente mediante enlaces de hidrógeno, estos mismos puentes de hidrogeno pueden formarse entre los fosfolípidos de la membrana y las proteínas

celulares de las BAL (T33, T38, T39 y T40) y reemplazar las moléculas de agua liberadas durante el secado (Archacka et al., 2019; Bersaneti et al., 2016).

Cabe mencionar que después del secado, la concentración de BAL (T33, T38, T39 y T40) fue superior a 10^6 UFC/g, que es la dosis mínima recomendada para productos probióticos (Barajas-Álvarez et al., 2022; FAO/WHO, 2002).

Investigadores como Bustamante et al. (2020) obtuvieron una eficiencia de encapsulación superior al 90% para los géneros *Lactobacillus rhamnosus* (91.23%), *Lactobacillus plantarum* (94.77%), *Bifidobacterium longum* (96.07%) y *Bifidobacterium infantis* (97.24%) cuando fueron encapsulados con polisacáridos como inulina o mucílago de las semillas de chía o lino, empleando el secado por aspersión. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares ya que en todos los tratamientos se obtuvieron eficiencias de encapsulación por encima del 90%.

Por otro lado, Nunes et al. (2018) microencapsularon a *L. acidophilus* con inulina, trehalosa o Hi-Maize® mediante secado por aspersión; los mayores porcentajes de encapsulación del probiótico se obtuvieron con inulina y maíz (93.12% y 94.26%, respectivamente). En otro estudio, Pinto et al. (2015), microencapsularon *Bifidobacterium* BB-12 con lactosuero dulce y dos prebióticos diferentes (inulina y povidex), las microcápsulas producidas sólo con suero dulce mostraron el mayor % EE 95.43. Estas investigaciones dan evidencia sobre un alto % EE (> al 90%) en presencia de algún prebiótico cuando se encapsula mediante secado por aspersión.

6.11.2 Actividad de agua (a_w) y contenido de humedad de los encapsulados

El valor de actividad de agua (a_w) indica la cantidad de agua disponible para reacciones bioquímicas, es decir, está agua no se encuentra ligada a moléculas (Reyes et al., 2018). En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de agua en los encapsulados. Los valores hallados para todos los tratamientos oscilaron entre 0.2 y 0.3. Específicamente, los tratamientos de las cepas T33 y T39 con y sin prebiótico presentaron diferencias estadísticamente significativas, de tal forma que los tratamientos en presencia del prebiótico presentaron la menor a_w (0.2). Según lo informado por Reyes et al. (2018), un valor

de a_w cercano a 0.3 presentó un impacto positivo en la viabilidad de los probióticos durante un período de almacenamiento de 60 días. Los autores destacaron que una baja actividad de agua previene el crecimiento de microorganismos no deseados y reacciones químicas no deseadas, como la oxidación de lípidos.

Por otra parte, los valores por debajo de 0.3 de a_w promueven la estabilidad del polvo y prolongan la vida útil al reducir la presencia de agua libre disponible para las reacciones químicas (Atalar & Dervisoglu, 2015). Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que a una temperatura de entrada por encima de 100 °C durante el secado por aspersion conduce a una transferencia de calor a las partículas, esto aumenta la fuerza motriz de la evaporación, lo que conduce a una mayor eliminación de agua por lo tanto, se producen polvos con menor contenido de humedad (Daza et al., 2016). Cabe mencionar que en la presente investigación se empleó una temperatura de entrada de 100 °C, por que pudo ocurrir algo similar a lo anteriormente descrito.

Por otro otra parte, en la misma tabla (Tabla 18) se muestran los resultados del contenido de humedad en los encapsulados hallando valores entre 5.1 a 5.8 %. Esta propiedad está relacionada con la cantidad de grupos hidrófilos en la estructura del alimento, los cuales pueden unirse a las moléculas de agua presentes en el aire circundante (Barajas-Álvarez et al., 2022). Además, los diferentes niveles de humedad podrían interferir en las propiedades del polvo como, en la forma, la distribución del tamaño y en la fluidez (Jung et al., 2018).

Otro punto es que, los polvos de la cepa T38+0.6% FOS presentaron el mayor nivel de humedad, seguidos por los polvos de la cepa T40+0.6% FOS. Este comportamiento se relaciona con la estructura de los FOS, que consiste en cadenas cortas de unidades de fructosa unidas por enlaces (2→1)-β-glucosídicos y llevan una sola unidad de D-glucosil en el extremo no reductor de la cadena, unida (1→2)-α. Por ende, los FOS cuentan con múltiples grupos hidroxilo que están disponibles para absorber agua (Barajas-Álvarez et al., 2022).

De acuerdo con el estudio de Liao et al. (2017), mencionan que se necesitan niveles de humedad reducidos, menores al 6 %, para extender la vida útil de los polvos probióticos, lo que coincide con los hallazgos de la presente investigación.

Autores como Jurado et al. (2021) obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, ellos encapsularon *Lactobacillus plantarum* empleando el secado por aspersión bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada de 170 °C y de salida 67 °C. La a_w obtenida en sus polvos fue menor a 0.3 expresando que una baja a_w es favorable para la vida útil de los polvos. Con respecto a la humedad, los mismos autores obtuvieron el 5.26% en los encapsulados evaluados, explicando que la humedad se ve influida por el tamaño del microencapsulado, además que una baja humedad evita el crecimiento microbiano y micótico.

Hernández et al. (2018) obtuvieron un contenido de humedad de 3.31% y a_w de 0.26 al encapsular *L. paracasei* cepa T40 (una de las cepas empleadas en esta investigación) mediante secado por aspersión. Los autores no emplearon la adición de prebióticos lo que podría contribuir a un incremento de humedad.

6.11.3 Caracterización morfológica de las microcápsulas (MEB).

En las Figuras 11 y 12 se muestran las micrografías obtenidas mediante MEB de los polvos de las cuatro cepas de BAL (T33, T38, T39 y T40) combinados con inulina y/o FOS. De acuerdo a la escala de la micrografía el tamaño de las microcápsulas osciló entre 10 y 20 μm .

La forma de las microcápsulas fue parcialmente esférica (Figuras 11 y 12). Además todos los tratamientos presentaron concavidades en la superficie tal y como se aprecia en las Figuras 11 y 12, característica dada por el proceso de atomización, debido a la rápida evaporación del agua de las gotas (Barajas-Álvarez et al., 2022; Nunes et al., 2018). La morfología de los polvos puede cambiar al modificar los parámetros de secado por aspersión, tales como la temperatura de secado, la velocidad de alimentación y la composición de la solución encapsulante. Cuando se lleva a cabo el proceso de secado a temperaturas bajas, regularmente se producen deformaciones y contracciones de las partículas debido a la lenta difusión del agua. A altas temperaturas, las partículas tienden a expandirse, formando una superficie

sólida y, en ciertos casos, fracturarse debido a la rápida evaporación del agua y la elevada presión interna (Alamilla-Beltrán et al., 2005).

Las micropartículas obtenidas en la presente investigación no presentaron evidencia de grietas o fracturas visibles en sus superficies, lo que indica que la permeabilidad al aire es muy baja o prácticamente inexistente. Esto asegura una protección adicional de los microorganismos probióticos (Nunes et al., 2018; Rajam & Anandharamakrishnan, 2015). Además, no se detectaron bacterias en forma libre en las micrografías analizadas (Figuras 11 y 12), lo que respalda la idea de que se llevó adecuadamente la encapsulación y que se formó una capa alrededor de los probióticos. Resultados similares fueron reportados por Nunes et al. (2018) y Barajas-Álvarez et al. (2022) en investigaciones con combinaciones de fructanos de agave, maltodextrina, inulina, trehalosa y almidón de maíz modificado.

Rodríguez-Barona et al. (2012) reportaron resultados similares para encapsulados de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*. Aunque no se determinó el promedio del tamaño de las micropartículas, las micrografías por MEB permitieron estimar el tamaño de las microcápsulas de ≈ 10 a $20 \mu\text{m}$.

Jurado et al. (2021) reportaron tamaños de partícula de 15.18 a $35.6 \mu\text{m}$ cuando microencapsularon *Lactobacillus plantarum* mediante secado por aspersion, los valores reportados por estos autores coinciden con lo hallado en la presente investigación.

Por otro lado, Pérez-Leonard et al. (2013) reportaron características morfológicas de las microcápsulas con formas redondas u ovaladas concluyendo que estas formas tienen mayor facilidad de distribución al producto final. Por otra parte, estos mismos autores describen que un tamaño de partícula se considera óptimo cuando se encuentra en un rango de 15 a $100 \mu\text{m}$, cápsulas mayores a $100 \mu\text{m}$ son muy fáciles de detectar en la boca, y menores a $15 \mu\text{m}$ no dan una buena protección frente a agentes externos.

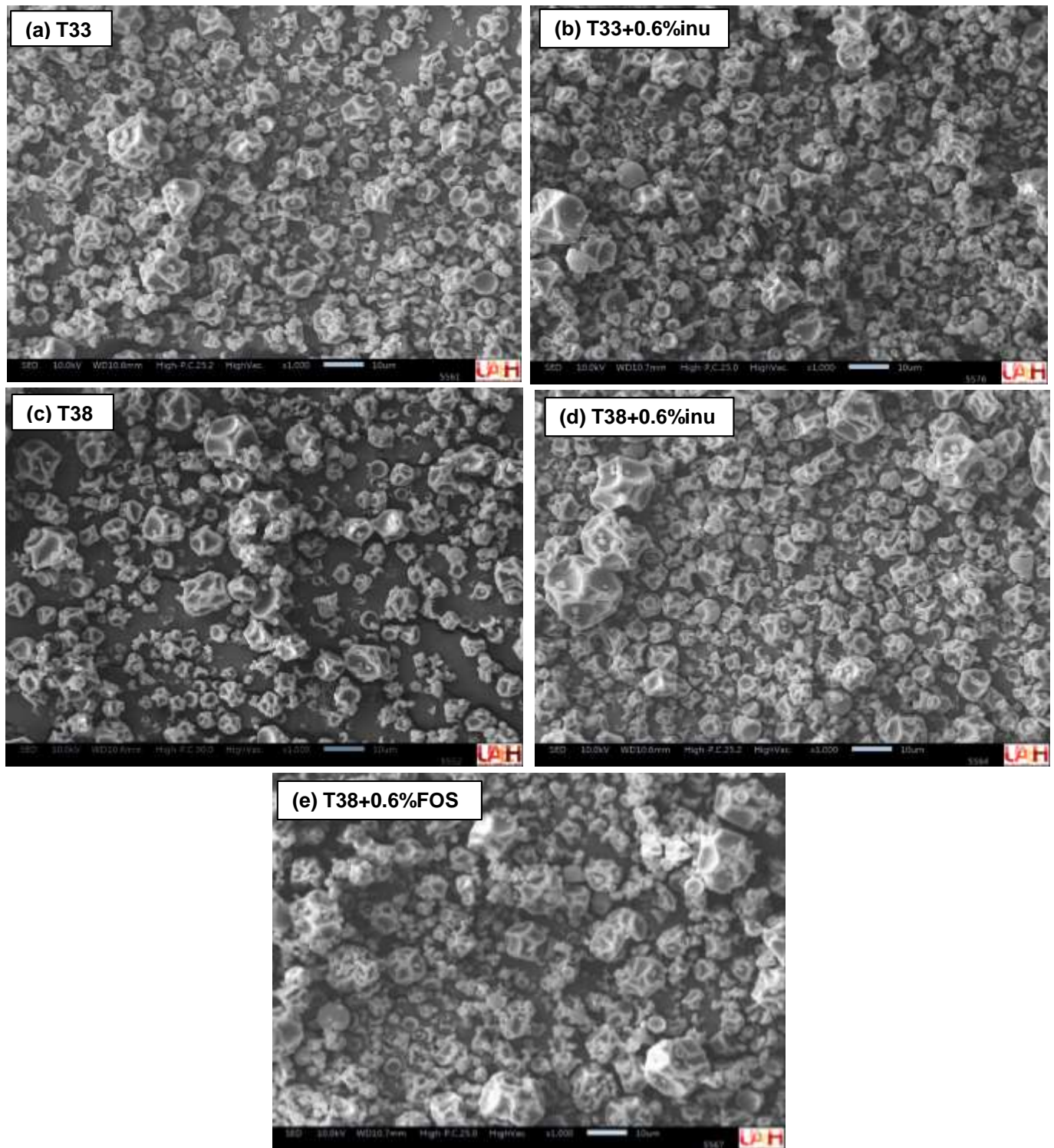


Figura 11. Microfotografías (1000x) de las microcápsulas de cepas BAL con y sin prebiótico: (a) *E. lactis* cepa T33 sin prebiótico; (b) *E. lactis* cepa T33 con 0.6% de inulina; (c) *E. lactis* cepa T38 sin prebiótico; (d) *E. lactis* cepa T38 con 0.6% de inulina; (e) *E. lactis* cepa T38 con 0.6% de FOS (continuación Figura 12).

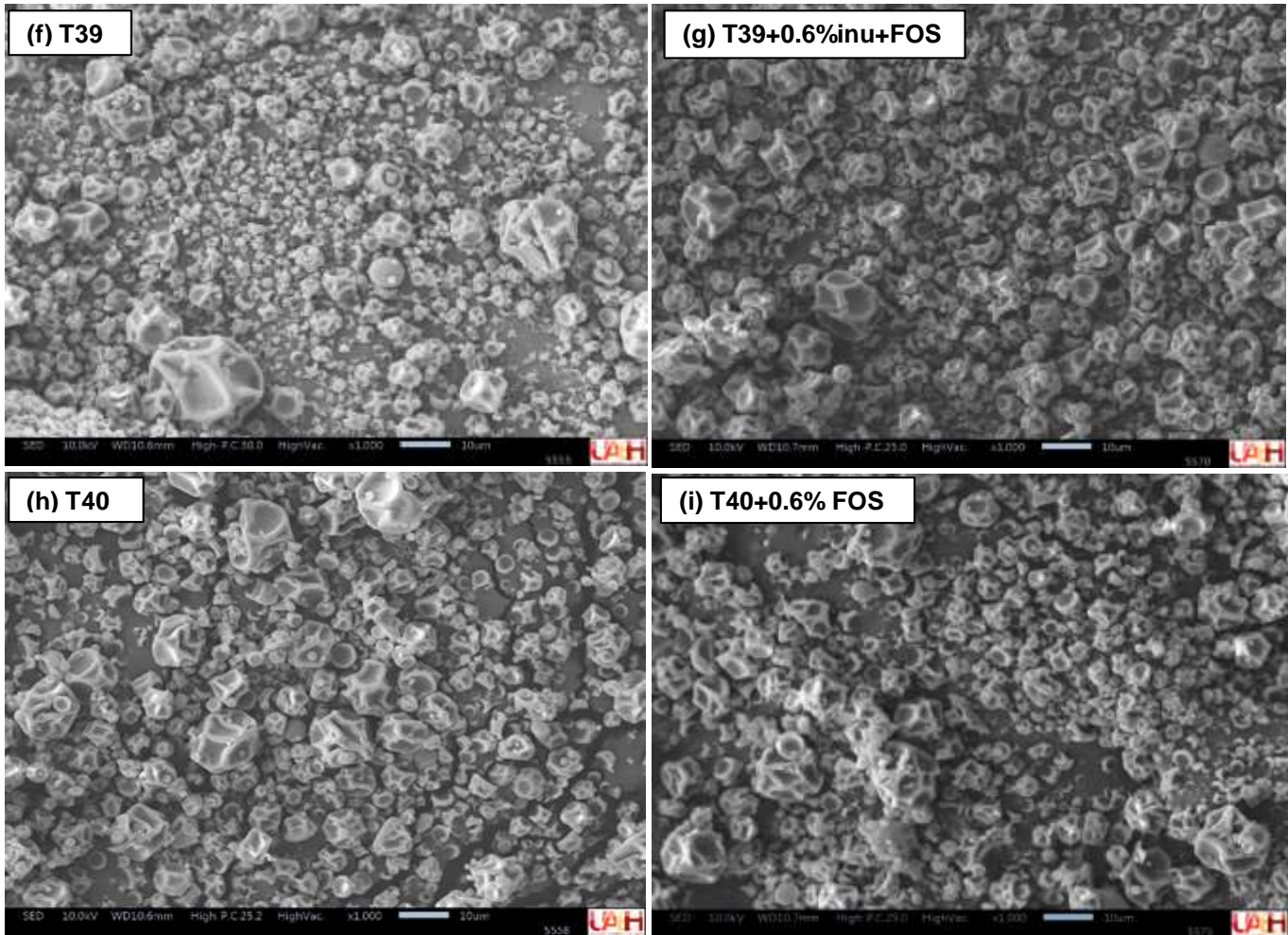


Figura 12. Microfotografías (1000x) de las microcápsulas de cepas BAL con y sin prebiótico: (f) *E. lactis* cepa T39 sin prebiótico; (g) *E. lactis* cepa T39 con 0.6% de inulina y FOS; (h) *L. paracasei* cepa T40 sin prebiótico; (i) *L. paracasei* cepa T40 con 0.6% de FOS.

6.11.4 Tolerancia de las cepas BAL encapsuladas a pH ácido 2 y 3

El estrés al que se enfrentan los probióticos en el tracto gastrointestinal comienza después de la ingesta del alimento probiótico. La habilidad de los probióticos para sobrevivir en esta región es fundamental para que puedan ejercer sus efectos benéficos (Barajas-Álvarez et al., 2022). En las Figuras 13 y 14 se muestra la viabilidad de cepas BAL T33, T38, T39 y T40, libres, encapsuladas y encapsuladas con prebiótico, cuando fueron expuestas a pH 2 y 3 por un periodo de 3 h. Se decidió evaluar la exposición de las BAL a diferentes tratamientos de pH bajo durante 3 horas, ya que se estima que el tránsito de alimentos con predominio de proteínas, carbohidratos y grasas ocurre en un intervalo de tiempo de 2 a 3 horas.

Los resultados mostraron que la cepa T33 en su forma libre no experimentó recuento alguno de su viabilidad después de 3 h de exposición a un pH de 2 (Figura 13). En contraste, cuando la misma cepa bacteriana fue encapsulada con inulina al 0.6% mostró la mejor viabilidad (5.7 Log UFC/g) después de 3 h de exposición a pH 2. Este mismo comportamiento se observó en las cepas T39 y T40. La cepa T38 exhibió un comportamiento diferente, ya que de forma libre mantuvo una viabilidad cercana a 8 Log UFC/g después de 3 h de exposición a pH 2. Por otra parte, cuando esta cepa (T38) fue encapsulada con inulina al 0.6% y expuesta a pH 2 durante 3 h no presentó una disminución estadísticamente significativa en comparación con la concentración en el momento cero.

Las cuatro cepas de estudio (T33, T38, T39 y T40) que fueron encapsuladas en presencia de algún prebiótico y posteriormente expuestas a pH 2 durante 3 h mostraron una viabilidad alrededor de 6 Log UFC/g, concentración mínima necesaria de acuerdo a la FOS/WHO (2002) para que un microorganismo probiótico pueda ejercer algún efecto benéfico en la salud del huésped.

