



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN MEDIOS DE CULTIVO Y EN
RATONES CD-1**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA

L.Q.A. Brenda Esmerada Jiménez Villeda

DIRECTOR

Dr. Javier Castro Rosas



Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Noviembre 2016



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Coordinación de Investigación y Posgrado del ICAP



Acta de la reunión del comité de Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances del trabajo de tesis; “Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas en medios de cultivo y en ratones CD-1”, que desarrollo la estudiante: Lic. en Química de Alimentos **Brenda Esmeralda Jiménez Villeda**.

Asistentes:

- Dr. Javier Castro Rosas
- Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
- Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés
- Dra. Esmeralda Rangel Vargas

A. Revisión del trabajo de tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicándole oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo de investigación y poder continuar con el proceso de titulación para obtener el grado de Maestra en Ciencia de los Alimentos. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 10 de noviembre del 2016

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Dra. Esmeralda Rangel Vargas



A Dios y a mi familia

A Dios por haber puesto en mi vida a personas maravillosas que han contribuido a la realización de esta Tesis. Gracias Dios por darme, sabiduría, ímpetu, determinación y perseverancia para lograr la culminación de este proyecto. Tú nunca te equivocas.

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a ti Erik mí amado esposo por todas tus palabras de aliento, por tu paciencia inagotable, por ese optimismo que siempre me impulso a seguir adelante y por los días que te toco hacer el papel de madre y padre. Te amo.

A mi hermosa hija Keny, por ser siempre mi inspiración, motivación para poder superarme cada día más y luchar por un futuro mejor para ti mi amor.

A ti mamita hermosa Carmen, porque a pesar de todo siempre estás ahí, impulsándome, motivándome con tu palabras exactas, además de tu gran cariño y por ayudarme en esos momento difíciles con mi pequeña Keny. Te amo mamita.

A mi papito Fermín que amo con todas mis fuerzas por ser mi ejemplo a seguir, de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me han motivado siempre, por tu valor mostrado para salir adelante.

A ti mi querida hermana Perla, por tu paciencia, apoyo incondicional y amor, que siempre te caracteriza.

A ti Juanita por quererme y apoyarme siempre, esto también te lo debo a ti. Te quiero mucho

Lulú Hernández esta Tesis también es dedicada a ti, por gran apoyo cuando lo requerimos, porque sin el todo hubiese sido mas complicado.

A ustedes Alma, Cesar, Ulises y Lía por estar conmigo y apoyarme siempre.

A ustedes Diego, Dulce, Grecia y Vale por sus palabras de aliento, apoyo y amor.

A mis guías Dr. Castro, Dr. Aldapa y Dra. Nayeli por su gran apoyo y motivación para la elaboración y culminación de esta Tesis.

A Lulú, Netza, Monse, Zenia, Javi y Chucho por su apoyo en el laboratorio durante la parte experimental de la presente Tesis.

y finalmente a CONACyT por la beca num. 621404 otorgada durante los estudios de posgrado.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Alimentos funcionales	3
2.2	Probióticos	4
2.2.1	Administración y consumo de probióticos	5
2.3	Efectos de los probióticos sobre el epitelio.....	8
2.3.1	Incremento de secreción de mucus por las células caliciformes	8
2.3.2	Producción de ácidos grasos de cadena corta.....	8
2.3.3	Incremento de la secreción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas) por los enterocitos.....	9
2.3.4	Disminución en la permeabilidad epitelial a patógenos o sus productos	9
2.4	Efectos de los probióticos sobre el sistema inmune asociado a mucosas	10
2.4.1	Incremento del número de células productoras de inmunoglobulina A	10
2.4.2	Aumento en la secreción de la IgA al mucus luminal	10
2.5	Efectos de los probióticos sobre otros miembros de la microbiota	10
2.5.1	Competencia por sitios de unión con comensales o patógenos	10
2.5.2	Producción de sustratos metabolizables por determinados miembros de la microbiota beneficiosos para el hospedador.....	11
2.5.3	Efecto bactericida o efecto bacteriostático sobre bacterias patógenas al liberar factores antimicrobianos.....	11
2.6	Efectos benéficos a la salud del huésped por el consumo de probióticos.....	12
2.6.1	Efectos nutricionales.....	12
2.6.2	Atenuación de la intolerancia a la lactosa y mejora de la digestibilidad	12
2.6.3	Personas con estreñimiento crónico	12
2.6.4	Efectos sobre el sistema inmunológico	13

2.6.5	Mantenimiento de la microbiota intestinal normal.....	13
2.6.6	Prevención del cáncer.....	14
2.6.7	Reducción infecciones respiratorias.....	14
2.6.8	Reducción colesterol.....	15
2.6.9	Salud gástrica.....	15
2.6.10	Coadyuvante de antibióticos.....	15
2.7	Criterios para considerar un alimento como probiótico según la FAO.....	16
2.7.1	Identificación de género, especie y cepa probiótica.....	16
2.7.2	Estudios in vitro para la selección de probióticos de uso en humanos.....	16
2.7.3	Seguridad de los probióticos.....	17
2.7.4	Estudios in vivo utilizando animales y humanos.....	19
2.7.5	Viabilidad de las cepas declaradas en productos probióticos comerciales.....	20
2.8	Bacterias potencialmente probióticas.....	20
2.9	Bacterias ácido lácticas.....	21
2.9.1	Genero Lactobacillus.....	22
2.10	Metabolismo de BAL.....	24
2.11	Rutas principales de fermentación.....	25
2.12	Productos finales de la fermentación de las BAL de interés en alimentos.....	27
2.12.1	Ácidos orgánicos.....	27
2.12.2	Peróxido de hidrógeno.....	28
2.12.3	Dióxido de carbono.....	28
2.12.4	Diacetilo.....	28
2.13	Aplicaciones de los probióticos en alimentos.....	29
2.13.1	Alimentos probióticos a base de lácteos.....	29
3	JUSTIFICACIÓN.....	30

4	OBJETIVOS.....	31
4.1	Objetivo General.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5	MATERIALES Y METODOS.....	32
5.1	Equipo de laboratorio.....	32
5.2	Medios de cultivo.....	32
5.3	Material biológico.....	33
5.4	Resistencia de cepas Bacterias Ácido Lácticas a rifampicina.....	33
5.5	Comprobación del potencial probiótico de Bacterias Ácido Lácticas.....	33
5.5.1	Actividad antimicrobiana.....	33
5.5.2	Resistencia de BAL a sales biliares in vitro.....	34
5.5.3	Resistencia de cepas BAL a antibióticos de uso común.....	35
5.6	Determinación de viabilidad de las cepas BAL.....	38
5.7	Determinación de ácido láctico por el método de acidez titulable.....	38
5.8	Marcaje de BAL con fluoresceína.....	39
5.9	Preparación de inóculo para la administración en ratones CD-1.....	39
5.10	Resistencia de cepas BAL al paso por TGI en ratones.....	39
5.10.1	Análisis microbiológico de BAL en intestinos de ratones CD-1.....	41
5.11	Potencial antagónico de cepas BAL adheridas al intestino de ratones.....	41
5.11.1	Análisis microbiológico del potencial antagónico de cepas BAL adheridas en intestinos de ratones CD-1.....	42
5.12	Análisis estadístico.....	43
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
6.1	Efecto inhibitorio de BAL frente a diversos patógenos.....	44
6.2	Resistencia de BAL a sales biliares.....	47

6.3	Sensibilidad a antibióticos	49
6.4	Determinación de viabilidad de las cepas BAL.....	53
6.5	Determinación de ácido láctico por el método de acidez titulable	56
6.6	Evaluación del efecto de la administración de las cepas BAL en el bienestar de ratones CD-1.....	59
6.7	Adhesión de cepas BAL in vivo	61
6.8	Potencial antagónico de BAL contra patógenos en ratones CD-1	68
6.8.1	Poder antagónico de <i>L. pentosus</i> y <i>Lactobacillus</i> spp QT19 frente a ratones infectados con <i>Salmonella</i> entérica serovar Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i>)	68
6.8.2	Poder antagónico de <i>L. pentosus</i> y <i>Lactobacillus</i> spp QT19 frente a ratones infectados con <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica stx2 (SETC).....	71
6.8.3	Adaptación de BAL al tracto gastrointestinal de ratón.....	74
7	CONCLUSIONES.....	77
8	BIBLIOGRAFIA	79
9	ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Administración de probióticos en diferentes formas.	6
Figura 2. Contribución de los probióticos a la función barrera.	7
Figura 3. Rutas de fermentación de las BAL.....	26
Figura 4. Técnica para determinar actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas frente a patógenos (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014).....	34
Figura 5. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares. (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014).....	35
Figura 6. Técnica para la prueba de sensibilidad de bacterias ácido lácticas a antibióticos. (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014).....	37
Figura 7. Crecimiento bacteriano en función del tiempo	54
Figura 8. Producción de ácidos por BAL	57
Figura 9. Ratones empleados en los ensayos de adherencia de BAL. A) Ratones administrados con la cepa <i>L. pentosus</i> ; B) Ratones administrados con la cepa <i>Lactobacillus</i> spp QT17.	59
Figura 10. Ratones empleados en los ensayos de adherencia de BAL. C) Ratones administrados con la cepa <i>Lactobacillus</i> spp QT19; D) Ratones administrados con la cepa <i>Lactobacillus</i> spp QR25.	60
Figura 11. A) Tracto gastrointestinal completo de ratón; B) Lavado de intestinos de ratón	61
Figura 12. Cantidad de bacterias excretadas en heces fecales. Valores con letras similares no representan diferencia significativa ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey, $n=8$)	63
Figura 13. Cantidad de bacterias adheridas en intestinos de ratón Valores con letras similares no representan diferencia significativa ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey).....	64
Figura 14. A) Tinción de Gram de <i>L. pentosus</i> ; B) <i>L. pentosus</i> adherida a la pared intestinal de ratones.....	65
Figura 15. Translocación de <i>S. Typhimurium</i> en ratones administrados <i>L. pentosus</i> (A) y con <i>Lactobacillus</i> spp QT19 (B). ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$)	69
Figura 16. Translocación de <i>E. coli</i> en ratones administrados con <i>L. pentosus</i> (A) y con <i>Lactobacillus</i> spp QT19 (B). ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$)	73
Figura 17. Cantidad de bacterias adheridas en intestinos de ratón antes y después de una adaptación al tracto gastrointestinal (TGI) ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$).	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos probióticos y su estatus de seguridad.	19
Tabla 2. Probióticos estudiados para su uso en la alimentación.	21
Tabla 3. Características del género <i>Lactobacillus</i>	24
Tabla 4. Antibióticos utilizados para la evaluación de la resistencia de las BAL.	36
Tabla 5. Puntos de corte de los diferentes antibióticos.	38
Tabla 6. Parámetros que permiten evaluar el estado del bienestar de los animales y valores semicuantitativos atribuidos.	40
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de cepas BAL frente a cepas patógenas.	45
Tabla 8. Halos de inhibición obtenidos al exponer cepas BAL a antibióticos de uso común.	49
Tabla 9. Resistencia a antibióticos presentada por cepas BAL.	50

RESUMEN

Los probióticos se definen según la (FAO/WHO, 2002) como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico sobre la salud del huésped. Dichos microorganismos deben cubrir ciertos criterios para ser considerados como tal, entre los que destacan: la resistencia a sales biliares, a pH ácido y a jugos gástricos, además deben poseer la capacidad de colonizar el intestino. En un trabajo previo se han aislado Bacterias Ácido Lácticas (BAL) de quesos frescos, a las cuales les realizó algunas pruebas *in vitro* para determinar su potencial probiótico, no obstante, para que las bacterias de interés sean consideradas como probiótico es necesario realizar pruebas *in vivo*. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la sobrevivencia de 4 cepas BAL durante su paso por el tracto gastrointestinal, su capacidad de adherencia y colonización al intestino de ratones y su influencia en la invasión a órganos de los ratones por parte de *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC). Los estudios se realizaron con ratones CD-1 inoculándolos oralmente con una dosis diaria de BAL (10^9 UFC/mL). Se probó una cepa de *Lactobacillus pentosus* y 3 de *Lactobacillus* spp. (QT17, QT19 y QR25), la administración fue por 10 días. Al finalizar cada uno de los experimentos los ratones fueron sacrificados para analizar los intestinos. Para los estudios de invasión, se siguió un procedimiento semejante, solo que a la mitad de los días de administración de BAL se administró, por separado, *S. Typhimurium* o STEC; los ratones fueron sacrificados y se analizaron los órganos abdominales. Todas las cepas de BAL lograron adherirse y colonizar los intestinos de los ratones; no obstante, *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 fueron las cepas que lograron una mayor adherencia y colonización. En los ratones colonizados con *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 se inhibió la invasión de *S. Typhimurium* y STEC a los intestinos, hígado y bazo en comparación con el control. Los resultados muestran que tanto *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 pueden ser consideradas como bacterias probióticas. Además ambas cepas podrían usarse como probióticos por la industria de alimentos y la farmacéutica.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un incremento en el consumo de alimentos que proporcionen un beneficio a la salud, sobre todo que ayuden en la prevención de enfermedades. Por esta razón se han realizado numerosos estudios enfocados en desarrollar alimentos funcionales. Este tipo de alimentos además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios para la salud. Este grupo de alimentos están irrumpiendo con fuerza en los mercados nacionales e internacionales, dado el interés creciente de los consumidores hacia la promoción de la salud. Por lo general, los alimentos funcionales son considerados como aquellos alimentos provistos de componentes biológicamente activos, que pueden ser incluidos como parte de una dieta normal. Dentro de la gran gama de componentes bioactivos encontramos a los probióticos.

Los alimentos con probióticos deben contener microorganismos viables en concentración suficiente para modificar la microflora del huésped. Se ha establecido que el número mínimo de bacterias probióticas al momento del consumo debe encontrarse en una concentración entre 10^6 y 10^7 células viables por mililitro o gramo de producto. Además, estas bacterias probióticas deben tolerar las condiciones ácidas del estómago, sobrevivir a las enzimas digestivas y sales biliares del intestino delgado y de colonizar el íleon terminal y/o el colon (Brito, Navarrete, Schöbitz, & Horzella, 2011).

La FAO establece que uno de los criterios más importantes para considerar a un microorganismo como probiótico es demostrar que el microorganismo sobrevive a su paso por el tracto gastrointestinal y capacidad de colonización del intestino de animales de laboratorio o del humano.

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo de trabajo se aislaron cepas de BAL de quesos artesanales; varias de estas cepas mostraron capacidad inhibitoria contra bacterias patógenas, no obstante, no se les determinó su capacidad de sobrevivencia por el tracto gastrointestinal de animales de laboratorio ni su capacidad para colonización el intestino de los animales. Por tal razón, en este estudio se determinó el potencial probiótico de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp (cepas QT17, QT19 y QR25) en medios de cultivo, la sobrevivencia de estas cepas a su paso por el tracto gastrointestinal de ratones CD-1 y su

capacidad para colonizar el intestino de dichos ratones, así como el efecto de las cepas de BAL adheridas al intestino de los ratones en la invasión de *S. Typhimurium* y STEC a los órganos abdominales de los ratones.

2 ANTECEDENTES

2.1 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como aquellos que contienen componentes biológicos adicionales, con potencial de reducir el riesgo de enfermedad y favorecer la salud (FAO, 2007). Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (EUFIC, 2006).

Como respuesta al gran interés por la salud y la alimentación nacen en Japón en 1984 los alimentos funcionales (Arai, 2000), que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Esto es debido a la preocupación de las autoridades sanitarias japonesas, por preservar una mejor calidad de vida a su población cada vez más longeva (Meléndez Illanes, Gonzalez Diaz, & Alvarez-Dardet, 2013).

Debido a la una legislación deficiente y que la información presentada en el etiquetado de los alimentos carecía de fundamentos científicos en cuanto a la atribución de beneficios a la salud, fue necesaria la exigencia de evidencia científica la debe ir avalada por diversos estudios. Los de intervención aleatorizados y controlados son los que tienen mayor peso para demostrar el efecto que se quiere declarar. Teniendo en cuenta que es fundamental que dichos efectos sean reproducibles, se debe disponer de más de un estudio con tales características. Otro tipo de estudios como experimentales en animales o in vitro a nivel celular, entre otros, no tendrían el peso suficiente para validar por sí mismo una declaración, pero sí podrían aportar información complementaria (Meléndez *et al.*, 2013).

El interés por los alimentos funcionales ha aumentado en la última década debido a que los consumidores prestan especial atención a la dieta, la nutrición y el cuidado de la salud. El auge de estos productos representa un beneficio para el consumidor y una oportunidad para la industria de alimentos, al brindar mayor valor añadido a sus productos. Para ello, esta debe controlar los procesos y asumir estándares de seguridad (Amorocho Cruz, 2011).

En la búsqueda de estos estándares, la FAO basándose en el Codex Alimentarius hace las siguientes recomendaciones:

- Adoptar una definición internacional de alimentos funcionales.
- Generar una base de datos de alimentos funcionales con información sobre su actividad, funciones estructurales y nutritivas con la respectiva validación y justificación científica.
- Estandarizar los métodos de análisis e inventariarlos.

En el mismo camino, algunos investigadores hacen énfasis en el estudio de componentes de los alimentos. Estos recomiendan en el desarrollo de dichos productos llevar un programa de control y análisis para evitar sinergias indeseables entre los ingredientes, certificar su seguridad, ausencia de toxicidad y profundizar en el conocimiento de la interacción entre los alimentos funcionales y la microbiota intestinal de cada individuo (Hill *et al.*, 2014; Laparra & Sanz, 2010). Actualmente los probióticos, componentes de los alimentos funcionales, son de especial interés por los beneficios potenciales en la salud y por ello, se ha incrementado la investigación en el desarrollo de estos productos

2.2 Probióticos

La definición hecha por Havenaar y Huis In't Veld se considera la más acertada para el término probiótico: “preparación o producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales restablecen la microbiota (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped provocando efectos benéficos sobre la salud del mismo (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Esta definición, hace hincapié en la presencia de microorganismos viables (ya sea como células liofilizadas o en productos frescos o fermentados), en número suficiente para provocar los efectos benéficos sobre la salud, a través de una restablecimiento de la microbiota endógena por colonización del intestino (Hernández Hdez., Coronel Rodríguez, Monge Zamorano, & Quintana Herrera, 2015).

Los probióticos se instalan en la mucosa intestinal y ahí producen las sustancias inhibitorias que combaten la acción de bacterias toxigénicas, por lo tanto ésta población microbiana, representa un potencial metabólico importante que no solo mantiene los procesos de digestión sino que también actúa sobre los procesos de destoxificación, llevados a cabo en el

intestino, además de la estimulación del sistema inmunológico. Las actividades metabólicas benéficas de las bacterias intestinales incluyen también la síntesis de vitaminas B y K, la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales sirven como fuentes de energía para los tejidos del huésped, así como, la conversión de carcinógenos presentes en la dieta a compuestos inactivos (Hernández Ramírez, 2009).

2.2.1 Administración y consumo de probióticos

Las cepas vivas especialmente del grupo *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* fueron por primera vez suplementadas a los productos lácteos en Alemania, a finales de los 60, debido a su esperada adaptación al intestino y a los beneficios sensoriales para producir yogurts acidificados. Tales productos primero empezaron a conocerse como yogurts ligeros, mientras que en Estados Unidos, la leche acidophilus fue mejor conocida (Hummel, Hertel, Holzapfel, & Franz, 2007).

Los probióticos pueden ser administrados en diferentes formas, incluyendo a los alimentos fermentados, y productos farmacéuticos en forma microencapsulada (Figura 1.). Se han realizado intensas investigaciones y esfuerzos en la manera de desarrollar productos alimenticios que contengan microorganismos probióticos, tales como especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estas aplicaciones se han enfocado principalmente a productos lácteos, siendo el yogurt el principal representante., sin embargo también en los alimentos no lácteos tales como carne, vegetales fermentados y jugos de frutas (Hummel *et al.*, 2007).

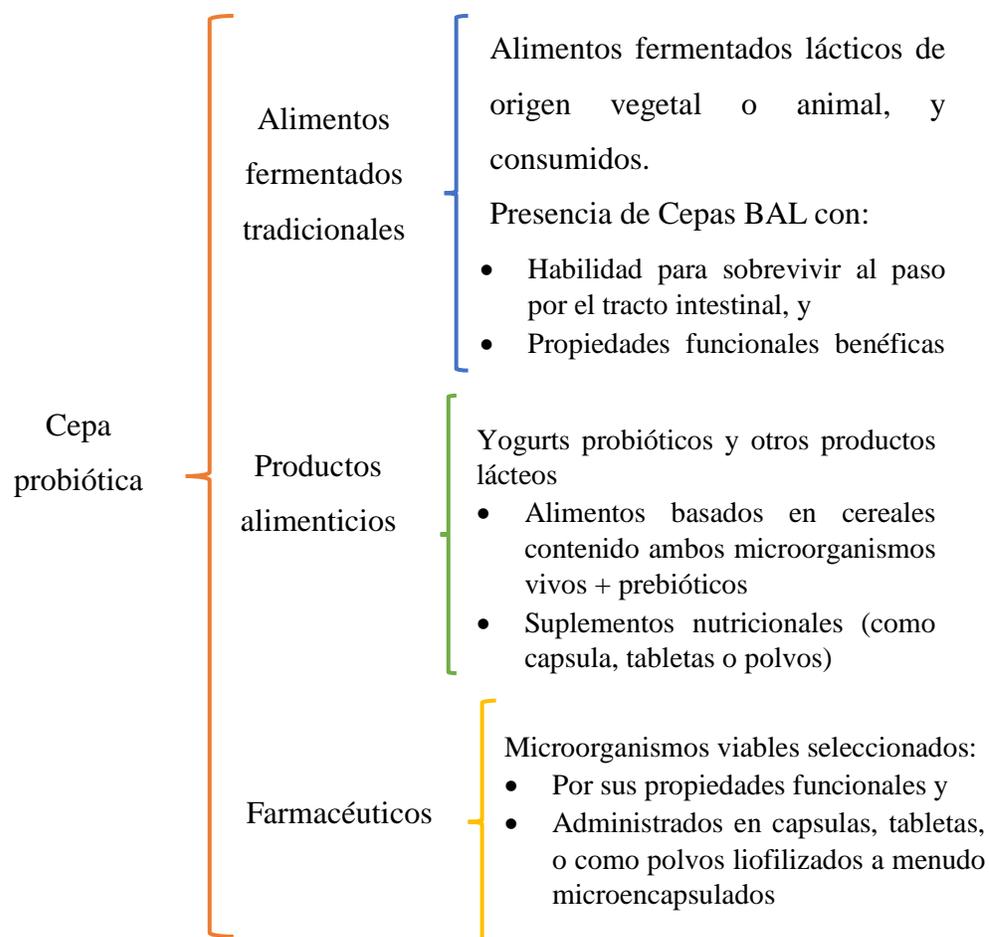


Figura 1. Administración de probióticos en diferentes formas.

Fuente:(Hummel *et al.*, 2007).

Los microorganismos empleados actualmente en la elaboración de productos fermentados incluyen diferentes BAL, especialmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, siendo sus especies bacterianas más representativas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* (Hernández Ramírez, 2009). En la elaboración de productos fermentados los microorganismos desempeñan un papel decisivo, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto.

2.3 Contribución de los probióticos en la función de la barrera intestinal

Los datos obtenidos sobre los métodos de acción de probióticos a nivel intestinal provienen en su mayoría de estudios *in vitro*, aunque en la actualidad se han obtenido datos de estudios realizados con modelos animales y de estudios clínicos con humanos. (Otte & Podolsky, 2004).

Se ha visto que los probióticos actúan sobre la función de la barrera del epitelio intestinal en tres diferentes tipos: sobre el epitelio, sobre el tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (GALT) y sobre la microbiota (Ohland & Macnaughton, 2010) (Figura 2).

