

Evaluación de las características probióticas de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilados de pulpa de café.

Serrano-Casas, V.^a, Gaime, I.^b, Pérez-Chabela, M.L., ^{a,*}

a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, Ciudad de México. CP 55210, México. *lpch@xanum.uam.mx

b Institut de recherche pour le développement, Le Sextant 44, bd de Dunkerque, CS 90009, 13572 Marseille cedex 02.

RESUMEN:

Se evaluaron las propiedades probióticas de cinco cepas de bacterias ácido lácticas, aisladas previamente de ensilados de café. Se observó un buen perfil probiótico de las cepas evaluadas al ser sometidas a condiciones gástricas e intestinales *in vitro*, además de cumplir con la sensibilidad a antibióticos y mostrar buenos resultados en las pruebas de adhesión *in vitro*.

ABSTRACT:

Probiotic properties of five strains of lactic acid bacteria were evaluated, these were previously isolated from coffee silages. A good probiotic profile of the evaluated strains was observed when subjected to gastric and intestinal conditions *in vitro*, in addition to complying with the non-resistance to antibiotics and showing good results in adhesion tests *in vitro*.

Palabras clave:

Bacterias ácido lácticas, lactic acid bacteria, probióticos, probiotics, alimentos funcionales, functionally foods, propiedades probióticas, probiotic properties.

Área:

Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas han tenido una participación fundamental en los procesos de fermentación de alimentos tradicionales desde hace miles de años, ya que además de transformar las propiedades sensoriales de los alimentos al generar olores y sabores deseables, la reducción del pH y la presencia de éstas bacterias crean condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición; siendo un método de conservación fiable. Actualmente su uso en procesos fermentativos alimentarios a nivel industrial es de gran importancia debido a los metabolitos de interés producidos por éstas.

Metabólicamente, las bacterias ácido lácticas se dividen en dos grupos dependiendo de cómo transforman los carbohidratos que toman como sustrato: son homofermentativas cuando producen ácido láctico como metabolito principal (ruta Embden-Meyerhof-Parnas) y heterofermentativas cuando además producen ácido acético o etanol y dióxido de carbono (vía de las pentosas fosfato) (Axelsson, 2004).

En el ensilaje, que es un método de conservación a través de una fermentación ácido láctica espontánea en condiciones anaeróbicas, las bacterias ácido lácticas autóctonas del material a ensilar fermentan los carbohidratos solubles del forraje, produciendo principalmente ácido láctico y en menor grado, ácido acético (Stefanie *et al.* 1999). La composición microbiana de los ensilados es altamente variable a través de los cultivos y campos agrícolas ya que depende del tipo de planta y de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla. Dentro de los microorganismos homofermentativos presentes en los ensilados encontramos principalmente *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* y especies de *Pediococcus spp.*, y *Enterococcus spp.* En el caso de microorganismos heterofermentativos, *Lactobacillus buchneri* es la bacteria más representativa al producir ácido acético e inhibir levaduras y hongos que provocan calentamiento y pudrición del ensilaje (Muck & Jung, 1997).

Algunas cepas de bacterias ácido lácticas se han utilizado como probióticos debido a su resistencia al paso por el tracto gastrointestinal, así como la adhesión al epitelio y la prevención del crecimiento o la invasión de bacterias

patógenas en el intestino (Rivera y Gallardo, 2010). Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico sobre la salud del hospedero” (FAO/WHO, 2001). El objetivo del uso de bacterias probióticas es intentar restablecer las deficiencias en el ecosistema gastrointestinal, sin añadir nada que no esté presente bajo condiciones naturales (OMGE, 2008).

Para ser definido como un probiótico, un microorganismo debe poseer diversos atributos, incluyendo la seguridad para el consumo humano, la capacidad de sobrevivir el tracto gastrointestinal, adherirse a las células epiteliales intestinales y colonizar el intestino (Marteau *et al.*, 2001). La resistencia a la alta acidez gástrica y al medio intestinal permite que un mayor número de microorganismos beneficiosos viables alcancen el intestino inferior, que es el principal órgano diana de la acción probiótica (Bove *et al.*, 2013).

Evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilajes de café nos permite considerar su utilización como cultivos iniciadores en alimentos fermentados que además de propiciar las características organolépticas deseables, tendrán un alto valor agregado el cual esté enfocado a su funcionalidad en el sistema gastrointestinal, confiriendo beneficios al consumidor.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades probióticas de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilados de pulpa de café; previamente identificadas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Pediococcus pentosaceus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas de la determinación de propiedades probióticas fueron aplicadas a 5 cepas: *Pediococcus pentosaceus* L06, *Lactobacillus plantarum* L08, *Pediococcus pentosaceus* NAT5, *Lactobacillus plantarum* NAT38 y *Lactobacillus plantarum* K, usando como control positivo una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG de la colección Chr. Hansen.

Resistencia a condiciones gástricas

La tolerancia a pH bajo simulando los jugos gástricos, se evaluó siguiendo el método descrito por Conway *et al.*, (1987). Cada cepa a evaluada se cultivó en MRS a $35\pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche y se transfirió a caldo MRS fresco hasta que alcanzó una absorbancia de 0.8-1.0 (10^8 UFC/mL) a 600 nm. Los cultivos se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C , se lavaron una vez con solución buffer pH 7.2 y se concentraron por resuspensión en PBS. Estas suspensiones se usaron para evaluar la resistencia al estrés de condiciones gástricas. Con este fin, se administró 1 ml de la suspensión en una serie de volúmenes de 2 ml de PBS estéril pH 4, 3, 2 y 1, ajustados con HCl concentrado. La mezcla se mantuvo a 37°C y las bacterias viables se cuantificaron a las 0 h, 1 h y 3 h, realizando cuenta en placa en agar MRS.

Resistencia a condiciones intestinales

La capacidad de las cepas para crecer en presencia de bilis se determinó de acuerdo con el método de Walker y Gilliland (1993). Cada cepa se incubó en MRS suplementado con bilis porcina al 0.3% (p/v) (Sigma, Aldrich) a 37°C en un baño de agua. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la absorbancia a 620 nm, en intervalos de 0, 3, 6 y 9 h. Se estimó la tolerancia a la bilis de cada cepa como el tiempo requerido para que alcance una diferencia de 0.3 unidades de absorbancia, en presencia de bilis.

Resistencia a antibióticos

Se realizó el perfil de resistencia a 14 antibióticos usando el kit de discos Clairo Combo para bacterias Gram positivas (Accutrack, México) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los antibióticos analizados incluyen penicilina G (10 UI), amoxicilina (10 μg), cefalotina (30 μg), co-trimoxazol (25 μg), cefalexina (30 μg), cefazolina (30 μg), cefuroxima (30 μg), eritromicina (15 μg), cloranfenicol (30 μg), claritromicina (15 μg), ceftizoxima (30 μg), cefaloxina (30 μg), azitromicina (15 μg) y tetraciclina (30 μg). La suspensión estándar de McFarland 1 de cada una de las bacterias evaluadas, se inocularon en placas de agar Muller-Hinton (ISO, 2010).

Ensayos de hidrofobicidad

La determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana se realizó como se describe por Sánchez y Tromps (2014). Las cepas bacterianas a evaluar se cultivaron durante 10 h en caldo MRS a 37°C y después se transfirieron a caldo MRS fresco durante 7 h. Las células bacterianas se obtuvieron mediante centrifugación a 5000 x g durante 30 minutos y se lavaron dos veces con PBS (pH 7,2). La absorbancia a 560 nm se ajustó de 0,6-0,7. Se mezclaron volúmenes iguales de suspensión bacteriana e hidrocarburos (xileno y cloroformo) y se sometieron a agitación vigorosa en un vórtex durante 30 segundos. La fase acuosa se eliminó después de 1 h de incubación a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 560nm. La hidrofobicidad de cepas bacterianas se reporta como porcentaje de adhesión de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1: \% de Adhesión} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Donde A_0 y A son la absorbancia antes y después de la extracción con disolventes orgánicos. Las cepas se consideran fuertemente hidrófobas cuando los valores son $>60\%$, hidrófobas moderadas con valores en el rango de 40% a 60% e hidrófilas cuando los valores son $<40\%$ (Basson *et al.*, 2008).