Por otro lado, en la Figura 14 se puede observar la viabilidad de las cuatro cepas BAL estudiadas en su forma libre, encapsuladas o encapsuladas con prebiótico después de ser expuestas a pH 3 por 3 h. En términos generales, se pudo notar, que las BAL en forma libre mantuvieron una concentración por encima de 6.4 Log UFC/ mL. En diversas investigaciones han revelado que las BAL pueden resistir el

estrés ácido al modificar los tipos y niveles de ácidos grasos en sus membranas celulares, reduciendo así el daño celular causado por el entorno externo (P. Wu et al., 2021). Se ha documentado que la preadaptación ácida de *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 (recientemente reclasificado como *Lactiplantibacillus plantarum* ZDY2013) conlleva un aumento significativo en la proporción de ácidos grasos saturados y ciclopentano, mejorando de este modo la función de la bomba de protones (R. Huang et al., 2016). Las BAL en forma libre mostraron una mayor viabilidad a un pH 3 en comparación con la sobrevivencia observada a un pH 2. En primer lugar, podría atribuirse a que el pH 3 es menos agresivo para la sobrevivencia de los microorganismos estudiados y en segundo lugar la mayoría de las cepas de estudio desarrollan en un entorno con un pH cercano a 3.

Derivado a que el pH del estómago se encuentra generalmente entre 1 y 3, es crucial proporcionar una protección a estos microorganismos para asegurar su viabilidad al paso por el estómago y puedan alojarse en el intestino delgado y grueso (Shao et al., 2022).

Sin embargo, las cepas T33, T38, T39 y T40 cuando fueron encapsuladas con prebiótico y expuestas a pH 2 y 3 durante 3 h, mantuvieron una concentración alrededor de 6 Log UFC/g. Aunque en esta prueba en particular no se mostraron diferencias evidentes entre las concentraciones de BAL de forma libre, encapsulada o encapsuladas con prebióticos existen otros ensayos que sugieren que la barrera de protección proporcionada por la encapsulación ofrece ventajas en comparación con las BAL sin encapsular.

Por otra parte Yoha et al. (2020) encapsularon *Lactobacillus plantarum* (NCIM 2083) adicionado con FOS mediante la técnica de secado por aspersion. Estas microcápsulas fueron expuestas a condiciones gástricas hallando una pérdida significativa en la viabilidad celular (2 a 3 reducciones logarítmicas) después de exponerse a condiciones gástricas (pH 3 por 2h). Sin embargo, se mantuvo una concentración de 8 Log UFC/g después de la exposición gástrica.

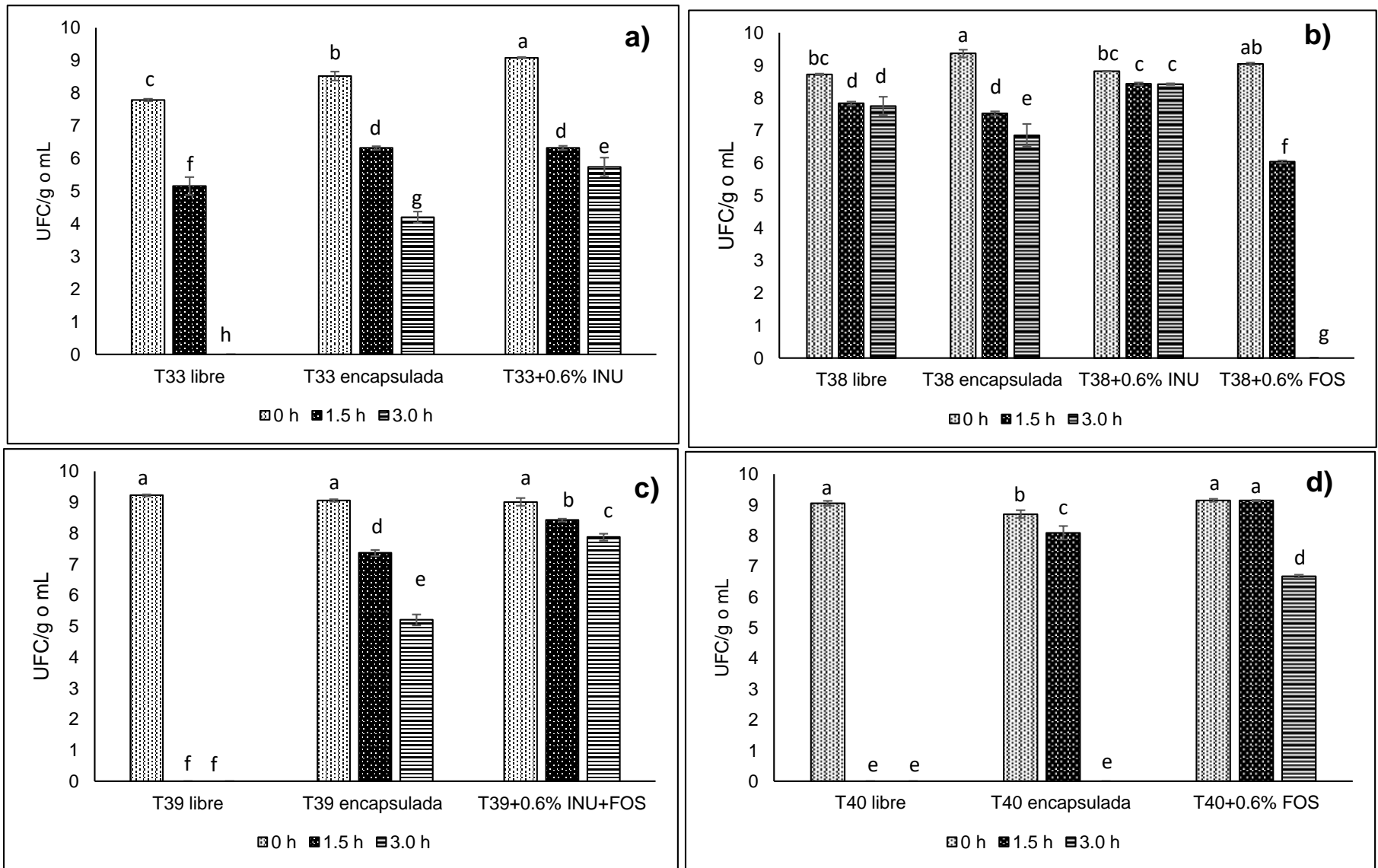


Figura 6. Supervivencia de BAL encapsuladas con y sin prebióticos a pH 2 a tiempo 0, 1.5 y 3 h

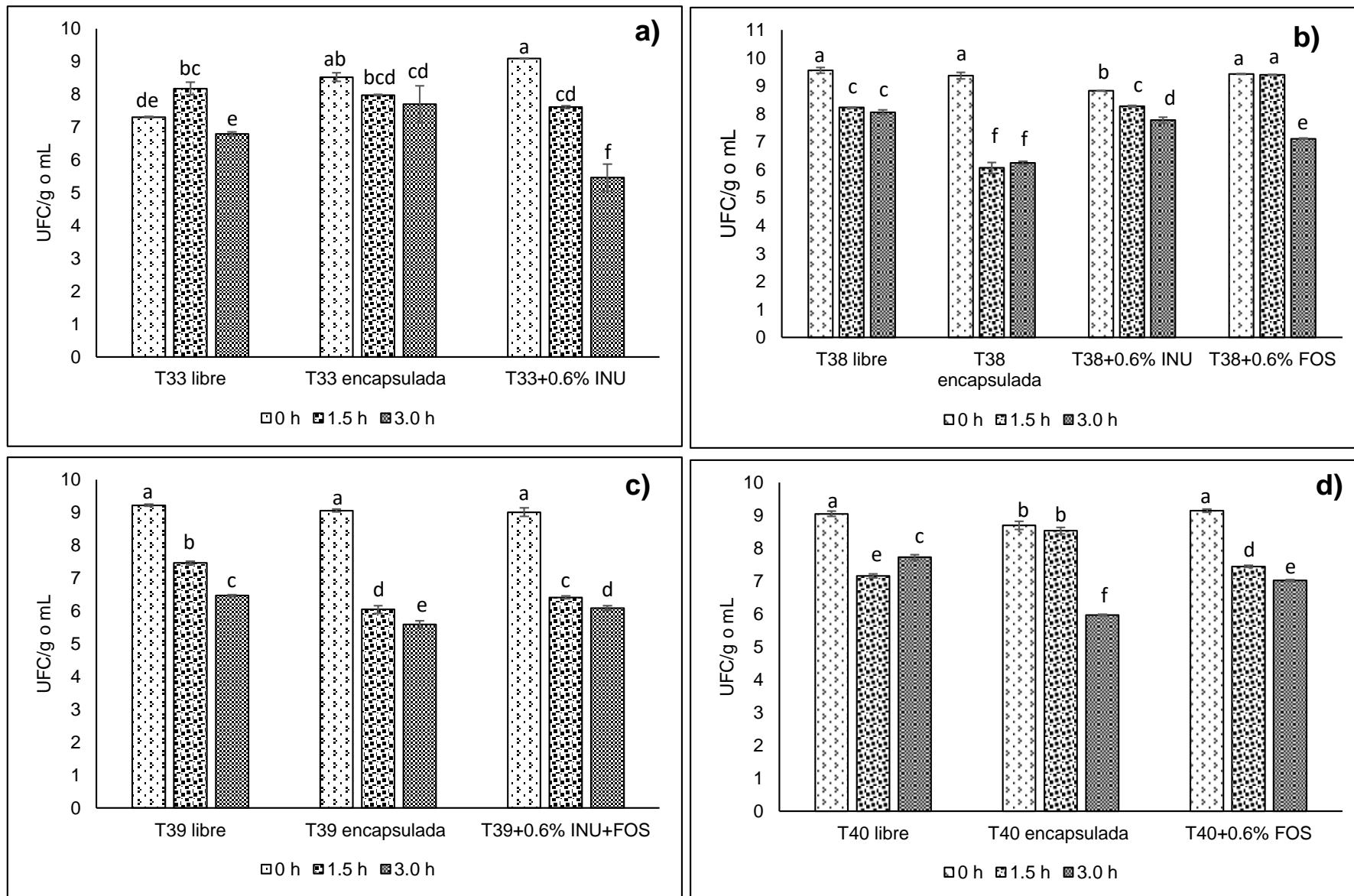


Figura 7. Supervivencia de BAL encapsuladas con y sin prebióticos a pH 3 a tiempo 0, 1.5 y 3 h

Xavier et al. (2018) encapsularon mediante secado por aspersión *Lactobacillus acidophilus* La-5 con inulina reportando una tasa de supervivencia del 78.7% a condiciones ácidas (pH 2 - 2.5). *L. acidophilus* La-5 tuvo una alta supervivencia en el entorno gástrico *in vitro* en comparación con células libres, debido a la lenta degradación de las microcápsulas de inulina en condiciones ácidas, lo que resultó en una disminución tardía de la supervivencia de los probióticos.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, junto con los hallazgos de otras investigaciones previamente mencionadas dan evidencia de la protección que brinda la encapsulación mediante secado por aspersión. Además, la incorporación de un prebiótico también contribuye a preservar la viabilidad celular en condiciones gástricas simuladas.

6.11.5 Tolerancia de las cepas BAL encapsuladas a sales biliares

Es importante destacar que, una de las propiedades de los probióticos es su capacidad para resistir las condiciones adversas de tracto gastrointestinal, en particular su resistencia a sales biliares. La concentración de sales biliares en el intestino humano puede llegar al 0.3%, lo que a menudo se utiliza como condición para la detección de probióticos (Fu et al., 2022). Además, se ha observado que la encapsulación de un probiótico junto con un prebiótico puede ofrecer una protección más eficaz contra los ácidos fuertes y las condiciones biliares, al tiempo que mejora las actividades fisiológicas de la microbiota, mejorando así la salud intestinal (Pandey et al., 2015).

En este sentido, en la Figura 15 se aprecian los resultados obtenidos después de exponer los diferentes tratamientos de cepas BAL T33, T38 y T39 de forma libre, encapsuladas y encapsuladas con prebióticos a una solución de sales biliares al 0.3%. En la figura, se observa que los tratamientos de probióticos con prebiótico encapsulados resistieron de manera más efectiva. Manteniendo una mayor viabilidad (> 6 Log UFC/g) después de 3 h de exposición en comparación con las BAL libres.

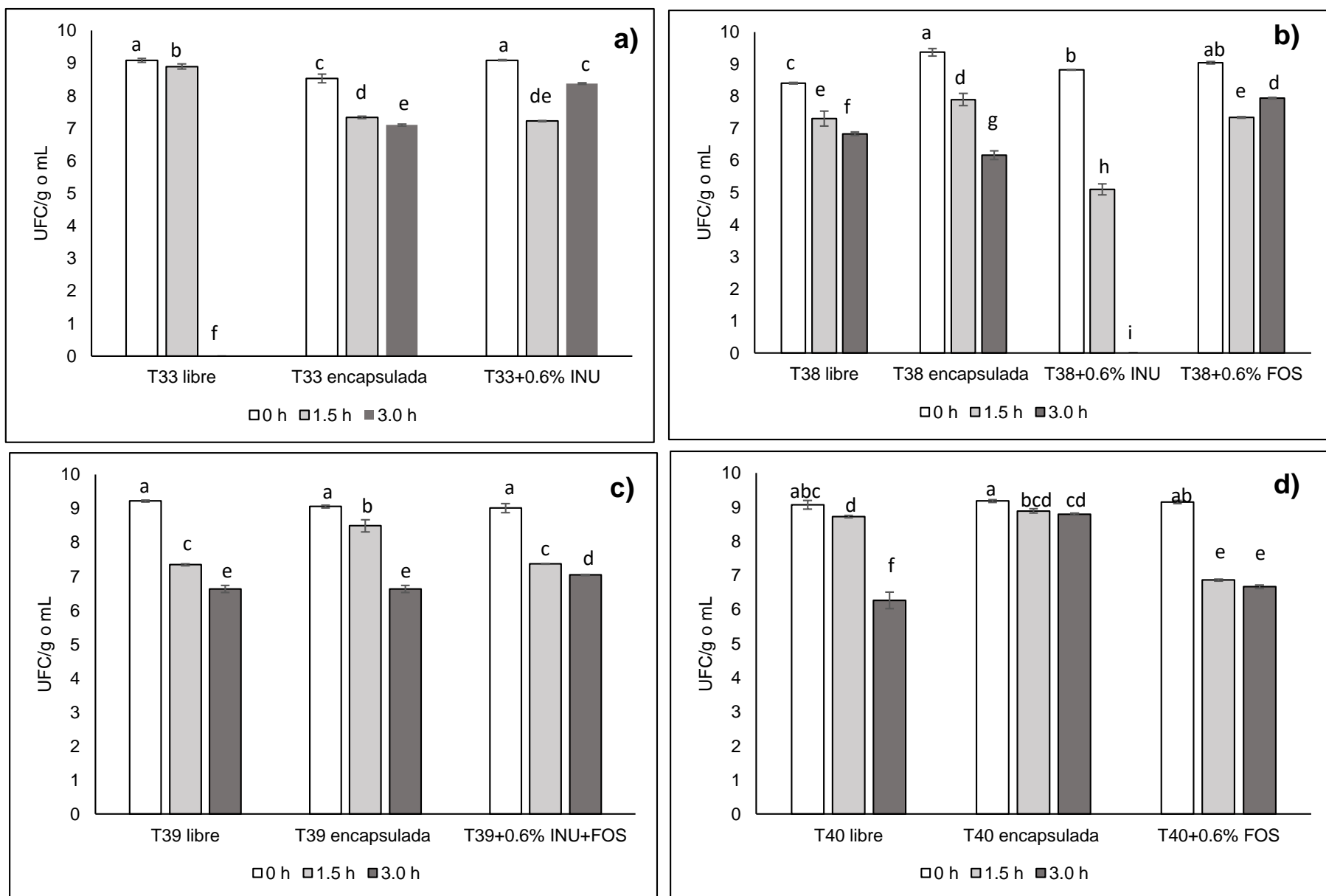


Figura 8. Viabilidad de BAL libres, encapsuladas, encapsuladas con y sin prebióticos a sales biliares al 0.3% a tiempo 0, 1.5 y 3 h

Estos resultados concuerdan con los hallazgos reportados por Peredo et al. (2016) quienes encapsularon *L. casei* Shirota y dos cepas de *L. plantarum* (Lp33 y Lp17) con almidón de papa, platago psyllium e inulina como prebióticos exponiendo las microcápsulas simbióticas a sales biliares, observando una viabilidad superior a 6 Log UFC/g. Por otro lado, Yoha et al. (2020), llevaron a cabo la encapsulación mediante secado por aspersión de *L. plantarum* (NCIM 20283) adicionado con FOS. Las microcápsulas fueron expuestas a condiciones simuladas del intestino delgado que incluían sales biliares al 1%. En su estudio, observaron una reducción de 4 logaritmos (6 Log UFC/g) después de 2 horas de exposición

Las cepas T33, con un contenido del 0.6% de inulina, y T38, con un porcentaje equivalente de FOS, exhibieron un incremento en la concentración de células viables después de 3 horas de exposición a sales biliares, en comparación con la concentración obtenida a las 2 horas (Figura 15). Este comportamiento podría atribuirse al hecho de que las BAL encapsuladas aún permanecían inmersas en la cápsula, es decir, no se habían liberado por completo a diferencia de las 3 horas, momento en el cual es posible que la cápsula ya se hubiera desintegrado, permitiendo la liberación de las BAL. Sería interesante llevar a cabo una cinética de liberación de las BAL encapsuladas para determinar en qué momento se produce la liberación completa de los microorganismos.

Rajam et al. (2012) demostraron que una combinación de alginato de sodio y una proteína de suero desnaturalizada como medio de secado podía mejorar la tasa de supervivencia y el comportamiento controlado de liberación central de *Lb. plantarum* durante condiciones ácidas y biliares simuladas.

En el caso de la cepa T38 encapsulada con un 0.6% de inulina, después de 3 horas de exposición a sales biliares, no mostró viabilidad (Figura 15). Esto podría atribuirse al estrés por deshidratación sufrido durante el proceso de secado por aspersión, que pudo haber causado daño a los ácidos nucleicos (cuyo mecanismo aún no se comprende completamente) y a los ribosomas. Estos últimos probablemente se vieron afectados debido a la fuga de Mg²⁺ desde la membrana celular comprometida por el calor. (Akanuma et al., 2014). Aunque ciertos daños

bacterianos causados por el secado por aspersión pueden ser reparados por sistemas de reparación celular, en circunstancias extremas o con daños extensos, la viabilidad de la bacteria puede quedar comprometida. La habilidad de una bacteria para preservar su integridad genética y ejecutar procesos metabólicos resulta esencial para su sobrevivencia a largo plazo. (S. Huang et al., 2017).

6.11.6 Viabilidad de las BAL microcápsulas con y sin prebióticos durante el almacenamiento

La viabilidad de las cepas BAL T33, T38, T39 y T40 se evaluó a 4 °C y 30 °C, con actividades de agua de 0.75 y 0.32, durante 4 semanas (Figuras 16, 17, 18 y 19).