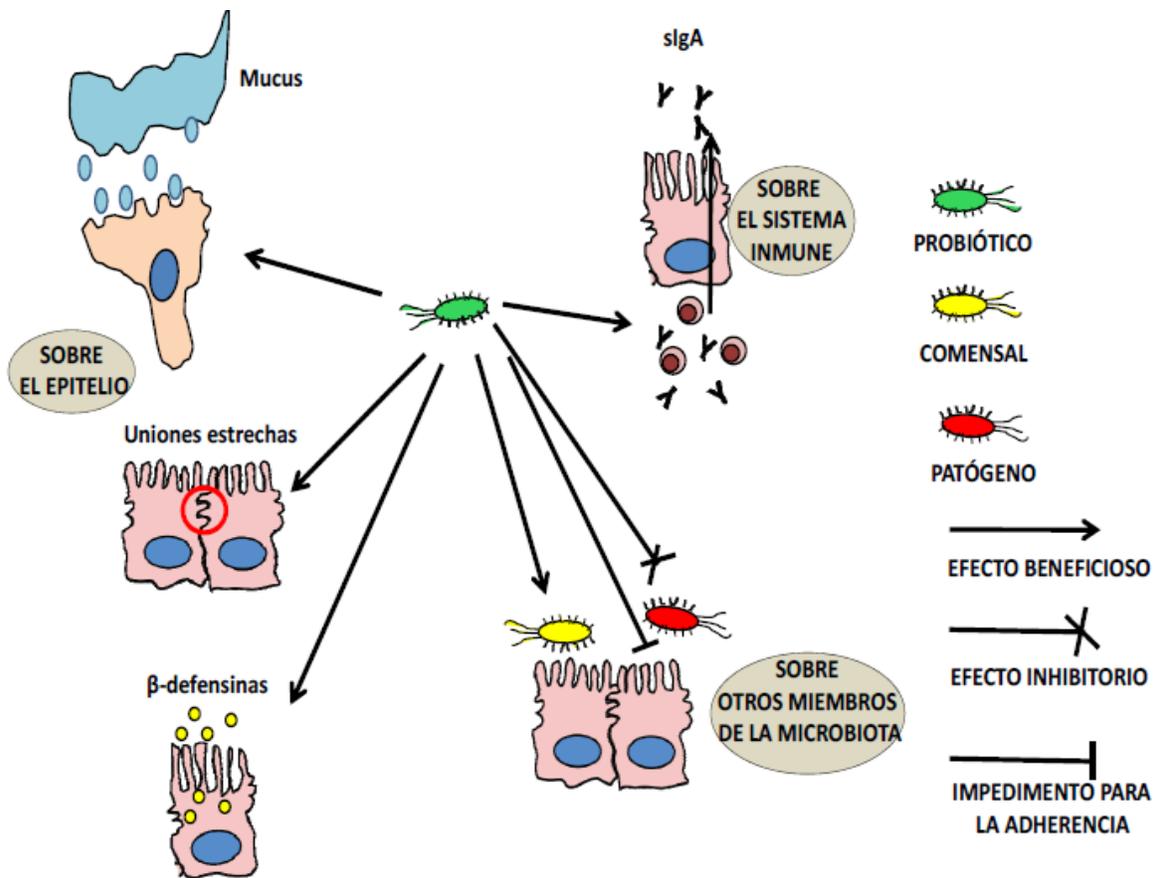


Figura 2. Contribución de los probióticos a la función barrera.

2.3 Efectos de los probióticos sobre el epitelio

2.3.1 Incremento de secreción de mucus por las células caliciformes

En el año 1999, Mack y colaboradores plantearon la posibilidad de que la capacidad de los probióticos de inhibir la unión de enteropatógenos al epitelio intestinal se debiera a que estimularan la secreción de mucinas. Observaron que la incubación de células epiteliales intestinales HT-29 con lactobacilos probióticos producía una disminución significativa de la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena y un aumento significativo de la expresión de MUC-2 y MUC-3 (Mack *et al.*, 1999).

Caballero-Franco *et al.* (2007) ensayaron el efecto de la fórmula probiótica VSL#3 (una mezcla liofilizada de 8 microorganismos Gram-positivos: 4 especies de lactobacilos, 3 de bifidobacterias y una de streptococos) en ratas Wistar, donde observaron un incremento del contenido luminal de mucus de un 60% y un aumento de la expresión de MUC-2. Por su parte al usar la línea de células epiteliales colónicas LS 174T la incubación con la fórmula no produjo un aumento de la secreción de mucus, pero sí la adición del medio condicionado que contiene productos secretados por las bacterias. Las especies de lactobacilos fueron las que produjeron un efecto mayor *in vitro*.

2.3.2 Producción de ácidos grasos de cadena corta

Los probióticos, en el ciego y colon proximal principalmente, pueden fermentar carbohidratos de la dieta que no han sido digeridos y absorbidos en el intestino delgado generando ácidos grasos de cadena corta. Estos metabolitos son fácilmente absorbibles, de forma que solo el 5-10% se elimina con las heces. Su efecto sobre receptores del epitelio intestinal como GPR41 y GPR43 promueve el peristaltismo intestinal (Ohara *et al.*, 2009).

Es de importancia mencionar que el butirato se considera como la principal fuente de energía de los colonocitos y está encargado de regular la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. También participa en la prevención del cáncer colorectal mediante la activación de enzimas metabolizadoras de glutatión-S-transferasa, capaz de detoxificar carcinógenos endógenos o exógenos, o actuar sobre células ya transformadas como inhibidor de la histona desacetilasa, promoviendo la detención del ciclo celular y la apoptosis (Scharlau *et al.*, 2009).

En un estudio llevado a cabo por Le Leu *et al.* (2010) con ratas Sprague-Dawley, al administrar la combinación simbiótica de *Bifidobacterium lactis* y almidón resistente aumentó la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el recto con respecto al control ($p=0.03$) y se redujo un 50% ($p<0.01$) la inducción de cáncer colorectal por azoximetano.

2.3.3 Incremento de la secreción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas) por los enterocitos

En un estudio ensayaron el efecto de diversas cepas de *Lactobacillus* y de una mezcla probiótica sobre la producción de la beta defensina humana 2 (hBD-2) en células Caco-2. Se observó un aumento dependiente del tiempo y la dosis en la expresión del gen y una secreción al medio de cultivo en la que participa la inducción de vías proinflamatorias (Schlee *et al.*, 2008).

2.3.4 Disminución en la permeabilidad epitelial a patógenos o sus productos

Karczewski y colaboradores observaron un aumento de proteínas del sello paracelular en el epitelio de individuos sanos a los que se les había suministrado *L. plantarum* WCFS1 en el duodeno mediante catéter respecto a los que habían recibido placebo. Efectos similares y de importancia en la integridad del epitelio se encontraron en cultivos celulares de células Caco-2 al añadirles dicha cepa. Estos efectos estaban mediados por la interacción con el receptor TLR-2 de las células eucariotas (Karczewski *et al.*, 2010).

Anderson y colaboradores estudiaron el efecto de diversas cepas probióticas en la potenciación de la función barrera sirviéndose de la medida de la resistencia transepitelial en células Caco-2. Seleccionaron la cepa *L. plantarum* DSM 2648 para sucesivos experimentos por ser la que mayor incremento de la resistencia transepitelial producía. Ya fuera mediante un cocultivo previo o simultáneo, esta cepa era capaz de disminuir el efecto negativo de *E. coli* enteropatógena O127:H6 sobre la adhesión y sobre la resistencia transepitelial, potenciando por tanto el efecto barrera (Anderson *et al.*, 2010).

En un modelo de infección por *Shigella dysenteriae* en rata, en los controles se producía un daño en la integridad de la membrana de las células epiteliales y una disminución de la expresión de las proteínas de los complejos laterales de unión. Dicho daño se veía reducido significativamente al administrar previamente una mezcla de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* (Moorthy *et al.*, 2009).

2.4 Efectos de los probióticos sobre el sistema inmune asociado a mucosas

2.4.1 Incremento del número de células productoras de inmunoglobulina A

En un estudio realizado por De LeBlanc y colaboradores realizaron una administración continuada, de leche fermentada conteniendo bacterias probióticas a ratones BALB/c, esto no produjo efectos secundarios, y tuvo efectos inmunomoduladores sobre el mantenimiento de la homeostasis intestinal. El número de células productoras de IgA aumentó tanto en el intestino delgado como en el grueso. También se observó un incremento en diversas citoquinas reguladoras como IL-10, que previene la aparición de una respuesta inflamatoria (De LeBlanc *et al.*, 2008).

2.4.2 Aumento en la secreción de la IgA al mucus luminal

La cepa Bifido B de *B. animalis* subsp. *lactis* al ser suministrada a ratones gnotobióticos es capaz de colonizar y mantener unos niveles poblacionales altos. Los ratones colonizados por esta cepa muestran niveles más altos de sIgA e IL-10 en relación a los controles y pueden conferir protección frente a Salmonella, lo que se refleja en una menor mortalidad (Martins *et al.*, 2010).

El consumo por parte de niños sanos de un producto probiótico conteniendo *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 y *L. gasseri* CECT5714 mejoró la salud de su flora intestinal y potenció sus defensas entre otras cosas aumentando la cantidad de sIgA, tal y como mostraron los análisis de heces y saliva (Lara-Villoslada *et al.*, 2007).

2.5 Efectos de los probióticos sobre otros miembros de la microbiota

2.5.1 Competencia por sitios de unión con comensales o patógenos

La capacidad de inhibir la unión de patógenos o de desplazarlos es uno de los aspectos más importantes de la manipulación terapéutica de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos. Se requiere una evaluación caso por caso ya que se ha constatado que el efecto observado depende tanto de las cepas de microorganismos probióticos y patógenos empleadas como del sistema modelo utilizado en el estudio (proteínas inmovilizadas, líneas celulares, etc.).

L. rhamnosus GG y *L. casei* Shirota son capaces de competir y desplazar cepas patógenas intestinales de *E. coli* y *Salmonella* del mucus intestinal humano y células Caco-2, aunque este desplazamiento es relativamente lento (Lee *et al.*, 2003).

La adhesión a células Caco-2 por *L. plantarum* 423 es capaz de prevenir la adhesión de *Clostridium sporogenes* y *Enterococcus faecalis* y también de desplazar estas bacterias por exclusión competitiva. Dicha capacidad se conserva en gran medida tras eliminar las proteínas de superficie, por lo que se deduce que existen componentes de superficie no proteicos implicados en la adhesión (Ramiah *et al.*, 2008).

2.5.2 Producción de sustratos metabolizables por determinados miembros de la microbiota beneficiosos para el hospedador

El proceso fermentativo implica diferentes grupos funcionales de microorganismos unidos en una cadena trófica. El ácido láctico generado por la fermentación de oligosacáridos llevada a cabo por un grupo de microorganismos puede ser aprovechado como sustrato por otros utilizadores del mismo como las bacterias productoras de propionato, algunas productoras de butirato y bacterias reductoras de sulfato (SRB, sulphate-reducing bacteria) (Chassard *et al.*, 2008). Esto evita la acumulación del mismo en el intestino de individuos sanos y permite que la reacción de obtención del ácido láctico pueda seguir llevándose a cabo al ser termodinámicamente favorable.

2.5.3 Efecto bactericida o efecto bacteriostático sobre bacterias patógenas al liberar factores antimicrobianos

Uno de los efectos buscados al emplear probióticos es el mantenimiento o restauración de la microbiota del hospedador. La actividad antimicrobiana de los preparados probióticos depende de la producción de sustancias antimicrobianas inespecíficas como los ácidos orgánicos o el peróxido de hidrógeno y/o de la producción de toxinas antimicrobianas con diverso rango de acción (Millette *et al.*, 2007). Los ácidos grasos de cadena corta pueden difundir a través de la membrana, disociarse en el ambiente más alcalino del citoplasma y acidificarlo, lo cual explica su efecto inhibidor.

La fuerte actividad antimicrobiana de *L. rhamnosus* GG sobre *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium es debida a la acumulación de ácido láctico que afecta al crecimiento y la expresión de factores de virulencia (Durant *et al.*, 2000). El ácido láctico puede actuar además

de bajando el pH, aumentando la permeabilidad de la membrana externa de bacterias Gram-negativas e incluso capturando elementos esenciales para el crecimiento, como el hierro, dadas sus propiedades quelantes (Presser *et al.*, 1997).

2.6 Efectos benéficos a la salud del huésped por el consumo de probióticos

Debido a las implicaciones que tienen los probióticos sobre la salud, es necesario conocer su interacción con el organismo hospedador e identificar las diferencias genéticas que determinan que cepas filogenéticamente muy próximas muestren cualidades probióticas dispares. Los probióticos ejercen efectos beneficiosos en el sistema digestivo y tienen la capacidad de modular el sistema inmune contribuyendo al buen estado de la salud (Kumar & Salminen, 2016). Entre los beneficios estudiados se encuentran

2.6.1 Efectos nutricionales

Las bacterias probióticas son las responsables del proceso de fermentación y de esta forma se incrementa la biodisponibilidad de proteínas, aminoácidos y péptidos por su acción proteolítica (Fooks, Fuller, & Gibson, 1999).

2.6.2 Atenuación de la intolerancia a la lactosa y mejora de la digestibilidad

Los pacientes intolerantes a la lactosa tienen riesgo de suprimir el consumo de calcio y vitamina D y están predispuestos a osteoporosis. Se estima que 65-75% de la población mundial tienen bajos niveles de lactasa (McCray, 2003). Las bacterias productoras de ácido acético y d-galactosidasa aumentan la actividad lactasa reduciendo posibles problemas de asimilación (Fooks *et al.*, 1999; van Loveren, Sanz, & Salminen, 2012).

2.6.3 Personas con estreñimiento crónico

Al consumir productos prebióticos y probióticos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* junto con ejercicio físico lograron reducir el estreñimiento. Una vez dejaron de consumir el suplemento dicho efecto se mantuvo durante 6 semanas. Algunas combinaciones probióticas han estabilizado la microbiota funcional sin efectos adversos. Otras mezclas no han favorecido la microbiota y se ha ocasionado flatulencia a los pocos días de consumo (Jiménez, 2008).

2.6.4 Efectos sobre el sistema inmunológico

El consumo de probióticos puede ayudar a disminuir y aliviar síntomas de alergias alimentarias por medio de la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la microbiota intestinal. Es una alternativa, especialmente en niños que tienen su microbiota en pleno desarrollo. Las cepas no son las que inducen o modifican la respuesta inmune, pero están vinculadas a alteraciones transitorias que favorecen al consumidor (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999). Además, tienen efecto beneficioso sobre la evolución de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Ng, Koon, Padam, & Chye, 2015). La presencia de bacterias probióticas puede contrarrestar los efectos mutagénicos y genotóxicos en el colon (Salminen & van Loveren, 2012). Según algunos autores, estos efectos persisten más allá de la duración de la colonización de la cepa probiótica debido a la capacidad de memoria del sistema inmune (Isakow, Morrow & Kollef, 2007). Los probióticos actúan como adyuvantes de respuestas inmunes específicas por intervención de linfocitos T4, aumentan los mecanismos defensivos no específicos contra infecciones o tumores por fenómenos fagocitarios e incrementan los niveles de interferón (Fooks *et al.*, 1999).

2.6.5 Mantenimiento de la microbiota intestinal normal

La microbiota intestinal está influenciada por la edad, dieta, condición socio-económica, uso de antibióticos y estado de salud (Parkes *et al.*, 2009). Los probióticos interactúan con la microbiota intestinal y con los receptores de la pared intestinal produciendo variedad de efectos en el hospedador (Salminen & van Loveren, 2012). Sin embargo, se desconoce el papel metabólico e inmunológico de la microbiota del tracto gastrointestinal y si estos cambios son primarios o secundarios (Parkes *et al.*, 2009).

En estudios previos se ha demostrado que los probióticos previenen episodios de diarreas relacionadas con el consumo de antibióticos, aunque su uso en el tratamiento y prevención requiere comprobación cuando está asociada a *Clostridium difficile* (Isakow *et al.*, 2007). En la diarrea del viajero aún no existe una recomendación médica clara y se requieren más estudios (Marteau, Seksik, & Jian, 2002).

Los probióticos tienen efecto preventivo sobre enteritis o colitis, incluso sobre infecciones en las vías urinarias (Arciero, Ermentrout, Upperman, Vodovotz, & Rubin,

2010). Al mejorar la función de barrera del intestino, protegen la muerte celular induciendo genes específicos del moco.

2.6.6 Prevención del cáncer

La flora endógena y el sistema inmune cumplen una función importante en la modulación de la carcinogénesis (Marteau *et al.*, 2002). El consumo de probióticos redujo el riesgo de sufrir cáncer de colon y en otro estudio, el uso de calostro fermentado inhibió el avance de tumores en ratones (Burns & Rowland, 2003). Se considera que ocurre a través de varios mecanismos como alteración de las actividades metabólicas en la microbiota intestinal, alteración de las condiciones fisicoquímicas en el colón, vinculación y degradación del potencial carcinógeno, producción de compuestos antitumorales y mejora de la respuesta inmune del hospedador (Thirabunyanon, Boonprasom, & Niamsup, 2009).

2.6.7 Reducción infecciones respiratorias

Existe una tendencia a disminuir las infecciones respiratorias (Marteau *et al.*, 2002). De acuerdo a los estudios de (Pregliasco *et al.*, 2009), la ingesta a largo plazo de simbióticos (probiótico y prebiótico) logró mejorar la salud mediante la reducción de la incidencia y gravedad de las enfermedades respiratorias durante la temporada de frío. Por otro lado, la suplementación de probióticos en niños de 3 a 5 años en la dieta diaria durante 6 meses resultó una manera segura y efectiva de reducir la incidencia de fiebre y tos. Además, disminuyó la duración e incidencia de la prescripción de antibióticos (Leyer, Li, Mubasher, Reifer, & Ouwehand, 2009).

El estudio de (Guillemard, Tondu, Lacoïn, & Schrezenmeir, 2010) concluyó que el consumo de productos lácteos con *L. casei* DN-114001 en personas mayores estuvo asociado con la disminución en la duración de infecciones de las vías respiratorias como la rinofaringitis. Además, estudios en ratones desnutridos a los que se les suministró una dieta balanceada con yogur probiótico incrementaron la función bactericida de los fagocitos bronco-alveolares. Los macrófagos alveolares constituyen la primera línea de defensa contra agentes infecciosos que tienen acceso a las vías respiratorias por el intercambio gaseoso (Villena, Racedo, Agüero, & Alvarez, 2007). Otro estudio clínico demostró que la ingestión de *Bifidobacterium longum* aumentó el número de macrofagos

en los pulmones (De Vrese & Schrezenmeir, 2002). Sigue siendo cuestión de debate el mecanismo por el cual el producto probiótico tiene un efecto contra las infecciones respiratorias. Una hipótesis es que el probiótico favorece los mecanismos inmunomoduladores implicados en la protección contra las infecciones respiratorias (Villena *et al.*, 2007).

2.6.8 Reducción colesterol

Algunas hipótesis sugieren que ciertas cepas ácido lácticas pueden asimilar la molécula del colesterol impidiendo su reabsorción, produciendo metabolitos que afectan los niveles de grasa en la sangre incidiendo favorablemente en las enfermedades coronarias. El efecto y los mecanismos de acción se desconocen. Según algunos autores, el consumo de 125 mL de leche probiótica puede disminuir considerablemente los niveles de LDL-colesterol (Fooks *et al.*, 1999).

2.6.9 Salud gástrica

Las bacterias intestinales producen gran variedad de sustancias como ácidos grasos, peróxidos, bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Quigley, 2010).

Algunos probióticos estimulan la producción de mucina en el epitelio, compiten con las bacterias patógenas por adherirse y modifican las toxinas derivadas por estos patógenos (Isakow *et al.*, 2007). Las bacterias probióticas especialmente cepas de *Lactobacillus* tienen habilidad para influir en la colonización y actividad de *Helicobacter pylori*, han inhibido la infección en animales y humanos a partir sus productos metabólicos (Amarocho Cruz, 2011).

2.6.10 Coadyuvante de antibióticos

El consumo indiscriminado de antibióticos en humanos y animales para tratar infecciones de origen microbiano afecta a patógenos y demás microorganismos naturales del huésped. Además, favorece la aparición de cepas resistentes y aumenta los riesgos a infecciones. El uso de antibióticos en los primeros años de vida puede estar asociado más tarde con síntomas de asma, rinoconjuntivitis alérgica y eccema (Kalliomäki, 2009). La resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos probióticos es un problema porque a través de plásmidos pueden transferir la resistencia a bacterias patógenas

presentes en el intestino del huésped, creando situaciones no deseables para la salud (Errecalde, 2004).

2.7 Criterios para considerar un alimento como probiótico según la FAO

La FAO proporciona una guía para evaluar las propiedades de los alimentos probióticos de forma sistemática. Entre las que se encuentran:

2.7.1 Identificación de género, especie y cepa probiótica

La caracterización de los productos probióticos a nivel de género, especie y cepa es fundamental para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo y seguro denominado GRAS (Generally Regarded As Safe), en el estudio de sus efectos biológicos y clínicos (Azais-Braesco, Bresson, Guarner, & Corthier, 2010). Por otra parte, la inclusión de todas las especies de BAL y *Lactobacillus* en un grupo probiótico es incorrecta.

2.7.2 Estudios *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos

Dentro de las pruebas *in vitro* para determinar las propiedades probióticas de cada cepa se encuentran:

- a) Resistencia a la acidez gástrica y sales biliares, es una característica imprescindible en las bacterias probióticas cuando pasan por el tracto gastrointestinal. Las condiciones ácidas, sales biliares, variaciones de pH afectan en alguna medida la viabilidad de los microorganismos y es necesario que lleguen vivos al final del intestino para ejercer efectos inmunomoduladores (Ramasamy, Abdullah, Wong, Karuthan, & Wan, 2010).
- b) Adherencia a la mucosa intestinal y células epiteliales es un pre-requisito para que el probiótico sea efectivo y desarrolle sus efectos inmunomoduladores, reduzca la adhesión de microbiota competitiva, desarrolle la actividad microbiana que favorece el desplazamiento de patógenos. La habilidad de adhesión a la superficie intestinal permite la colonización aunque sea transitoria y es una propiedad dependiente de la cepa (Kirjavainen, Ouwehand, Isolauri, & Salminen, 1998). Hay pocos estudios sobre las interacciones de probióticos en relación con las propiedades de adhesión en el intestino; sin embargo, se mencionan que esta mediada por la unión de proteínas de la superficie bacteriana como lecitinas a oligosacáridos del tejido presentes en la superficie. Aunque,

la adhesión puede ser no específica debida a interacciones hidrofóbicas con la superficie intestinal (Grootaert *et al.*, 2009). Otro mecanismo de adhesión para *Lactobacillus* es la vinculación a algunos glicoesfingolípidos específicos. Algunas cepas de *Bifidobacterium* poseen la enzima 1,2-a-L-fucosidasa implicada en la adhesión en el tracto intestinal (Takahashi, Oka, Iwana, Kuwata, & Yamamoto, 1993). En condiciones *in vitro* no es posible simular el efecto de las bacterias probióticas sobre el sistema inmune (Quigley, 2010), por lo que es necesario realizar pruebas *in vivo*.

2.7.3 Seguridad de los probióticos

Durante décadas, varias especies y cepas probióticas se han ensayado en individuos saludables y enfermos. Aún hoy en día, no hay total certeza de la seguridad de las mismas. Sin embargo, los probióticos son tratados como un alimento y no como un producto farmacéutico aunque tengan la propiedad de atenuar una enfermedad (FAO/WHO, 2002).

En Estados Unidos de America la FDA (Food and Drug Administration) es la entidad encargada de regular los productos probióticos. La categorización de estos productos es determinada en parte por el uso como alimento o ingrediente de alimento, alimento medicinal, suplemento dietético y producto biológico (Degnan, 2008) y emplean el sistema GRAS para evaluar la seguridad de los microorganismos empleados en la producción de alimentos. En Europa, la European Food Safety Authority (EFSA) los clasifica dentro de los productos nutricionales para darle un rango más alto y emplea el sistema Qualified Presumption of Safety (QPS). Básicamente, solo los microorganismos identificados a nivel de cepa y cuyo uso histórico haya sido seguro pueden recibir la denominación de probiótico, de lo contrario se debe recurrir a estudios clínicos y de toxicidad (Havelaar *et al.*, 2010; Quigley, 2010). Algunos autores sugieren adoptar las recomendaciones de la declaración “Consolidated Standards of Reporting Trials” (CONSORT), con el fin de facilitar la validación de los resultados (Kalliomäki, 2009; Moher, Schulz, & Altman, 2001).

Por tanto, la seguridad de un probiótico depende de la especie bacteriana de interés, la aplicación, el uso, la población objetivo, taxonomía, identificación y la caracterización

fenotípica. Requiere especial cuidado las poblaciones vulnerables como recién nacidos, pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades críticas (Amorocho Cruz, 2011).

Para garantizar la seguridad de las cepas, se recomiendan las siguientes pruebas de caracterización (FAO/OMS, 2006).

- a) Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles.
- b) Actividades metabólicas perjudiciales.
- c) Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.
- d) Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica.
- e) Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.
- f) Determinar la dosis y la duración de la terapia.
- g) Realización de pruebas aleatorias, ensayos en diferentes centros, doble ciego, controlado con placebo y con un apropiado diseño estadístico.

En la Tabla 1 se presentan los principales microorganismos probióticos y su estatus de seguridad potencial.

Tabla 1. Microorganismos probióticos y su estatus de seguridad.