Ensayo de autoagregación

La capacidad de autoagregación se midió según Collado *et al.*, (2008). Las células bacterianas se obtuvieron por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS (pH 7,2), y luego se resuspendieron en el mismo tampón. Se ajustó la absorbancia a $0.50 - 0.60 \pm 0,10$ en una longitud de onda de 600nm para estandarizar el número de bacterias (107-108 UFC/mL). A continuación, las suspensiones bacterianas se incubaron a temperatura ambiente y se monitorearon durante diferentes intervalos de tiempo (0 h, 2 h, 4 h, 20 h y 24 h). El porcentaje de autoagregación se expresa como (Ecuación 2):

$$\text{Ecuación 2: } A\% = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

Donde A_0 representa la absorbancia a 0 h y A_t representa la absorbancia a diferentes intervalos de tiempo (2 h, 4 h, 20 h y 24 h).

Ensayo de co-agregación

Las suspensiones bacterianas se prepararon como en la prueba de autoagregación descrita anteriormente. Se mezclaron volúmenes iguales de células (500 μ l) de las cepas probióticas y patógenas y se incubaron a temperatura ambiente sin agitación. Se monitoreó la absorbancia de las mezclas a 600nm durante diferentes tiempos (2 h, 4 h, 20 h y 24 h). La absorbancia se monitoreó para la mezcla y para las suspensiones bacterianas solas. La coagregación se calculó de acuerdo con la ecuación 3 propuesta por Malik *et al.*, (2013):

$$\text{Ecuación 3. } C\% = [(A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}}) - (A_{\text{mix}})] / [(A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}})] \times 100$$

Donde A_{pat} y A_{probio} representan la absorbancia de las suspensiones bacterianas independientes a 0 h y A_{mix} representa la absorbancia de la mezcla bacteriana en diferentes momentos probados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia a condiciones gástricas

En los alimentos fermentados, las BAL tienen la capacidad de crecer hasta valores de pH de 4.6 a 4.2 (Wacher, 2014); cuando éstos son consumidos, las bacterias presentes deben sobrevivir al estrés que implica el tránsito estomacal. El pH promedio del estómago es de 3.0 a 2.0 y durante la digestión, se genera un gradiente de pH que va desde 4.0 a valores de 1.8. Respecto al tiempo de tránsito del estómago al duodeno, el proceso se lleva a cabo en período de 2 a 3 h (Maragkoudakis *et al.*, 2006).

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos por cuenta en placa en agar MRS cuando las cinco cepas fueron sometidas a estrés gástrico a valores de pH 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0. Se evaluaron en intervalos de tiempos de 0, 1 y 3 horas.

Tabla 2. Supervivencia a diferentes valores de pH gástrico simulado

Condiciones de acidez	Tiempo (h)	Cuenta en placa (Log UFC/mL)					
		<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>
		Control	L06	L08	NAT5	NAT 38	K
pH 1	0	4.04 ± 0.07	7.79 ± 0.13	7.70 ± 0.13	7.26 ± 0.14	7.06 ± 0.12	6.96 ± 0.15
	1	4.00 ± 0.21	7.60 ± 0.21	5.63 ± 0.06	4.04 ± 0.06	6.02 ± 0.11	3.83 ± 0.11
	3	0.00 ± 0.00	4.30 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.60 ± 0.09	0.00 ± 0.00
pH 2	0	4.04 ± 0.21	7.94 ± 0.18	7.19 ± 0.26	6.90 ± 0.15	7.69 ± 0.25	8.51 ± 0.34
	1	4.60 ± 0.41	7.45 ± 0.07	6.99 ± 0.14	5.00 ± 0.36	6.15 ± 0.19	6.68 ± 0.22
	3	4.57 ± 0.08	6.62 ± 0.11	5.03 ± 0.28	2.90 ± 0.24	3.74 ± 0.05	2.00 ± 0.16
pH 3	0	7.95 ± 0.09	6.99 ± 0.04	7.48 ± 0.26	7.66 ± 0.08	7.44 ± 0.33	7.48 ± 0.03
	1	7.67 ± 0.16	6.40 ± 0.23	6.40 ± 0.09	6.15 ± 0.16	7.04 ± 0.16	6.25 ± 0.17
	3	6.18 ± 0.12	6.11 ± 0.14	5.73 ± 0.05	6.51 ± 0.11	7.55 ± 0.27	5.92 ± 0.24
pH 4	0	6.90 ± 0.09	7.93 ± 0.07	7.16 ± 0.23	7.42 ± 0.22	7.93 ± 0.11	6.90 ± 0.41
	1	6.88 ± 0.22	7.10 ± 0.16	7.08 ± 0.18	6.24 ± 0.05	5.93 ± 0.19	6.24 ± 0.26
	3	6.20 ± 0.07	6.16 ± 0.36	6.85 ± 0.09	6.27 ± 0.17	4.78 ± 0.27	6.05 ± 0.06