Después de la primera semana de almacenamiento los encapsulados de las BAL con y sin prebiótico o bien sin material pared (BAL sin material pared pasadas por el secador por aspersión) almacenados con una actividad de agua de 0.75 y a 30 °C mostraron un recuento de microorganismos por debajo de las dosis recomendadas (Figura 16c, 17c, 18c y 19c). Barajas-Álvarez et al. (2022) informaron un comportamiento similar en sobrevivencia de *L. rhamnosus*. La viabilidad de los probióticos disminuyó con el aumento de actividad de agua 0.75 a 20 °C, empleando diferentes combinaciones de goma arábica, fructanos de agave, maltodextrina, inulina y trehalosa como materiales de pared. Heidebach et al. (2010) reportaron que a medida que los valores de actividad de agua aumentan, se da la oxidación lipídica de la membrana bacteriana formando radicales libres, provocando un daño en el ADN y en la propia membrana, de tal forma que podría disminuirse la viabilidad de los probióticos.

Por otra parte, los polvos de BAL T33, T38, T39 y T40 con y sin prebiótico encapsuladas mantuvieron una concentración por encima de lo recomendado (10^6 UFC/g) después de cuatro semanas de almacenamiento a 30 °C con una actividad de agua de 0.32 en comparación con las BAL a las que no se les proporcionó un material pared (específicamente este tratamiento fue sometido a las mismas condiciones de secado por aspersión, sin adición de material pared). Tal y como se aprecia en las Figuras 16d, 17d, 18d y 19d.

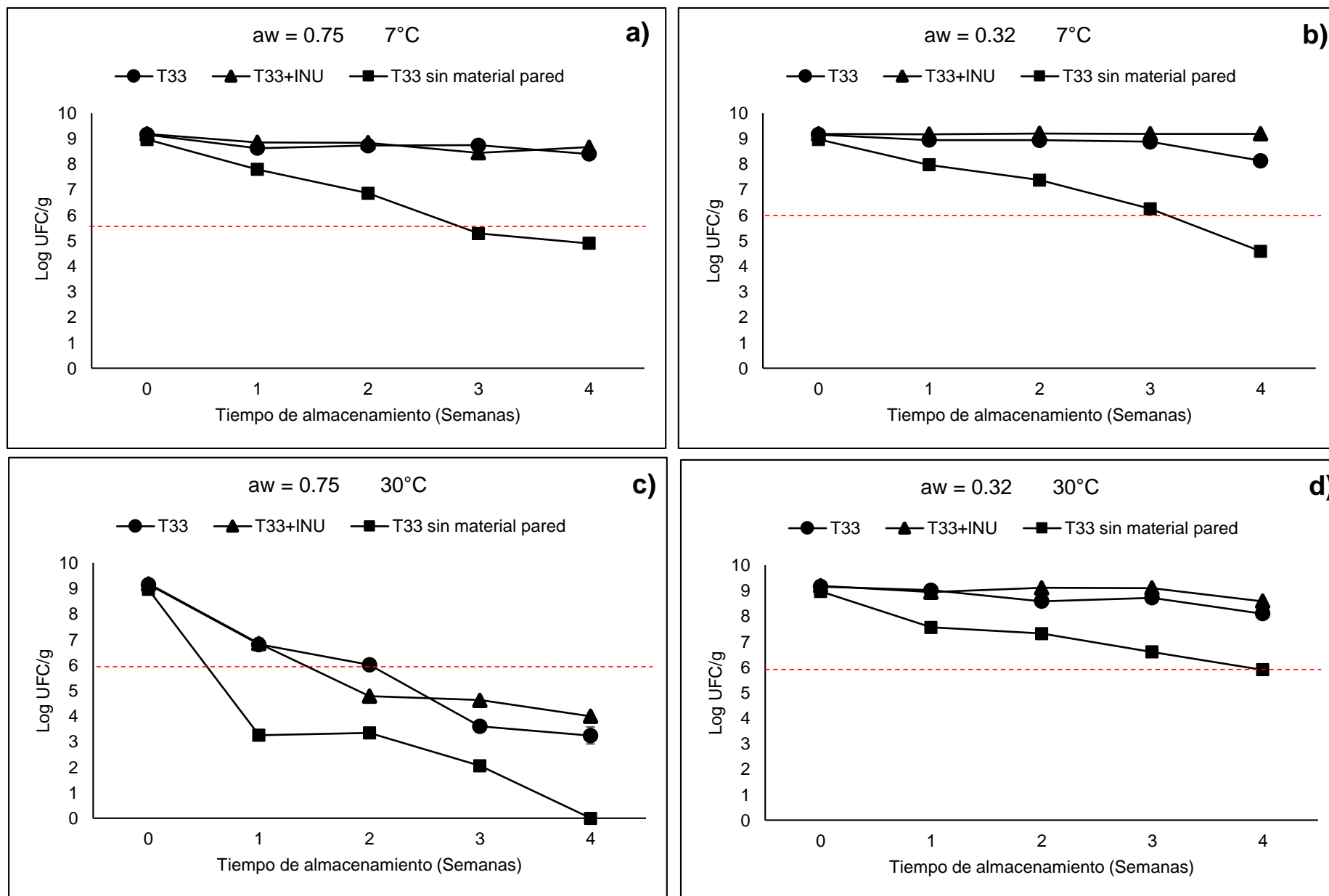


Figura 16. Sobrevivencia de T33 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y D, aw = 0.32.

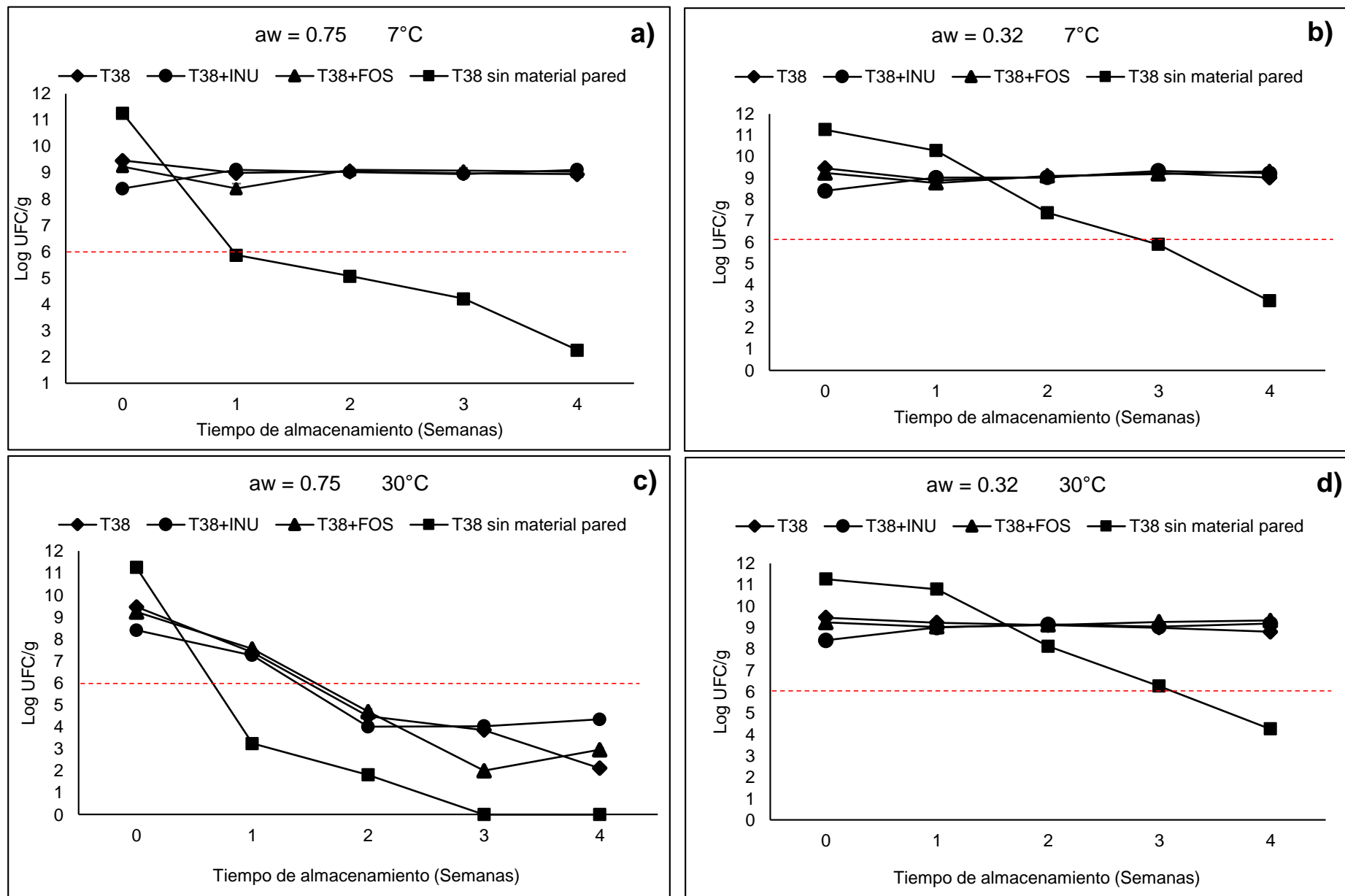


Figura 17. Sobrevivencia de T38 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y D, aw = 0.32.

La sobrevivencia de los probióticos se atribuye a la unión de los grupos hidroxilos (-OH) de la inulina y los FOS con el grupo cabeza polar del fosfolípido presente en la membrana celular, lo cual actúa como un escudo protector ante posibles daños ocasionados por variaciones en la humedad del entorno (Agudelo et al., 2017). Asimismo, debido a su elevada temperatura de transición vítrea, es que la inulina y FOS conservan su estructura amorfa sin experimentar recristalización en diversos entornos, lo que contribuye a su estabilidad en una amplia variedad de condiciones ambientales (Andrews & Urias-Silvas, 2012; Mensink et al., 2015; O'Donnell, K., Kearsley, 2012).

Cuando las microcápsulas de BAL (T33, T38, T39 o T40) con prebióticos fueron almacenadas con una actividad de agua de 0.32 y temperaturas de 7 °C o 30 °C, se observó una disminución en la viabilidad de alrededor de 1 Log UFC/g. Sin embargo, las BAL sin material pared almacenadas bajo las mismas condiciones presentaron reducciones en su viabilidad inferiores a 10⁶ UFC/g.

Heidebach et al. (2010), reportaron que la sobrevivencia de *Bifidobacterium* Bb12 y *Lactobacillus* F19 encapsulada disminuyó con el aumento de la actividad del agua de 0.11 a 0.33 a una temperatura de 25 °C utilizando caseinato de sodio como material pared. Por otro lado, Barajas-Álvarez et al. (2022) informaron una pérdida de viabilidad promedio inferior a 1 Log UFC/g con valores bajos de aw (0.11 y 0.23) después de ocho semanas de almacenamiento empleando trehalosa..

Al igual que nuestros resultados, Moayyedi et al. (2018), observaron una disminución en la viabilidad de 1.5 Log UFC/g a 25 °C y un valor de actividad de agua de 0.32 al utilizar proteínas aisladas de suero, inulina de achicoria y goma persa. Sin embargo, en este estudio no se examinó cómo diferentes valores de aw afectan la pérdida de viabilidad.

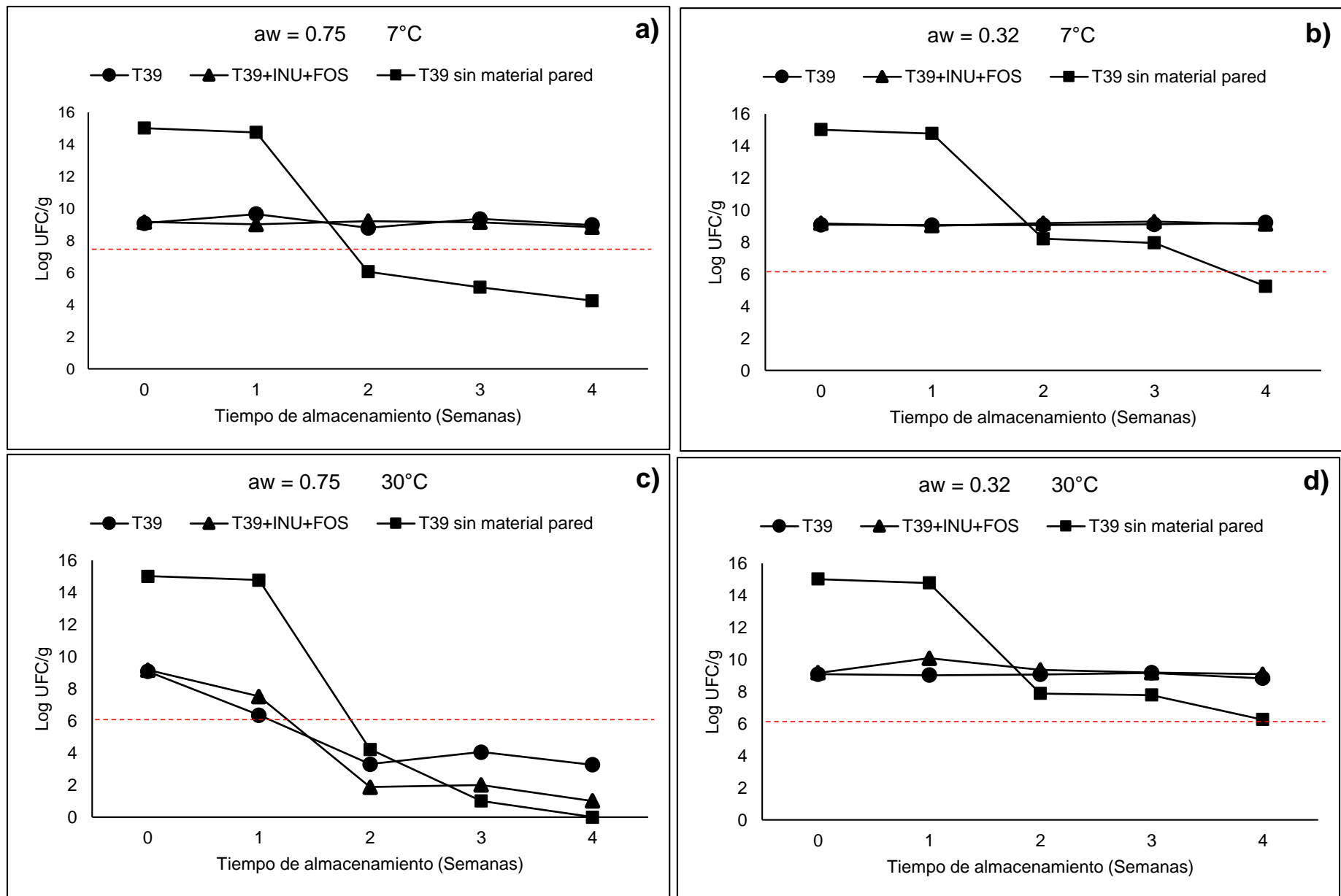


Figura 18. Sobrevivencia de T39 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y C, aw = 0.32.

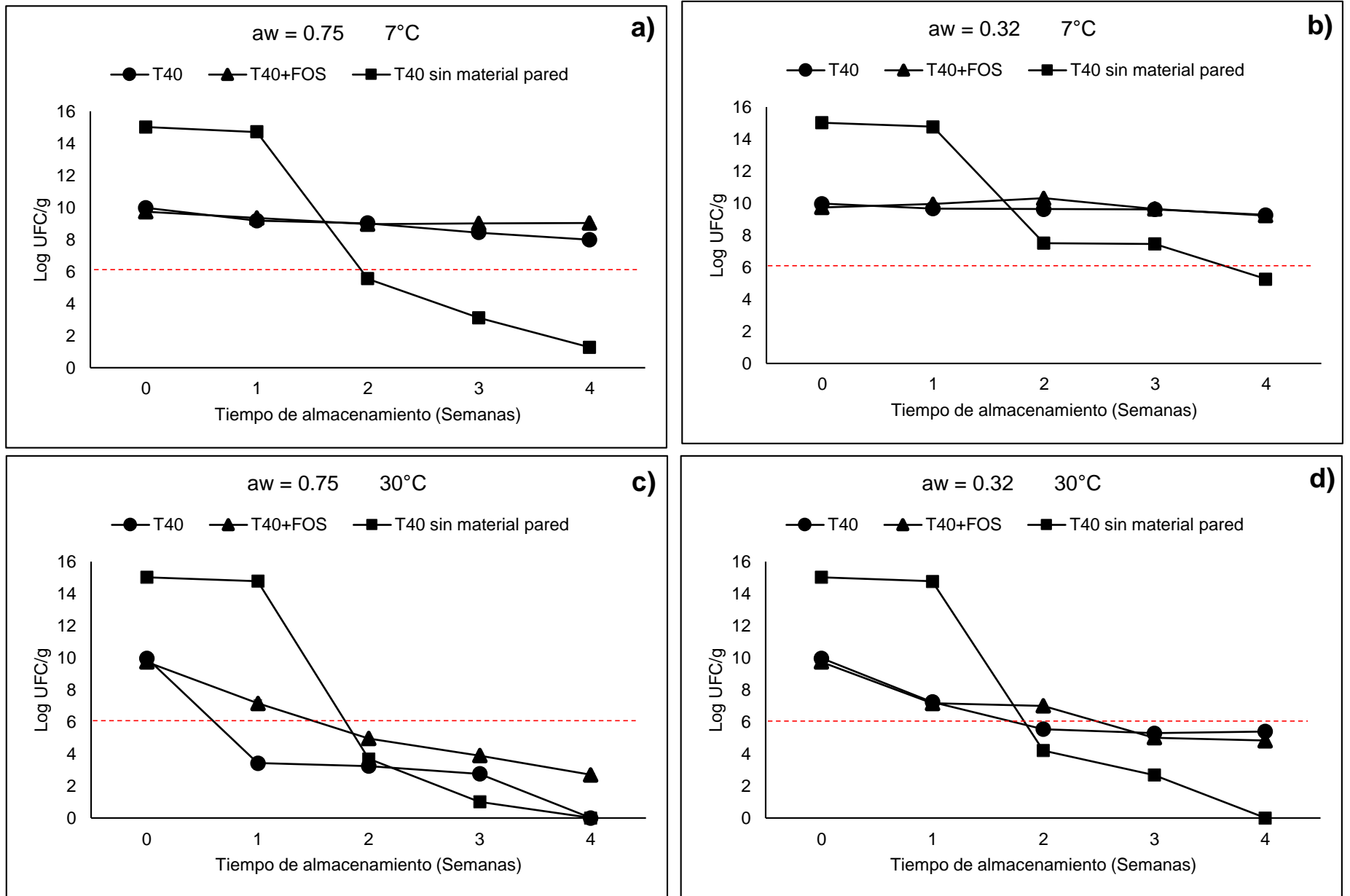


Figura 19. Sobrevivencia de T40 microencapsulada con y sin prebiótico durante el almacenamiento (4 semanas) a 7°C y 30°C y a diferentes niveles de actividad de agua (aw). A y C, aw = 0.75; B y D, aw = 0.32.

Además, un valor elevado de a_w puede reducir la tasa de sobrevivencia de los probióticos debido al desarrollo de otras bacterias y hongos, los cuales generan reacciones químicas no deseadas (Dinkçi et al., 2019; Šipailienė & Petraitytė, 2018).