Organismo	Infección potencial
<i>Lactobacillus</i>	No patógenos
<i>Lactococcus</i>	No patógenos
<i>Streptococcus</i>	Oportunistas, solo <i>S. thermophilus</i> es usado en productos lácteos
<i>Enterococcus</i>	Oportunistas, solo algunas cepas tienen resistencia a antibióticos.
<i>Bacillus</i>	Solo <i>B. subtilis</i> , es reportado en uso probiótico.
<i>Bifidobacterium</i>	Principalmente no patógenos, algunas cepas son aisladas a partir de infección humana.
<i>Propionibacterium</i>	Candidato potencial para probióticos.
<i>Saccharomyces</i>	No patógeno, algunas cepas son aisladas de infecciones humanas.

Fuente:(Sanz *et al.*, 2003).

2.7.4 Estudios *in vivo* utilizando animales y humanos

Con el propósito de demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos se han definido modelos animales donde entran en acción mayor número de variables como la matriz del alimento, el procesamiento de la cepa probiótica y la interacción con la microbiota intestinal del hospedador (Quigley, 2010). Resultados de varios estudios clínicos han demostrado que determinadas cepas probióticas tienen capacidad de acortar la duración o reducir el riesgo de ciertas infecciones bacterianas y virales. Se está trabajando en identificar los mecanismos de acción de los probióticos y como estos pueden llegar a afectar los diferentes alimentos en los

que se introducen (Allgeyer, Miller, & Lee, 2010; Jankovic, Sybesma, Phothirath, Ananta, & Mercenier, 2010).

2.7.5 Viabilidad de las cepas declaradas en productos probióticos comerciales

El mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos en un producto probiótico durante toda la vida útil es imprescindible porque condiciona su actividad. El número de células viables en el alimento al final de su vida útil debe ser de al menos 10^6 UFC/mL en productos con bifidobacterias. Algunos autores, recomiendan un consumo de 10^9 UFC/día para conservar los niveles suficientes (Collado Amores, 2004).

Dicha cantidad de probiótico con *L. acidophilus* fue efectiva en la reducción de la inflamación del ciego y el colon en un estudio *in vivo* con ratones y con *L. rhamnosus* GG fue suficiente para disminuir la diarrea en niños de 1 a 36 meses (Marteau *et al.*, 2002; Sandholm *et al.*, 1999). En otros casos, algunas combinaciones de probióticos han sido más efectivas sobre la inhibición de adhesión de patógenos en comparación con los probióticos de manera natural.

2.8 Bacterias potencialmente probióticas

En la actualidad se conocen más de 20 géneros de microorganismos probióticos en el mundo, estos han sido aislados de diversas fuentes como: el tracto intestinal de humanos y animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Barboza, Vázquez, Salcedo, & Bautista, 2004). De estos, la mayor parte pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas.

Los *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, son los géneros comúnmente empleados para la producción de probióticos (Sandine *et al.*, 1972), caracterizados por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que los hace útiles para la fermentación de alimentos. Algunos de ellos se presentan en el Tabla 2.

Tabla 2. Probióticos estudiados para su uso en la alimentación.

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>B. animalis subsp. animalis</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>B. lactis subsp. lactis</i>	<i>L. amylovorus</i>
<i>B. longum subsp. longum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>B. pseudolongum subsp. pseudolongum</i>	<i>L. casei subsp. casei</i>
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. crispatus</i>
	<i>L. farmicinis</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. murinus</i>
	<i>L. plantarum subsp. plantarum</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. salivarius</i>
	<i>L. amylovorus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>L. lactis subsp. cremoris</i>	<i>L. citreum</i>
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>L. mesenteroides</i>

Fuente: (Caballero Cervantes, 2014)

2.9 Bacterias ácido lácticas

Años atrás se creía que la bacterias ácido láctico causaban alteración en los alimentos, en poco tiempo descubrió que la sustancia que los alteraba era el ácido láctico, el cual es un

producto derivado de la fermentación de ciertos microorganismos. En 1890, Weigman estableció lo que fue el primer cultivo iniciador reconocido y más tarde, en 1899 definió a las bacterias ácido lácticas como “aquellas bacterias que formaban leche ácida a partir del azúcar de la leche” (Dosta *et al.*, 2009).

Es sabido que las BAL no solo son interesantes en la industria de los alimentos por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlos para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos (Laparra & Sanz, 2010). La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano. Además de los ácidos orgánicos producen tras sustancias como el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, bacteriocinas (Muñoz-Atienza *et al.*, 2014).

Las BAL han adquirido recién interés debido a sus características fermentativas y antagonicas por parte de la industria alimentaria ya que son consideradas GRAS por la FDA, debido a que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos sin que hubiera efectos adversos sobre la población (Dosta *et al.*, 2009).

2.9.1 *Genero Lactobacillus*

Pertenece a la familia *Lactobacillaceae*. Son bacilos largos y finos, algunos curvados o cortos y morfología cocobacilar corniforme, es habitual la formación de cadenas. La longitud de los bacilos y el grado de curvatura está en función de la edad del cultivo, composición y pH del medio. No es común la movilidad, aunque algunos presentan flagelos peritricos (Ramirez Ramirez *et al.*, 2011).

Crecen en la superficie de medios sólidos en condiciones de anaerobiosis o con tensiones de oxígeno bajas y un 5-10% de CO₂, en rangos de temperatura comprendidos entre 2-53°C, pH óptimo entre 5.5–6.2, la velocidad de crecimiento a menudo se reduce en pH neutro y alcalino. Tienen metabolismo fermentativo, son sacarolíticos y su característica principal es fermentar azúcares con producción de ácido láctico. Son homofermentadores cuando originan ácido láctico y heterofermentadores al producir ácido láctico, ácido acético, dióxido

de carbono (CO₂), etanol, ácido fórmico o succínico. El porcentaje molar G+C tiene valores de 32-53 (Brito *et al.*, 2011).

Se encuentran en productos lácteos, cereales, carnes, pescados, agua de consumo, aguas residuales, cerveza, vino, frutas, zumos de frutas, encurtidos y chucrut. Forman parte de la flora de la boca, el tracto intestinal, el aparato reproductor femenino y de muchos animales (Aguavil Enriquez, 2012).

Los requerimientos nutricionales incluyen aminoácidos, péptidos derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio Man Rogosa Sharpe (MRS) es uno de los más empleados y es recomendado para la enumeración y el mantenimiento de los bacilos lácticos (Collado Amores, 2004)

No son considerados patógenos aunque algunas especies son responsables de la placa dental y el inicio de caries dental. Infecciones causadas por este género son extrañas y representan 0.05-0.48% de todos los casos de endocarditis infectiva y bacteremias, aunque se han involucrado en infecciones locales y de la sangre. Este género contribuye positivamente en la tecnología de alimentos, producen compuestos volátiles que pueden otorgar un aroma placentero de alimento fermentado o deteriorarlos afectando las propiedades sensoriales como el sabor, textura, color, limo y formación de aminas biogénicas (Aguavil Enriquez, 2012). Las características propias de *Lactobacillus* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características del género *Lactobacillus*.

Características	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
	Homofermentativos Obligados	Heterofermentetivos Facultativos	Heterofermentativos Obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa	+	+	+
Presencia de fosfoquetolasa	-	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
		<i>L. pentosus</i>	<i>L. reuteri</i>
		<i>L. paracasei</i>	<i>L. kefir</i>

2.10 Metabolismo de BAL

La característica esencial del metabolismo de las BAL es la eficiencia de fermentación de carbohidratos, la generación de Adenosin Trifosfato (ATP), es subsecuentemente usado para propósitos biosintéticos además la enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos relacionados.

Generalmente el producto final predominante es por supuesto el ácido láctico. Sin embargo, las BAL se adaptan de acuerdo a varias condiciones y cambian su metabolismo esto puede

llevar a los diferentes productos finales de fermentación. Los niveles y proporciones de los productos finales de la fermentación que se acumulan dependen de las especies de BAL involucradas, la composición química del ambiente de cultivo y las condiciones físicas que hay durante el proceso fermentativo (Vandamme *et al.*, 1996).

2.11 Rutas principales de fermentación

Dos rutas de fermentación del azúcar pueden ser distinguidas en las bacterias ácido lácticas (Hui, Guerrero, & Rosmini, 2006). En la Figura 3 se muestra las dos rutas de fermentación para las BAL.

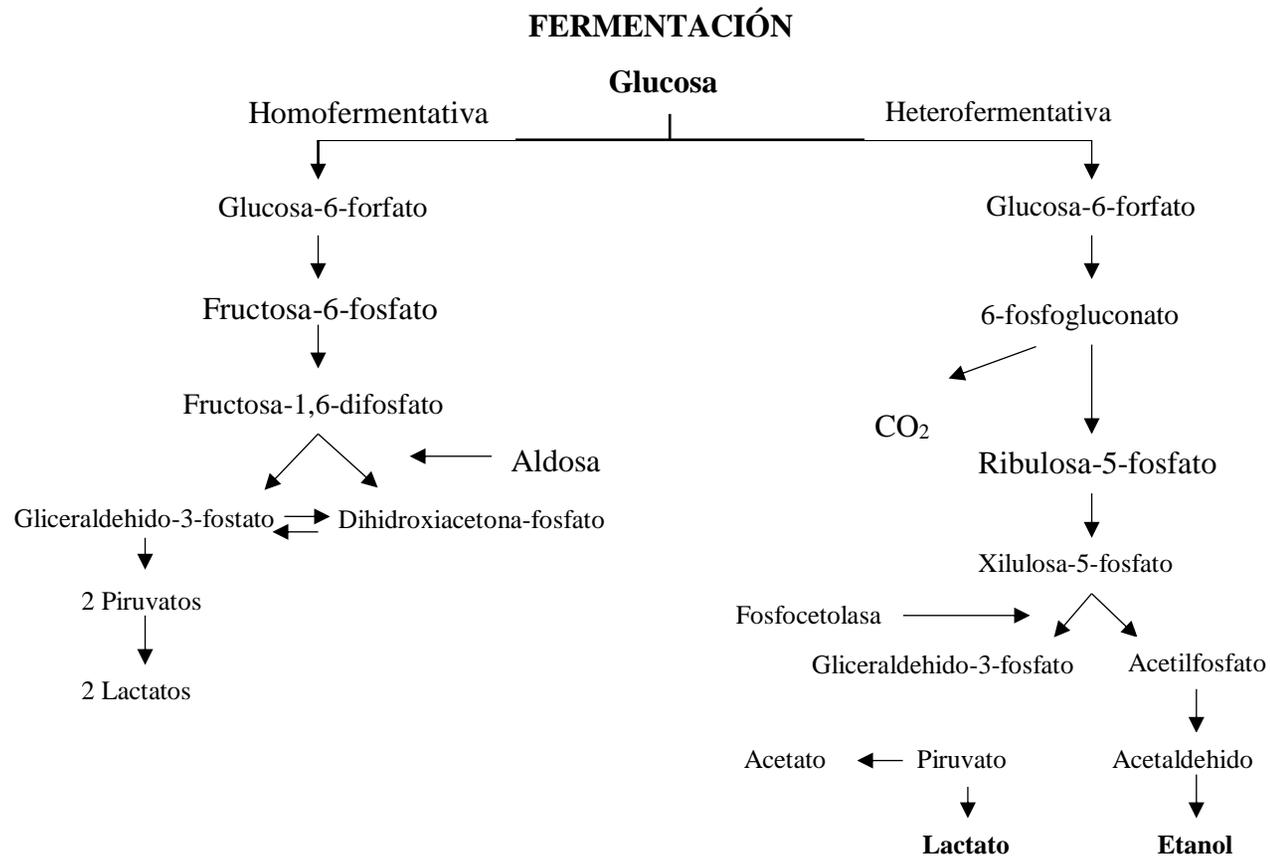


Figura 3. Rutas de fermentación de las BAL.

Fuente: (Hui *et al.*, 2006)

- 1) Fermentación Homoláctica: O también llamada Glucólisis (rutas Embden-Meyerhof) resultando casi exclusivamente en ácido láctico como el producto final, (vía glicolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas): *Lactococos*, *Pediococos*, *Streptococos*, *Lactobacilos* homofermentadores. Metabolizan las hexosas principalmente a ácido láctico, con un rendimiento neto de dos moles de ATP por mol de hexosa fermentado.
- 2) Fermentación Heteroláctica: Esta fermentación es por medio de la enzima 6-fosfogluconato/fosfocetolasa dando como resultado cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO₂ además del ácido láctico. *Leuconostocs*, *Latobacilos* son heterofermentadores. En la fermentación de hexosas, el ácido láctico comprende el 70% de los productos catabólicos finales, junto con cantidades equimolares de CO₂ y acetato o etanol. El rendimiento neto es de un mol de ATP por mol de hexosa (Vandamme *et al.*, 1996).

2.12 Productos finales de la fermentación de las BAL de interés en alimentos

Los productos finales de la fermentación de las BAL de más interés en la industria alimenticia son ácidos orgánicos, dióxido de carbono, diacetilo, y las bacteriocinas. Además de la producción de metabolitos primarios, se pueden formar otros compuestos antimicrobianos por las diferentes BAL (Ogunbanwo, Sanni, & Onilude, 2003; Vesterlund, Paltta, Karp, & Ouwehand, 2005). La habilidad de las BAL para producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada históricamente para la conservación de los alimentos. A continuación se mencionan algunas sustancias antimicrobianas producidas por las BAL, y cómo influyen en muchas de las propiedades benéficas atribuidas a estos microorganismos.

2.12.1 Ácidos orgánicos

Se ha observado que el ácido propiónico, láctico, acético y butírico, tiene una fuerte actividad antimicrobiana. Debido a que la reducción del pH causado por éstos ácidos permeabiliza las membranas de las células, por lo tanto incrementa la actividad de otras sustancias antimicrobianas como el péroxido de hidrógeno (Alakomi *et al.*, 2000).

2.12.2 *Peróxido de hidrógeno*

El efecto bactericida del peróxido de hidrógeno ha sido atribuido a su fuerte efecto oxidativo sobre las células bacterianas, los grupos sulfidril de proteínas celulares y membranas de lípidos pueden ser oxidados. El peróxido de hidrógeno produce reacciones que disminuyen el oxígeno, por lo tanto crean un ambiente anaeróbico que es desfavorable para ciertos organismos. La producción de peróxido de hidrógeno es particularmente importante para la colonización del tracto urogenital por *Lactobacillus*. Se ha encontrado que la colonización por *Lactobacillus* disminuye la adquisición de gonorrea, e infecciones del tracto urogenital (Martínez, Gómez, Rodríguez, Urbina, & Ortiz, 2005).

2.12.3 *Dióxido de carbono*

El dióxido de carbono (CO₂) es formado durante la fermentación del ácido láctico de las hexosas, pero también por muchas otras vías metabólicas generan dióxido de carbono durante la fermentación. El dióxido de carbono tiene un efecto antimicrobiano (Martín, Werner, & Hotchkiss, 2003). El mecanismo de esta actividad es desconocido pero se ha sugerido que la descarboxilación enzimática es inhibida y que la acumulación de dióxido de carbono en la bicapa lipídica causa disfunción en la permeabilidad de la membrana, a bajas concentraciones el dióxido de carbono puede estimular el crecimiento de algunos organismos, mientras que a altas concentraciones se puede prevenir su crecimiento. Debido a su actividad antimicrobiana, el CO₂ es ahora comúnmente usado como principal componente de la atmósfera modificada. Las bacterias Gram-negativas han mostrado ser más sensibles al CO₂ que las bacterias Gram-positivas (Devlieghere & Debevere, 2000).

2.12.4 *Diacetilo*

El Diacetilo (2-3-butanodiona) fue identificado por van Niel y colaboradores como el componente del aroma y sabor en la mantequilla. Este compuesto es producido por especies y cepas del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, entre otros organismos. Se encontró que el diacetil es más activo contra bacterias Gram-negativas, levaduras y hongos en comparación a las bacterias Gram-positivas, las BAL, fueron menos sensibles a este compuesto (Lanciotti, Patrignani, Bagnolini, Guerzoni, & Gardini, 2003).

2.13 Aplicaciones de los probióticos en alimentos

Existe un aumento en conocimiento de los alimentos funcionales que ha llevado a desarrollar alimentos con beneficios para la salud más allá de proporcionar una nutrición adecuada. En los últimos 20 años se ha demostrado un mayor interés entre los consumidores de alimentos funcionales incluyendo aquellos que contienen probióticos. La presencia de los probióticos en los alimentos comerciales ha sido reclamada por ciertos beneficios a la salud. Esto ha llevado a las industrias a centrarse en diferentes aplicaciones de los probióticos en los alimentos y crear una nueva generación de alimentos "probióticos" benéficos para la salud (Song, Ibrahim, & Hayek, 2012).

2.13.1 Alimentos probióticos a base de lácteos

La leche y sus productos son buen vehículo para cepas probióticas debido a sus propiedades inherentes y al hecho de que la mayoría de la leche y productos lácteos se almacenan a temperaturas de refrigeración. Los probióticos se pueden encontrar en una amplia variedad de productos lácteos comerciales, incluyendo la leche agria y fresca, yogur, queso, etc. Los productos lácteos juegan papel importante en la provisión de las bacterias probióticas al humano, ya que estos productos proporcionan un entorno adecuado para las bacterias probióticas que apoyan su crecimiento y la viabilidad (Gardiner *et al.*, 1999). Hay varios factores que deben ser abordados para la aplicación de los probióticos en los productos lácteos, como la viabilidad de los probióticos en los productos lácteos (Phillips, Kailasapathy, & Tran, 2006), las características físicas, química y las propiedades organolépticas de los productos finales (Akin, Akin, & Kirmaci, 2007; Bais H. P., T. L. Weir, Perry L. G., Gilroy S., & M., 2006), el efecto de los probióticos en la salud (Hill *et al.*, 2014) y los reglamentos y cuestiones de etiquetado (FAO, 2007; Sanders *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICACIÓN

En nuestro país se ha incrementado la elaboración y consumo de alimentos funcionales debido a la tendencia actual de los consumidores por buscar alimentos que, además de nutrir, aporten un beneficio a la salud. Es importante mencionar que el incremento de enfermedades gastrointestinales por factores como una mala alimentación y estrés, ha generado interés en profundizar en el estudio de alternativas nutricionales que permitan mejorar la calidad de vida del ser humano. Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica en nuestro país y en el mundo (León, 2002). Es por ello que se considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social. En el 2008 el sistema gubernamental de salud brindó 2 millones 188 mil consultas relacionadas con desordenes gastrointestinales en nuestro país (León, 2002). Es evidente que la mejor manera de prevenir ciertas enfermedades es mediante una dieta saludable y practicar ejercicio. No obstante, el estilo de vida predominante en la sociedad actual hace complicado el cuidado de la alimentación, lo que provoca el abandono de ciertos hábitos nutricionales. Esta situación ha provocado el aumento considerable en la demanda de nuevos alimentos funcionales, destacando dentro de ellos a los probióticos. Los probióticos, entre otros beneficios, han mostrado tener un efecto benéfico en el control de enfermedades gastrointestinales provocadas por bacterias. Debido a esto, durante los últimos años se ha incrementado el interés por el aislamiento, identificación y caracterización de las BAL con actividad probiótica para su uso en la industria farmacéutica y la de alimentos. En el presente estudio se determinó la capacidad probiótica de cepas BAL aisladas de quesos frescos, mediante pruebas en medios de cultivo y ratones CD-1.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el potencial probiótico de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp (QT17, QT19 y QR25) en medios de cultivo, la sobrevivencia de estas cepas a su paso por el tracto gastrointestinal de ratones CD-1 y su capacidad para colonizar el intestino de dichos ratones, así como el efecto de las cepas de BAL adheridas al intestino de los ratones en la invasión de *S. Typhimurium* y STEC a los órganos abdominales de los ratones.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el potencial probiótico de las cepas BAL en medios de cultivo mediante pruebas de resistencia a sales biliares y sensibilidad a antibióticos.
- Determinar la cantidad de ácidos producidos por las cepas BAL.
- Analizar la resistencia de cepas BAL al paso por el tracto gastrointestinal de ratones CD-1, y determinar la capacidad de adherencia, y colonización al intestino.
- Determinar el efecto de las cepas de BAL adheridas al intestino de los ratones en la invasión de *S. Typhimurium* y STEC a los órganos abdominales de los ratones.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Equipo de laboratorio

Autoclave Felisa Mod FE-399

Autoclave Yamato Scientific. Sterilizer SM 200

Balanza analítica Adam Equipment Mod. AQT 1500

Campana de flujo laminar LABCONCO CORPORATION Mod. 36208-04

Cuenta colonias DARKFIELD QUEBEC Mod. 3325 American Optical

Dispensador Dispensette® III Var. 1-10 mL Brand

Incubadora LAB-LINE AMBI-HI-LOW

Incubadora bacteriológica blue M Electric Company Mod. 100a

Incubadora bacteriológica blue M Electric Company Mod. 200^a

Micropipeta LABMATE* 100-1000 µL

Micropipeta LABMATE* 20-200 µL

Microscopio Motic® Mod. SFC-28 Instrumentos Ópticos de Precisión S.A. de C.V

Microscopio de Fluorescencia MacroView MVX10 Olympus®

Parrilla de calentamiento. Barnstead Thermolyne. Cimarec

Centrifuga universal Hermle® Z300/Z300K

Refrigerador LAB-LINE Environeers REB800/804

Vortex 2 Genie Mod. G-560 Scientific Industries

5.2 Medios de cultivo

Agar bacteriológico Bioxon de México

Agar para métodos estándar Bioxon, Becton Dickinson

Agar verde brillante con sulfa Difco™, Becton Dickinson

Agar con Eosina y Azul de Metileno Bioxon, Becton Dickinson

Caldo MRS Difco™, Becton Dickinson

Caldo soya tripticaseína Bioxon, Becton Dickinson

Peptona de caseína Bioxon, Becton Dickinson

5.3 Material biológico

La cepa de *Lactobacillus pentosus* resistente a rifampicina y el resto de las cepas de *Lactobacillus* spp QT17, QT19 y QR25 así como los microorganismos patógenos *S. Typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* enterotoxigénica *stx2* (SETC) de prueba resistentes a rifampicina fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,

Los ratones experimentales de la línea CD-1 fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

5.4 Resistencia de cepas Bacterias Ácido Lácticas a rifampicina

Se activaron las cepas de *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus* spp_QT17, QT19 y QR25 en 3 mL de caldo MRS, se incubaron 24 h a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm por 20 minutos, se decantó el sobre nadante y se realizaron dos lavados con 3 mL de solución salina isotónica al 0.85%, se decantó y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de diluyente de peptona del cual se tomaron 300 µL que posteriormente se sembró por extensión en superficie en agar MRS con rifampicina (1 mL rifampicina/100 mL AME), para crear resistencia a este antibiótico, se incubó 24 h a 37°C.

5.5 Comprobación del potencial probiótico de Bacterias Ácido Lácticas

5.5.1 Actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron a cada una de las cepas de bacterias ácido lácticas. Los microorganismos patógenos que se utilizaron para este ensayo fueron: *S. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y STEC. Las bacterias patógenas fueron inoculadas en caldo soya tripticaseína (CST) a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se realizaron diluciones hasta 10⁻³, de esta última dilución se tomó 1 mL y se colocó en una caja de Petri, se adicionó AME con rifampicina (AME-R), se homogeneizó y dejó solidificar, posteriormente se realizaron de 5 a 6 pozos por cada caja de aproximadamente 5 mm de diámetro.

En cada pozo se añadieron 50 µL de cada una de las bacterias lácticas previamente cultivadas en caldo MRS por 48 h a 37°C, se dejó secar y difundir por 2 h y después se incubaron a 37

°C durante 24 h, transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición como se muestra en la Figura 4.