Se observó que las 5 cepas evaluadas tuvieron la capacidad de mantener su viabilidad entre el rango de 5-7 log UFC/mL después de tres horas expuestas a las condiciones de pH 4.0 y 3.0. La cepa NAT 38 presentó crecimiento hasta valores de 7.55 log UFC/mL a pH 3.0. Respecto a la resistencia a pH 2.0, las cepas aún mantienen buena viabilidad, como es el caso de L06 con valores de 7 log UFC/m, mientras NAT5 y K presentaron valores entre 3-2 log UFC/mL. Después de 3 horas en condiciones ácidas a pH 1.0, no todas las bacterias fueron capaces de sobrevivir, como fue el caso de las cepas L08, NAT5 y K.

En 2006 Maragkoudakis *et al.*, evaluaron la sobrevivencia de 21 bacterias ácido lácticas, llegando a pH 2.0 durante 3 horas; 21 cepas sobrevivieron entre valores de 3-4 log UFC/mL. Charteris *et al.*, (1988) obtuvieron valores de sobrevivencia de 7-3 log UFC/mL de 15 bacterias de los generos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuando fueron sometidas a un ambiente gástrico simulado a pH 2.0 durante 2 horas. Comparado con nuestros resultados, observamos buena resistencia por parte de las cepas L06, L08 y NAT38, incluso con valores más altos que el control positivo.

Resistencia a condiciones intestinales

Las sales biliares tienen un papel importante en los mecanismos de defensa del intestino, dependiendo su efecto inhibitor de la concentración de éstas (Charteris *et al.*, 1998). En el intestino delgado, el obstáculo para la supervivencia de los probióticos son las sales biliares. De acuerdo con Dunne *et al.*, (2001), las concentraciones fisiológicas de la bilis humana van del 0.3% al 0.5%.

Se evaluó el efecto del 0.3% de sal biliar sobre el crecimiento de las cepas L06, L08, NAT 5, NAT 38 y K. La tabla 3 muestra los datos obtenidos en los ensayos a diferentes intervalos de tiempo. Tabla3

Tabla 3. Crecimiento bacteriano en presencia de sales biliares

Cepa	Absorbancia (620nm)			
	0h	3 h	6h	9h
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.0145 ± 0.005	0.0285 ± 0.003	0.0915 ± 0.03	0.325 ± 0.021
<i>P. pentosaceus</i> L06	0.016 ± 0.009	0.109 ± 0.01	1.073 ± 0.005	1.331 ± 0.007
<i>L. plantarum</i> L08	0.0145 ± 0.001	0.152 ± 0.012	0.934 ± 0.014	1.4065 ± 0.016
<i>L. plantarum</i> NAT 5	0.024 ± 0.004	0.1425 ± 0.009	1.155 ± 0.009	1.3955 ± 0.024
<i>P. pentosaceus</i> NAT 38	0.0345 ± 0.000	0.12 ± 0.013	1.1755 ± 0.011	1.538 ± 0.005
<i>L. plantarum</i> K	0.0235 ± 0.007	0.1545 ± 0.004	1.169 ± 0.05	1.379 ± 0.008

Se observa que todas las cepas fueron capaces de crecer tanto en MRS como en MRS suplementado con bilis al 0.3% (p / v). En el caso de L06, NAT 5, NAT 38 y K la presencia de bilis no afecta el crecimiento de estas cepas. Se sabe que el estrés gástrico es el paso más crítico que debe resistir una bacteria probiótica en comparación con el tracto intestinal que inicia en el duodeno hasta llegar al intestino delgado, donde incluso aquellas bacterias dañadas, pueden recuperarse (Maragkoudakis *et al.*,2006).