Por lo general, los productos probióticos son almacenados durante un largo período antes de ser consumidos. La efectividad de su encapsulación radica en mantener la viabilidad de los probióticos por encima de la cantidad mínima recomendada (10^6 UFC/g) durante los procesos de producción, almacenamiento y consumo, garantizando así su efecto beneficioso (Bustamante et al., 2020).

Por otro lado, es importante evaluar la viabilidad de los probióticos encapsulados a diferentes condiciones de almacenamiento variando temperaturas y humedades, ya que una adecuada humedad relativa podría mantener la viabilidad de los probióticos, sin necesidad de condiciones de refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La estabilidad de sobrevivencia de BAL microencapsuladas con prebióticos a condiciones controladas de almacenamiento puede ofrecer diversas aplicaciones. Una de ellas es que podría ser que sean empleados como suplementos con probióticos y prebióticos. Ya que los microencapsulados pueden utilizarse en la fabricación de suplementos dietéticos que combinan beneficios de los probióticos (BAL) y prebióticos (Viana, 2022). La creciente demanda en el mercado de alimentos y suplementos funcionales que contienen probióticos y que requieren estabilidad incluso en condiciones no refrigeradas plantea un desafío significativo para las industrias de alimentos y suplementos (Ying et al., 2016). En este sentido de acuerdo a los resultados obtenidos las BAL que podrían emplearse para este tipo de productos serían las tres cepas de *E. lactis* (T33, T38 y T39) encapsuladas debido a que temperaturas de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con a_w 0.32 presentaron viabilidades por encima de 6 Log UFC/g después de 30 días de almacenamiento.

6.11.7 Morfología de microcápsulas de cepas BAL con y sin prebióticos después del almacenamiento

En las Figuras 20, 21 y 22 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los polvos de *E. lactis* T38 y *L. paracasei* T40, respectivamente, después de un período de almacenamiento de cuatro semanas en condiciones controladas de actividad de agua y temperatura. Estas micrografías muestran que las microcápsulas analizadas con una a_w de 0.32 conservaron su estructura morfológica inicial aparentemente sin cambios, tanto a 7 °C como a 30 °C. Es relevante señalar que estos resultados se correlacionan con la viabilidad de estos microorganismos bajo las mismas condiciones de almacenamiento, mostrando concentraciones de alrededor de 8 Log UFC/g.

En resumen, las cápsulas mantuvieron su integridad, ya que no mostraron grietas o fracturas visuales en sus superficies, lo que sugiere que la permeabilidad al aire es mínima o inexistente y, por lo tanto, garantiza una mayor protección de los microorganismos probióticos (Rajam & Anandharamakrishnan, 2015).

Por otro lado, las micrografías revelaron que cuando las microcápsulas son almacenadas con una actividad de agua elevada (0.75) estas pierden su forma regular (esferas con concavidades en la superficie). Este cambio afectó la viabilidad celular, ya que un aumento en los niveles de humedad y en la actividad del agua en los alimentos conlleva a una disminución en la tasa de supervivencia de los probióticos (Barajas-Álvarez et al., 2022).

Una baja actividad de agua ($a_w < 0.3$) es fundamental para asegurar una óptima supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento. Para la mayoría de las especies de lactobacillus, se considera que la actividad de agua ideal oscila entre 0.11 y 0.23. El incremento en la actividad de agua conlleva a la disminución de la viabilidad de las células probióticas, ya que propicia un aumento en el crecimiento de otros microorganismos y hongos, así como la ocurrencia de reacciones químicas no deseables (Anekella & Orsat, 2013).

De igual forma que nuestros resultados Weinbreck et al. (2010) llevaron a cabo un estudio sobre la viabilidad de *L. rhamnosus* GG en distintos niveles de actividad de

agua (rango entre 0.15 y 0.70) a una temperatura de 37 °C. Los resultados indicaron que una alta actividad de agua (0.70) provocó una pérdida de más de 10 Log UFC/g en la viabilidad celular tras un período de almacenamiento de 2 semanas. Durante este proceso, no solo la actividad del agua, sino también la humedad relativa del entorno, las características de absorción de humedad y la movilidad molecular dentro de la matriz alimentaria tienen un impacto significativo en la viabilidad de los probióticos (Rodríguez, S., 2012).

Desde un punto de vista comercial, es importante mantener la estabilidad del polvo atomizado durante la vida útil.

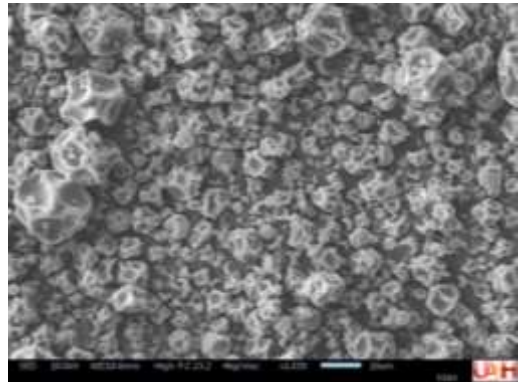
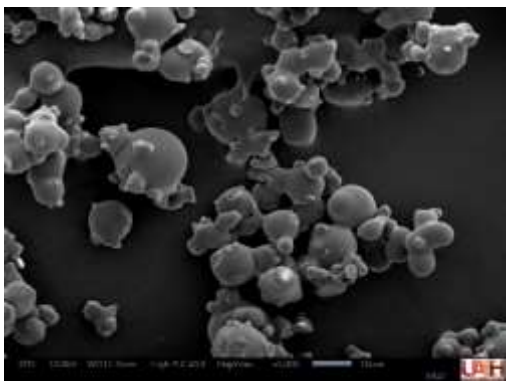
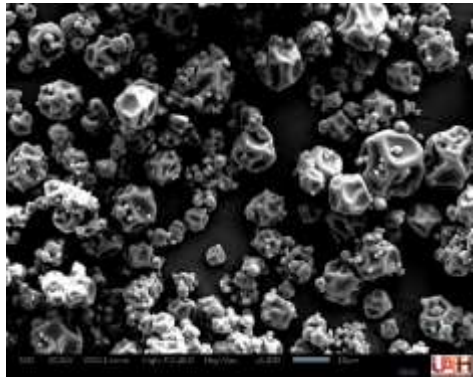
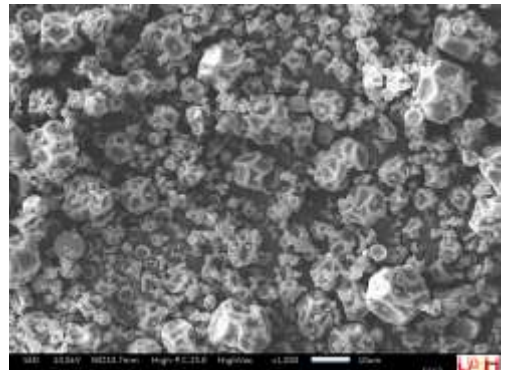
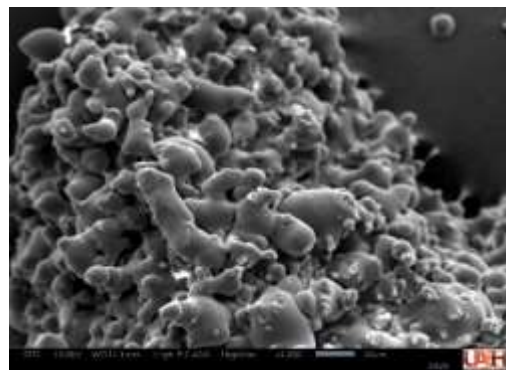
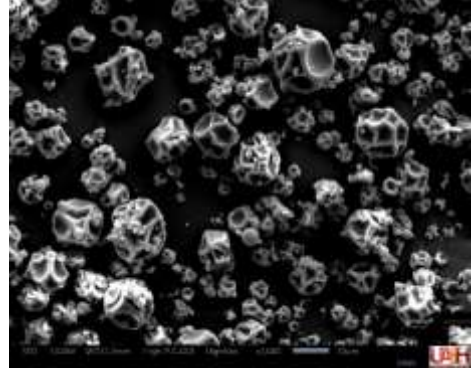
Micrografías de microcápsulas de T38 después de 4 semanas de almacenamiento			
7 °C			
	Después del secado (T 0)	aw 0.75	aw 0.32
Inulina			
FOS			

Figura 20. Micrografías de microcápsulas de T38 con inulina y FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 (T 0) y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 7 °C.

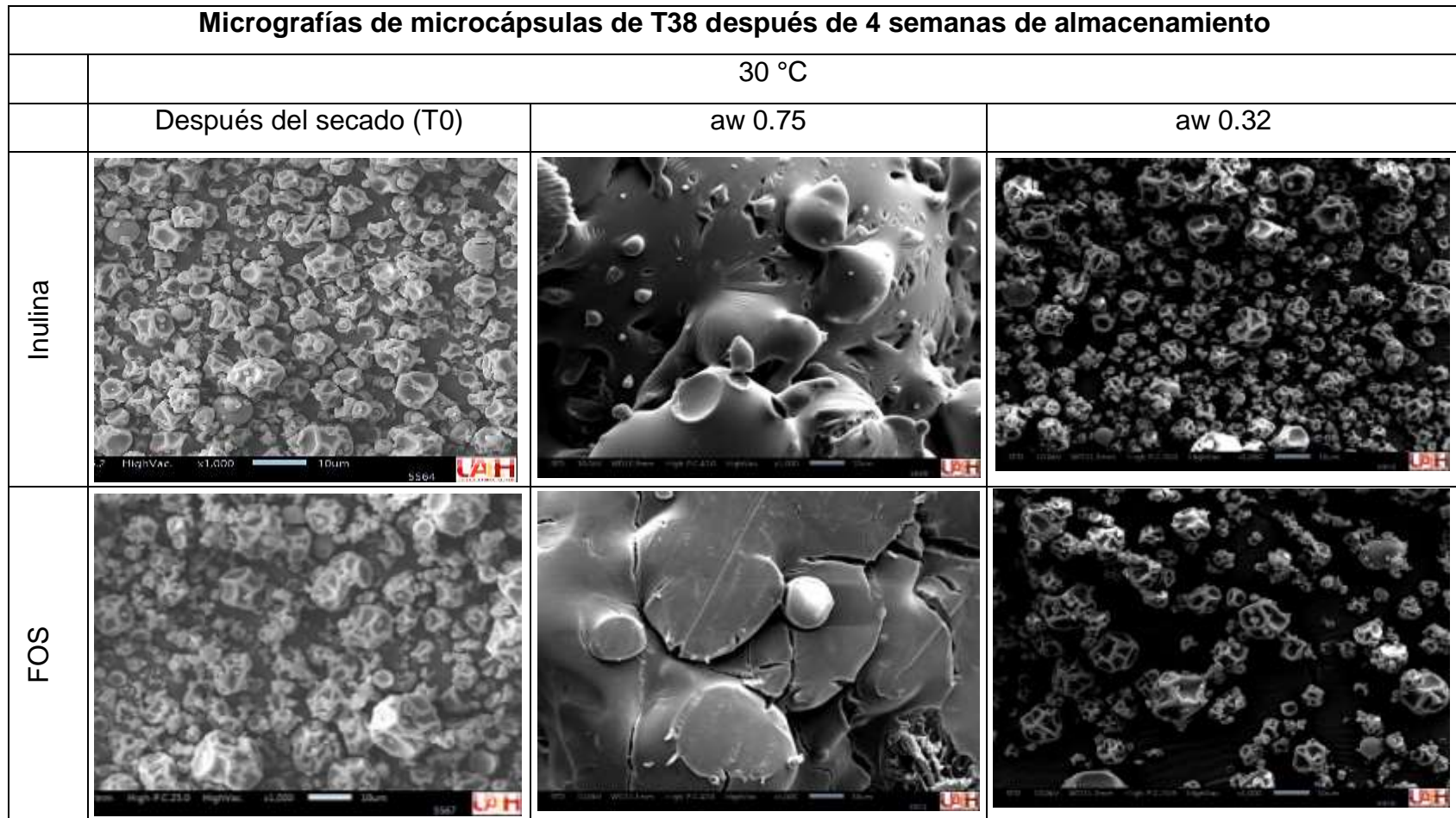


Figura 21. Micrografías de microcápsulas de T38 con inulina y FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 (T0) y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 30 °C.

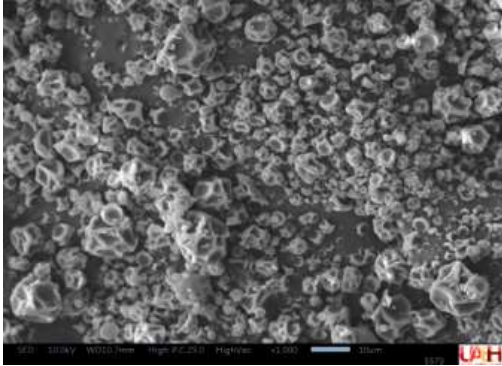
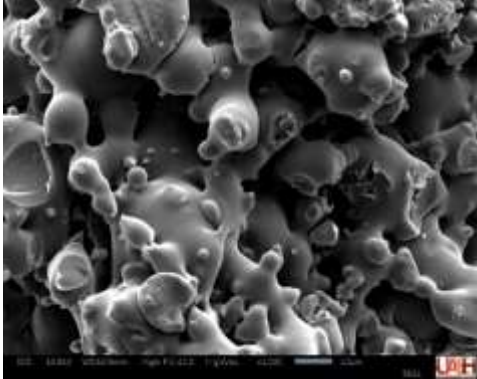
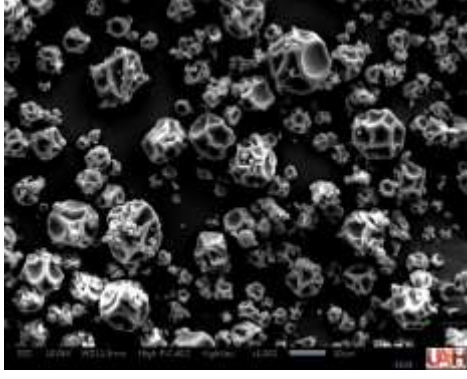
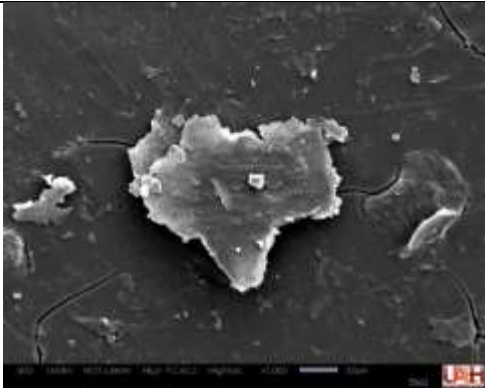

Micrografías de microcápsulas de T40 después de 4 semanas de almacenamiento		
T 0	 <p>Después del secado</p>	
	7 °C	
	aw 0.75	aw 0.32
FOS		
	30 °C	
	aw 0.75	aw 0.32
		

Figura 22. Micrografías de microcápsulas de T40 con FOS obtenidas por MEB (1500X) a tiempo 0 y después de cuatro semanas de almacenamiento con actividades de agua de 0.32 y 0.75 a temperaturas de 7 °C y 30 °C.

Etapas 2:

Pruebas *in vivo*

6.12 Evaluación *in vivo* el efecto inhibitorio de *E. lactis* cepas T33, T38 y T39 en mezcla, con y sin prebióticos encapsuladas contra *C. jejuni*.

6.12.1 Distribución de ratones por grupo y condiciones de experimentación

La Figura 23 ilustra la distribución de ratones en jaulas, cada una albergó a 4 ratones, lo que resulta en el uso de 2 jaulas por tratamiento (8 ratones). Esta cantidad se seleccionó debido a los niveles generalmente bajos de sociabilidad observados en los ratones BALB/c. Además, esta cepa de ratones presenta otros fenotipos, como niveles relativamente altos de ansiedad, comportamientos agresivos y subdesarrollo del cuerpo calloso (Brodkin, 2007). No obstante, esta cepa es más propensa al desarrollo de colitis, por lo que se utiliza comúnmente en investigaciones relacionadas con afecciones intestinales (Adedara et al., 2017; Pandurangan et al., 2015) .



Figura 23. Distribución de ratones BALB/c en jaulas

Los ratones fueron sometidos a una semana de observación antes del inicio de la experimentación. Durante este período, se observaron comportamientos agresivos entre ratones que compartían una misma jaula. Debido a esto, se optó por alojar a cada ratón de forma individual, implementando además elementos de distracción

con la finalidad de reducir sus niveles de agresividad y ansiedad, tal como se ilustra en la Figura 24.

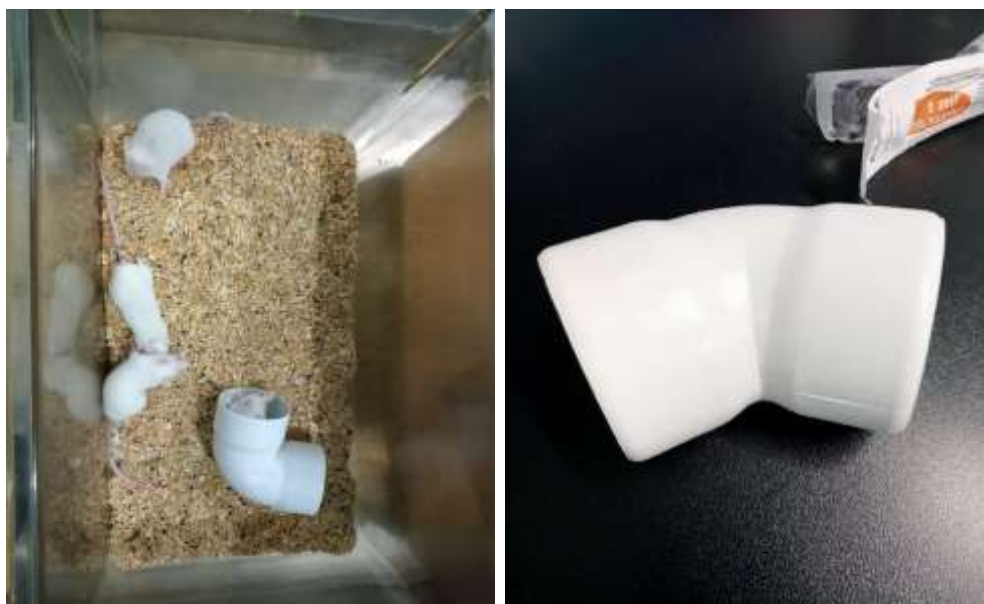


Figura 24. Elementos de recreación incluidos en jaulas de ratones

La inclusión de estos elementos de recreación en jaulas ayudo a evitar pelias entre los roedores y por ende lesiones entre los ellos, ya que este tipo de conductas pudieron representar una alteración en los resultados. Algunos autores como Rojas-Carvajal et al. (2022), mencionan que la inclusión de estímulos adicionales como distractores, gimnasios o ruido podría aumentar aún más la validez y el alcance del modelo.