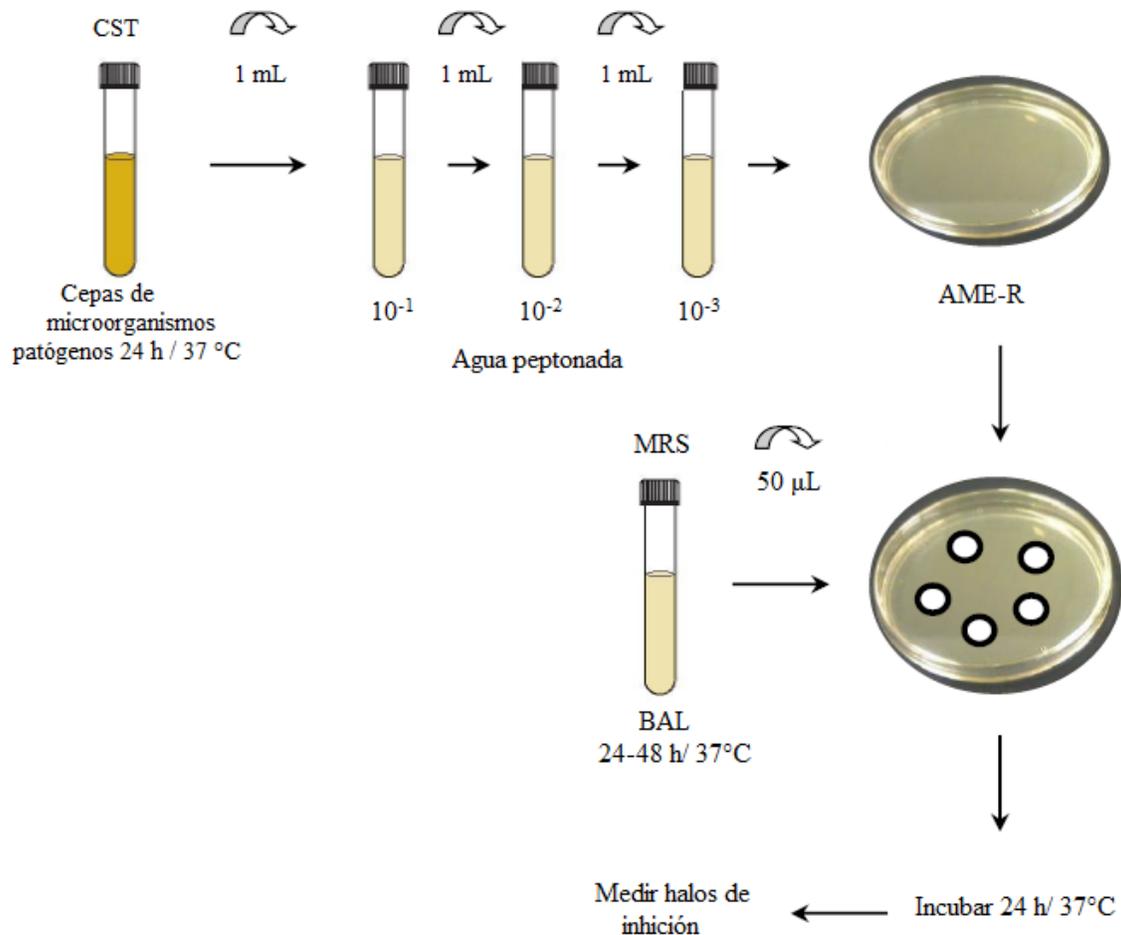


Figura 4. Técnica para determinar actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas frente a patógenos (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014)

5.5.2 Resistencia de BAL a sales biliares in vitro

Para evaluar la resistencia de las cepas a sales biliares, se prepararon tubos de caldo MRS con sales biliares, a una concentración final de 0.15, 0.3, 0.5 y 1 %. Posteriormente los tubos fueron esterilizados a 121°C por 15 min. Se tomaron 100 µL del cultivo directo (previamente activado) de BAL y se inocularon en los tubos de MRS finalmente se incubaron a 37°C durante 48 horas; pasado el tiempo únicamente se observó si existió o no turbidez (Figura 5).

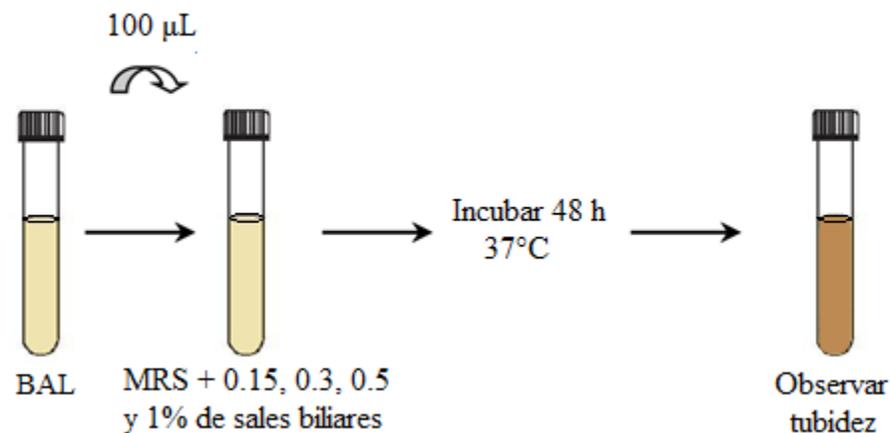


Figura 5. Técnica de resistencia de bacterias ácido lácticas a sales biliares. (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014)

5.5.3 Resistencia de cepas BAL a antibióticos de uso común

Se utilizó la técnica de difusión en disco sobre agar MRS con rifampicina (MRS-R). Se activó la cepa a ensayar se incubó a 37°C por 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se obtuvo un cultivo joven del cual se tomaron 100 μ L, se colocó sobre agar MRS-R solidificado extendiéndose con una varilla de vidrio hasta absorberse por completo, se colocaron discos de papel filtro con sobre la placa y sobre estos, se depositaron 10 μ L de los antibióticos a evaluar, finalmente se incubaron a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición (Figura 6). Los antibióticos utilizados para el ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Antibióticos utilizados para la evaluación de la resistencia de las BAL

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Ampicilina	10
Colistina	10
Estreptomicina	10
Eritromicina	15
Ácido nalidíxico	30
Kanamicina	30
Neomicina	10
Tetraciclina	30
Gentamicina	10
Cloranfenicol	30
Amikacina	30
Ceftriaxon	30
Ciprofloxacina	5

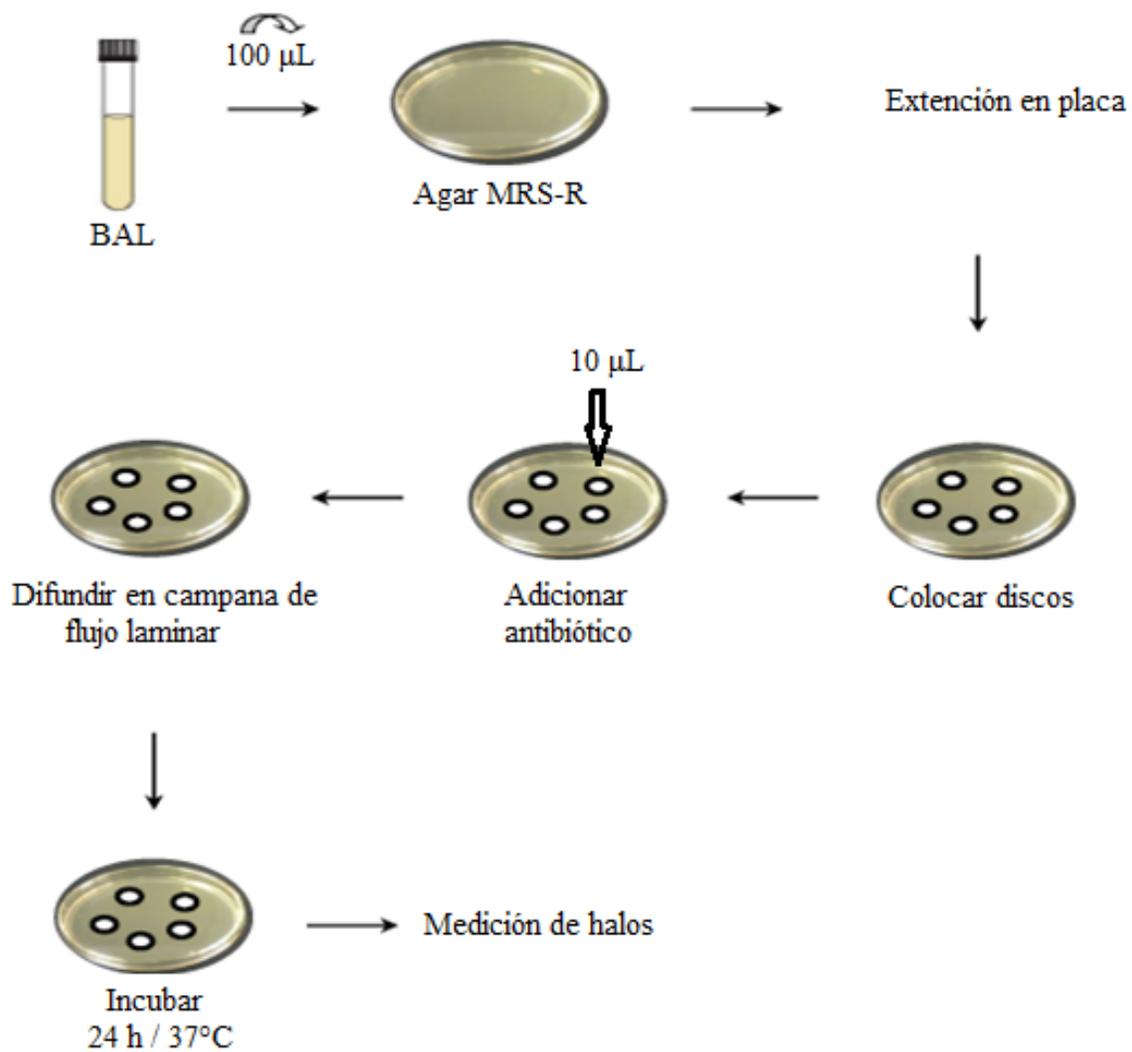


Figura 6. Técnica para la prueba de sensibilidad de bacterias ácido lácticas a antibióticos. (Imagen tomada de Mora Peñaflor, 2014)

Los resultados obtenidos se discutirán de acuerdo a lo establecido en manual Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012. (Tabla 5).

Tabla 5. Puntos de corte de los diferentes antibióticos

Antibiótico	Puntos de corte (mm)		
	S	SI	R
Ácido nalidíxico (Nal)	≥19	14-18	≤13
Amikacina (Amk)	≥17	15-16	≤14
Ampicilina (Amp)	≥17	14-16	≤13
Ceftriaxona (Cro)	≥23	20-22	≤19
Ciprofloxacina (Cip)	≥21	16-20	≤15
Cloranfenicol (Chl)	≥18	13-17	≤12
Colistina (Col)	≥11	-	≤10
Eritromicina (Eri)	≥21	16-20	≤15
Estreptomicina (Str)	≥15	12-14	≤11
Gentamicina (Gen)	≥15	13-14	≤12
Kanamicina (K)	≥18	14-17	≤13
Neomicina (Neo)	≥17	13-16	≤12
Tetraciclina (Tcy)	≥15	12-14	≤11

(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012)

5.6 Determinación de viabilidad de las cepas BAL

Se determinó la viabilidad de las cepas BAL a las 24 y 48 h de incubación por la técnica de conteo en placa, por triplicado de acuerdo al siguiente procedimiento:

Las cepas BAL se incubaron en caldo MRS a 37°C por 24 y 48 h., se prepararon diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10⁻⁹, se colocó 1 mL en la caja Petri de la dilución 10⁻⁶ a la 10⁻⁹, se vertió agar MRS-R en cada una de las cajas, y se incubaron a 37°C por 48 h. Se contaron las colonias y se reportaron los resultados en UFC/mL.

5.7 Determinación de ácido láctico por el método de acidez titulable

Se midió 1 mL de muestra y diluyó agregando 9 mL de agua destilada hasta obtener un volumen de muestra de 10 mL. Se añadió una gota de solución de fenolftaleína al 1% y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persistía de 5 a 30 segundos. Los resultados se reportaron en g/L.

5.8 Marcaje de BAL con fluoresceína

Para observar la adhesión de las cepas BAL en el mucus intestinal, fueron marcadas con DTAF según el método descrito por Sherr y colobaradores con ligeras modificaciones. Las cepas se cultivaron en 30 mL de caldo MRS por 24 horas a 37°C, se centrifugaron a 4000 rpm, 15 min y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS y 250 µL de DTAF (10 mg de DTAF Sigma en 50 mL de PBS). La suspensión fue incubada en baño María a 37°C por 2,0 h y lavada tres veces con buffer fosfato salino (Sherr, Sherr, & Fallon, 1987).

5.9 Preparación de inóculo para la administración en ratones CD-1

Las bacterias *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25 fueron activadas mediante tres traspasos consecutivos en caldo MRS cada 24h. Una vez activadas se tomaron 100 µL del cultivo directo se inocularon en tubos de para centrifuga Corning con 30 mL de caldo MRS, se incubaron por 24 h a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm por 15 min, se decantó el sobre nadante, se realizaron dos lavados con 18 mL de diluyente de peptona, se decantó y el pellet obtenido se resuspendió en 2 mL de buffer fosfato salino. Con a una concentración bacteriana aproximada de 10⁹ UFC/mL

5.10 Resistencia de cepas BAL al paso por TGI en ratones

Para evaluar la adherencia bacteriana a la mucosa intestinal, se utilizaron 4 grupos de ocho de ratones por grupo, fueron mantenidos bajos condiciones de temperatura controlada (22°C ± 2) con un ciclo de 12 h de luz/obscuridad con dieta estándar y agua a libertad. A cada roedor se le administró una dosis diaria de 10⁹ UFC/mL de BAL en un volumen 200 µL usando como vehículo buffer fosfato salino estéril por 10 días consecutivos, la inoculación se llevó a cabo vía oral (con ayuda de una sonda intragástrica). De manera diaria los roedores fueron evaluados físicamente para detectar cualquier anomalía de acuerdo a lo reportado por. Kotzamanidis y colacoradores, parámetros descritos en la Tabla 6 (Kotzamanidis, Kourelis, Litopoulou-Tzanetaki, Tzanetakis, & Yiangou, 2010).

Tabla 6. Parámetros que permiten evaluar el estado del bienestar de los animales y valores semicuantitativos atribuidos

Aspecto general de salud	Puntuación
Ratón presenta ojos brillantes y alerta, tiene una capa lisa con brillo, responde a los estímulos, muestra interés en su entorno	5
Piel ligeramente erguida, pérdida de brillo al pelaje, el ratón se mantiene alerta y activo	4
Piel notablemente erguida, ratón no alerta o activos, menos interesados en el medio ambiente exterior	3
Ratón encorvado y letárgico, muestra poco interés en el medio ambiente, piel agrupada	2
Ratón no reactiva a los estímulos, la piel presenta "piloerección", ratón encorvado, prefiere el sueño que reaccionar con el medio ambiente, frío al tacto del ratón, patas frías al tacto	1

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical extrayendo intestino grueso e intestino delgado para determinar la presencia de BAL por medio de análisis microbiológicos. Cabe mencionar que se usaron cuatro diferentes cepas de BAL *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25, esto con la finalidad de averiguar cuál de estas cepas tendría mayor capacidad de adherencia en los intestinos de los roedores.

Para esta primera etapa del experimento la distribución de los grupos experimentales se realizó de la siguiente manera:

1. Dieta estándar suministrada por el bioterio y administración de *L. pentosus*.
2. Dieta estándar suministrada por el bioterio y administración de *Lactobacillus* spp QT17.

3. Dieta estándar suministrada por el bioterio y administración de *Lactobacillus* spp QT19.
4. Dieta estándar suministrada por el bioterio y administración de *Lactobacillus* spp QR25.

5.10.1 Análisis microbiológico de BAL en intestinos de ratones CD-1

Los intestinos de ratón 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 (PSB) 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 la 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 depositó en una caja Petri adicionando agar MRS-R, se homogenizo y se dejó solidificar, por último se incubo por 48 h a 37°C, una vez concluida la incubación se procedió a realizar el conteo para evaluar la resistencia de las bacterias ácido lácticas al paso de tracto gastrointestinal así como su adherencia en intestinos.

5.11 Potencial antagónico de cepas BAL adheridas al intestino de ratones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se procedió a determinar la capacidad antagónica contra bacterias patógenas de solo aquellas dos cepas de BAL que tuvieron mayor adherencia. Para esto, se usó las mismas condiciones del experimento anterior, administrando la misma dosis de BAL por un periodo de 7 días y las bacterias patógenas se administraron en el día 8 con una dosis única de las bacterias STEC (Shua & Gill, 2001) o *S. Typhimurium*, (Gill, Shu, Lin, Rutherford, & Cross, 2001) por vía oral (sonda intragástrica) en una concentración de 10^7 UFC/mL. Después de la administración de las bacterias patógenas, se continuó administrando BAL por 7 días más. Se monitoreo diariamente el estado general de los ratones así como la aparición de signos de enfermedad como: letargo, pérdida de peso, diarrea y cambios en la locomoción como signos de infección en los ratones. Al día 15 de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo

el intestino grueso, intestino delgado, bazo e hígado, se determinaron los daños o lesiones en los órganos así como la presencia de las bacterias patógenas y bacterias ácido lácticas.

La distribución de los grupos experimentales se realizará de la siguiente manera:

1. Dieta estándar suministrada por el bioterio y administración de patógeno (STEC o *S. Typhimurium*)
2. Dieta estándar suministrada por el bioterio, administración de BAL con mayor capacidad de adherencia (*L. pentosus* o *Lactobacillus* spp QT19) y administración de patógeno (STEC o *S. Typhimurium*)
3. Dieta estándar suministrada por el bioterio, administración de BAL con mayor capacidad de adherencia (*L. pentosus* o *Lactobacillus* spp QT19).

5.11.1 Análisis microbiológico del potencial antagónico de cepas BAL adheridas en intestinos de ratones CD-1

Los intestinos, el hígado y bazo del ratón se extrajeron en condiciones de esterilidad, cada uno fue colocado en una caja Petri estéril, posteriormente los intestinos fueron lavados con Buffer Fosfato Salino (PSB) para eliminar el contenido intestinal y una vez que estuvieron libre de dicho contenido, se procedió a realizar diluciones decimales de cada una de las muestras transfiriendo 1 mL de la muestras a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de diluyente de peptona hasta llegar a la dilución 10^{-6} , esto para el caso de los intestinos. Para el hígado y bazo únicamente se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . De cada una de las diluciones se tomó 1 mL el cual se depositó en una caja Petri adicionando agar MRS con rifampicina, esto para la determinación de bacterias ácido lácticas en intestinos y para la determinación de STEC o *S. Typhimurium* se añadió agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB) y agar Verde Brillante (BGA) según el caso, se homogenizo y se dejó solidificar, por último se incubo por 24 h a 37°C, posteriormente se realizó en conteo para evaluar la translocación de patógenos

5.12 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico mediante una ANOVA usando la prueba de Tukey utilizando el software estadístico SPSS, con un nivel de significancia $P < 0.05$. Los datos se graficaron el programa SigmaPlot 12.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto inhibitorio de BAL frente a diversos patógenos

Diversos estudios han reportado que los probióticos incluyendo los géneros de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, y *Enterococcus* entre otros, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas principalmente de aquellas que están directamente relacionadas con enfermedades gastrointestinales como *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*, este efecto se puede atribuir a diversos mecanismos entre los que destacan la producción de sustancias inhibitorias como peróxido de hidrógeno, ácido láctico y bacteriocinas (Hernández Ramírez, 2009).

Este mismo efecto de inhibición se pudo comprobar en el presente trabajo al evaluar la capacidad antimicrobiana de los cultivos de las BAL en medio MRS contra cepas patógenas de STEC, *S. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En la Tabla 7 se observa, que las cepas de bacterias lácticas mostraron halos de inhibición mayores a 10 mm, lo que evidencia su capacidad de inhibir bacterias patógenas. La actividad antimicrobiana de los probióticos de manera general, demuestra la capacidad que tienen los cultivos probióticos de eliminar y competir contra ciertos patógenos intestinales, por tal motivo es que se han considerado como coadyuvantes en tratamientos contra enfermedades causadas por dichos patógenos representando un gran potencial para la industria alimentaria (Ogawa *et al.*, 2001).

La capacidad de las cepas para inhibir la presencia de diversos patógenos se realizó mediante la técnica de difusión en pozos realizando un ajuste en el pH de los sobrenadantes a 6.5 con NaOH, para determinar el tipo de compuesto involucrado en la actividad, y descartar el efecto inhibitorio atribuido a la producción de alguna bacteriocina, debido a que no se presentó algún tipo de inhibición del sobrenadante frente a los diversos patógenos, se asume que la actividad antimicrobiana es debida principalmente a la producción de ácidos orgánicos especialmente ácido láctico, producidos por las BAL en el proceso de fermentación de carbohidratos y algunos otros compuesto como aldehídos y peróxidos. El ácido láctico no solo exhibe capacidad para interferir en la estabilidad de la membrana externa de la bacterias Gram negativas sino que permite que otras moléculas lipofílicas o de alto peso molecular,

puedan permear esta barrera biológica y ejercer su efecto bactericida o bacteriostático aun en bajas concentraciones (Alakomi *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2001).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de cepas BAL frente a cepas patógenas.

<i>Lactobacillus</i>	Halo de inhibición (mm)			
	STEC	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>pentosus</i>	13.0±1.1	13.25±0.3	13.38±1.3	11.30±0.4
QT17	12.75±1.0	12.95±0.7	14.10±0.7	12.25±0.5
QT19	15.38±2.1	15.25±0.7	14.72±0.4	17.08±0.8
QR25	11.43 ¹ ± 0.4 ²	11.38±0.4	11.80±1.0	10.67±2.1

¹ Promedio de triplicado, ² Desviación estándar

El pH final del medio en el que se desarrollan las BAL tiene gran influencia en la actividad inhibitoria mostrada, toda vez que es la forma no disociada del ácido orgánico la que posee actividad antimicrobiana. Por tal motivo se requiere que el pH final del medio sea menor que el pKa del ácido para tener mayor proporción en forma no disociada y por tanto activa. Cuando alcanzan su pKa, los ácidos pueden difundir pasivamente a través de la membrana celular y pasar al citoplasma disociándose en protones y aniones, para los que la membrana es impermeable. Esto origina una disminución del pH interno que afecta a la fuerza protón motriz utilizada para numerosos procesos de transporte transmembrana; además, también disminuye la actividad de enzimas sensibles y daña a proteínas y ADN (Alvarado Orozco. 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo superan a los reportados por Leite *et al.* (2015), quienes reportaron halos de inhibición de 1 a 5 mm con las cepas *Lactibacillus paracasei* subp. MRS59 contra la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 1531. Algo similar ocurrió en lo reportado por Zhang *et al.* (2010), quienes reportaron halos de inhibición entre 2 a 7 mm de diámetro utilizando las cepas de *Lactibacillus paracasei* subp. M5-L, *L. rhamnosus* J10-L y *L. casei* Q8-L contra cepas de *E. Coli* y *S.*

Typhimurium. Trabajos como el de Roldána *et al.* (2011), muestra la actividad inhibitoria de *Lactobacillus* spp contra *E. coli* O157:H7 también Murry *et al.* (2004), lograron determinar la actividad inhibitoria de cepas bacterias ácido lácticas contra algunos microorganismos patógenos como *E. coli*, *S. Typhimurium* y *C. perfringes*, aunque ellos desconocen el metabolismo responsable de dicha actividad.

En lo que respecta a la actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas, sobre todo bacterias pertenecientes al género de *Lactobacillus* frente a *Escherichia coli*, Duran *et al.* (2000) hallaron halos de inhibición entre 7 y 7.75 mm de diámetro, estos valores son inferiores a los reportados en el presente estudio. La resistencia que presentó *Escherichia coli* podría atribuirse principalmente a que se trata de una bacteria Gram negativa, presentando una envoltura celular, compuesta por una membrana citoplasmática, una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Los lactobacilos son cepas heterofermentativas y producen cantidades variables de los isómeros D y L de ácido láctico (Fox *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la actividad del isómero L ejerce un mayor poder antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7 que el isómero D y que su modo de acción no se limita a disminuir el pH intracelular del patógeno, sino que actuaría interfiriendo su metabolismo en forma específica (Leitch & Stewart, 2002).

Se ha postulado que algunas cepas BAL producen también H₂O₂ sin embargo Rodríguez *et al.* (1997) demostraron que dicho compuesto no es estable en MRS , medio seleccionado para la producción de los extractos empleados en el presente estudio, por lo que en caso de haberse producido no se observó su efecto.

El uso de cultivos seleccionados en la elaboración de productos lácteos fermentados ha despertado gran interés en la industria alimentaria debido a que no sólo influyen en las características nutricionales del producto sino también en su calidad microbiológica (Valenzuela *et al.*, 2008). Este nuevo concepto denominado biopreservación (Stiles, 1996), para diferenciarlo de la preservación química de alimentos, ha inducido a investigar características metabólicas de microorganismos que potencialmente se puedan utilizar en productos destinados al consumo humano o animal (Murry *et al.*, 2004).

6.2 Resistencia de BAL a sales biliares

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecieron en 2002 criterios de selección de microorganismos probióticos en el “Informe del grupo de trabajo sobre la redacción de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos” (FAO/WHO, 2002). Uno de los criterios de selección *in vitro* es la resistencia a la acidez y a las sales biliares del intestino delgado (Cueto, Acuña, & Valenzuela, 2010).