Resistencia a antibióticos

Los antibiogramas disco-placa es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiótico impregnado en un disco de papel difunde radialmente a través del espesor del agar y forma un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución (Picazo, 2000).

Comparando los diámetros del halo de inhibición con las CMIs, se han fijado tres categorías para clasificar a las cepas estudiadas: sensible (S), intermedia (I) y resistentes (R). Por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes.

En la tabla 4 se muestran la categoría obtenida para cada una de las cepas a los 14 antibióticos que contiene el kit (ISO, 2010).

Tabla 4. Clasificación de resistencia-sensibilidad de las cepas en estudio contra 14 antibióticos usando el kit Clairo Combo Disk para bacterias Gram positivas.

Antibióticos (dosis)	Clasificación NCCLS					
	<i>L. rhamnosus</i> GG Control	<i>P. pentosaceus</i> L06	<i>L. plantarum</i> m L08	<i>L. plantarum</i> m NAT5	<i>P. pentosaceus</i> NAT 38	<i>L. plantarum</i> K

Amoxicilina/Ácido clavulónico	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina [10 µg]	S	S	S	S	S	S
Azitromicina [15 µg]	S	S	S	R	S	I
Cloranfenicol [30 µg]	S	S	S	S	S	S
Cefalexina [30 µg]	S	I	I	S	S	S
Cefaxolin [30 µg]	S	S	S	I	S	S
Ciprofloxacina [5 µg]	S	S	S	S	I	S
Eritromicina [15 µg]	S	I	I	S	S	S
Ofloxacina [5 µg]	S	S	S	S	S	S
Penicilina – G [10 IU]	S	S	S	S	S	S
Piperaciclina [100 µg]	S	S	I	S	R	S
Cotrimazol [25 µg]	S	S	S	S	S	I
Tetraciclina [30 µg]	S	S	S	S	S	S
Cefuroxima	S	S	S	S	S	S

La resistencia a antibióticos es un factor muy importante en la evaluación de bacterias ácido lácticas como cepas probióticas, ya que al ser microorganismos que se espera sean utilizados como cultivos iniciadores en alimentos, deben ser seguros en los alimentos y durante su uso clínico en individuos inmunodeficientes, por lo que se busca que se les otorgue la clasificación GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (Dunne *et al.*, 2001; Tannock, 1998).

Se comprobó que la cepa probiótica control *Lactobacillus rhamnosus GG* es una bacteria segura para el consumo humano, al presentar sensibilidad a todos los antibióticos evaluados. Las cepas L06, L08, y K mostraron ser sensibles a la gran mayoría de los antibióticos, excepto por algunos rangos intermedios de sensibilidad. En el caso de NAT 5 con azitromicina y N38 con piperaciclina, estos presentaron resistencia al tener halos de inhibición menores a 15 mm. Algunas veces, un inóculo demasiado denso puede generar halos de inhibición pequeños, además de otros factores como el deterioro del antibiótico, una contaminación, agar demasiado profundo o incluso tener un aislamiento resistente (Picazo, 2000). Es importante evaluar otros ensayos para determinar con mayor precisión la seguridad de las bacterias evaluadas en este trabajo, como podría ser la actividad hemolítica.

Pruebas de hidrofobicidad

La actividad de hidrofobicidad *in vitro* de las cepas de BAL se clasifica como alta (51-100%), media (30- 50%) y baja (0-29 %) (Sanchez y Tromps, 2014). Los resultados correspondientes de las cepas evaluadas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de adhesión de las cepas seleccionadas usando dos tipos de hidrocarburos: cloroformo y xileno.

Cepa	% de Adhesión en cloroformo	% de Adhesión en xilenos
<i>L. rhamnosus GG</i>	66.65 ± 8.49	60.97 ± 0.27
<i>P. pentosaceus L06</i>	49.59 ± 0.23	50.82 ± 1.29
<i>L. plantarum L08</i>	47.68 ± 5.46	41.50 ± 3.08
<i>L. plantarum NAT 5</i>	62.34 ± 3.26	60.69 ± 2.79
<i>P. pentosaceus NAT 38</i>	70.00 ± 0.32	66.62 ± 4.47
<i>L. plantarum K</i>	76.14 ± 8.54	68.56 ± 4.06

Las características físicoquímicas de la pared celular bacteriana, y la naturaleza de la superficie a la que se adhiere, influyen sobre los fenómenos de autoagregación y adhesión. Sanchez y Tromps (2014), evaluaron los porcentajes de hidrofobicidad de 5 bacterias ácido láctico de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* con valores de hidrofobicidad del 82-91% que se consideran como altos, mientras para la cepa de *Pediococcus*, obtuvieron valores de 10-11% que se considera como valores bajos.