En cuanto a la administración intragástrica de los tratamientos descritos en el apartado 5.13.2, esta se realizó en condiciones de esterilidad en volumen de 100 μ L con ayuda de una cánula calibre 20 tal y como se aprecia en la Figura 25. La administración se realizó por las mañanas tratando se seguir la misma rutina, para evitar situaciones o condiciones de estrés para los animales.



Figura 25. Administración intragástrica de los diferentes tratamientos

6.12.2 Adherencia de BAL en intestinos de ratón BALB/c

Los beneficios a la salud que una cepa probiótica pueda tener se fundamentan en su capacidad de unirse y establecerse en el cuerpo (Li et al., 2019). A pesar de ello, existe una falta de información respecto a sus niveles de unión y establecimiento. Se emplearon las cepas *E. lactis* T33, T38 y T39 para determinar si eran capaces de adherirse al epitelio intestinal de ratones. Para ello, se les indujo resistencia a rifampicina de tal forma que se pudiera realizar una siembra selectiva al incorporar este antibiótico a los medios de cultivos. Los roedores fueron administrados con las BAL por un periodo de 21 días consecutivos.

Por otra parte, es importante señalar que la cepa *L. paracasei* T40 no se incluyó en esta experimentación debido a que los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* no evidenciaron el mejor efecto contra el patógeno de prueba *C. jejuni*, a diferencia de lo observado con las cepas de *E. lactis*. En este estudio, se llevaron a cabo seis diferentes tratamientos, destacándose por la administración intragástrica a ratones BALB/c de tres cepas diversas de *E. lactis* T33, T38 y T39 encapsuladas, algunas con prebióticos y otras sin ellos, durante un período de 21 días. Al finalizar esta administración de probióticos, los roedores fueron infectados con *C. jejuni* y posteriormente se les mantuvo hasta el día 28 sin recibir probióticos. Es relevante señalar que uno de los tratamientos consistió en la administración de antibiótico (oxitetraciclina) después de la inoculación del patógeno.

Para evaluar la colonización de *E. lactis* T33, T38 y T39 después su de administración en ratones, se procedió al sacrificio, extrayendo sus intestinos para llevar a cabo el recuento de las bacterias lácticas. Dado que las cepas BAL objeto de estudio presentaban resistencia a la rifampicina, el recuento se realizó en placas con rifampicina con el fin de evitar la interferencia de otras especies. Para analizar la colonización de *E. lactis* T33, T38 y T39 después de 21 días de administración en ratones, estos fueron sacrificados al día 28 extrayendo los intestinos para posteriormente realizar el conteo las bacterias lácticas. Dado que las cepas BAL de estudio presentaban resistencia a la rifampicina, el recuento realizado en placas con rifampicina pudo evitar la interferencia de otras especies. Tal y como se aprecia en la Figura 26 los roedores que fueron administrados únicamente con PBS no mostraron presencia de BAL en comparación con los administrados con alguna cepa de *E. lactis* T33, T38 y T39 (8 Log UFC/mL) hallando una concentración alrededor de 4 Log UFC/g. Estos resultados coinciden con lo reportado por Li et al. (2019) quienes hallaron que el número de células de *L. rhamnosus* disminuyó después de la alimentación intragástrica se mantuvo estable en aproximadamente 5 Log UFC/g.

Por otro lado, los mismos autores (Li et al., 2019) mencionaron que los probióticos se establecen en diferentes secciones del intestino que comprenden desde el extremo proximal del intestino delgado hasta el extremo distal del intestino grueso. Sin embargo, la cantidad de cepas de probióticos que lograron establecerse mostró un incremento progresivo desde la parte inicial del intestino delgado (duodeno < yeyuno < íleon) hacia la sección más alejada del intestino grueso. Concluyendo que este comportamiento indica una variación en la preferencia de colonización entre las diferentes secciones intestinales y las cepas específicas. Ya que observaron una disminución en el número de *L. rhamnosus* presente en el colon en comparación con el intestino delgado más alejado (íleon), principalmente debido a la presencia de una variedad compleja de especies bacterianas en el colon.

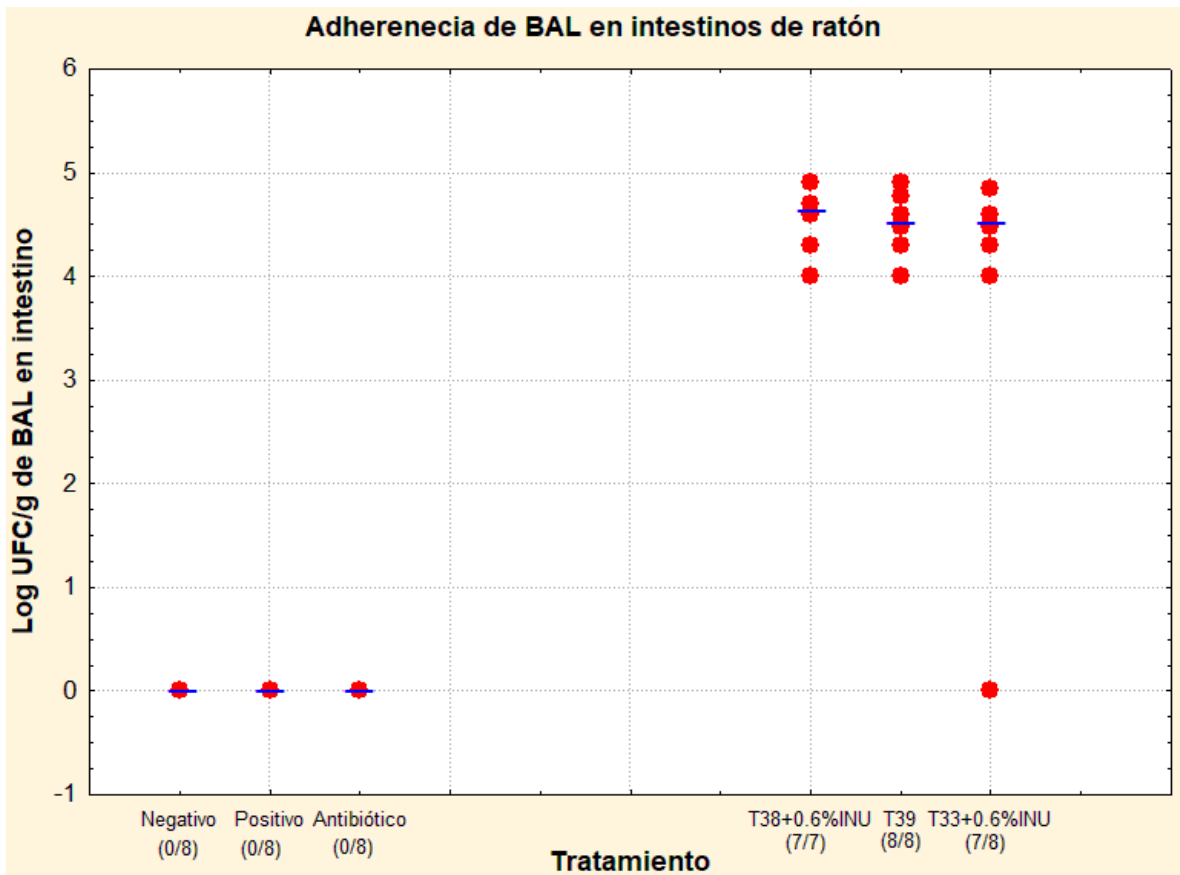


Figura 26. Adherencia de BAL en intestinos de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de BAL gastrointestinales mediante cultivo después del sacrificio (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*

Para sugerir un comportamiento de establecimiento de las cepas de BAL analizadas se tendría que realizar diversas investigaciones como técnicas moleculares en cada una de las secciones del intestino delgado y del intestino grueso.

6.12.3 Adherencia de *C. jejuni* en intestinos de ratón BALB/c

Las bacterias del género *Campylobacter*, especialmente *Campylobacter jejuni*, representan una de las principales causas de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos. Su incidencia suele estar vinculada principalmente a la contaminación de productos cárnicos durante su procesamiento. Para causar infección, *Campylobacter* spp. requiere adherirse a las células epiteliales presentes en la capa mucosa, sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal y establecerse en el intestino del huésped. La inclusión de bacterias probióticas podría favorecer una adhesión competitiva a las células epiteliales y, como resultado, disminuir la colonización por *Campylobacter jejuni* (Šikić Pogačar et al., 2020).

Los ratones que recibieron microcápsulas de la cepa T33 junto con un 0.6% de inulina no presentaron rastros de *C. jejuni* en sus intestinos, tal y como se aprecia en la Figura 27. En contraste, en los animales tratados con microcápsulas de las cepas T38+0.6% inulina y T39, únicamente dos de los ocho ratones mostraron presencia del patógeno.

Un hallazgo relevante a destacar es que los roedores que recibieron tratamiento con antibióticos después de la infección con *C. jejuni* mostraron un recuento aproximado de 4 Log UFC/g en sus intestinos. Estos resultados indican que las cepas *E. lactis* T33, T38 y T39 lograron inhibir la capacidad de adhesión de *C. jejuni* al epitelio intestinal de los ratones en comparación con el antibiótico.

Nuestros resultados coinciden con lo hallado por Šikić Pogačar et al. (2020) ya que reportaron que la adición de bacterias probióticas *Lactobacillus* spp. PCS20, PCS22, PC25 y PCK9 disminuyó significativamente la adherencia de *C. jejuni* a las células PSI cl.1 y B1OXI en comparación con las células no tratadas con el probiótico. También la adición de células PCS20, PCS22, PCS25 y PCK9 disminuyó significativamente la cantidad de *C. jejuni* adherida a las células PSI cl.1 después de 17 h y 24 h de infección.

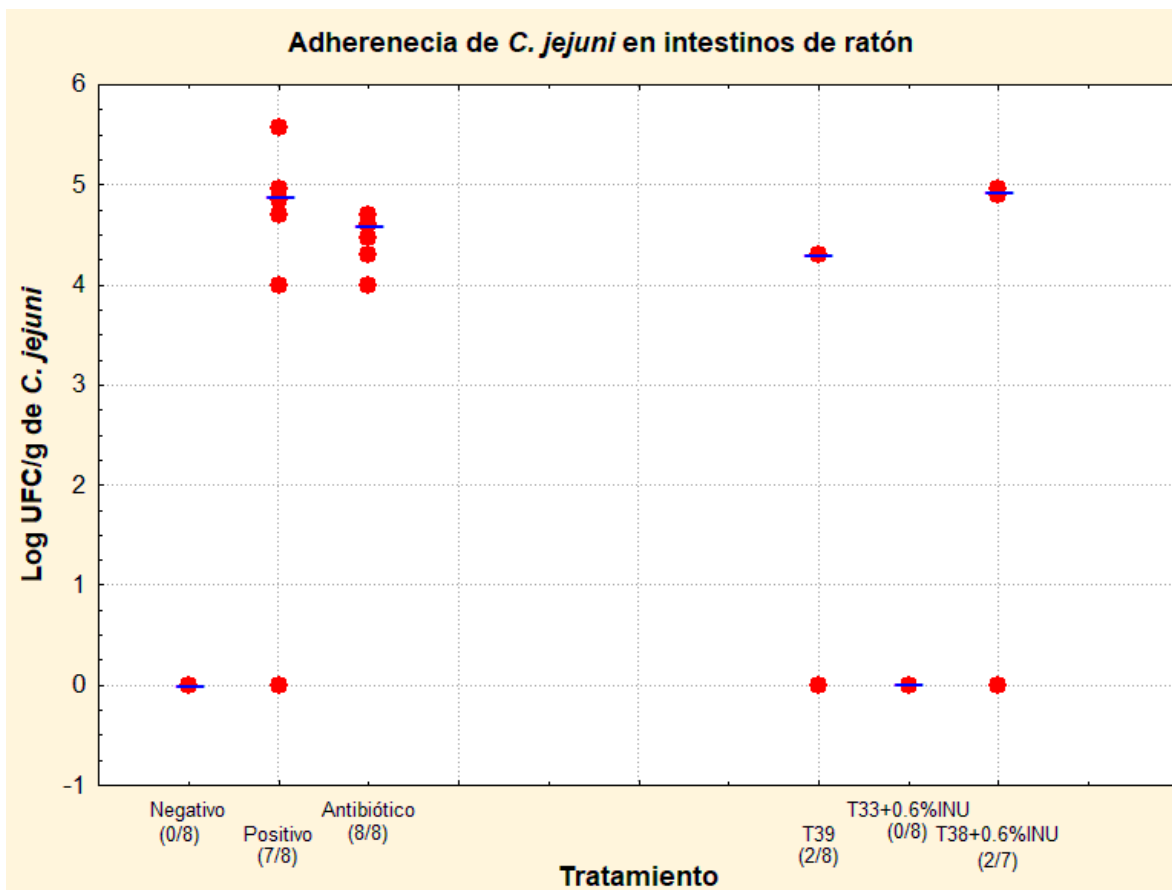


Figura 279. Adherencia de *C. jejuni* en intestinos de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de *C. jejuni* gastrointestinales mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*

En la presente investigación, hemos centrado la atención en el empleo de probióticos como una estrategia alternativa a los antibióticos. Se ha constatado que estos microorganismos mejoran los niveles de glucosa y albúmina en la sangre, lo que indica una posible mejora en la digestión y la absorción de nutrientes en el ganado avícola. Así mismo, reduce los niveles de triglicéridos y colesterol en la sangre, promueven la salud del revestimiento gastrointestinal y mejoran la composición de la microbiota intestinal. Esta relación simbiótica establecida en el huésped contribuye al bienestar general. Estos hallazgos podrían desempeñar un

papel relevante en la prevención e incluso en el tratamiento de diversas enfermedades humanas al retrasar la colonización por *C. jejuni* y aliviar las señales adversas provocadas durante la infección por esta bacteria.

Con los resultados hallados confirmamos que la presencia de estas bacterias probióticas obstaculizaba la capacidad de *C. jejuni* para adherirse a la superficie celular. Por lo tanto coincidimos con los resultados de Mohan (2015) , quien informó que ciertas cepas probióticas pueden prevalecer sobre *C. jejuni* a través de diversos mecanismos de acción. En particular, Mohan (2015) señaló que los probióticos lograron llegar más rápidamente a los sitios de adhesión, compitiendo de manera exclusiva contra *C. jejuni* al ocupar estos sitios de adhesión. Los datos obtenidos en la presente investigación evidencian que *E. lactis* T33 encapsulado con 0.6% de inulina fue la BAL más efectiva, reduciendo al máximo la capacidad de *C. jejuni* para adherirse a las células epiteliales de los intestinos de ratón.

6.12.4 Translocación de *C. jejuni* en hígado y bazo de ratón BALB/c

A continuación, se presenta la capacidad de las cepas probióticas *E. lactis* T33, T38 y T39 para limitar la translocación de *C. jejuni* a órganos diana como hígado y bazo. O bien, si solo se limitan al tracto intestinal.

Los resultados obtenidos reflejan un comportamiento similar al registrado en los intestinos. Tanto que, los ratones que recibieron microcápsulas de la cepa T33 junto con un 0.6% de inulina no mostraron translocación de *C. jejuni* hacia el hígado. Probablemente, la cepa T33 actuó mediante el mecanismo de barrera adhiriéndose en los intestinos de ratón y evitando la translocación de *C. jejuni* a diversos órganos diana. (Figura 28 y 29).

Por otro lado, en el caso de los ratones tratados con microcápsulas de las cepas T38 con inulina y T39, respectivamente. Solo uno de los ocho roedores mostró evidencia de translocación en hígado (Figura 28). Por otro lado, estos mismos roedores mostraron la presencia de *C. jejuni* en bazo (Figura 29).

En un estudio realizado por Kita et al. (1992) mostraron que ratones infectados por vía intragástrica con cepas hepatotóxicas de *C. jejuni* presentaron un trastorno

hepático crónico, siendo la infiltración una lesión característica de las células mononucleares. Lo que evidencia que *C. jejuni* es capaz de causar un daño importante en el hígado. Sin embargo, en la presente investigación los probióticos de estudio podrían mitigar dichos daños, ya que la translocación presentada fue baja en comparación con los otros tratamientos. Varios patógenos son capaces de provocar lesiones hepáticas en ratones, por ejemplo *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, y el cambio histológico característico inducido por estas bacterias es una respuesta proliferativa crónica (Kita et al., 1992).

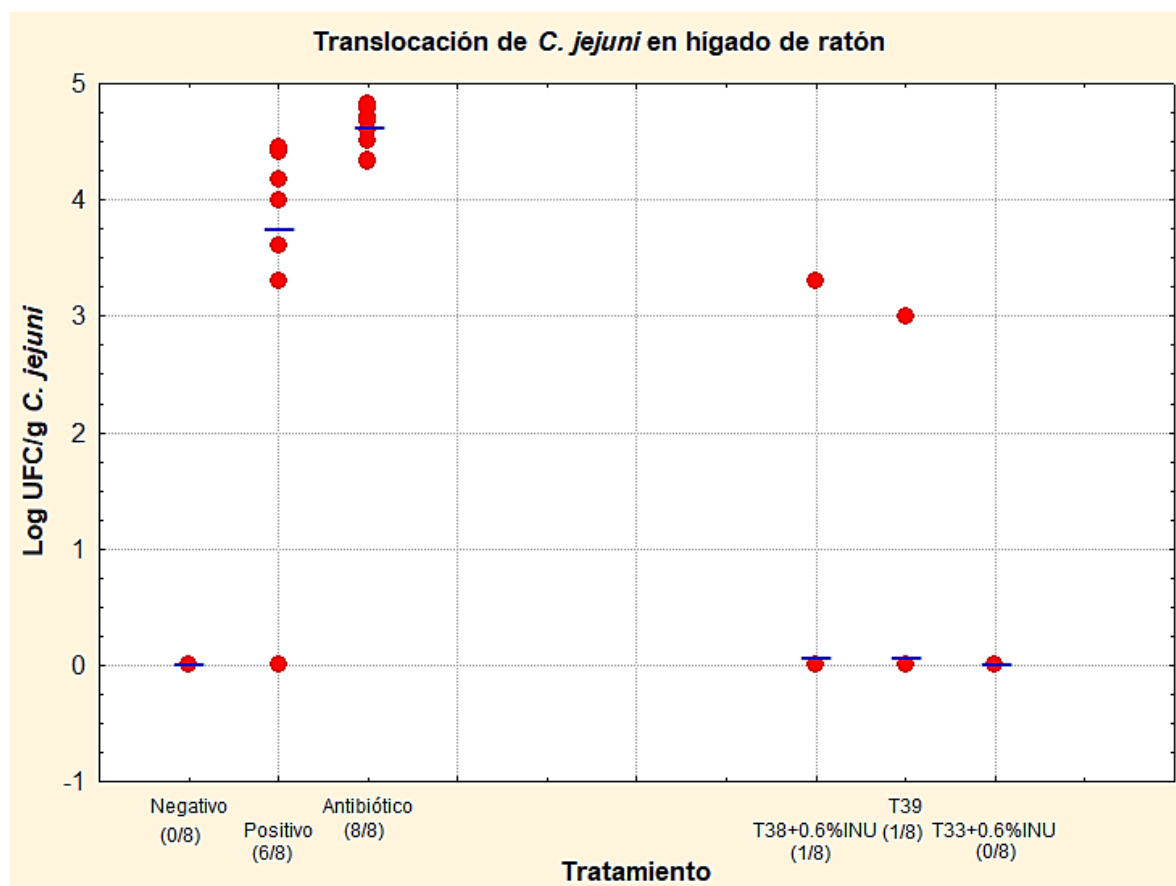


Figura 28. Translocación de *C. jejuni* en hígado de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de *C. jejuni* en bazo mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*

En el caso de la campilobacteriosis, se ha comprobado que los probióticos, especialmente los lactobacilos, tienen la capacidad de coagregarse con *C. jejuni*. Esta acción reduce la adhesión y la invasión en las capas de células epiteliales del intestino, al mismo tiempo que disminuye la motilidad, un aspecto esencial para la patogenicidad (Ding et al., 2005; Nishiyama et al., 2015). En la sección 6.9.2 se confirma que, los probióticos estudiados tienen la habilidad de coagregarse con *C. jejuni*. Esta capacidad posiblemente esté siendo un factor crucial para prevenir la translocación de este patógeno a otros órganos.