Las concentraciones de sales biliares utilizadas comúnmente en estudios de selección de cepas resistentes se sitúan entre 0.1 y 1 % (Kingsley & Koyama, 2007). Con la finalidad de comprobar la resistencia de las bacterias ácido lácticas a las sales biliares, se realizó un ensayo exponiendo las cepas de *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, QT19 y QR25 a diferentes concentraciones de sales biliares. En éste estudio se utilizaron concentraciones de 0.15, 0.3, 0.5 y 1% de sales biliares. Todas las cepas ensayadas superaron esta barrera, ya que en las diferentes concentraciones ensayadas presentaron turbidez como evidencia del crecimiento.

Este crecimiento de bacterias ácido lácticas también ha sido reportado por autores como (Pennacchia *et al.*, 2004; Vinderola & Reinheimer, 2003), también resultados similares han sido obtenidos por Shukla *et al.* (2010) quienes evaluaron la resistencia a sales biliares de varias cepas de *Lactobacillus* por 3h de incubación a diversas concentraciones de sales biliares, encontrando que la cepa no disminuyó su población. Con estos resultados se demuestra que estas cepas pudieran ser capaces de desconjugar las sales biliares. Se ha comprobado que las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación pudiera ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por producción de gran cantidad de ácidos orgánicos (Rondón *et al.*, 2008).

Las primeras 4 h de exposición a las condiciones del tracto gastrointestinal son críticas para la sobrevivencia de *Lactobacillus* spp. tanto en el estómago como en el intestino. El proceso de digestión involucra tiempos largos de residencia que pueden afectar la viabilidad de las

células. Desde que un alimento es consumido hasta que es liberado del estómago transcurren 90 min (Rondón *et al.*, 2008), durante el cual las bacterias se encuentran sometidas a pH ácido, pasado este tiempo se encuentra nuevamente ante una condición de estrés, las sales biliares, cuya concentración disminuye después de la primera hora hasta la cuarta hora de digestión, en este ensayo se encontró que las bacterias pueden sobrevivir las condiciones de estrés generadas por las sales biliares, esta sobrevivencia podría permitir a los lactobacilos adherirse y colonizar el intestino.

6.3 Sensibilidad a antibióticos

La capacidad que manifiestan determinadas cepas bacterianas de ser resistentes a los antibióticos, es un criterio determinante y restrictivo para su elección como posibles probióticos. En recientes investigaciones, se ha afirmado que las bacterias comensales incluyendo BAL pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos similares a los encontrados en patógenos humanos y así fungir como adyuvante en los tratamientos de infecciones gastrointestinales (Cueto *et al.*, 2010).

A las 4 cepas (*L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25) se les evaluó la sensibilidad a 13 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, estreptomycin, 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 8.

Tabla 8. Halos de inhibición obtenidos al exponer cepas BAL a antibióticos de uso común

Antibiótico	Halo de inhibición (mm)			
	<i>L. pentosus</i>	<i>L. spp</i> QT17	<i>L. spp</i> QT19	<i>L. spp</i> QR25
Ácido nalidíxico (Nal)	0	0	0	0
Amikacina (Amk)	0	29.42 ± 1.23	9.50 ± 0.86	8.5 ± 1.32
Ampicilina (Amp)	28.80 ¹ ± 1.49 ²	30.33 ± 1.26	26.83 ± 1.04	27.66 ± 1.52
Ceftriaxona (Cro)	14.40 ± 1.21	10.25 ± 0.43	14.16 ± 1.25	11.40 ± 1.35
Ciprofloxacina (Cip)	11.90 ± 2.47	10.33 ± 1.60	21.50 ± 1.50	23.50 ± 2.78
Cloranfenicol (Chl)	40.56 ± 0.90	34.66 ± 2.02	36.73 ± 1.96	36.90 ± 1.01
Colistina (Col)	0	0	12.33 ± 2.51	0
Eritromicina (Eri)	38.23 ± 2.73	25.50 ± 1.32	23.83 ± 2.75	23.50 ± 3.12
Estreptomycin (Str)	10.50 ± 0.50	13.00 ± 2.00	15.83 ± 2.25	11.33 ± 1.52
Gentamicina (Gen)	9.50 ± 0.50	9.33 ± 0.57	9.33 ± 0.76	0
Kanamicina (K)	9.00 ± 0	11.00 ± 0	9.66 ± 2.02	10.41 ± 0.80
Neomicina (Neo)	14.40 ± 3.43	8.66 ± 0.57	9.16 ± 0.29	6.50 ± 0.50
Tetraciclina (Tcy)	26.66 ± 1.52	29.33 ± 1.04	28.90 ± 1.21	30.56 ± 1.50

¹ Promedio de triplicado, ² Desviación estándar

De acuerdo con el manual Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2012) los resultados se clasificaron en tres niveles: Sensibles (S), Sensibilidad Intermedia (SI), y Resistentes (R) establecido de esta manera los porcentajes de resistencia de cada una de las cepas (Tabla 9).

Tabla 9. Resistencia a antibióticos presentada por cepas BAL

Antibiótico	Cepas			
	<i>L. pentosus</i>	<i>L. spp</i> QT17	<i>L. spp</i> QT19	<i>L. spp</i> QR25
Ácido nalidíxico (Nal)	R	R	R	R
Amikacina (Amk)	R	S	R	R
Ampicilina (Amp)	S	S	S	S
Ceftriaxona (Cro)	R	R	R	R
Ciprofloxacina (Cip)	R	R	S	S
Cloranfenicol (Chl)	S	S	S	S
Colistina (Col)	R	R	S	R
Eritromicina (Eri)	S	S	S	S
Estreptomina (Str)	R	SI	S	SI
Gentamicina (Gen)	R	R	R	R
Kanamicina (K)	R	R	R	R
Neomicina (Neo)	SI	R	R	R
Tetraciclina (Tcy)	S	S	S	S
Porcentaje de Resistencia	61.53%	53.85 %	46.15%	53.85%

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

Como se observa en la Tabla 9 las cepas lactobacilos fueron resistente a más del 50% de los antibióticos ensayados considerándolas como cepas con potencial probiótico, es importante mencionar que la cepa *L. spp* QT19 obtuvo un porcentaje menor resistencia, esto no significa que no presente actividad probiótica. Por tal motivo las cuatro cepas seguirán siendo evaluadas en las demás pruebas.

Las cuatro cepas de BAL estudiadas fueron sensibles al β -lactámico (ampicilina) y aminoglucidos como el cloranfenicol (Figura 9). Estos resultados coinciden con las publicaciones de Martín *et al.* (2009) y Rodríguez *et al.* (2009).

Estudios llevados a cabo por Coppola *et al.* (2005); Danielsen & Wind, (2003), con respecto a los inhibidores de la síntesis de pared celular, señalan que los lactobacilos son frecuentemente sensibles a la ampicilina perteneciente al grupo de las Penicilinas A, tal y como se muestra en la Tabla 9, donde las cuatro cepas ensayados mostraron sensibilidad a este antibiótico.

Las BAL estudiadas por Mejía Rodríguez *et al.*, (2007), fueron sensibles a 0.5 μ g de ampicilina con halos entre 12 y 30 mm. En los resultados obtenidos por Cueto *et al.*, (2010) todas las BAL fueron susceptibles a 10 μ g/mL de ampicilina con halos de inhibición entre 17 y 38.5 mm. Mientras que en el presente trabajo las cuatro BAL estudiadas presentaron sensibilidad al mismo antibiótico, mostrando halos entre 26.83 y 30.33 mm.

Las cepas ensayadas presentaron sensibilidad a la eritromicina, esto puede atribuirse a que las BAL al ser expuestas a éste antibiótico detienen la síntesis de proteínas (mecanismo de acción de dicho antibiótico) pero no a la de ácidos nucleicos, con lo cual el efecto conseguido es bacteriostático al inhibirse la multiplicación bacteriana (Yunis, 1989).

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias grampositivas y gramnegativas. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesario su difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos, en todos los casos se requiere de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Una vez en el interior de la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas, impidiendo el acceso del aminoacil RNAt al sitio aceptor del complejo RNAm-ribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Rodríguez *et al.*, 1998). Mora Peñaflor, (2014) expuso la cepa QT20, a las mismas condiciones y concentraciones de antibiótico, obteniendo resultados muy cercanos a los obtenidos en el presente trabajo, lo mismo ocurrió con las demás cepas expuestas QT19, QT17 y QR25.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido que es transportado de forma activa a través de la membrana bacteriana, se une irreversiblemente a una o más proteínas receptoras específicas de los ribosomas bacterianos e interfiriendo de manera que el ADN puede leerse de forma errónea, lo que da lugar a la producción de proteínas no funcionales; los polirribosomas se separan y no son capaces de sintetizar proteínas. Esto da lugar a un transporte acelerado de aminoglucósidos, con lo que aumenta la ruptura de las membranas citoplasmáticas de las bacterias y la consiguiente muerte celular (Cano, 2012). En el presente trabajo todas las cepas expuestas a este antibiótico mostraron resistencia, atribuyéndose a la ausencia de transporte de electrones mediado por citocromo, estableciendo que esta resistencia es de carácter intrínseco, tal y como lo describe Mora Peñaflor (2014). Se sugiere que *Lactobacillus* tiene resistencia a aminoglucósidos debido a la impermeabilidad de la membrana (Rodríguez *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con lo reportado por Amorocho Cruz, (2011) donde las cepas de las especies *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*. presentaron resistencia a gentamicina.

L. spp QT19 y *L. spp* QR25 fueron sensibles a la fluoroquinolona ciprofloxacino, mientras que las cepas *L. spp* QT17 y *L. pentosus* presentaron resistencia. Se considera, que la resistencia a fluoroquinolona en bacterias Gram positivas está asociada a mutaciones en el QRDR de *gyrA* y *parC* (Fukao *et al.*, 2009).

Algunas cepas han presentado multi-resistencia. Es importante realizar otras pruebas que comprueben dicha multi-resistencia y verificar si es codificada en el cromosoma o en los plásmidos, con el fin de evitar transmitir dicha resistencia a otras bacterias próximas.

6.4 Determinación de viabilidad de las cepas BAL

Se determinó la viabilidad de las cepas BAL en caldo MRS, en la Figura 7 se muestra el perfil de crecimiento de las cepas encontrando un mayor crecimiento celular a las 24 h de incubación, para el caso de *Lactobacillus. pentosus* se obtuvo un crecimiento de 10.88 log UFC/mL a ese tiempo de incubación, posterior a las 24 h de incubación se observó una disminución del conteo celular. Aunque no existió diferencia significativa entre el crecimiento bacteriano de las cepas *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25 a las 24 h o a las 48 h se tomó como tiempo óptimo de crecimiento a las 24 h, esto con la finalidad de optimizar tiempos.

En el presente trabajo se encontró mayor crecimiento de las cepas BAL a las 24 h, esto puede atribuirse al ciclo de crecimiento que las bacterias llevan a cabo el cual se divide en cuatro fases: Primera etapa. Lag o de adaptación, los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial. Según Agudelo *et al.* (2010) describen que el tiempo de adaptación para *L. plantarum* es de 1.98 h por lo que en este punto el crecimiento bacteriano será casi nulo. Segunda etapa. Exponencial o logarítmica la velocidad de crecimiento es máxima, es aquí es donde las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima, en el caso de las BAL se da una fermentación de carbohidratos por tanto existe un agotamiento sucesivo de la fuente de carbono, la fuente de carbono en el medio de cultivo es de vital importancia para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (Sánchez Minutti, 2011), en el mismo estudio realizado por Agudelo *et al.* (2010) mencionan que los lactobacilos en las primeras 12 horas, consumen alrededor del 77% de los azúcares totales disponibles, esto debido a la reproducción bacteriana que se lleva a cabo en este tiempo.

Tercera etapa. Fase estacionaria no se incrementa el número de bacterias, las células desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios sobre todo ácido láctico, a veces algunos ácidos volátiles como ácido acético, propiónico, butírico entre otros en el caso de las BAL, se estima que hasta las 36 horas se lleva a cabo esta fase quedando solo el 3.2% de azúcar total disponible (Agudelo *et al.*, 2010).

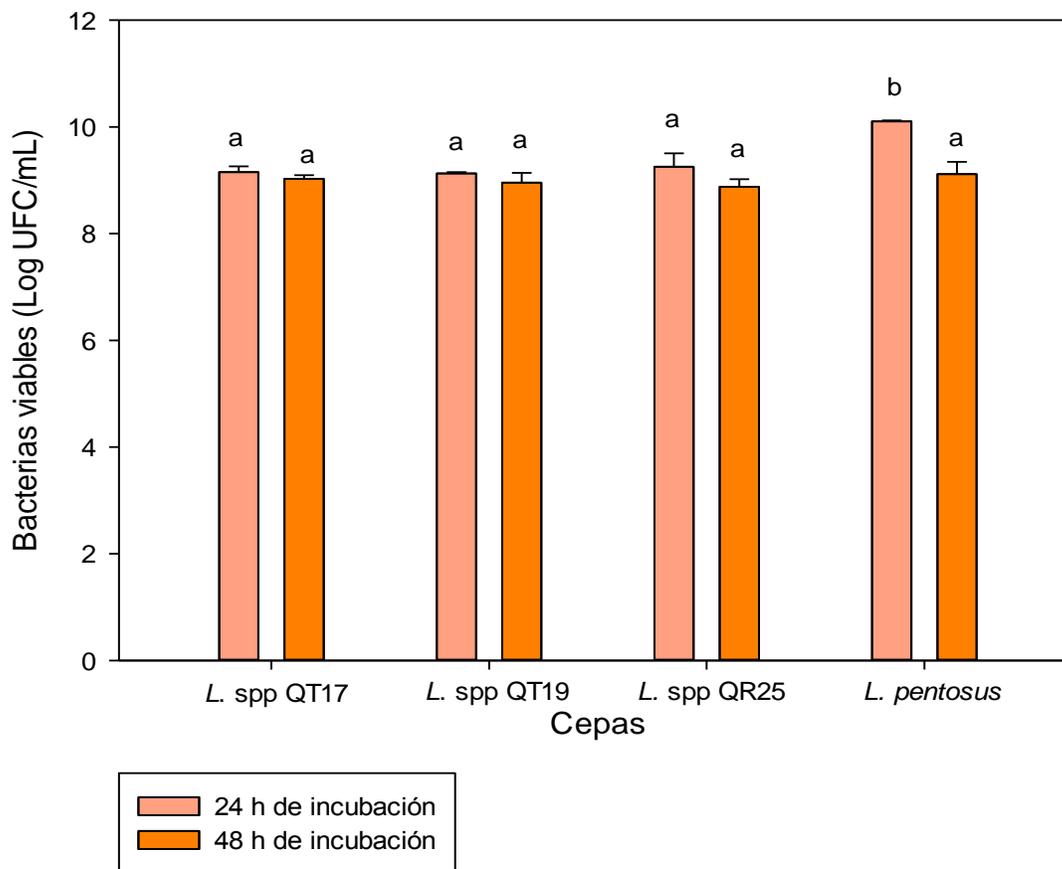


Figura 7. Crecimiento bacteriano en función del tiempo

Cuarta etapa. Fase de muerte en donde se reduce el número de bacterias viables del cultivo por la falta de nutrientes disponibles en el medio, cabe destacar que *L. plantarum* A6, una vez agotada la fuente energética, es capaz de aprovechar otros nutrientes como proteínas y grasas presentes en el medio (Samaniego & Sosa, 2000), por lo que se recomienda que la fermentación no sea prolongada más allá de las 48 horas en donde se ha agotado prácticamente todo el sustrato. Debido a lo anterior es que después de las 48 h de incubación comienza a decrecer la viabilidad de las células, ya que no existen los nutrientes necesarios para continuar desarrollándose, tal y como se muestra en la Figura 7.

El crecimiento de *Lactobacillus. pentosus* fue de 10.88 log UFC/mL en el presente trabajo mientras que Pimentel *et al.* (2013) hallaron un crecimiento de 10.01 Log UFC/mL utilizando como medio de crecimiento el caldo MRS en un tiempo de 24 h.

Macedo *et al.* (2002) han reportado la utilización de suero permeado desproteínizado enriquecido con extracto de levadura, aminoácidos, vitaminas y sales, para el crecimiento de

L. rhamnosus RW-9595M, y encontraron una viabilidad de 10.3 Log UFC/mL en un tiempo de fermentación 32 h. Estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo, sin embargo para esta investigación el medio de crecimiento fue caldo MSR.

6.5 Determinación de ácido láctico por el método de acidez titulable

Se determinó la acidez como cantidad de ácidos producidos por las cuatro cepas BAL seleccionadas: *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25. La evaluación se llevó a cabo de acuerdo al método de la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994.

Los principales mecanismo por los cuales las bacterias lácticas reprimen a sus competidores es por la formación de ácido láctico, ácido acético y bacteriocinas. Debido a ello es importante determinar el tiempo en el que se tiene mayor crecimiento bacteriano, así como la mejor producción de ácidos.

Como se muestra en la Figura 8 la mayor concentración de acidez generada, se encuentra a las 24 h, esto se relaciona con el crecimiento bacteriano, es decir a medida que este aumenta, existe una mayor generación de ácidos, este comportamiento indica una producción de metabolitos generados por el microorganismo, podría ser la proporción de ácido láctico y otros compuestos que acidificaron el medio. El tiempo en el que se logra una concentración máxima de ácidos en el medio coincide con el máximo valor de recuento celular expresado en la Figura 7.

Puede apreciarse en la Figura 8 que la producción de ácidos por la cepa *L. pentosus* fue 2.24 g/L a las 24 h de crecimiento, mientras que Alvarado Orozco, (2007) reportan una producción de 1.7 g/L de ácidos para *Lb. Plantarum* CC10, lo cual indica que la producción de ácidos por *L. pentosus* es superior que lo descrito por dicho autor, la diferencia en los resultados anteriores puede atribuirse a la variación de las condiciones en las que fueron inoculadas las cepas, ya que dichos autores suplementó el medio de cultivo con almidón/glucosa/fructosa, mientras que en el presente estudio se empleó el medio selectivo para bacterias ácido lácticas, caldo MRS.

Cabe mencionar que la información que nos proporcionan, dichos resultados son útiles para determinar las condiciones óptimas en las que las BAL alcanzan un punto máximo en cuanto a la producción de ácidos.

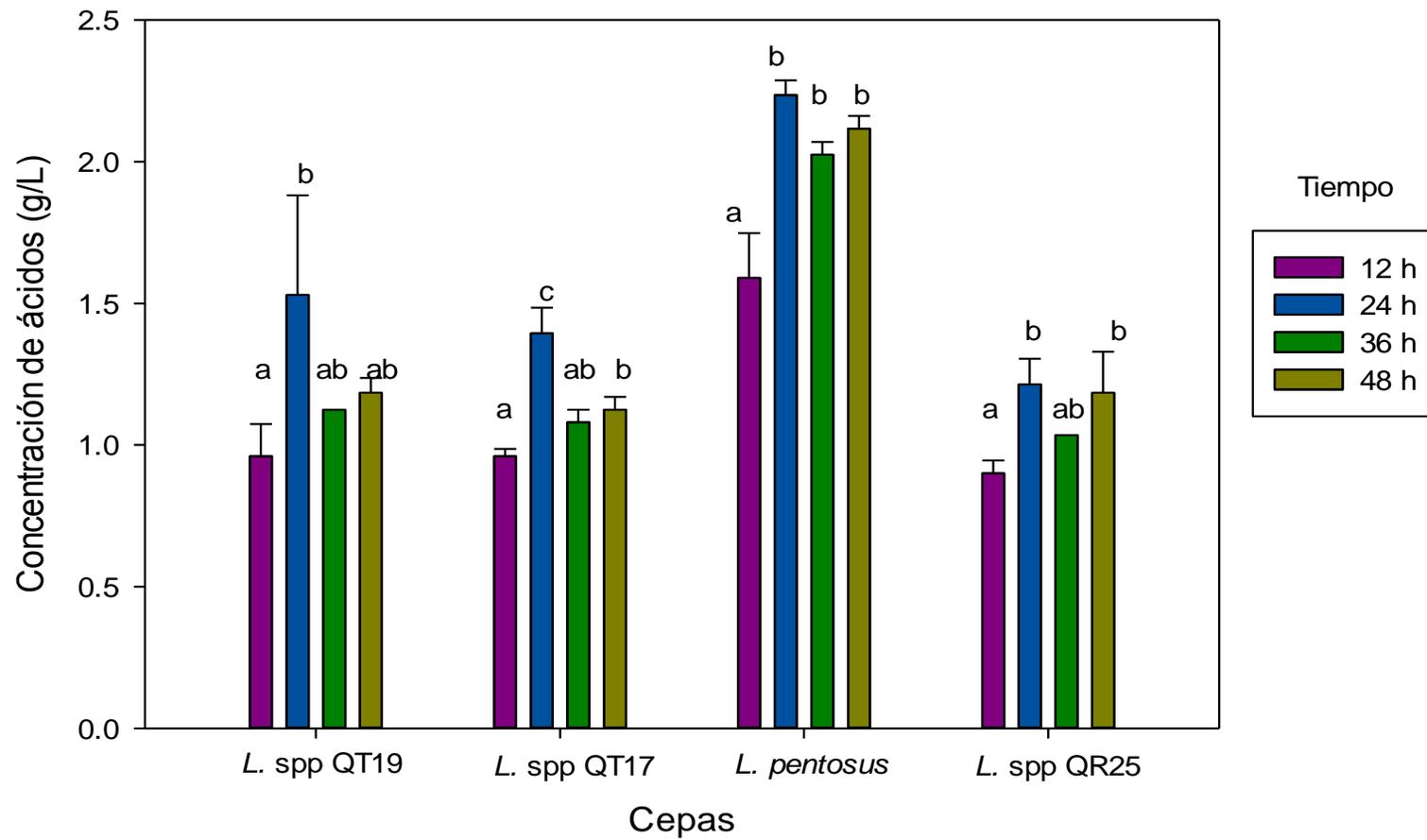


Figura 8. Producción de ácidos por BAL

La primera determinación realizada (12 horas), coincide con la fase de adaptación del microorganismo, por tanto existe una concentración de ácido láctico baja; esto es similar con lo reportado por Lee (2003).

A las 24 h se encontraron concentraciones de ácidos para las diferentes cepas que comprendían desde 1.32 g/L hasta 2.23 g/L, Cueto *et al.* (2010) determinaron que *L. fermentum* 72, presentó la mayor concentración de ácido láctico $1,0 \pm 0,08$ g/l. De la misma forma Adesokan *et al.* (2009), obtuvieron una producción entre $0,65 \pm 0,4$ a $1,35 \pm 0,04$ g/l de ácido láctico de *Lactobacillus* spp., cultivados en medios enriquecidos. Cabe mencionar que en ambos estudios se determinó específicamente ácido láctico por la técnica de HPLC, mientras que en el presente estudio se determinó la cantidad de ácidos producidos por medio de titulación, a estos hechos se podrían atribuir la mayor concentración de ácidos obtenidos en este trabajo.

Es de vital importancia determinar la concentración de ácidos producidos por las BAL en estudio, ya que esto nos determinará el efecto de inhibición que tengan frente a los patógenos a los que se expondrán en las condiciones *in vivo* sobre todo frente a *Salmonella* y *E. coli*.

Tal es el caso de Wilson *et al.* (2005) quienes indicaron que *Salmonella enteritidis* resultó sensible a la actividad bactericida de ácido láctico producido por cepas probióticas como *L. acidophilus*. De la misma forma Amochoro Cruz (2011) determino que, *L. acidophilus* (9O3), *L. paracasei paracasei* (1O10), *L. pentosus* (2O7), *L. plantarum* (Q2, Q3) y *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (1O3) mostraron buenos resultados de inhibición sobre las cepas de *Salmonella*.

6.6 Evaluación del efecto de la administración de las cepas BAL en el bienestar de ratones CD-1

Se evaluó el efecto de la administración de las cepas *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.10, podemos destacar que no se observaron efectos negativos en el comportamiento ni en el bienestar de los ratones CD-1 de 6 a 7 semanas (machos), a lo largo de todo el estudio realizado, esta evaluación se realizó con la finalidad de establecer la posible toxicidad aguda, derivada del consumo de las BAL.

Siguiendo la clasificación indicada en la Tabla 6, se consideró que los parámetros: peso, comportamiento y respuesta al estímulo, fueran normales en todos los animales, por tanto el valor final del estudio fue de cinco, demostrando que los animales no presentaron cambios físicos durante el tiempo que fueron administrados con las BAL, tal y como se aprecia en la Figura 9 y Figura 10.