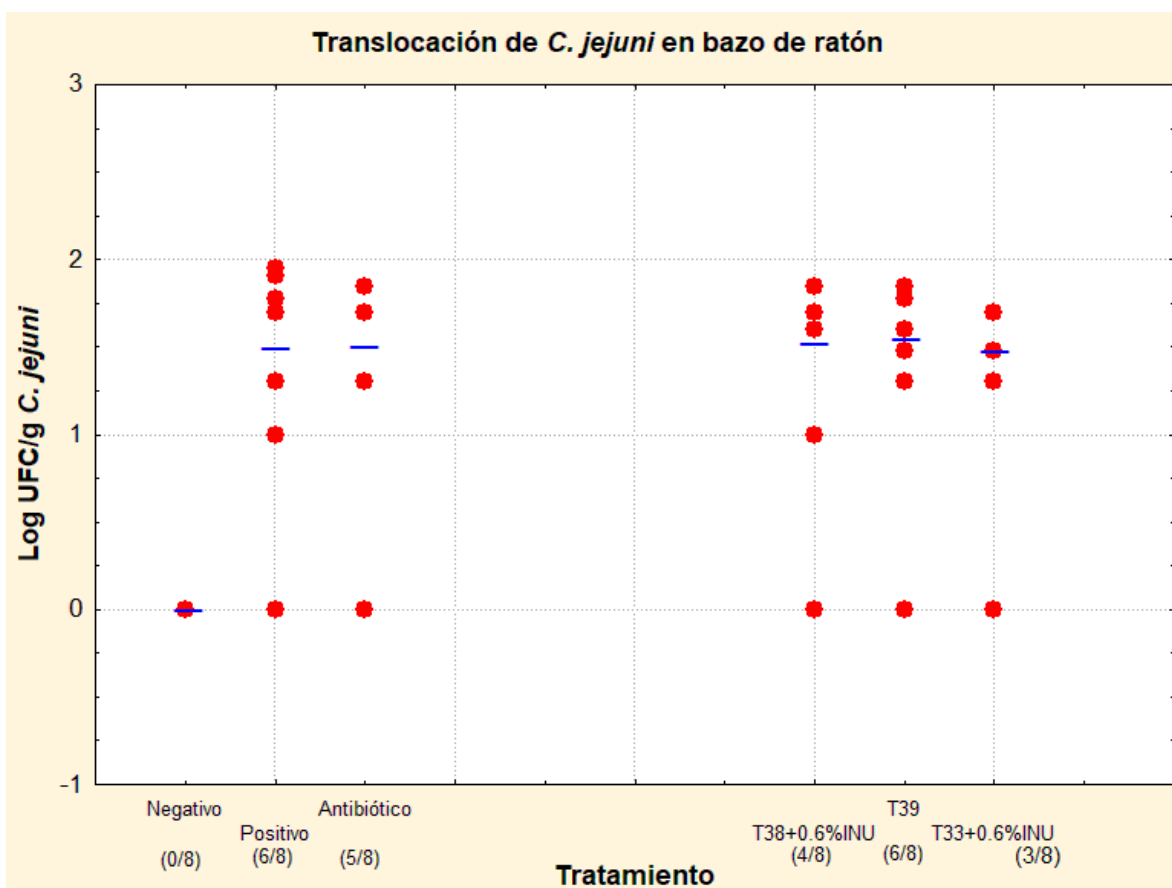


Figura 29. Translocación de *C. jejuni* en bazo de ratón BALB/c. Se determinaron las cargas de *C. jejuni* en bazo mediante cultivo (expresadas como Logaritmos de unidades formadoras de colonias por g de intestino, UFC/g). Se dan los promedios (barras azules) y el número de ratones con cultivo positivo del número total de animales analizados (entre paréntesis). Negativo: Sin administración de BAL o *C. jejuni*; Positivo: *C. jejuni* (10^8 UFC/mL); T38+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T39: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*; T33+0.6%INU: 21 de administración del tratamiento y administración de *C. jejuni*

Sin embargo, los mecanismos anteriormente no son los únicos que los probióticos podrían emplear contra patógenos entéricos en el tracto gastrointestinal algunos otros son (van Zyl et al., 2020):

A. Impacto directo en las células epiteliales intestinales (CEI):

- Estimulación de la producción de mucina por parte de las células caliciformes, formando una capa densa de moco que refuerza la barrera protectora.
- Aumento en la secreción de proteínas antimicrobianas (defensinas) por parte de las CEI, ayudando a eliminar comensales o patógenos que atraviesan la capa mucosa.
- Mejora en la estabilidad de las uniones intercelulares (uniones estrechas), reduciendo la permeabilidad de las CEI a patógenos y otros antígenos.

B. Acción antimicrobiana:

- Muchos probióticos pueden inhibir patógenos entéricos mediante la producción de sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas.

C. Competencia y ocupación de sitios de adhesión:

- Los probióticos compiten con comensales y patógenos por sitios de adhesión en la capa mucosa o en las CEI, previniendo su colonización dañina y mejorando la función de barrera.

Los probióticos también pueden alterar la composición natural de la microbiota intestinal y la expresión génica, lo que contribuye a mejorar la integridad de la barrera a través de la microbiota comensal.

En los últimos años, ciertos informes han sugerido que los probióticos que no son viables, ni colonizadores también podrían ofrecer beneficios para la salud del hospedador (S. A. dos Reis et al., 2017; Plaza-Diaz et al., 2019; van Zyl et al., 2020). A lo largo del paso por TGI, estas bacterias probióticas que no colonizan de manera permanente siguen siendo metabólicamente activadas, lo que resulta en efectos positivos para la salud de su hospedador (Sebastián Domingo, 2017).

7. CONCLUSIONES

En este estudio, las cepas *Enterococcus lactis* T33, T38 y T39 demostraron inhibir a *C. jejuni* y *H. pylori* de forma *in vitro*. En presencia de inulina o FOS este efecto se vio incrementado. Por otro lado, la cepa *Lacticaseibacillus paracasei* y las tres cepas de *E. lactis* fueron capaces de inhibir significativamente la actividad de la ureasa producida por *H. pylori*. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que este efecto inhibidor se reproduzca de manera similar en modelos *in vivo*.

El proceso de encapsulamiento y la presencia de inulina o FOS ayudaron a las cuatro cepas estudiadas a conservar la concentración de microorganismo por encima de los niveles recomendados (10^6 UFC/mL). Esto se evidencia tanto en la prueba de resistencia a pH 2 y 3 como en la prueba de resistencia a sales biliares.

Además, estas cepas BAL (T33, T38, T39) presentaron una sobrevivencia por encima de lo recomendado después de ser almacenadas en condiciones controladas de temperatura y actividad de agua. Este hecho sugiere su potencial para ser incorporados en diversos alimentos. Por otro lado, estas cepas también podrían resistir las condiciones adversas del tractogastrointestinal humano y adherirse al epitelio intestinal de acuerdo con los resultados hallados en las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Estos hallazgos indican un elevado potencial para su utilización como coadyuvantes en tratamientos contra *C. jejuni*.

El tratamiento con la cepa *E. lactis* T33, con un 0.6% de inulina, demostró ser el más eficaz, ya que en el modelo *in vivo* logró prevenir la translocación del patógeno en los órganos diana. Además, se observó una notable adherencia a los intestinos de los ratones.

Sin duda alguna, esta investigación brinda evidencia sobre la capacidad de las cepas de *E. lactis* para inhibir patógenos de preocupación mundial como *C. jejuni* y *H. pylori* y potencializar su actividad antimicrobiana en presencia de prebióticos. Su resistencia a las condiciones extremas del secado por aspersión y a las condiciones de almacenamiento.

8. Referencias

- Abdi, E., Latifi-Navid, S., Zahri, S., Yazdanbod, A., & Pourfarzi, F. (2019). Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma: Insights and new perspectives. *Cancer Medicine*, 8(13), 6114–6126. <https://doi.org/10.1002/cam4.2497>
- Abouloifa, H., Khodaei, N., Rokni, Y., Karboune, S., Brasca, M., D'Hallewin, G., Salah, R. Ben, Saalaoui, E., & Asehraou, A. (2020). The prebiotics (Fructo-oligosaccharides and Xylo-oligosaccharides) modulate the probiotic properties of *Lactiplantibacillus* and *Levilactobacillus* strains isolated from traditional fermented olive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(12), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02961-9>
- Adedara, I. A., Ajayi, B. O., Awogbindin, I. O., & Farombi, E. O. (2017). Interactive effects of ethanol on ulcerative colitis and its associated testicular dysfunction in pubertal BALB/c mice. *Alcohol*, 64, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.06.001>
- Agudelo, J., Cano, A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2017). Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers. *Journal of Functional Foods*, 37, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.014>
- Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Mirhadi Zadi, T., Kuliyeu, A., Franco, B. D. G. de M., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.009>
- Akanuma, G., Kobayashi, A., Suzuki, S., Kawamura, F., Shiwa, Y., Watanabe, S., Yoshikawa, H., Hanai, R., & Ishizuka, M. (2014). Defect in the formation of 70S ribosomes caused by lack of ribosomal protein L34 can be suppressed by magnesium. *Journal of Bacteriology*, 196(22), 3820–3830. <https://doi.org/10.1128/JB.01896-14>

-
- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R., & Gutiérrez-Lopez, G. F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.063>
- Alfredson, D. A., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Allen, S. J., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2011). Probiotics for treating acute infectious diarrhea. *Sao Paulo Medical Journal*, 129(3), 185. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802011000300012>
- Almashhadany, D. A., Mayas, S. M., Mohammed, H. I., Hassan, A. A., & Khan, I. U. H. (2023). Population- and Gender-Based Investigation for Prevalence of *Helicobacter pylori* in Dhamar, Yemen. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2023/3800810>
- Altermann, E., Barrangou, R., Hutkins, R., Cano, R., & Klaenhammer, T. R. (2003). Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15)(15), 8957–8962.
- Andrews, H., & Urias-Silvas, J. (2012). Evaluacion de las propiedades termicas de fructanos de Agave (Agave tequilana Weber var. Azul). *XXXIII Encuentro Nacional y II Congreso Internacional AMIDIQ*, 6–10.
- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.003>
- Aquino, C. R., Carlos, F. D., Padua, F., Tayactac, H., Zulueta, A. H., Roque, E., & Almanzor, N. (2019). Extraction of cellulose from waste papers for the preparation of cellulose graft-poly (acrylamide) for superabsorbent. *MATEC*

- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., Celińska, E., Jankowski, T., Olejnik, A., & Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food Chemistry*, 274, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.033>
- Arsi, K., Donoghue, A. M., Woo-Ming, A., Blore, P. J., & Donoghue, D. J. (2015). The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), 327–334. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv032>
- Ashaolu, T. J., & Reale, A. (2020). A holistic review on euro-asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms*, 8(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081176>
- Ashaolu, T. J., Saibandith, B., Yupanqui, C. T., & Wichienchot, S. (2019). Human colonic microbiota modulation and branched chain fatty acids production affected by soy protein hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 141–148. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13916>
- Atia, A., Gomaa, A., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait, G., & Subirade, M. (2016). A prebiotic matrix for encapsulation of probiotics: Physicochemical and microbiological study. *Journal of Microencapsulation*, 33(1), 89–101. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1134688>
- Attaran, B., & Falsafi, T. (2017). Identification of factors associated with biofilm formation ability in the clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(1), 58–66. <https://doi.org/10.15171/ijb.1368>
- Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, 102(1),

423–430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>

Ayyash, M., Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., Enan, M., El-Tarabily, K., & Shah, N. (2018). In-vitro investigation into probiotic characterisation of Streptococcus and Enterococcus isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*, *87*, 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.019>

Bakhti, S. Z., Latifi-Navid, S., & Safaralizadeh, R. (2020). Helicobacter pylori-related risk predictors of gastric cancer: The latest models, challenges, and future prospects. *Cancer Medicine*, *9*(13), 4808–4822. <https://doi.org/10.1002/cam4.3068>

Ballongue, J., Schumann, C., & Quignon, P. (1997). Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement*, *32*(222), 41–44. <https://doi.org/10.1080/00365521.1997.11720716>

Balta, I., Butucel, E., Stef, L., Pet, I., Gradisteanu-Pircalabioru, G., Chifiriuc, C., Gundogdu, O., McCleery, D., & Corcionivoschi, N. (2022). Anti-Campylobacter Probiotics: Latest Mechanistic Insights. *Foodborne Pathogens and Disease*, *19*(10), 693–703. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0039>

Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of Lactobacillus rhamnosus HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *Lwt*, *153*(September 2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485>

Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2023). Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal Conditions and Their Impact on Functional Food Formulation. *Food Reviews International*, *39*(2), 992–1013. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1928691>

Barona Rodríguez, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación De Alimentos Probióticos Mediante Liofilización En Presencia De Prebióticos. *Informacion Tecnologica*, *27*(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718->

- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B. E., & Mobley, H. L. T. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, *40*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1136/gut.40.1.25>
- Ben Braïek, O., Ghomrassi, H., Cremonesi, P., Morandi, S., Fleury, Y., Le Chevalier, P., Hani, K., Bel Hadj, O., & Ghrairi, T. (2017). Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *110*(6), 771–786. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0847-1>
- Ben Braïek, O., Morandi, S., Cremonesi, P., Smaoui, S., Hani, K., & Ghrairi, T. (2018a). Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing *Enterococcus lactis* strains. *Lwt*, *92*, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.045>
- Ben Braïek, O., Morandi, S., Cremonesi, P., Smaoui, S., Hani, K., & Ghrairi, T. (2018b). Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic *Enterococcus lactis* strains isolated from raw shrimps. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.021>
- Bersaneti, G. T., Mantovan, J., Magri, A., Mali, S., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 1132–1138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.081>
- Bhatia, S. J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. G., & Mehta, A. P. (1989). *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, *27*(10), 2328–2330. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.10.2328-2330.1989>
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., & Walter, J. (2015). Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews*

Gastroenterology and Hepatology, 12(5), 303–310.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>

Boger, M. C. L., van Bueren, A. L., & Dijkhuizen, L. (2018). Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), 1–16.

Boris, S., & Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*, 2(5), 543–546.
[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00313-0)

Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F., & Bornet, F. R. (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1658–1664. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1658>

Bratz, K., Gölz, G., Janczyk, P., Nöckler, K., & Alter, T. (2015). Analysis of in vitro and in vivo effects of probiotics against *Campylobacter* spp. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 128(3–4), 155–162.
<https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-155>

Brodkin, E. S. (2007). BALB/c mice: Low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behavioural Brain Research*, 176(1), 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.025>

Bustamante, M., Laurie-Martínez, L., Vergara, D., Campos-Vega, R., Rubilar, M., & Shene, C. (2020). Effect of three polysaccharides (inulin, and mucilage from chia and flax seeds) on the survival of probiotic bacteria encapsulated by spray drying. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(13), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/app10134623>

Campana, R., Van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>

- Cani, P. D., Possemiers, S., Van De Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., & Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, *58*(8), 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition*, *2*(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Cazorla, S. I., Maldonado-Galdeano, C., Weill, R., De Paula, J., & Perdigón, G. D. V. (2018). Oral administration of probiotics increases Paneth cells and intestinal antimicrobial activity. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00736>
- Cervantes-García, E. (2016). Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *63*(2), 100–109.
- Champagne, C. P., Raymond, Y., & Tompkins, T. A. (2010). The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiology*, *27*(8), 1104–1111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.017>
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Chen, C., Zhao, G., Chen, W., & Guo, B. (2015). Metabolism of fructooligosaccharides in Lactobacillus plantarum ST-III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(22), 7697–7707. <https://doi.org/10.1128/AEM.02426-15>

-
- Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 83–112. <https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch4>
- Chiang, S. L., Taylor, R. K., Koomey, M., & Mekalanos, J. J. (1995). Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. *Molecular Microbiology*, 17(6), 1133–1142.
- CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute. (2011). Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing. An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 33, Issue 1).
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Corona, L., Lussu, A., Bosco, A., Pintus, R., Marincola, F. C., Fanos, V., & Dessì, A. (2021). Human milk oligosaccharides: A comprehensive review towards metabolomics. *Children*, 8(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/CHILDREN8090804>
- Cortés, R. N. F., Martínez, M. G., Guzmán, I. V., Llano, S. L. A., Grosso, C. R. F., & Bustos, F. M. (2014). Evaluation of modified amaranth starch as shell material for encapsulation of probiotics. *Cereal Chemistry*, 91(3), 300–308. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-13-0112-R>
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 99–118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Coticchia, J. M., Sugawa, C., Tran, V. R., Gurrola, J., Kowalski, E., & Carron, M. A. (2006). Presence and Density of *Helicobacter pylori* Biofilms in Human Gastric

Mucosa in Patients With Peptic Ulcer Disease. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 10(6), 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.12.009>

Cui, Y., & Qu, X. (2021). Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. *Trends in Food Science and Technology*, 115(July), 486–499. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.058>

Daza, L. D., Fujita, A., Fávaro-Trindade, C. S., Rodrigues-Ract, J. N., Granato, D., & Genovese, M. I. (2016). Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.10.001>

De Barros, R., Vilela, S., & Alvarenga, D. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083>

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

de Moreno de LeBlanc, A., Dogi, C. A., Galdeano, C. M., Carmuega, E., Weill, R., & Perdigón, G. (2008). Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. *BMC Immunology*, 9(February). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-27>

Ding, W., Wang, H., & Griffiths, M. W. (2005). Probiotics down-regulate *flaA* σ^{28} promoter in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2295–2300. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2295>

Dinkçi, N., Akdeniz, V., & Akalin, A. S. (2019). Survival of probiotics in functional foods during shelf life. In *Food Quality and Shelf Life*. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00006-9>

Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S129–S134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>

dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Peluzio, M. do C. G. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.009>

Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., & Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research*, 134(11), 664–671. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992>

EFSA. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. In *EFSA Journal* (Vol. 19, Issue 2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

Elhadidy, M., Ali, M. M., El-Shibiny, A., Miller, W. G., Elkhatib, W. F., Botteldoorn, N., & Dierick, K. (2020). Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. *PLoS ONE*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227833>

Falfán-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco-Fernández, M. J., & Castro-Rosas, J. (2021). Characterization and Evaluation of the Probiotic Potential in Vitro and in Situ of *Lactobacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. *Journal of Food Protection*, 85(1), 112–121. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-021>

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Joint FAO/WHO working group Report on drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In *World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations* (pp. 1–11).