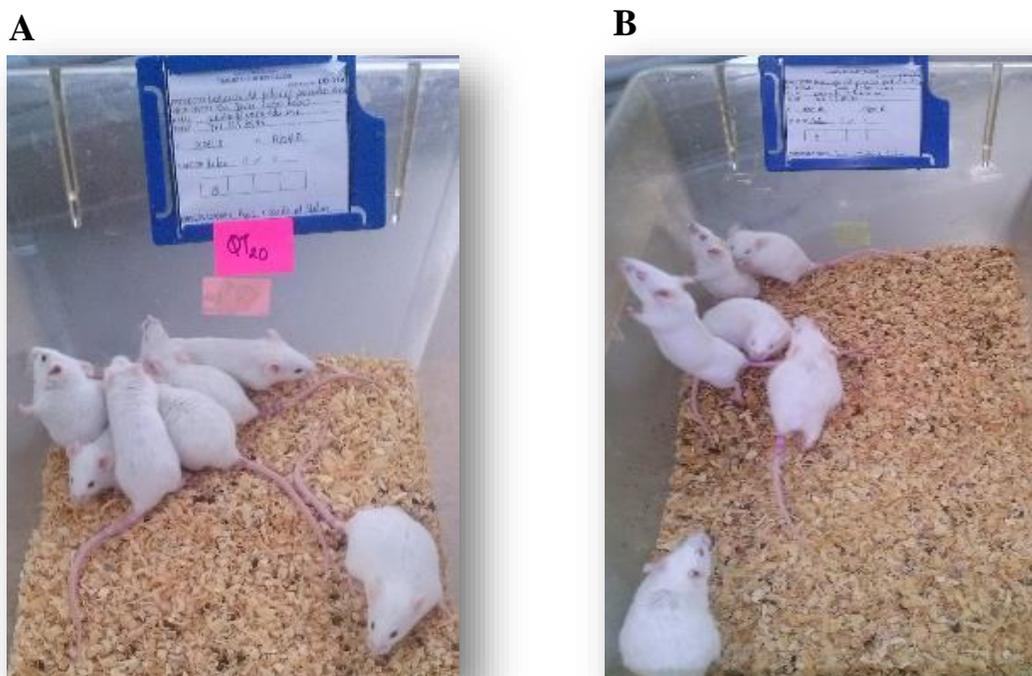


Figura 9. Ratones empleados en los ensayos de adherencia de BAL. A) Ratones administrados con la cepa *L. pentosus*; B) Ratones administrados con la cepa *Lactobacillus* spp QT17.



Figura 10. Ratones empleados en los ensayos de adherencia de BAL. C) Ratones administrados con la cepa *Lactobacillus* spp QT19; D) Ratones administrados con la cepa *Lactobacillus* spp QR25.

Es importante mencionar que los ratones administrados con las bacterias ácido lácticas, a lo largo del experimento no presentaron trastornos gastrointestinales como diarrea, inflamación abdominal o estreñimiento síntomas evidentes de enfermedad a causa de la administración de BAL.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este apartado se puede decir que el consumo de estas BAL no causa efectos secundarios en el bienestar de los roedores, por tanto estas bacterias podrían ser administradas por humanos, aunque sería importante realizar un experimento previo para determinar que efectivamente el consumo de estos probióticos, no presentan efectos secundarios al ser ingeridos.

6.7 Adhesión de cepas BAL in vivo

Para poder determinar la adhesión de BAL al intestino de ratón, se tomó el intestino completo desde el estómago hasta el colon (Figura 11 A) en condiciones estériles (Figura 11 B), eliminando la mayoría del contenido intestinal.

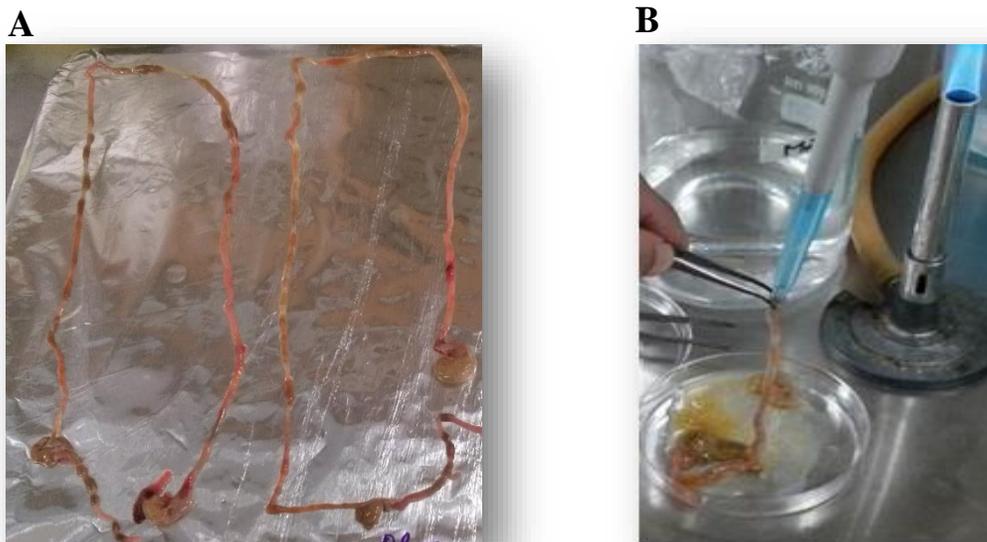


Figura 11. A) Tracto gastrointestinal completo de ratón; B) Lavado de intestinos de ratón

La adhesión bacteriana a las células intestinales es considerada uno de los criterios más importantes para la selección de cepas probióticas. La adhesión y colonización de bacterias probióticas en el colon es un requerimiento esencial para el beneficio a la salud.

Uno de los principales problemas que se planteó a la hora de estudiar la colonización del intestino por probióticos fue la imposibilidad de diferenciar entre las bacterias ácido lácticas exógenas, administradas en el curso de los tratamientos por vía intragástrica, y las bacterias ácido lácticas endógenas, propias de la microbiota intestinal normal del ratón. Los medios selectivos como Rogosa y similares son útiles para estudiar los lactobacilos indígenas presentes en heces, pero no sirven para enumerar lactobacilos exógenos (Jackson *et al.*, 2002).

Algunos autores han recurrido a la morfología colonial para diferenciar cepas exógenas (Alander *et al.*, 1999); semejante criterio podría ser útil para propósitos cualitativos

(aislamiento de colonias), pero parece excesivamente engorroso para propósitos de cuantificación; incluso, según Jackson *et al.* (2002), la morfología de las colonias no pueden considerarse un indicador fiable de la identidad a nivel de género. Ello obliga a recurrir a técnicas de tipaje molecular como lo describe Satokari *et al.* (2003). Por tal motivo, se planteó la posibilidad de exponer las cepas BAL a rifampicina y de esta manera las bacterias pudieran presentar resistencia a dicho antibiótico, una vez obtenidas las cepas con esta resistencia, se agregó rifampicina al medio de cultivo haciendo el medio aún más selectivo para las cepas exógenas. En este sentido, el desarrollo de esta técnica debe apreciarse como un logro del presente trabajo.

En la Figuras 12 y 13 se muestra la cantidad de bacterias adheridas en el intestino de ratones CD-1, así como las bacterias halladas en la heces fecales, estos valores obtenidos coinciden con lo reportado por Berg, (1998) quien describe que las poblaciones de *Lactobacillus* que pueden cultivarse desde el estómago hasta el intestino grueso en humanos son generalmente pequeñas ($<10^4$ bacterias por mL).

Tras la administración de 10 días consecutivos de BAL (1×10^9 UFC/mL), los resultados mostraron que la presencia de *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17 y *Lactobacillus* spp QT19 fue de aproximadamente 4 log UFC por g de heces, mientras que para cepa *Lactobacillus* spp QR25 solo se lograron detectar aproximadamente 2 log UFC por g de heces. Kucan *et al.* (2012) administraron por 5 días consecutivos *L. planrarium* en una concentración aproximada de 9.5×10^8 y 9.2×10^8 UFC, obteniendo recuentos de *L. planrarium* en heces de aproximadamente 5 log UFC por g de heces, resultados muy semejantes a los reportados en la presente investigación.

Los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de *Lactobacillus* spp QR25 en heces nos dan indicio que fue la que menos logró adaptarse a las condiciones del tracto gastrointestinal, aunque de acuerdo con Alander *et al.* (1999) el estudio de muestras fecales no es suficiente para evaluar la colonización por una cepa probiótica, debiendo examinarse adicionalmente biopsias de la mucosa colónica que pueden ser positivas en ausencia de excreción fecal de la cepa en cuestión. Para ello se determinó la presencia de BAL en intestinos de ratón CD-1.

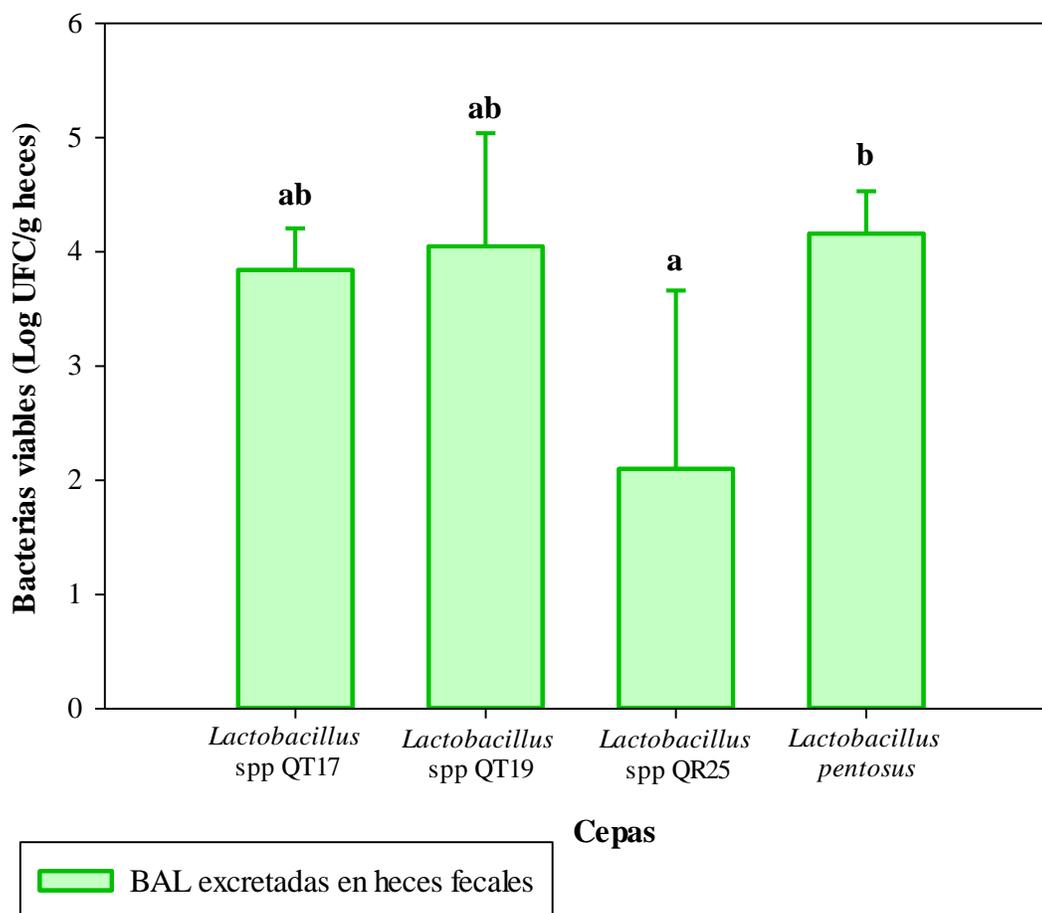


Figura 12. Cantidad de bacterias excretadas en heces fecales. Valores con letras similares no representan diferencia significativa ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey, $n=8$)

De acuerdo a lo descrito por Alander *et al.* (1999), no puede excluirse la posibilidad de que las cepas *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25 persistan durante algún tiempo, proliferando a un ritmo suficiente para mantener una población bacteriana adherida a la mucosa, sin ser detectada por los coprocultivos de rutina.

Es importante tener presente que no hay unanimidad en la definición del término “colonización”. La interpretación de nuestros estudios de colonización intestinal tras la administración intragástrica de *L. pentosus*, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25, es negativa, si se hace de acuerdo con el criterio de Freter (1992): hay colonización intestinal cuando una población bacteriana permanece estable en el tracto gastrointestinal a lo largo del tiempo, sin necesidad de ser reintroducida

periódicamente. Sin embargo, sería positiva si utiliza el criterio, mucho menos restrictivo, de Rönkä *et al.* (2003), para quienes es suficiente que la bacteria sea detectada en coprocultivo después de la ingestión (lo que, simplemente, significa que ha sido capaz de conservar su viabilidad a lo largo de su recorrido por el tractogastrointestinal).

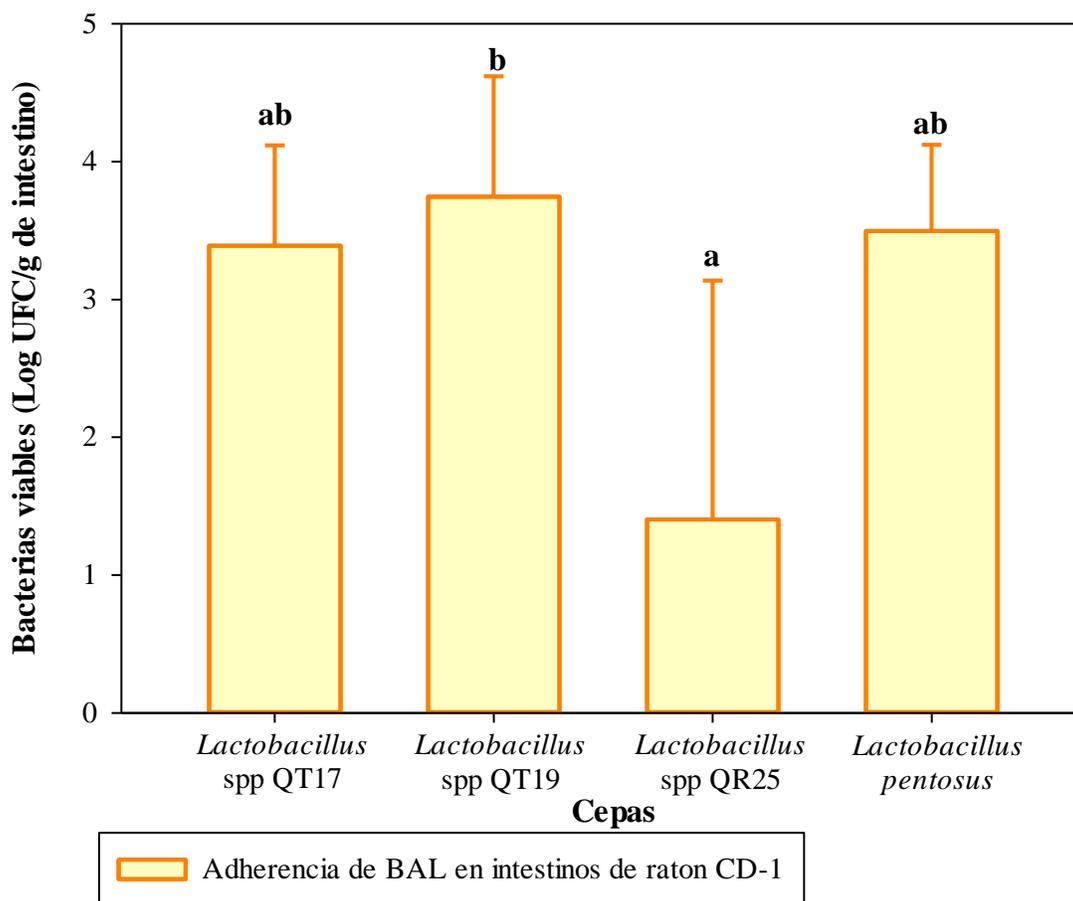


Figura 13. Cantidad de bacterias adheridas en intestinos de ratón Valores con letras similares no representan diferencia significativa ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey)

Cabe mencionar que no existen reportes sobre la cantidad de bacterias que deben adherirse al tracto gastrointestinal de ratones o de humanos para poder considerarse como probióticos. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas ensayadas colonizaron con éxito el sistema gastrointestinal de ratones por tanto son capaces de sobrevivir a las condiciones de TGI.

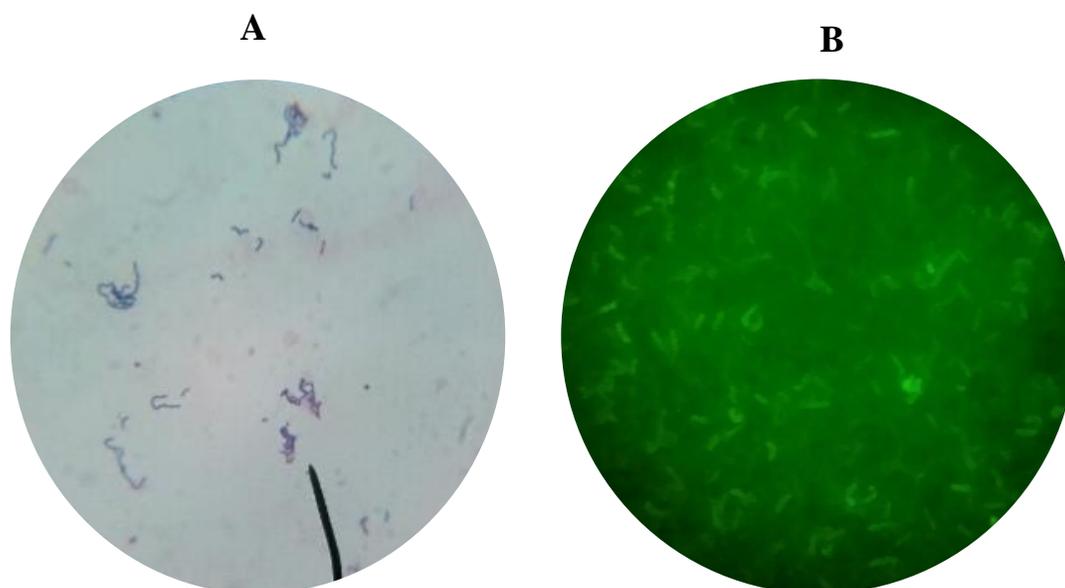


Figura 14. A) Tinción de Gram de *L. pentosus*; B) *L. pentosus* adherida a la pared intestinal de ratones

En la Figura 14 B, se observa la adherencia de *L. pentosus* a la mucosa intestinal de ratones, distinguiéndose pequeños bacilos característicos de dicha bacteria, tal y como se aprecia en la tinciones de Gram realizada previamente (Figura 14 A). Con estas imágenes se confirma la adherencia intestinal de *L. pentosus*, según Kotzamanidis *et al.* (2010), describen que un número creciente de informes indican que la adherencia de *Lactobacillus* en la capa de la mucosa intestinal está mediada por proteínas de superficie con capacidad de unión al moco, debido a que los genes de la bacterias ácido lácticas implicados en la resistencia al estrés intestinal, desencadena la producción de varios componentes de la superficie implicados en dicha adhesión. La adhesión intestinal de *Lactobacillus* a células epiteliales es conferida principalmente por proteínas de superficie que son covalentemente ancladas al peptidoglicano de la pared celular (Rahman *et al.*, 2014).

Otro mecanismo de adhesión intestinal de las bacterias ácido lácticas es debido a la presencia de Pili de unión. Los Pili son múltiples subunidades estructuras similares a pelos que se extienden desde la superficie de la célula bacteriana que están implicados en la adhesión a los tejidos del huésped (Douillard *et al.*, 2013). Se ha reportado

recientemente que las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* presentan Pili de unos 50 a 80 nm de largo, lo que favorece su adherencia (Rahman *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Jurado *et al.* (2011) describen que *Lactobacillus plantarum* 1 H1 (T1) y *Lactobacillus plantarum* 1 H2 (T2) administrados a cerdos jóvenes lograron sobrevivir a las condiciones de TGI de dichos animales, presentando concentraciones de 8×10^4 hasta 2.35×10^5 UFC/mL en ciego, colon transverso y recto. Valores muy parecidos a los reportados en el presente trabajo.

Rocha *et al.* (2012) administraron diversas cepas de *Lactobacillus* a pollos encontraron que su adherencia en la pared intestinal de los pollos era mínima ya reportan concentraciones de 2 hasta 534 colonias en las diversas secciones de intestino estudiadas (Duodeno, yeyuno, íleon y ciego). Mientras que el presente estudio se encontraron concentraciones mayores en los mismos órganos de estudio, lo cual nos indica que estas cepas de BAL podrían ser consideradas como probióticas. Estas diferencias de adhesión podrían atribuirse a la naturaleza de la cepa, ya que pueden tener diferente capacidad de adhesión intestinal, debido a las diferencias en la conformación estructural o en la composición de la pared celular bacteriana, estas diferencias pueden darse aunque se trate del mismo género y aun dentro de la misma especie de *Lactobacillus* (Servin & Coconnier, 2003; Deepika & Charalampopoulos 2010).

L. pentosus, *Lactobacillus* spp QT17, *Lactobacillus* spp QT19 y *Lactobacillus* spp QR25, demostraron tener capacidad de adhesión a las células epiteliales, lo que sugiere que las cepas pueden colonizar con éxito el TGI. Perdígón *et al.* (2003) mostraron que la adhesión de lactobacilos a las células epiteliales y al moco intestinal, determina la colonización del sistema TGI y puede ser un requisito previo para la exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas y la inmunomodulación del huésped. Kučan *et al.* (2012) administraron *L. plantarum* S1 obteniendo altos niveles de adherencia ($10 \log$ UFC/g) en los intestinos de ratones administrando la cepa por un periodo de 21 días.

Aun no se explica completamente el mecanismo del efecto probiótico. Los posibles mecanismos mediante los cuales las bacterias ácido lácticas presentan efecto protector o terapéuticos son: competencia por los nutrientes, la competencia por los sitios de unión en el sistema gastrointestinal, la producción de sustancias antibacterianas, modificaciones de los

procesos metabólicos en el sistema gastrointestinal y la modulación inmune (Kos *et al.*, 2003; Šušković *et al.*, 1997; Beganović *et al.*, 2011).

Además se ha demostrado que las BAL son estimulantes del sistema inmune tal y como lo describe Jurado *et al.* (2011) quienes observaron una respuesta positiva al tratamiento efectuado con inóculos probióticos a cerdos jóvenes, lo que significa una mejor inmunidad específica, es este mismo estudio se lograron disminuir los niveles de colesterol total con la administración de *Lactobacillus plantarum* 1 H2 y *Lactobacillus plantarum* 1 H1. Rocha *et al.* (2012) determinaron que tras administrar por 21 días consecutivos *Lactobacillus* a pollos ocurría algo similar ya que los niveles de IgA fueron más altos al termino del experimento, lo mismo ocurrió para IgG.

En un estudio llevado a cabo por Le Leu y colaboradores con ratas Sprague-Dawley, al administrar la combinación simbiótica de *Bifidobacterium lactis* y almidón resistente aumentó la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el recto con respecto al control ($p=0.03$) y se redujo un 50% ($p<0.01$) la inducción de cáncer colorectal por azoximetano (Le Leu *et al.*, 2010).

6.8 Potencial antagonico de BAL contra patógenos en ratones CD-1

La siguiente etapa del trabajo consistió en determinar el poder antagonico de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 (cepas que demostraron tener las mejores propiedades de adherencia) frente a *S. Typhimurium* y *Escherichia coli*.

La evaluación de la infección causada por las bacterias patógenas se realizó determinando el número de bacterias viables presentes en el intestino, bazo e hígado. Para evaluar el posible efecto protector de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 frente a la translocación intestinal de *S. Typhimurium* y *Escherichia coli*, para esto se realizó el siguiente diseño:

1. Grupo control → Animales infectados con la bacteria enteropatógena
2. Grupo con pre y post tratamiento con *L. pentosus* o *Lactobacillus* spp QT19.

6.8.1 Poder antagonico de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 frente a ratones infectados con *Salmonella* entérica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)

Entre los efectos benéficos atribuidos a los probióticos podemos mencionar la capacidad de los mismos para proteger contra enteropatógenos tanto en modelos experimentales como en humanos (Novotny, Maldonado, Castillo, Moreno, & Perdigón, 2012).

En la Figura 15, se presentan los resultados del ensayo de protección frente a *S. Typhimurium* para los ratones administrados con *L. pentosus* (Figura 15 A), así como *Lactobacillus* spp QT19 (Figura 15 B).

Se demostró el efecto de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 frente a una infección con *S. Typhimurium* en un modelo experimental en ratones CD-1. La administración de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 tanto preventiva como continúa disminuyó la severidad de la infección por *S. Typhimurium*, disminuyendo los recuentos del patógeno en el intestino, así como su diseminación fuera de este órgano. Además de conferir un mayor grado de protección en los animales expuestos a cepas BAL, mostrando reducciones en la carga de patógenos.

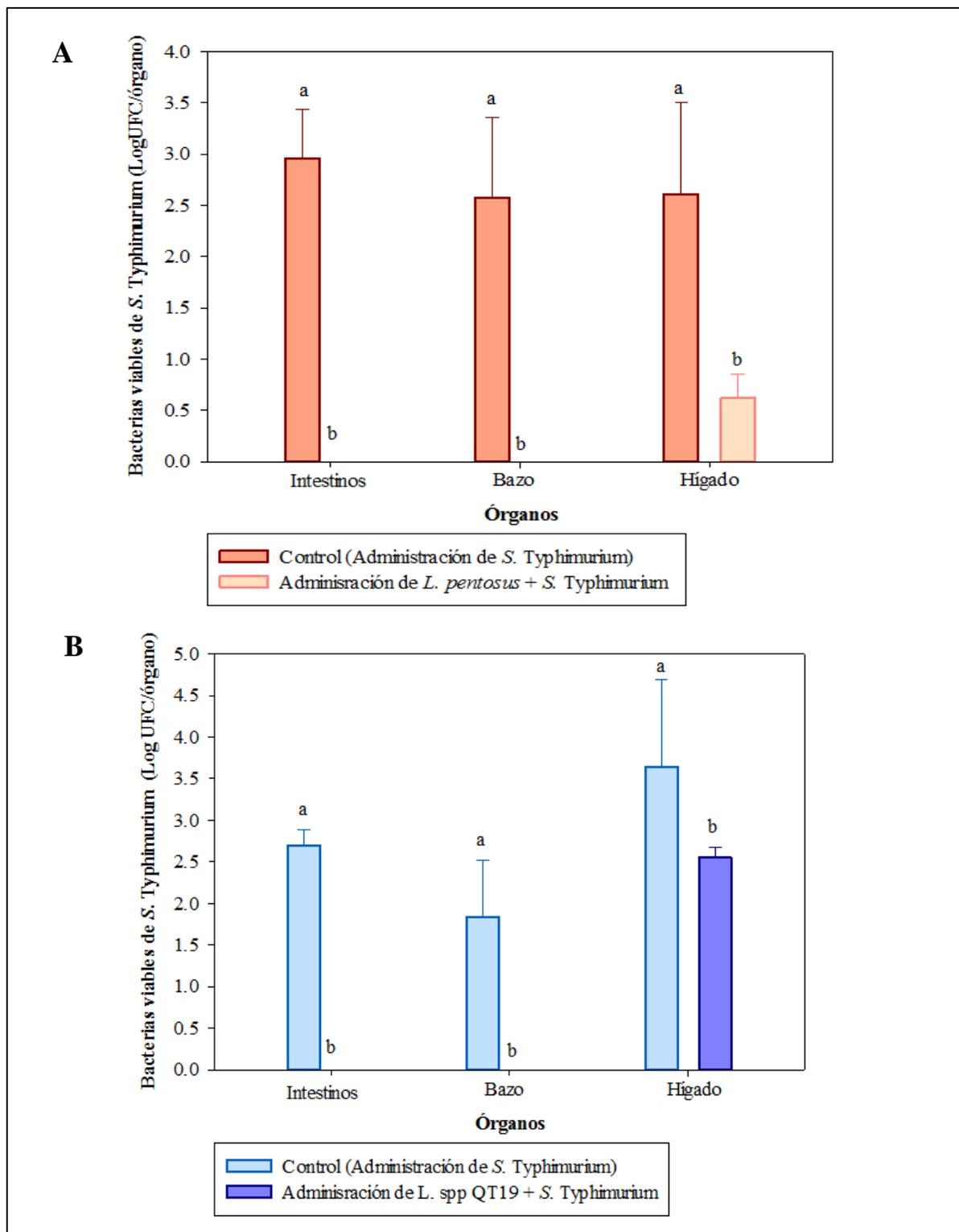


Figura 15. Translocación de *S. Typhimurium* en ratones administrados *L. pentosus* (A) y con *Lactobacillus* spp QT19 (B). ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$)

Esto pone de manifiesto la importancia de la continuidad en la administración del probiótico así como también la inocuidad de su consumo durante el proceso infeccioso. Al determinar que el probiótico refuerza los mecanismos de la barrera intestinal y disminuye el estado inflamatorio permite proponer su uso como suplemento dietario para la prevención y tratamiento de enfermedades entéricas, especialmente frente a *Salmonella*. Debemos remarcar que no todos los microorganismos probióticos tienen el mismo efecto frente a una infección por *Salmonella* y que esta propiedad es dependiente al tipo de cepa (Castillo, De Moreno de LeBlanc, C, & Perdigon, 2013).

Se ha demostrado que la microbiota láctica endógena (bifidobacterias y lactobacilos) también puede inhibir la invasión por patógenos como *Escherichia coli*, *Campylobacter*, especies de *Salmonella* e incluso *Helicobacter pylori*. El efecto de la bacterias ácido lácticas sobre la colonización y actividad de patógenos posiblemente ocurra mediante mecanismos inmunológicos o por la secreción de productos finales de su metabolismo como ácidos que pueden bajar el pH del nicho en el que se encuentran a niveles inferiores a aquellos necesarios para la supervivencia de diversos patógenos. Con este fin, aquellas cepas bacterianas capaces de adherirse a la superficie intestinal serían más eficaces que los microorganismos que no presenten esta cualidad. Este sería un factor más para la selección de bacterias probióticas (Fuentes Enríquez de Salamanca, 2005).

Tras la administración oral, algunas cepas de BAL probióticas han demostrado que estimulan las funciones inmunes así como sitios sistémicos de los tejidos, y estas cepas particulares recientemente han recibido gran atención investigando su potencial para ser incorporados en los productos alimenticios. En los últimos años, la investigación se ha centrado en definir las formas en las se da la estimulación del sistema inmune ejercida por cepas de BAL ya que podrían ser utilizadas en lucha contra las enfermedades infecciosas específicas. Por ejemplo, una cepa de *Lactobillus casei* CRL, ha demostrado respuestas innatas en la presencia de células humorales, demostrando reducir la infección en ratones debido a desafío oral con patógenos bacterianos entéricos, incluyendo *Escherichia coli* y *S. Typhimurium* (Gill *et al.*, 2001).

La capacidad de *S. Typhimurium* de migrar a los órganos viscerales es el principal determinante de la patogenicidad de este microorganismo en ratones (Gill *et al.*, 2001). En

el presente estudio, la alimentación de ratones tanto *Lactobacillus* spp QT19 como con *L. pentosus* demostraron ser eficaces ya que se logró eliminar la carga de *S. Typhimurium* en el bazo y en intestinos, así como de reducir considerablemente su presencia en el hígado. Esta reducción en la infección causada por *S. Typhimurium* es similar a los informes sobre otras cepas de *Lactobacillus* (tales como *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* (Martins *et al.*, 2010) y confirma que la suplementación adecuada con probióticos puede reducir notablemente la tasa de translocación de cepas *Salmonella*.

A pesar de que la alimentación con ciertas cepas probióticas de BAL es conocida por reducir la infección por enteropatógenos bacterianos y virales (Moreno, Salas, Pérez-Maldonado, & Jiménez, 2013), el mecanismo causal aún no se ha definido. Las posibilidades incluyen una disminución del pH intestinal debido a la biosíntesis de ácido láctico por cepas BAL; producción de sustancias antimicrobianas por cepas BAL probióticas; o exclusión competitiva de patógenos de sitios de contacto de células epiteliales intestinales por la colonización probiótica de la mucosa del intestino (Martins *et al.*, 2010). Una posibilidad adicional es que el sistema inmunológico está aumentado por la inmunoestimulación del probiótico, de manera que este confiere mayor protección inmune mediada. Esto es particularmente importante en el caso de un patógeno virulento como *S. Typhimurium*, ya que se ha demostrado en estudios anteriores su efecto de suprimir severamente la capacidad de un huésped infectado estimulando las defensas inmunitarias innatas y adquiridas (Castillo *et al.*, 2013).

El presente estudio se utilizó *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 como cepas probióticas. Por consiguiente, fue interesante observar que las respuestas inmunes del huésped fueron mayores entre los ratones infectados por *S. Typhimurium* que habían sido alimentados con *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 antes de la exposición.

6.8.2 Poder antagónico de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 frente a ratones infectados con *Escherichia coli* enterotoxigénica *stx2* (SETC)

Escherichia coli serotipo O157: H7 causa diarrea aguda, colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (LeBlanc, 2003). Este microorganismo es el serotipo más comúnmente identificado en el grupo de patógenos entéricos. La terapia actual se limita al tratamiento de apoyo sola, porque el uso de antibióticos parece aumentar el riesgo de complicaciones

sistémicas, tales como la insuficiencia renal aguda que ocurre en el síndrome urémico hemolítico, tal vez mediante la promoción de la liberación de la toxina a partir del periplasma (Bhardwaj *et al.*, 2010).

Muchos casos de infecciones y brotes causados por *E. coli* O157: H7 se han reportado en todo el mundo. Por ejemplo, un brote masivo donde participaron más de 9,500 casos y 9 muertes ocurrió en Japón en 1996 (Shua & Gill, 2001). Medidas para limitar la ocurrencia o impacto de *E. coli* O157: H7 son por lo tanto de gran importancia en la salud pública.

Debido a las complicaciones asociadas con antibióticos, tales como la aparición de cepas resistentes a los medicamentos y el potencial de toxicidad crónica, el uso generalizado de antibióticos no es aceptable como una medida de control preventivo o terapéutica (Shua & Gill, 2001). Por tanto, existe el deseo de desarrollar estrategias alternativas, no farmacéuticas para controlar *E. coli*. Una posibilidad es el uso de, agentes tales como bacterias probióticas del genero ácido lácticas.

Los resultados de este estudio demuestran que la suplementación con la administración de *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 en la dieta puede reducir la severidad de infección causada por SETC en ratones tal y como se muestra en la Figura 16, ya que en el caso de los ratones que fueron administrados previamente y posterior a la infección con *L. pentosus* se redujo considerablemente la presencia de este patógeno en intestinos así como en el hígado, mientras que el bazo se inhibió por completo su presencia.

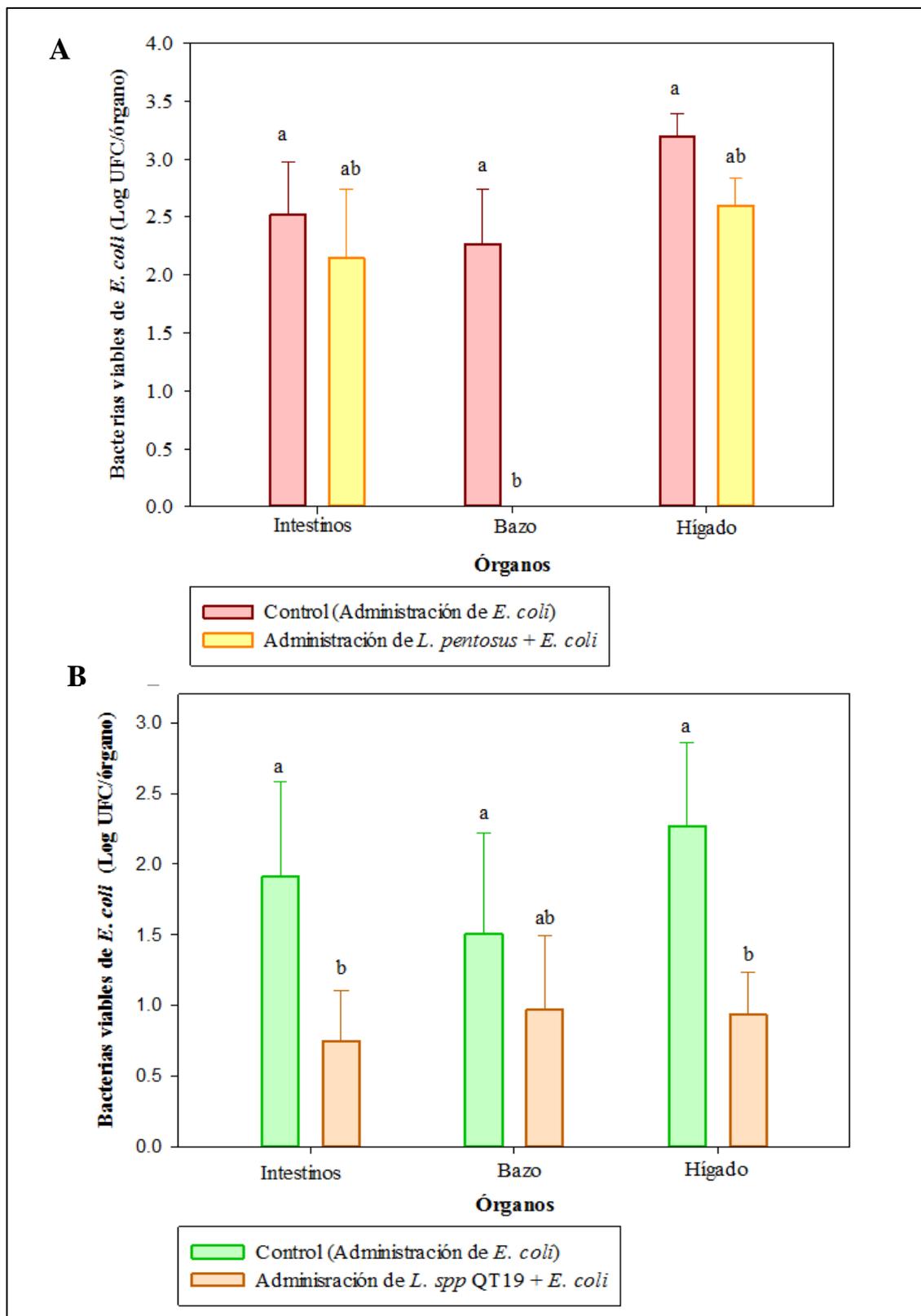


Figura 16. Translocación de *E. coli* en ratones administrados con *L. pentosus* (A) y con *Lactobacillus* spp QT19 (B). ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$)

En el ensayo donde se expusieron los ratones administrados con *Lactobacillus* spp QT19, existió una reducción evidente de SETC en los tres órganos analizados. Esto nos confirma que dichas cepas pueden utilizarse con coadyuvantes en el tratamiento con antibióticos.

Aunque existe poca información sobre los mecanismo de protección de las cepas BAL contra *E. coli in vivo*, varios estudios han examinado los efectos protectores in vitro. Shua *et al.* (2011) estudiaron la acción antagónica de *Lactobacillus lactis* contra *E. coli* O157: H7 en la carne de pollo cruda refrigerada, y se encontró que las muestras inoculadas con *Lactobacillus lactis* mostraron una disminución significativa de *E. coli* O157: H7 en el recuento después de 3 días de almacenamiento (Shua & Gill, 2001).

Los mecanismos por los cuales *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 disminuyeron el efecto de SETC pueden incluir:

- a) la competencia entre microbiana con patógenos por los sitios de unión intestinal
- b) la producción de sustancias antimicrobianas directamente para los patógenos
- c) la mejora de la inmunidad del huésped

6.8.3 Adaptación de BAL al tracto gastrointestinal de ratón

Las BAL están naturalmente adaptadas para crecer y sobrevivir en los medios a base de leche. En el tracto digestivo no se multiplican en gran magnitud por las condiciones hostiles del medio y por los efectos antagónicos de la microflora. Sin embargo, señalan los autores, que es probable que los probióticos puedan adaptarse al medio ambiente del tracto digestivo y que cumplan funciones particulares que pueden ser de gran beneficio para el huésped (Mater *et al.*, 2007).

En el presente estudio se recuperaron las bacterias lácticas (*L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19), que fueron administradas a ratones en el primer experimento, posteriormente se cultivaron para que dichas bacterias fueran administradas en los experimentos subsecuentes, obteniendo como resultado un incremento en la adherencia en los intestinos de ratón esto para los experimentos siguientes, lo que nos lleva a pensar que estas bacterias pudieron adaptarse a las condiciones del TGI. La bacteria que mayor capacidad de adaptación tuvo fue *L. pentosus*, ya que la adherencia incremento en casi dos logaritmos a diferencia de y

Lactobacillus spp QT19, incrementando su adherencia un poco más de un logaritmo, tal y como se aprecia en la Figura 17.

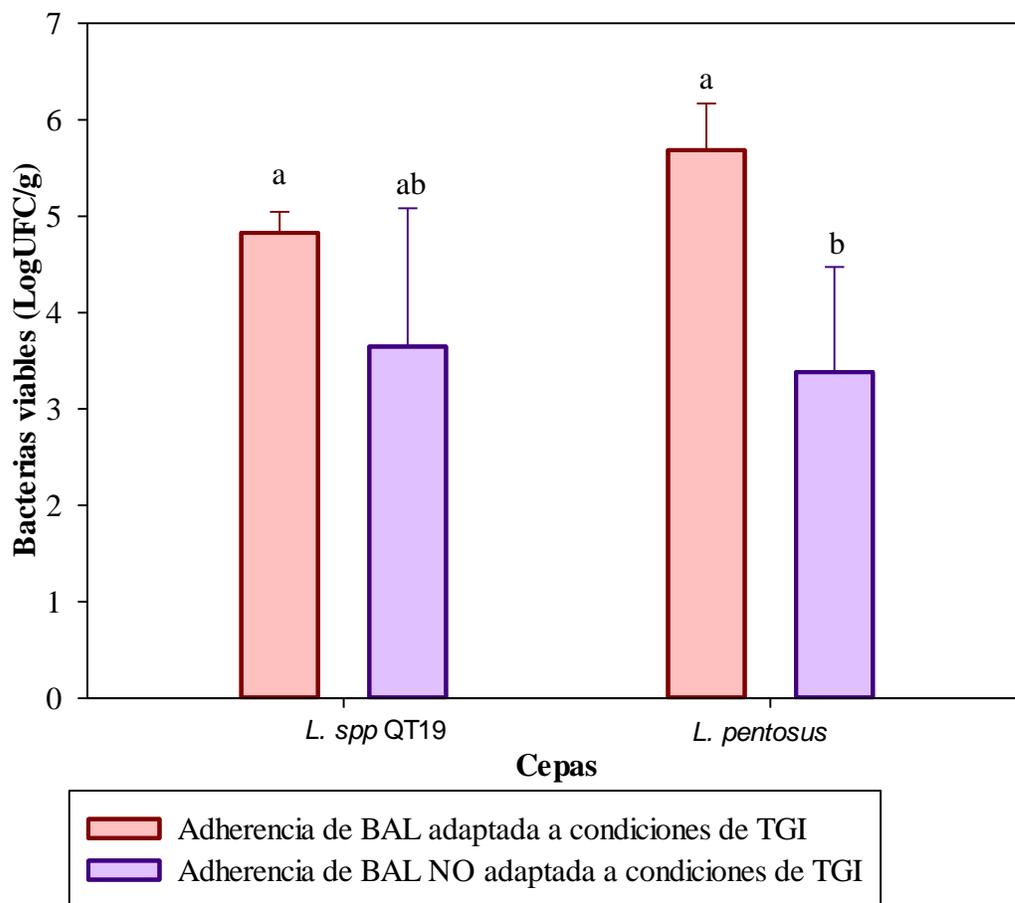


Figura 17. Cantidad de bacterias adheridas en intestinos de ratón antes y después de una adaptación al tracto gastrointestinal (TGI) ($P \leq 0.05$, Prueba Tukey $n=8$).

En estudio realizado por Chiaramonte *et al.* (2010) determinaron la capacidad de adaptación a las condiciones de tracto gastrointestinal en ratones de las células de *Lactobacillus sakei*, encontrando que esta cepa fue capaz de mutar, permitiéndole una mejor adaptación al ambiente del TGI. Este análisis reveló que cepa mutada presentaba una membrana celular anormalmente deformada y una pared celular aparentemente más gruesa que la de la cepa matriz, confiriéndole mayor resistencia. Los autores proponen que las mutaciones en genes reguladores promueven una mejor adaptación y la evolución en algunos casos solo se ve favorecida una sola función celular. Una de las adaptaciones más importantes que llegan a presentar dichas cepas es el uso más eficiente de las fuentes alternativas de carbono que están

presentes en el TGI, en un ambiente pobre en fuentes de energía, en particular la glucosa es la única fuente de carbono disponible.

El análisis proteómico realizado en un clon de resistencia sugirió una modificación del estado de estrés de las células, que pueden correlacionan con la modificación de la tasa de supervivencia después de que se aplicaron diversas tensiones. Algunas proteínas implicadas en la transcripción y regulación también fueron expresadas de forma diferente en el mutante (Chiaramonte *et al.*, 2010).

Debido a lo descrito anteriormente se piensa que *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 pudieron mutar expresando genes de resistencia a condiciones de tracto gastrointestinal, pudiéndose adaptar de mejor manera y con ello expresar una mayor adherencia y colonización de las BAL en intestinos de ratón.

Nuestros resultados coinciden con Mater *et al.* (2007) quienes demostraron que la cepa de *L. plantarum* S1 sobrevivir con éxito las condiciones en el sistema GI de los ratones y tiene la capacidad de adherencia y la colonización del colon e intestino delgado. Además, la cepa de prueba tiene un efecto positivo en la flora microbiana, ya que reduce la presencia de poblaciones de microflora intestinal potencialmente adversos.

7 CONCLUSIONES

- *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp cepas QT17, QT19, QR25 fueron resistentes a sales biliares y a antibióticos en medios de cultivo.
- *L. pentosus* tuvo la mayor producción de ácidos obteniendo una concentración de 2.0 g/L a las 24 h de monitoreo, seguida *Lactobacillus* spp QT19 con una producción alrededor de 1.5 g/L.
- El antibiograma realizado demostró que las 4 cepas de BAL presentaron sensibilidad solo a 4 antibióticos, por esta razón podrían usarse como coadyuvante durante el tratamiento con antibióticos de pacientes humanos o animales
- Las BAL en estudio fueron capaces de colonizar en el intestino de ratones CD-1 tras una administración intragástrica. Por tanto, existe una relación entre los ensayos de potencial probiótico efectuados en medios de cultivo y la capacidad de colonización intestinal en ratones CD-1
- *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 fueron las cepas que presentaron mayor adherencia y colonización intestinal en ratones CD-1.
- *L. pentosus* presentó una adhesión alrededor de 6 log UFC/g de mucosa intestinal, lo cual corresponden a una cantidad suficiente de bacterias que se adhieren y que posteriormente colonizaran y ejercer los efectos beneficiosos en el huésped.
- Tanto *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 después de colonizaron el intestino de ratón, cuando fueron desprendidas y recuperadas del intestino y administradas a nuevos ratones, incrementaron su capacidad de adherencia y colonización en los nuevos ratones CD-1.
- *L. pentosus* inhibió por completo la invasión de *S. Typhimurium* a los órganos abdominales de los ratones CD-1. Sin embargo, no se logró una completa inhibición de la invasión de STEC a los mismos órganos; no obstante, la inhibición de la invasión de STEC que se logró fue significativa comparada con el control.
- *Lactobacillus* spp QT19 mostro un efecto antagónico semejante al de *L. pentosus*: inhibió por completo la invasión de *S. Typhimurium* a los órganos abdominales de

los ratones CD-1, pero no la de STEC. Sin embargo, la inhibición de la invasión de STEC que se logró fue más significativa que la obtenida con *L. pentosus*.