Felis, G. E., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2009). Taxonomy of Probiotic Microorganisms. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, 591–637.

https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_15

- Félix Aragon, Silvia Carino, Gabriela Perdigón, A. de M. de L. (2015). Inhibition of Growth and Metastasis of Breast Cancer in. *Journal of Immunotherapy*, 38(5), 185–196.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Laursen, R. R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Fernández, J., Moreno, F. J., Olano, A., Clemente, A., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). A galacto-oligosaccharides preparation derived from lactulose protects against colorectal cancer development in an animal model. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02004>
- Figuroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., & Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341–1348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4367>
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s39–s49. <https://doi.org/10.1079/bjn2002628>
- Fooks, Laura J., & Gibson, G. R. (2002). In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00197-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00197-0)
- Fooks, Laura J., & Gibson, G. R. (2003). Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 9(5), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00043-X)
- Franceschi, F., Cazzato, A., Nista, E. C., Scarpellini, E., Roccarina, D., Gigante, G., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2007). Role of probiotics in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 12(SUPPL. 2), 59–63.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00565.x>

Fu, X., Lyu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Guo, X., Chen, Q., & Liu, C. (2022). Safety assessment and probiotic characteristics of *Enterococcus lactis* JDM1. *Microbial Pathogenesis*, 163, 105380. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105380>

Galdeano, C. M., & Perdigón, G. (2004). Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 673–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02353.x>

Gänzle, M. G. (2012). Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal*, 22(2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.010>

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2(Figure 2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

García C, A., Henríquez A, P., Retamal R, C., Pineda C, S., Delgado Sch, C., & González, C. (2009). Propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Médica de Chile*, 137(3), 369–376. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872009000300007>

Ghouri, Y. A., Richards, D. M., Rahimi, E. F., Krill, J. T., Jelinek, K. A., & DuPont, A. W. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 473–487. <https://doi.org/10.2147/CEG.S27530>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and

scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Frost, J. A., Adak, G. K., Horby, P., Swan, A. V., Painter, M. J., & Neal, K. R. (2002). A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A tool for generating hypotheses. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 937–942. <https://doi.org/10.3201/eid0809.010817>

Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R. (2015). Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 137–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706>

Goh, Y. J., Zhang, C., Benson, A. K., Schlegel, V., Lee, J. H., & Hutkins, R. W. (2006). Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7518–7530. <https://doi.org/10.1128/AEM.00877-06>

Gómez H., C., Serpa, A., Velásquez-Cock, J., Gañán, P., Castro, C., Vélez, L., & Zuluaga, R. (2016). Vegetable nanocellulose in food science: A review. *Food Hydrocolloids*, 57, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.023>

Gong, Y., Li, Y., & Sun, Q. (2015). Probiotics improve efficacy and tolerability of triple therapy to eradicate *Helicobacter pylori*: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4), 6530–6543.

Gotteland, M., Brunser, O., & Cruchet, S. (2006). Systematic review: Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(8), 1077–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02868.x>

-
- Gracia, M. I., Millan, C., Sanchez, J., Guyard-Nicodeme, M., Mayot, J., Carre, Y., Csorbai, A., Chemaly, M., & Medel, P. (2016). Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period: Part B. *Poultry Science*, *95*(4), 886–892. <https://doi.org/10.3382/ps/pev346>
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *76*(1), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.008>
- Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Slutsker, L., Tauxe, R. V., Hennessy, T., Griffin, P. M., Pickering, L. K., Steiner, T. S., Thielman, N. M., DuPont, H., Bradley Sack, R., Tarr, P., Neill, M., Nachamkin, I., Reller, L. B., Osterholm, M. T., & Bennish, M. L. (2001). Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(3), 331–351. <https://doi.org/10.1086/318514>
- Guyard-Nicodeme, M., Keita, A., Quesne, S., Amelot, M., Poezevara, T., Berre, B. Le, Sanchez, J., Vesseur, P., Martin, A., Medel, P., & Chemaly, M. (2016). Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period. *Poultry Science*, *95*(4), 886–892. <https://doi.org/10.3382/ps/pev346>
- Haffner, F. B., Diab, R., & Pasc, A. (2016). Encapsulation of probiotics: Insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*, *3*(1), 114–136. <https://doi.org/10.3934/matensci.2016.1.114>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology*, *9*(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.003>

-
- Helander, I., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146–150. [papers3://publication/uuid/DB10A4C9-F57F-4926-987F-B9B087E15FAD](https://doi.org/10.1016/j.tfs.1997.05.001)
- Hernández-López, Z., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Cadena-Ramírez, A., Acevedo-Sandoval, O. A., Gordillo-Martínez, A. J., & Falfán-Cortés, R. N. (2018). Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *Lwt*, 95(December 2017), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.075>
- Hernández Cortez, C., Arreola Aguilera, M., & Castro Escarpulli, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(2), 77–84. http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/campylobacter.pdf
- Hernández, F. (1990). Caracterización de *Campylobacter*, *Helicobacter* y bacterias curvadas asociadas con gastritis y úlceras pépticas. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.*, 11(3/4), 49–56.
- Hidemasa, H., Toshiaki, E., Toshio, T., Takahisa, T., & Yasuhito, T. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora*, 5(1), 37–50. https://doi.org/10.12938/bifidus1982.5.1_37
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2018). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>

-
- Hlashwayo, D. F., Sigaúque, B., & Bila, C. G. (2020). Epidemiology and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in animals in Sub-Saharan Africa: A systematic review. *Heliyon*, *6*(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03537>
- Homan, M., & Orel, R. (2015). Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World Journal of Gastroenterology*, *21*(37), 10644–10653. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10644>
- Hong, S.-S., Lee, H.-A., Kim, J. Y., Jeong, J.-W., Shim, J.-J., Lee, J. L., Sim, J.-H., Chung, Y., & Kim, O. (2018). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus paracasei* HP7. *Laboratory Animal Research*, *34*(4), 216. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.216>
- Huang, R., Pan, M., Wan, C., Shah, N. P., Tao, X., & Wei, H. (2016). Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. *Journal of Dairy Science*, *99*(2), 1002–1010. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9993>
- Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *63*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
- Hütt, P., Andreson, H., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Unt, E., Kals, J., Kampus, P., Zilmer, M., & Mikelsaar, M. (2009). Effects of a synbiotic product on blood antioxidative activity in subjects colonized with *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology*, *48*(6), 797–800. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02607.x>
- Janardhana, V., Broadway, M. M., Bruce, M. P., Lowenthal, J. W., Geier, M. S., Hughes, R. J., & Bean, A. G. D. (2009). Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens. *Journal of Nutrition*, *139*(7), 1404–1409. <https://doi.org/10.3945/jn.109.105007>
- Jawan, R., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., Kapri, M. R., Halim, M., & Ariff, A. B. (2021). In Vitro Evaluation of Potential Probiotic Strain *Lactococcus lactis* Gh1 and Its

Bacteriocin-Like Inhibitory Substances for Potential Use in the Food Industry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 422–440. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09690-3>

Jiménez-Villeda, B. E. (2016). *Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas en medios de cultivo y en ratones CD-1*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Jiménez-Villeda, B. E., Falfán-Cortés, R. N., Rangel-Vargas, E., Santos-López, E. M., Gómez-Aldapa, C. A., Torres-Vitela, M. R., Villarruel-López, A., & Castro-Rosas, J. (2023). Synbiotic Encapsulation: A Trend towards Increasing Viability and Probiotic Effect. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2023/7057462>

Johnson, T. J., Shank, J. M., & Johnson, J. G. (2017). Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00487>

Juntarachot, N., Sunpaweravong, S., Kaewdech, A., Wongsuwanlert, M., Ruangsri, P., Pahumunto, N., & Teanpaisan, R. (2023). Characterization of adhesion, anti-adhesion, co-aggregation, and hydrophobicity of *Helicobacter pylori* and probiotic strains. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 18(5), 1048–1054. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2023.02.017>

Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>

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>

Kaplan, H., & Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2682–2684. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2682-2684.2000>

-
- Kareem, K. Y., Ling, F. H., Chwen, L. T., Foong, O. M., & Anjas Asmara, S. (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathogens*, *6*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-23>
- Kaur, A. P., Bhardwaj, S., Dhanjal, D. S., Nepovimova, E., Cruz-martins, N., Kuča, K., Chopra, C., Singh, R., Kumar, H., Şen, F., Kumar, V., Verma, R., & Kumar, D. (2021). Plant prebiotics and their role in the amelioration of diseases. *Biomolecules*, *11*(3), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom11030440>
- Kaur, J., & Singh, P. K. (2022). Trypsin Detection Strategies: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *52*(5), 949–967. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1846490>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). *Health Benefits of Probiotics: A Review*. 2013.
- Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, *143*(1), 5–21. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-5>
- Khalil, M. A., El-Sheekh, M. M., El-Adawi, H. I., El-Deeb, N. M., & Hussein, M. Z. (2015). Efficacy of microencapsulated lactic acid bacteria in helicobacter pylori eradication therapy. *Journal of Research in Medical Sciences*, *20*(10), 950–957. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.172782>
- Khan, M., Anjum, A. A., Nawaz, M., & Awan, A. R. (2020). In vitro characterization of probiotic properties and anti-campylobacter activity of *Lactobacillus* spp. Isolated from poultry, fermented foods and human faeces. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *30*(2), 336–344. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2020.2.0053>
- Kim, E., Yang, S. M., Kim, D., & Kim, H. Y. (2022). Complete Genome Sequencing and Comparative Genomics of Three Potential Probiotic Strains, *Lactobacillus casei* FBL6, *Lactobacillus chiayiensis* FBL7, and

-
- Lacticaseibacillus zeae FBL8. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794315>
- Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., & Sasakawa, C. (2010). Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host and Microbe*, 8(1), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.006>
- Kim, M. N., Kim, N., Lee, S. H., Park, Y. S., Hwang, J. H., Kim, J. W., Jeong, S. H., Lee, D. H., Kim, J. S., Jung, H. C., & Song, I. S. (2008). The effects of probiotics on PPI-triple therapy for helicobacter pylori eradication. *Helicobacter*, 13(4), 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2008.00601.x>
- Kist, M., & Bereswill, S. (2001). Campylobacter jejuni. *Contributions to Microbiology*, 8, 150–165. <https://doi.org/10.4324/9780203856871-3>
- Kita, E., Nishikawa, F., Kamikaidou, N., Nakano, A., Katsui, N., & Kashiba, S. (1992). Mononuclear cell response in the liver of mice infected with hepatotoxic Campylobacter jejuni. *Journal of Medical Microbiology*, 37(5), 326–331. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-5-326>
- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>
- Krzyzek, P., & Gościński, G. (2018). Morphology of Helicobacter pylori as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 13(3), 182–195. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.78284>
- Kumar, A., Drozd, M., Pina-Mimbela, R., Xu, X., Helmy, Y. A., Antwi, J., Fuchs, J. R., Nislow, C., Templeton, J., Blackall, P. J., & Rajashekara, G. (2016). Novel anti-campylobacter compounds identified using high throughput screening of a pre-selected enriched small molecules library. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00405>

-
- Kutluk, G., Tutar, E., Bayrak, A., Volkan, B., Akyon, Y., Celikel, C., & Ertem, D. (2014). Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in children: Any advantage in clarithromycin-resistant strains? *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *26*(11), 1202–1208. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000190>
- Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D., & Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *38*(2), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00144-5)
- Lau, C. S. M., Ward, A., & Chamberlain, R. S. (2016). Probiotics improve the efficacy of standard triple therapy in the eradication of *Helicobacter pylori*: A meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, *9*, 275–289. <https://doi.org/10.2147/IDR.S117886>
- Lee, K. W., Park, J. Y., Sa, H. D., Jeong, J. H., Jin, D. E., Heo, H. J., & Kim, J. H. (2014). Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe*, *28*, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.013>
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 869–873. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.869-873.2000>
- Lee, N. K., Jung, B. S., Na, D. S., Yu, H. H., Kim, J. S., & Paik, H. D. (2016). The impact of antimicrobial effect of chestnut inner shell extracts against *Campylobacter jejuni* in chicken meat. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 746–750. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.004>
- Li, C., Bei, T., Niu, Z., Guo, X., Wang, M., Lu, H., Gu, X., & Tian, H. (2019). Adhesion and Colonization of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Labeled by Dsred2 in Mouse Gut. *Current Microbiology*, *76*(7), 896–903.

<https://doi.org/10.1007/s00284-019-01706-8>

Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3(2), 84–92. <http://www.journalissues.org/IJAPR/http://dx.doi.org/10.15739/IJAPR.030>

Liao, L. K., Wei, X. Y., Gong, X., Li, J. H., Huang, T., & Xiong, T. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. *Lwt*, 82, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>

Libera, K., Konieczny, K., Grabska, J., Szopka, W., Augustyniak, A., & Pomorska-Mól, M. (2022). Selected Livestock-Associated Zoonoses as a Growing Challenge for Public Health. *Infectious Disease Reports*, 14(1), 63–81. <https://doi.org/10.3390/idr14010008>

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 783–793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02677.x>

Liu, A. N., Teng, K. W., Chew, Y., Wang, P. C., Nguyen, T. T. H., & Kao, M. C. (2022). The Effects of HP0044 and HP1275 Knockout Mutations on the Structure and Function of Lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* Strain 26695. *Biomedicines*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010145>

Liu, J., Yi, L., Wang, X., Zhang, Y., Guo, X., Liu, L., Shao, C., & Lü, X. (2017). A novel antimicrobial substance produced by *Lactobacillus rhamnosus* LS8. *Food Control*, 73, 754–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.028>

Luyao, X., Changliang, Z., Xueliang, Z., Xiaogan, Z., Ghahvechi, C. M., Kai, M., Feng, J., Elham, A., Marjan, A., Xin, R., & Wei, L. (2024). Effects of *Lactobacillus paracasei* SNB-derived postbiotic components on intestinal barrier dysfunction and composition of gut microbiota. *Food Research International*, 175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113773>

-
- Ma, H. J., & Wang, J. L. (2013). Quadruple therapy for eradication of helicobacter pylori. *World Journal of Gastroenterology*, 19(6), 931–935. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i6.931>
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52, 827–834. <http://gut.bmj.com/content/52/6/827.full.pdf+html>
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., & Perdigón, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115–124. <https://doi.org/10.1159/000496426>
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.005>
- Maria Rosa Machado, C. R. S. (2015). Current Developments in Probiotics. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(01), 11–20. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000175>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Martinez, R. C. R., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2015). Scientific evidence for health

effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 114(12), 1993–2015. <https://doi.org/10.1017/S0007114515003864>

Martins, G. N., Ureta, M. M., Tymczyszyn, E. E., Castilho, P. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. *Frontiers in Nutrition*, 6(May). <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>

Maue, A. C., Poly, F., & Guerry, P. (2014). A capsule conjugate vaccine approach to prevent diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(6), 1499–1504. <https://doi.org/10.4161/hv.27985>

Menzio, F. D., Boucher, P. E., Riveau, G., Gantiez, C., & Loch, C. (1994). Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 62(10), 4261–4269. <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4261-4269.1994>

Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van Der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 130, 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.026>

Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Hirchaud, E., Parra, A., Chemaly, M., & Dory, D. (2016). Identification of novel vaccine candidates against *Campylobacter* through reverse vaccinology. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5715790>

Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L., & Corthésy-Theulaz, I. (1999). Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60(3), 203–209. <https://doi.org/10.1159/000007660>

Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food*

Microbiology, 103(1), 109–115.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047>

Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M. T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40(November 2017), 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>

Mobley, H. L. T. (1996). The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement*, 10(1), 57–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1996.22164006.x>

Mohan, V. (2015). The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(8), 1503–1513. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2392-z>

Moreno, G., Ramirez, K., Esquivel, M., & Jimenez, G. (2018). Isolation and characterization of nanocellulose obtained from industrial crop waste resources by using mild acid hydrolysis. *Journal of Renewable Materials*, 6(4), 362–369. <https://doi.org/10.7569/JRM.2017.634167>

Moura, J. M., Farias, B. S., & Rodrigues, D. A. S. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>

Mutanda, T., Mokoena, M. P., Olaniran, A. O., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2014). Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: Recent advances and current perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(6), 893–906. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1452-1>

Myllyluoma, E., Ahonen, A. M., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Kankuri, E. (2008). Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in

vitro. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(9), 1472–1482.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00080-08>

Nami, Y., Bakhshayesh, R. V., Jalaly, H. M., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A. (2019). Probiotic properties of enterococcus isolated from artisanal dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00300>

Nami, Y., Haghshenas, B., Haghshenas, M., Abdullah, N., & Khosroushahi, A. Y. (2015). The Prophylactic effect of probiotic *Enterococcus lactis* IW5 against different human cancer cells. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01317>

Namkin, K., Zardast, M., & Basirinejad, F. (2016). *Saccharomyces boulardii* in helicobacter pylori eradication in children: A randomized trial from Iran. *Iranian Journal of Pediatrics*, 26(1), 1–5. <https://doi.org/10.5812/ijp.3768>

Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H., & Konkel, M. E. (2012). Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *PLoS ONE*, 7(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043928>

Nelson, J. M., Smith, K. E., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Segler, S. D., Kassenborg, H. D., Zansky, S. M., Joyce, K., Marano, N., Hoekstra, R. M., & Angulo, F. J. (2004). Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6), 1150–1157.
<https://doi.org/10.1086/423282>

Neufeld, R. J., & Poncelet, D. (2004). *Industrial Scale Encapsulation of Cells Using Emulsification/Dispersion Technologies*. 311–325. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_17

Nguyen, V. T., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2011). Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiology*, 28(5), 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.004>

-
- Nishiyama, K., Nakazato, A., Ueno, S., Seto, Y., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y., & Mukai, T. (2015). Cell surface-associated aggregation-promoting factor from *Lactobacillus gasseri* SBT2055 facilitates host colonization and competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, *98*(4), 712–726. <https://doi.org/10.1111/mmi.13153>
- Nishizawa, T., & Suzuki, H. (2014). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *1*(OCT), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>
- Noreen, Z., Khalid, N. R., Abbasi, R., Javed, S., Ahmad, I., & Bokhari, H. (2019). Visible light sensitive Ag/TiO₂/graphene composite as a potential coating material for control of *Campylobacter jejuni*. *Materials Science and Engineering C*, *98*(March 2018), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.087>
- Nunes, G. L., Etchepare, M. de A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob Lopes, E., Barin, J. S., Flores, É. M. de M., da Silva, C. de B., & de Menezes, C. R. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>
- O’Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
- O’Donnell, K., Kearsley, M. W. (2012). Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*.
- O’Morain, N. R., Dore, M. P., O’Connor, A. J. P., Gisbert, J. P., & O’Morain, C. A. (2018). Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. *Helicobacter*, *23*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/hel.12519>
- Ooi, L. G., & Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(6), 2499–2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>