- Las cepas *L. pentosus* y *Lactobacillus* spp QT19 que analizamos son bacterias que podrían usarse como probióticos por la industria de alimentos y la farmacéutica

8 BIBLIOGRAFIA

- Adesokan, Y., Odetoyinbo, B., & Okanlawon, B. (2009). Optimization of lactic acid production by lactic acid bacteria isolates from some traditional fermented food in Nigeria. *Pakistan journal of nutrition*, 8(5), 611-615.
- Aguavil Enriquez, J. C. (2012). *Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a Lactobacillus acidophilus y Bacillus subtilis sobre el sistema gastrointestinal en pollos Broiler Ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas*. (Doctoral), Escuela Politécnica del Ejercito, Santo Domingo- Ecuador.
- Agudelo, C., Ortega, R., & Hoyos, J.L. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 8(2), 8-15.
- Akin, M. B., Akin, M. S., & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, 104, 93-99.
- Alakomi, H., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., & von Wright, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 351-354.
- Alvarado Orozco, C. (2007). *Identificación y cuantificación de compuestos antimicrobianos producidos por Bacterias Ácido Lácticas aisladas de alimentos artesanales mexicanas*. (Doctorado en Ciencias de los Alimentos), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro.
- Allgeyer, L. C., Miller, M. J., & Lee, S. Y. (2010). Drivers of liking for yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J Food Sci*, 75(4), S212-219. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01579.x
- AMOROCHO CRUZ, C. M. (2011). Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra (Doctoral dissertation).
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Kelly, W. J., & Roy, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*, 309(2), 184-192.
- Arai, S. (2000). Functional food science in Japan: state of the art. *Biofactors*, 12(1-4), 13-16.
- Arciero, J. C., Ermentrout, G. B., Upperman, J. S., Vodovotz, Y., & Rubin, J. E. (2010). Using a mathematical model to analyze the role of probiotics and inflammation in necrotizing enterocolitis. *PLoS One*, 5(4), e10066.
- Azais-Braesco, V., Bresson, J. L., Guarner, F., & Corthier, G. (2010). Not all lactic acid bacteria are probiotics, ...but some are. *Br J Nutr*, 103(7), 1079-1081. doi: 10.1017/S0007114510000723

- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Barboza, J. E., Vázquez, H., Salcedo, R., & Bautista, M. (2004). Probióticos y conservadores Naturales en Alimentos. *Acta Universitaria*, 14(3).
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Šušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(1), 43-53.
- Berg, R. D. (1998). Probiotics, prebiotics or conbiotics'?. *Trends in microbiology*, 6(3), 89-92.
- Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., & Malik, R. K. (2010). Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Int J Food Microbiol*, 141(3), 156-164. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.001
- Brito, C., Navarrete, C., Renate, S. T., & Mariela, H. R. (2011). Viabilidad y efectos del probiótico *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* en queso gauda semidescremado chileno. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(4), 414.
- Bujalance Martínez-Cañavate, M. C. (2006). *Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos de animales inmunocompetentes e inmunocomprometidos*. (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, Granada.
- Burns, A.J., & Rowland, I.R. . (2003). Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon. *Gastroenterol Hepatol* 26(1), 73-84.
- Caballero Cervantes, Y. (2014). *Aislamiento e Identificación de Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Probiótico en Bovinos Holstein*. (Maestría en Ciencias), Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C. & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G315-322.
- Cano, M. F. (2012). AminoglucoSIDo. España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Castillo, N. A., De Moreno de LeBlanc, A., Galdeano, C, M. & Perdigon, G. (2013). Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic *Lactobacilli*. *J Appl Microbiol*, 114(3), 861-876. doi: 10.1111/jam.12074
- Chassard, C., Scott, K. P., Marquet, P., Martin, J. C., Del'homme, C., Dapoigny, M., ... & Bernalier-Donadille, A. (2008). Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS microbiology ecology*, 66(3), 496-504.
- Collado Amores, M. C. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium*. (Tesis Doctoral), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., & Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 85(3), 193-204.
- Cueto, M. C., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). Evaluación In Vitro del Potencial Probiótico de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas de Suero Costeño. *Actual Biol*, 32(93), 129-138.
- Charalampopoulos, D., Deepika, G. (2010) . Propiedades de adhesión de superficie y lactobacilos . *Adv. Appl. Microbiol.* 70 : 127 - 152
- Chiaromonte, F., Anglade, P., Baraige, F., Gratadoux, J. J., Langella, P., Champomier-Verges, M. C., & Zagorec, M. (2010). Analysis of *Lactobacillus sakei* mutants selected after adaptation to the gastrointestinal tracts of axenic mice. *Appl Environ Microbiol*, 76(9), 2932-2939. doi: 10.1128/AEM.02451-09
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
- Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2010). Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Advances in applied microbiology*, 70, 127-152.
- De LeBlanc, A. D. M., 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(1), 27.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (second ed.). London, New York: Dordrecht, Heidelberg.
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2002). Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Br J Nutr*, 88 Suppl 1, S59-66. doi: 10.1079/BJN2002630
- Degnan, Frederick H. (2008). The US Food and Drug Administration and Probiotics: Regulatory Categorization. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S133-S136. doi: 10.1086/523324
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., & Hebraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett*, 256(1), 1-15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x
- Devlieghere, F., & Debevere, J. (2000). Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 33(8), 531-537. doi: 10.1006/fstl.2000.0705
- Dosta, M. D. C. M., Barrera, T. C., Perrino, F. J. F., & Reyes, L. M. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63-72.
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., ... & Caggia, C. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genet*, 9(8), e1003683.

- Durant, J. A., Corrier, D. E., & Ricke, A. C. (2000). Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection*, 63(5), 573-578.
- Errecalde, O. J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. *FAO*.
- Etzold, S., Kober, O. I., Mackenzie, D. A., Tailford, L. E., Gunning, A. P., Walshaw, J., . . . Juge, N. (2014). Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ Microbiol*, 16(3), 888-903. doi: 10.1111/1462-2920.12377
- EUFIC. (2006). *Alimentos funcionales*. Europa.
- FAO. (2007). Report on functional foods. Italia, Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO/OMS. (2006). Probióticos en los alimentos: Probióticos en los alimentos. In 92-5-305513-8 (Ed.), (Vol. 1014-2916). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002).
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.
- Fooks, J., Fuller, R., & Gibson, R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9, 53-61.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects*. Academic Press.
- Freter, R. (1992). Factors affecting the microecology of the gut. In *Probiotics* (pp. 111-144). Springer Netherlands.
- Fuentes Enríquez de Salamanca, S. (2005). *Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract: Effects of probiotics in health and disease*. (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, Granada, España.
- Fukao, M., Tomita, H., Yakabe, T., Nomura, T., Ike, Y., Yajima, N. 2009. Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Strain *Lactobacillus brevis* KB290. *Journal of Food Protection*, 72(9), págs.1923–1929.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (1999). Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1379–1387.
- Gill, H. S., Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K. J., & Cross, M. L. (2001). Protection against translocating *Salmonella* Typhimurium infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med Microbiol Immunol*, 190, 97-104.
- Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., . . . Van de Wiele, T. (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan

- oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 231–242.
- Guillemard, E., Tondou, F., Lacoïn, F., & Schrezenmeir, J. (2010). Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *Br J Nutr*, 103(1), 58-68. doi: 10.1017/S0007114509991395
- Havelaar, A. H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M. H., & Ter Kuile, B. H. (2010). Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol*, 139 Suppl 1, S79-94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.015
- Hernández Hdez., A., Coronel Rodríguez, C., Monge Zamorano, M., & Quintana Herrera, C. (2015). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatr Integral*, XIX (5), 337-354.
- Hernández Ramírez, A. (2009). *Evaluación del potencial probiótico de cepas de Lactobacillus para su uso en un alimento funcional*. (Maestría en Tecnología Avanzada), Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11, 506-514. *Hepatol*, 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Hui, Y., Guerrero, I., & Rosmini, M. (2006). *Ciencia y tecnología de carnes*. México.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzappel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 73(3), 730-739. doi: 10.1128/AEM.02105-06
- Institute, Clinical and Laboratory Standards. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement (pp. 1-188). USA: Second.
- Isakow, W., Morrow, L. E., & Kollef, M. H. (2007). Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: review of current evidence and recommendations. *Chest*, 132(1), 286-294. doi: 10.1378/chest.06-2156
- Jackson, M. S., Bird, A. R., & McOrist, A. L. (2002). Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. *Journal of microbiological methods*, 51(3), 313-321.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products--challenges and new approaches. *Curr Opin Biotechnol*, 21(2), 175-181. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.009
- Jiménez, M. B. (2008). Manejo dietético del estreñimiento crónico funcional. Especial referencia al beneficio de las bifidobacterias. *ANS. Alimentación, nutrición y salud*, 15(2), 31-38.

- Jurado, G., Castaño Z., Ramírez T. (2011). Evaluación de *Lactobacillus plantarum* en intestino grueso de lechones por microscopía electrónica y química sanguínea. *Rev.MVZ.*, 16(2), 2538-2548.
- Kalliomäki, M. (2009). The role of microbiota in allergy. *Ann. Nestlé*, 67(19-25).
- Karczewski, J., Troost, F. J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R. J. M., & Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G851-G859.
- Kingsley, C., & Koyama, T. E. (2007). Bile and Acid Tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A Potential Probiotic Agent. *International Journal of Dairy Science*, 2(3), 275-280.
- Kirjavainen, V., Ouwehand, C., Isolauri, E., & Salminen, J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 185-189.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *Int J Food Microbiol*, 140(2-3), 154-163. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.004
- Kučan, M., Gobin, I., Markov, K., Momčilović, D. J., & Frece, J. (2012). Testing the adhesion and colonization ability of *Lactobacillus plantarum* strain S1 to the mice intestinal epithelium. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 23-28.
- Kumar, H., & Salminen, S. (2016). Probiotics. *Elsevier*, 510-515. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00570-5
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20(5), 537-543. doi: 10.1016/s0740-0020(02)00159-4
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Boza, J., Xaus, J., & Olivares, M. (2006). [Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children]. *Nutricion hospitalaria*, 22(4), 496-502.
- LeBlanc, J.J. (2003). Implication of Virulence Factors in *Escherichia coli* O157:H7 Pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 29(4), 277-296. doi: 10.1080/10408410390243911

- Lee, Y. K., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of medical microbiology*, 52(10), 925-930.
- Leite, A. M., Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M., Mayo, B., & Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J Dairy Sci*, 98(6), 3622-3632. doi: 10.3168/jds.2014-9265
- Le Leu R.K., Hu Y., Brown I.L., Woodman R.J. & Young G.P. (2010). Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis* 31: 246-251.
- León, R. (2002). Shigelosis (disentería bacilar). *SALUD EN TABASCO*, 8, 22-25.
- Leyer, G. J., Li, S., Mubasher, M. E., Reifer, C., & Ouwehand, A. C. (2009). Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics*, 124(2), e172-e179.
- Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12(5), 419-426.
- Mack D.R., Michail S., Wei, S., McDougall, L. & Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276: G941-950.
- Marteau, P., Seksik, P., & Jian, R. (2002). Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br J Nutr*, 88 Suppl 1, S51-57. doi: 10.1079/BJN2002629
- Martín, J. D., Werner, B. G., & Hotchkiss, J. H. (2003). Effects of Carbon Dioxide on Bacterial Growth Parameters in Milk as Measured by Conductivity. *American Dairy Science Association*, 86, 1932-1940.
- Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., ... & Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *Journal of dairy research*, 76(04), 418-425.
- Martínez, F., Gómez, S., Rodríguez, P., Urbina, J., & Ortiz, G. (2005). *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de niños con diarrea: adherencia y citotoxicidad en líneas celulares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 2-9.
- Martins, A. K., Martins, F. S., Gomes, D. A., Elian, S. D., Vieira, A. T., Teixeira, M. M., ... & Nicoli, J. R. (2010). Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. *Archives of microbiology*, 192(12), 995-1003.
- Mater, D. D., Langella, P., Corthier, G., & Flores, M. J. (2007). A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), 123-127.

- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J. K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., ... & Marteau, P. (1999). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, 10(12), 393-399.
- McCray, S. (2003). Lactose intolerance: considerations for the clinician. *Practical Gastroenterology*, 27(2), 21-42.
- Lee, E. W., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2003). EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3733-3738.
- Leitch, E. M., & Stewart, C. S. (2002). *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to L-lactate than to D-lactate. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4676-4678.
- Mearina, F., Guarnerb, F., & Verdú, E. (2009). Probióticos y aparato digestivo. Evidencias actuales. *Gastroenterol Hepatol*, 32(Supl 1), 1-14.
- Mejía Rodríguez, J. A., Chacón Rueda, Z., Guerrero Cárdenas, B., Otoniel Rojas, J., & López Corcuera, G. (2007). Obtención de cepas de lactobacillus.: Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *Revista científica*, 17(2), 178-185.
- Meléndez, I. L., González, D. C., & Alvarez-Dardet, C. (2012). [Functional foods: for the health service or new business for the food industry?]. *Atencion primaria/Sociedad Espanola de Medicina de Familia y Comunitaria*, 45(6), 287-289.
- Millette, M., Luquet, F. M., & Lacroix, M. (2007). In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*-and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Letters in applied microbiology*, 44(3), 314-319.
- Moher, D., Schulz, K. F., Altman, D. G., & Consort Group. (2001). The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *The Lancet*, 357(9263), 1191-1194.
- Moorthy, G., Murali, M. R., & Devaraj, S. N. (2009). Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. *Nutrition*, 25(3), 350-358.
- Mora Peñaflo, N. (2014). *Elaboración de Queso fresco (tipo panela) con potencial probiótico*. (Maestría en Ciencias de los Alimentos), Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
- Moreno, R., Salas, E. J., Pérez-Maldonado, C., & Jiménez, J. (2013). Inocuidad de *Lactobacillus* potencialmente probióticos aislados de heces de lactantes y leche materna. *Acta Bioclinica*, 5(3), 149-157.
- Muñoz-Atienza, E., Araujo, C., Magadan, S., Hernandez, P. E., Herranz, C., Santos, Y., & Cintas, L. M. (2014). In vitro and in vivo evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish Shellfish Immunol*, 41(2), 570-580. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.007
- Murry, A.C., Hinton, A. & Morrison, H., (2004). Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by

- Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science*, 3(9), págs.603-607.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambang (Mangifera pajang). *CyTA-Journal of Food*, 13(4), 563-572.
- NOM-091-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. México D.F.
- Novotny, I., Maldonado, C., Castillo, N., Moreno, A., & Perdígón, G. (2012). Bacterias probióticas como suplemento dietario promisorio para la salud. *Química Viva*, 3, 199-209.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., ... & Takeda, Y. (2001). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International journal of food microbiology*, 68(1), 135-140.
- Ohara, T., Yoshino, K., & Kitajima, M. (2009). [Pre-and probiotics increase host-cell immunological competence, improve bowel movement, and prevent the onset of colon cancer--an analysis based on movements of intestinal microbiota]. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 57(6), 533-541.
- Ohland, C.L. & Macnaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G807-819.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., & Onilude, A.A. (2003). Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(7), 79-184.
- Otte, J.M. & Podolsky, D.K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G613-626.
- Parkes, G. C., Sanderson, J. D., & Whelan, K. (2010). Treating irritable bowel syndrome with probiotics: the evidence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(02), 187-194.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci*, 67(2), 309-317. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.11.003
- Perdígón, G., Locascio, M., Medici, M., de Ruiz Holgado, A. P., & Oliver, G. (2003). Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. *BIOCELL-MENDOZA*-, 27(1), 1-10.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., & Tran, L. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int J Food Microbiol*, 108(2), 276-280. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.009
- Pimentel, T. C., Cruz, A. G., & Prudencio, S. H. (2013). Short communication: Influence of long-chain inulin and *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* on the sensory

- profile and acceptance of a traditional yogurt. *Journal of dairy science*, 96(10), 6233-6241.
- Pregliasco, F., Anselmi, G., Fonte, L., Giussani, F., Schieppati, S., & Soletti, L. (2009). A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 42(3), S224-S233.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. & Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63: 2355- 2360.
- Provencio, Muñoz. (2011). *Caracterización de factores de adhesión a proteínas de la matriz extracelular en Lactobacillus casei*. (Tesis Doctoral), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Quigley, E. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res*, 61(3), 213-218. doi: 10.1016/j.phrs.2010.01.004
- Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M. C., Riedel, C. U., Foligné, B., Hanse, M., ... & Mangavel, C. (2014). Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: From survival in mice to interaction with human cells. *International Dairy Journal*, 34(1), 93-99.
- Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M., Karuthan, C., & Wan, Y. (2010). Bile salt desconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *J Sci Food Agric*, 90, 65-69.
- Ramiah, K., Van Reenen, C.A. & Dicks, L.M. (2008). Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 159: 470- 475
- Ramirez Ramirez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velazquez Gonzalez, M., Ulloa, J., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*, 7, 1-16.
- Rocha, T.S., Baptista, A. S., Donato, T.C., Milbradt, E.L., Okamoto, A.S., Rodriguez, C.Z., Coppola, M.P., Andreatti, R.L. (2012). Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. *Poultry Science*. 91:362–369
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Suárez, A.M., & Martínez, J.M. (1997). Research note: unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 73–74.
- Rodríguez, M. A., González, J., Barreto, J., Alonso, N., Areu, A., & Pardo, A. (1998). Tetraciclinas. *Acta médica*, 8(1), 75-9.
- Rodríguez-Alonso, P., Fernández-Otero, C., Centeno, J. A., & Garabal, J. I. (2009). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and Micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *Journal of food science*, 74(6), M284-M293.

- Roldána, M. L., Oterob, J. L., Villarreal, F., Baronia, M. R., Carrascoc, M. S., Álvarez, C., ... & Simonettac, A. C. (2011). Artículo original Efecto inhibitor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157: H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31, 37-41.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., & Ranilla, M. J. (2008). Ailamiento, identificación y caracterización parçila de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. prodedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc. Tecnol. Aliment*, 6(1), 55-63.
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., & Palva, A. (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International journal of food microbiology*, 83(1), 63-74.
- Salminen, Seppo, & van Loveren, Henk. (2012). Probiotics and prebiotics: health claim substantiation. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 23(0). doi: 10.3402/mehd.v23i0.18568
- Samaniego, L. M., & Sosa, M. (2000). *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Ciudad de Matanzas, Cuba: Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".
- Sanchez, B., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2008). Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54(1), 1-17. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00454.x
- Sánchez Minutti, L. (2011). *Desarrollo de un alimento funcional formulado a partir de Lentinula edodes y Lactobacillus spp.* (Mestría en Biotecnología Aplicada), Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala.
- Sanders, M., Akkermans, L., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., & Hörmannspberger, G. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185.
- Sandholm, M., Blum, S., Collins, J. K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., . . . Grenov, G. (1999). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 393-399.
- Sandine, W. E., Muralidhara, K. S., Elliker, P. R., & England, D. C. (1972). Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *Journal of Milk and Food Technology (JMFT)*, 35(12), 691-702.
- Sanz, Y., Collado, M., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Padiatrìca Española*, 61(9), 476-482.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J., & de Vos, W. M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and applied microbiology*, 26(4), 572-584.

- Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., ... & Gleis, M. (2009). Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 39-53.
- Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E. F., Wehkamp, J., & Fellermann, K. (2008). Probiotic lactobacilli and VSL# 3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clinical & Experimental Immunology*, 151(3), 528-535.
- Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 361s-364s.
- Servin, A. L., Coconnier, M., Marido. (2003) . La adhesión de las cepas probióticas a la mucosa intestinal y la interacción con los agentes patógenos. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17 : 741 - 754
- Sherr, B., Sherr, E., & Fallon, R. (1987). Use of Monodispersed, Fluorescently Labeled Bacteria to Estimate In Situ Protozoan Bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 958-965.
- Shua, Q., & Gill, H. S. (2001). A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol*, 189(3), 147-152.
- Shukla, G., Sharma, G., & Goyal, N. (2010). Probiotic Characterization of Lactobacilli and Yeast Strains Isolated from Whey Beverage and Therapeutic Potential of Lactobacillus Yoghurt in Murine Giardiasis. *American Journal of biomedical sciences*, 2(3), 248-261. doi: 10.5099/aj100300248
- Song, D., Hayek, S., & Ibrahim, S. (2012). *Recent application of probiotics in food and agricultural science*. INTECH Open Access Publisher.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345.
- Šušković, J., Brkić, B., & Matošić, S. (1997). Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo*, 47(1), 57-73.
- Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T., & Yamamoto, Y. (1993). Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(9), 1557-1560.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett*, 31(4), 571-576. doi: 10.1007/s10529-008-9902-3
- Valenzuela, A. S., Ruiz, G. D., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Cañamero, M. M., ... & Gálvez, A. (2008). Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*, 19(9), 842-848.
- van Loveren, H., Sanz, Y., & Salminen, S. (2012). Health claims in Europe: probiotics and prebiotics as case examples. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3, 247-261. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101206

- Vandamme, B., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407–438.
- Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., & Ouwehand, A. C. (2005). Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods. *J Microbiol Methods*, 60(2), 225-233. doi: 10.1016/j.mimet.2004.09.013
- Villena, J., Racedo, S., Agüero, G., & Alvarez, S. (2006). Yoghurt accelerates the recovery of defence mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* in protein-malnourished mice. *British journal of nutrition*, 95(03), 591-602.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904. doi: 10.1016/s0963-9969(03)00098-x
- Yunis, A. A. (1989). Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *The American journal of medicine*, 87(3N), 44N-48N.
- Zhang, Y. C., Zhang, L. W., Tuo, Y. F., Guo, C. F., Yi, H. X., Li, J. Y., ... & Du, M. (2010). Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. *Research in microbiology*, 161(8), 667-672.

9 ANEXOS

XVII Congreso Internacional
Inocuidad de Alimentos

XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos
5, 6 y 7 de noviembre 2015, Nuevo Vallarta, Nayarit, México

La Universidad de Guadalajara otorga la presente
CONSTANCIA

A: Jiménez Villeda, B. E., Castro Rosas, J., Gómez Aldapa C. y Rangel Vargas E.

por su participación como:
Autores del trabajo libre presentado en modalidad oral
“Determinación del potencial probiótico de Bacterias Ácido Lácticas”

[Signature]
Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento

[Signature]
Dr. César Octavio Monzón
Rector del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías

[Signature]
Dr. Arturo Chávez Chávez
Director de la División de Ciencias Básicas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

1. Composición de la dieta estándar de los roedores

Formulab Chow

Formulab Chow, Irradiated

5008*
5008C33*

DESCRIPTION

Formulab Diet is formulated to supply complete life-cycle nutrition for use in breeding colonies of rats and hamsters and many mouse strains. This diet is formulated using the unique and innovative concept of Constant Nutrition®, paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. The high energy, high quality protein formulation of this diet maximizes reproduction of rats and hamsters and is an excellent life-cycle diet for most rodents.

Features and Benefits

- Similar nutrient concentration to 5001, with higher energy content
- Maximizes reproductive performance of rats and hamsters; supports gestation and lactation simultaneously
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated to feed rats, hamsters and many mouse strains
- Single product inventory
- Available in Irradiated or Non-Irradiated form
- ZDF rats were developed using 5008

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
 - Non-Irradiated available in 15 kg or 50 lb paper sacks
 - Irradiated available in 25 lb paper sacks
- Meal (ground pellets), special order

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	6.5%
Crude fiber not more than	4.0%
Ash not more than	8.0%
Added minerals not more than	2.5%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, ground wheat, fish meal, wheat middlings, porcine animal fat preserved with BHA, cane molasses, brewers dried yeast, porcine meat meal, wheat germ, ground oats, dried beet pulp, dehydrated alfalfa meal, calcium carbonate, dried whey, salt, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite, choline chloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, pyridoxine hydrochloride, dl-alpha toco-phenyl acetate, thiamin mononitrate, folic acid, DL-methionine, nicotinic acid, calcium pantothenate, riboflavin, vitamin B₁₂ supplement, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate.

FEEDING DIRECTIONS

Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat between 15-30 grams per day. Smaller strains will eat between 12-15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

Mice-Adult mice will eat 4 to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

Hamsters-Adults will eat 10 to 14 grams per day.

12/11/09

CHEMICAL COMPOSITION¹**Nutrients²**

Protein , %	23.5
Arginine, %	1.44
Cystine, %	0.35
Glycine, %	1.23
Histidine, %	0.58
Isoleucine, %	1.20
Leucine, %	1.87
Lysine, %	1.40
Methionine, %	0.43
Phenylalanine, %	1.08
Tyrosine, %	0.66
Threonine, %	0.90
Tryptophan, %	0.28
Valine, %	1.19
Serine, %	1.20
Aspartic Acid, %	2.60
Glutamic Acid, %	4.77
Alanine, %	1.39
Proline, %	1.63
Taurine, %	0.02
Fat (ether extract) , %	6.5
Fat (acid hydrolysis) , %	7.5
Cholesterol, ppm	280
Linoleic Acid, %	1.37
Linolenic Acid, %	0.09
Arachidonic Acid, %	0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.29
Total Saturated Fatty Acids, %	2.51
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	2.32
Fiber (Crude) , %	3.8
Neutral Detergent Fiber ³ , %	11.3
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	4.0

Nitrogen-Free Extract

(by difference), %	49.4
Starch, %	34.9
Glucose, %	0.22
Fructose, %	0.24
Sucrose, %	2.57
Lactose, %	0.39
Total Digestible Nutrients , %	81.2
Gross Energy, kcal/gm	4.15
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.50
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.31

Minerals

Ash , %	6.8
Calcium, %	1.00
Phosphorus, %	0.65
Phosphorus (non-phytate), %	0.42
Potassium, %	1.10
Magnesium, %	0.20

Sulfur, %	0.24
Sodium, %	0.28
Chlorine, %	0.48
Fluorine, ppm	19
Iron, ppm	230
Zinc, ppm	73
Manganese, ppm	71
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.4
Iodine, ppm	0.8
Chromium, ppm	1.4
Selenium, ppm	0.23

Vitamins

Carotene, ppm	4.0
Vitamin K (as menadione), ppm	3.2
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	5.0
Niacin, ppm	109
Pantothenic Acid, ppm	15
Choline Chloride, ppm	2000
Folic Acid, ppm	3.0
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.20
B ₁₂ , mcg/kg	20
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D, (added), IU/gm	3.3
Vitamin E, IU/kg	55
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Calories provided by:

Protein, %	26.849
Fat (ether extract), %	16.710
Carbohydrates, %	56.441

***Product Code**

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