-
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjan, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pandurangan, A. K., Mohebali, N., Norhaizan, M. E., & Looi, C. Y. (2015). Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3923–3934. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86345>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030–3044. <https://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Pascual, L. M., Daniele, M. B., Ruiz, F., Giordano, W., Pájaro, C., & Barberis, L. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *Journal of General and Applied Microbiology*, 54(3), 141–148. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.141>
- Peng, M., Reichmann, G., & Biswas, D. (2015). *Lactobacillus casei* and its byproducts alter the virulence factors of foodborne bacterial pathogens. *Journal of Functional Foods*, 15, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.055>

-
- Peredo, A. G., Beristain, C. I., Pascual, L. A., Azuara, E., & Jimenez, M. (2016). The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, *73*, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.021>
- Petrova, P., & Petrov, K. (2017). Prebiotic-Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera. In *Food Bioconversion* (Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1.00007-3>
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, *14*(6), 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.008>
- Pineiro, M., & Stanton, C. (2007). Probiotic Bacteria: Legislative Framework—Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 850S-853S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.850s>
- Pinto, S. S., Fritzen-freire, C. B., Benedetti, S., Murakami, F. S., Carlos, J., Petrus, C., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. M. C. (2015). Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium -BB-12 microencapsulated by spray drying. *Food Research International*, *67*, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.038>
- Pinto, S. S., Verruck, S., Vieira, C. R. W., Prudêncio, E. S., Amante, E. R., & Amboni, R. D. M. C. (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of Bifidobacterium-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 1004–1009. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.020>
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, *10*, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Prabhurajeshwar, C., & Chandrakanth, R. K. (2017). Probiotic potential of

Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*, 40(5), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008>

Raddatz, G. C., Da Fonseca, B., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., Flores, E. M. M., de Bona da Silva, C., & Ragagnin de Menezes, C. (2020). Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, 362, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.114>

Raddatz, G. C., Poletto, G., Deus, C. de, Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Esmerino, E. A., & de Menezes, C. R. (2020). Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. *Food Research International*, 130, 108902. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108902>

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *Lwt*, 60(2), 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>

Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein - alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891–898. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.006>

Ramsey, M., Hartke, A., & Huycke, M. (2014). The Physiology and Metabolism of Enterococci. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, 1–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649507>

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012->

- Renye, J. A., White, A. K., & Hotchkiss, A. T. (2021). Identification of Lactobacillus Strains Capable of Fermenting Fructo-Oligosaccharides and Inulin. *Microorganisms*, 9, 2020.
- Reyes Esparza, J. A., & Rodríguez Fragoso, L. (2012). The probiotics: how a mixture of microorganisms do a great job? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(1), 7–17.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Reyes, V., Chotiko, A., Chouljenko, A., & Sathivel, S. (2018). Viability of Lactobacillus acidophilus NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum arabic. *Lwt*, 96, 642–647.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.017>
- Rezaee, P., Kermanshahi, R. K., & Falsafi, T. (2019). Antibacterial activity of lactobacilli probiotics on clinical strains of Helicobacter pylori. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(10), 1118–1124.
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.33321.7953>
- Robinson, D. A. (1981). Spinal meningioma presenting as focal epilepsy: a case report Infective dose of Campylobacter jejuni in milk. *Briti Medical Journal*, 282(6276), 1584.
- 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>
- Rodriguez, S., M. R. L. M. y R. D. (2012). Microencapsulación De Probióticos Mediante Secado Por Aspersión En Presencia De Prebióticos. *Vitae*, 19(1), S186–S188.

-
- Rojas-Carvajal, M., Sequeira-Cordero, A., & Brenes, J. C. (2022). The environmental enrichment model revisited: A translatable paradigm to study the stress of our modern lifestyle. *European Journal of Neuroscience*, *55*(9–10), 2359–2392. <https://doi.org/10.1111/ejn.15160>
- Rolim, P. M. (2015). Development of prebiotic food products and health benefits. *Food Science and Technology (Brazil)*, *35*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6546>
- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Nørrung, B., & Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Chemistry & Biology*, *10*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/S>
- Ruggiero, P. (2014). Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, *5*(4), 384. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i4.384>
- Salaheen, S., Nguyen, C., Hewes, D., & Biswas, D. (2014). Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, *46*, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.026>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *16*(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., & Biavati, B. (2010). Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(SUPPL.), S98–S108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2011). Storing Lactic Acid Bacteria: Current Methodologies and Physiological Implications. In *Stress Responses of*

Lactic Acid Bacteria (pp. 479–504). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8>

- Sathyabama, S., Ranjith kumar, M., Bruntha devi, P., Vijayabharathi, R., & Brindha priyadharisini, V. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.024>
- Schrotz-King, P., Prokhorova, T. A., Nielsen, P. N., Crawford, J. S., & Morsczeck, C. (2007). Campylobacter jejuni proteomics for new travellers' diarrhoea vaccines. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(2 SPEC. ISS.), 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2006.01.019>
- Sebastián Domingo, J. J. (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 40(6), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.gastre.2016.12.001>
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & 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, 8–16. <https://doi.org/10.1111/hel.12251>
- Shah, N. J., & Swami, O. C. (2017). *Role of Probiotics in Diabetes: A Review of Their Rationale and Efficacy - European Medical Journal. October*, 104–110.
- Shao, Y., Evers, S. S., Shin, J. H., Ramakrishnan, S. K., Bozadjieva-Kramer, N., Yao, Q., Shah, Y. M., Sandoval, D. A., & Seeley, R. J. (2022). Vertical sleeve gastrectomy increases duodenal Lactobacillus spp. richness associated with the activation of intestinal HIF2 α signaling and metabolic benefits. *Molecular Metabolism*, 57(January), 101432. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101432>

-
- Sharma, A., Lavania, M., Singh, R., & Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1622–1632. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.062>
- Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunsbjerg, S. D., Bosma, E. F., Mcnair, L. M., Beisel, C. L., & Neves, A. R. (2020). Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19>
- Sierra, F., Forero, J. D., & Rey, M. (2014). Tratamiento ideal del Helicobacter pylori: una revisión sistemática. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(1), 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.03.003>
- Šikić Pogačar, M., Langerholc, T., Mičetić-Turk, D., Možina, S. S., & Klančnik, A. (2020). Effect of Lactobacillus spp. On adhesion, invasion, and translocation of Campylobacter jejuni in chicken and pig small-intestinal epithelial cell lines. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2238-5>
- Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelon, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance Lactobacillus acidophilus survival. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>
- Šipailienė, A., & Petraitytė, S. (2018). Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1). <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9347-x>
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2005). Under the microscope: Campylobacter jejuni. *Letters in Applied Microbiology*, 41(4), 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01788.x>
- Snoep, J. L., Joost, M., de Mattos, T., & Neijssel, O. M. (1991). Effect of the energy source on the NADH/NAD ratio and on pyruvate catabolism in anaerobic

-
- chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775. *FEMS Microbiology Letters*, 81(1), 63–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04713.x>
- Sumithra, E., & Mahalakshmi, V. (2022). Synergistic Antibacterial Activity of the Probiotic Kefir with Conventional Antibiotics. *Indian Journal of Natural Sciences* *Www.Tnsroindia.Org.in* ©JONS, 13(April). www.tnsroindia.org.in
- Sun, L., Zhao, H., Liu, L., Wu, X., Gao, Q., & Zhao, Y. (2018). Effects of *Lactobacillus* on the inhibition of *Helicobacter pylori* growth. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(6), 1533–1540. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1515599>
- Tabashsum, Z., Peng, M., Kahan, E., Rahaman, S. O., & Biswas, D. (2019). Effect of conjugated linoleic acid overproducing: *Lactobacillus* with berry pomace phenolic extracts on *Campylobacter jejuni* pathogenesis. *Food and Function*, 10(1), 296–303. <https://doi.org/10.1039/c8fo01863d>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2013). In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART4), 637–649. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.049965-0>
- Thomrongsuwannakij, T., Chuanchuen, R., & Chansiripornchai, N. (2016). Identification of competitive exclusion and its ability to protect against *Campylobacter jejuni* in broilers. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 46(2), 279–286.
- Torres, D. P. M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438–454. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

-
- Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., & Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 1058–1069. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02085.x>
- Tulumoglu, S., Yuksekdog, Z. N., Beyatli, Y., Simsek, O., Cinar, B., & Yaşar, E. (2013). Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*, *24*, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.006>
- Uymaz Tezel, B. (2019). Preliminary in Vitro Evaluation of the Probiotic Potential of the Bacteriocinogenic Strain *Enterococcus lactis* PMD74 Isolated from Ezine Cheese. *Journal of Food Quality*, *2019*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/4693513>
- van Vliet, A. H., & Ketley, J. M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, *30*, 45–56.
- van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes*, *12*(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1831339>
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Viana, C. C. R. (2022). *Study of the bacteria-encapsulating agent interaction in microencapsulation of probiotics*.
- Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M., & Miwa, M. (2005). Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 1246–1253. <https://doi.org/10.1021/jf048711u>
- Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., Jan, C. M., Lai, C. H., Wang, T. N., & Wang, W. M. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter*

-
- pylori. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 737–741.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/80.3.737>
- Wang, S. Y., Ho, Y. F., Chen, Y. P., & Chen, M. J. (2015). Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. *Food Microbiology*, 46, 494–500. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.015>
- Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R., & Visser, G. M. (2008). Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26(5), 436–456.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.001>
- Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364–367.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.004>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among campylobacter. *BioMed Research International*, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- Wine, E., Gareau, M. G., Johnson-Henry, K., & Sherman, P. M. (2009). Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 300(1), 146–152. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x>
- Wu, L., Wang, Z., Sun, G., Peng, L., Lu, Z., Yan, B., Huang, K., & Yang, Y. (2019). Effects of anti-H. pylori triple therapy and a probiotic complex on intestinal microbiota in duodenal ulcer. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49415-3>
- Wu, P., Zhu, Q., Yang, R., Mei, Y., Chen, Z., & Liang, Y. (2021). Differences in acid stress response of *Lactobacillus paracasei* Zhang cultured from solid-state fermentation and liquid-state fermentation. *Microorganisms*, 9(9).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091951>

-
- Wyszyńska, A. K., & Godlewska, R. (2021). Lactic Acid Bacteria – A Promising Tool for Controlling Chicken *Campylobacter* Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703441>
- Xavier, D., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Marta, S., Saad, I., & Perego, P. (2018). Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.010>
- Yan, M., Sahin, O., Lin, J., & Zhang, Q. (2006). Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1154–1159. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl412>
- Yang, J., & Yang, H. (2018). Effect of *Bifidobacterium breve* in Combination With Different Antibiotics on *Clostridium difficile*. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02953>
- Ying, D. Y., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Bull, M., Singh, T. K., & Augustin, M. A. (2016). Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. *Journal of Functional Foods*, 25, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.020>
- Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of *Lactobacillus plantarum* (NCIM, 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, 110033. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110033>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Hojo, F., & Kamiya, S. (2019). Effect of *Helicobacter pylori* biofilm formation on susceptibility to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin. *Microbial Pathogenesis*, 132(March), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.030>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Zaman, C., Hanawa, T., & Kamiya, S. (2010).

Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 25(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06213.x>

Yong, J. G., Lee, J. H., & Hutkins, R. W. (2007). Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5716–5724.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00805-07>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zheng, P. X., Fang, H. Y., Yang, H. B., Tien, N. Y., Wang, M. C., & Wu, J. J. (2016). *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(2), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.014>

Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*, 67, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.010>

Zuo, F., Appaswamy, A., Gebremariam, H. G., & Jonsson, A. B. (2019). Role of Sortase A in *Lactobacillus gasseri* Kx110A1 Adhesion to Gastric Epithelial Cells and Competitive Exclusion of *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology*, 10(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02770>

Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., Zeng, Z., Khaskheli, G. B., Ma, H., & Chen, S. (2016). Characterization and in vitro properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1027–1037. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1187-x>

9. ANEXOS

CONSTANCIAS DE CONGRESOS



XXIII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos

XXXVIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos
Edición Online 4, 5 y 6 de noviembre 2021



Universidad de
Guadalajara

La Universidad de Guadalajara otorga la presente
CONSTANCIA



A: Jiménez Villeda B., Falfán Cortés N., Cariño Cortés R., Santos López E.,
Rangel Vargas E. Castro Rosas J.

por su participación como:

Autores del trabajo libre presentado en modalidad oral

"Evaluación del efecto antimicrobiano de cultivos de *Lactobacillus* spp con y sin inulina
contra *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*"

Dra. Ruth Padilla Muñoz
Rectora del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías

Dr. Oscar Blanco Alonso
Secretario Académico del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías



Instituto de
Ciencias Básicas
e Ingeniería



Instituto de
Ciencias
Agropecuarias

Instituto de
Ciencias
de la Salud

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a

M.C. Brenda Esmeralda Jiménez Villeda, Dr. Javier Castro Rosas, Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés, Dra. Raquel Cariño Cortés, Dra. Eva María Santos López

En la ponencia modalidad cartel **Evaluación del efecto probiótico in vitro e in vivo de mezclas de *Lactobacillus paracasei* UAEH20 y *Lactobacillus* sp UAEH19 con y sin prebióticos** en alimentos en el marco de Primer Foro de Trabajos de Investigación en Ciencia de los Alimentos y Salud Humana del 24 al 28 de mayo del año en curso. Organizado por los profesores del núcleo básico del doctorado en ciencia de los alimentos y salud humana.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 28 de mayo de 2021.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Armando Peláez Acero
Director del ICAP

Dr. Otilio A. Acuña Sandoval
Director del ICBI

MC. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del ICSA

PRIMER FORO
Trabajos de investigación
en **ciencia de alimentos
y salud humana**



ICBI Número de control: ICBI-DR139/2021

Review Article

Synbiotic Encapsulation: A Trend towards Increasing Viability and Probiotic Effect

Brenda Esmeralda Jiménez-Villeda,¹ Reyna Nallely Falfán-Cortés,²
Esmeralda Rangel-Vargas,¹ Eva Maria Santos-López,¹ Carlos Alberto Gómez-Aldapa,¹
Ma. Refugio Torres-Vitela,³ Angelica Villarruel-López,³ and Javier Castro-Rosas¹

¹Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Ciudad del Conocimiento, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Km 4.5, Mineral de la Reforma, Tulancingo, C.P. 42184 Hidalgo, Mexico

²Catedrática CONACYT, CONACYT-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, C.P. 42184 Hidalgo, Mexico

³Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Olímpica, Guadalajara 44430, Mexico

Correspondence should be addressed to Javier Castro-Rosas; jcastro@uach.edu.mx

Received 13 September 2022; Revised 22 November 2022; Accepted 5 December 2022; Published 30 March 2023

Academic Editor: Karthik Pothiyappan

Copyright © 2023 Brenda Esmeralda Jiménez-Villeda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Probiotics are effective coadjuvancy against human affections. To confer their beneficial effects to humans, probiotics adhere and colonize the intestine. Then, they must survive the gastrointestinal conditions ($\sim 10^8$ – 10^{10} cfu/day). However, their concentration and the dose to produce the beneficial effect are reduced. Synbiotics are the combination of probiotics and prebiotics, and they can increase the beneficial effect of probiotics. Microencapsulation is an efficient approach to protect synbiotics during their passage through the intestinal tract. In this article, we thoroughly reviewed the different encapsulation techniques of synbiotics. The most common were ionic gelation, emulsification, extrusion, spray drying, coacervation, freeze drying, and their combination in some cases. These techniques focus on survival under gastrointestinal conditions. The aim of this work was to review the different techniques of synbiotic encapsulation and discuss the effect of microencapsulation on viability and probiotic properties in vitro and in vivo models of microencapsulated synbiotics.

1. Introduction

Probiotics are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [1]. They are commonly administered to humans through foods [2]. However, probiotic viability can be affected by the stress during food production and storage [3, 4]. Factors such as presence of oxygen, high temperatures, antimicrobials, and present microbiota, among others intrinsic and extrinsic, can affect probiotic viability [3]. There is a hostile environment in the gastrointestinal tract (GIT) due to the low pH and the presence of salts and enzymes [5]. Probiotics exert a beneficial effect in the intestine when the concentration of viable cells is $\sim 10^8$ –

10^{10} cfu/day (considering 100 g or 100 ml of ingested food), corresponding to $\sim 10^6$ – 10^8 cfu/g or ml in the product when ingested [4, 6–10]. It must be noted that several clinical studies have proven that a mix of probiotics is better than only one strain when improving the characteristics of the endogenous microbiota [5, 11, 12].

Prebiotics are defined as nondigestible food ingredients that benefit the host by selectively stimulating growth and/or the activity of one or more bacteria in the GIT [13]. Supplementation with prebiotics can stimulate the growth of probiotic bacteria hosted in the host's intestine, including administered probiotic strains [14, 15]. Carbohydrates, as dietary fiber, are the most commonly used prebiotics to stimulate growth and normal gut microbiota activity; they

Manuscript type: (original paper)

Antagonistic Effect of Lactic Acid Bacteria (LAB) Strains with and without Prebiotics against *Campylobacter jejuni*

Abstract: The objectives of this research were to determine: (i) the inhibitory effect of four strains of lactic acid bacteria (LAB), with and without prebiotics (inulin or fructooligosaccharides), against *Campylobacter jejuni*, (ii) the adherence properties of LAB and *C. jejuni*, and (iii) molecularly identify LAB T33, T38 and T39. Three of the four LAB showed an inhibitory effect against *C. jejuni*, with diameters of inhibition between 8 and 13.5 mm. The T39 strain showed the highest inhibitory effect. In strain T33 there was an increase in the inhibitory effect against *C. jejuni* with both prebiotics. The percentages of autoaggregation, coaggregation and hydrophobicity were obtained from 19% to 45%, 22% to 25% and 2% to 88%, respectively. Strains T33, T38 and T39 were molecularly identified as *Enterococcus lactis* with 100% coverage and 100% identity. The results show the potential use of LAB in the prevention or control of *C. jejuni* in food, animals or humans.

Keywords: *Enterococcus*, Inulin, Fructooligosaccharides, Inhibitory effect, *C. jejuni*

INTRODUCTION

Campylobacter is one of the main causes of bacterial gastroenteritis in humans. Data from Asia, Africa, and the Middle East indicate that campylobacteriosis has become endemic in these areas, especially in young children (Kaakoush et al. 2015). Furthermore, the reported cases of infections caused by *C. jejuni* and *C. coli* probably represent only a small proportion due to underreporting, thus the number of *Campylobacter* infections is greatly underestimated (Wyszyńska and Godlewska 2021). In 2019 in the European Union (EU), 220,682 confirmed cases of human campylobacteriosis were registered (EFSA 2021). Patients infected with this pathogen present with gastroenteritis of varying degrees, ranging from mild malaise and watery diarrhea to severe ulcerative colitis with bloody inflammatory diarrhea. *Campylobacter* infections may also be associated with irritable bowel syndrome (IBS) and colorectal cancer (Myintzaw et al. 2021). *Campylobacter* strains are usually found in the gastrointestinal tract of most warm-blooded animals, with birds, cattle, and pigs being the main reservoirs of these bacteria, most of whom are asymptomatic carriers (Kim et al. 2021; Myintzaw et al. 2021; Wyszyńska and Godlewska 2021)