Se observó que la cepa control, NAT5, NAT38 y K son consideradas con una hidrofobicidad alta al tener porcentajes mayores a 51%, mientras las cepas L06 y L08 presentan valores intermedios al tener porcentajes de adhesión menores al 50%. Un fuerte carácter hidrofóbico de la superficie celular, contribuye a la probabilidad de que exista una interacción de las BAL con las células del tracto gastrointestinal (Basson y col., 2008).

Autoagregación

La autoagregación bacteriana es de considerable importancia en varios nichos ecológicos, especialmente en el intestino humano donde los probióticos deben estar activos (Jankovic y col., 2003). La capacidad de autoagregación de las cepas probióticas parece ser una exigencia necesaria para lograr la adhesión a las células epiteliales del intestino, ocupando lugares específicos para evitar la potencial colonización por microorganismos patógenos, por lo que es un importante criterio de selección de probióticos. El mecanismo de autoagregación fue previamente referido a los lactobacilos y se describe que las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo y las proteínas y lipoproteínas localizadas en la superficie de las células están involucradas en la agregación (Collado y col., 2008).

En la tabla 7 se muestran los resultados de autoagregación para las 5 cepas evaluadas y para las dos cepas patógenas utilizadas: *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus* a diferentes intervalos de tiempo.

Tabla 6. Porcentajes de Autoagregación a diferentes intervalos de tiempo

Cepa	Autoagregación (%)			
	2h	4h	20h	24h
<i>L. rhamnosus</i> GG	6.14 ± 0.23	8.53 ± 2.01	48.63 ± 2.11	69.11 ± 0.55
<i>P. pentosaceus</i> L06	16.89 ± 4.05	20.10 ± 3.04	75.17 ± 0.22	94.93 ± 1.32
<i>P. pentosaceus</i> L06L08	8.24 ± 0.34	17.45 ± 1.21	91.92 ± 0.34	92.25 ± 0.81
<i>L. plantarum</i> NAT 5	4.48 ± 1.04	6.30 ± 0.84	65.17 ± 1.93	87.23 ± 1.73
<i>P. pentosaceus</i> NAT 38	6.11 ± 1.03	20.82 ± 0.45	72.49 ± 0.83	88.65 ± 0.06
<i>L. plantarum</i> K	1.37 ± 0.5	2.90 ± 0.31	71.50 ± 0.25	75.09 ± 2.31
<i>S. aureus</i>	1.90 ± 0.23	2.25 ± 0.31	68.17 ± 2.15	70.19 ± 0.42
<i>S. enterica</i>	2.88 ± 0.93	6.22 ± 0.08	80.58 ± 1.42	81.79 ± 1.67

En general, las cepas evaluadas mostraron una mayor capacidad de autoagregación, como es el caso de L06 con 94.93% y L08 con 92.25%, en contraste con las cepas de los patógenos e incluso de la cepa control después de 20 horas de incubación. Basson *et al.*, (2008) evaluaron la autoagregación de 12 bacterias lácticas, obteniendo porcentajes de 18-43%, mientras que para las bacterias patógenas, obtuvo valores de hasta 71.9%. Comparando estos resultados, las bacterias lácticas evaluadas tienen porcentajes de autoagregación altos, lo cual es un parámetro necesario para lograr la adhesión a las células epiteliales del intestino, ocupando lugares específicos para evitar la potencial colonización por microorganismos patógenos, (Sanchez y Tromps, 2014).

Co-agregación

La capacidad de co-agregación de cepas probióticas con patógenos intestinales potenciales es un parámetro específico que se ha observado en todos los casos después de 20 h de incubación. Las cepas BAL analizadas muestran valores de hasta 80% de co-agregación (ver tabla 7), sin embargo, este porcentaje de coagulación es específico de cada cepa y depende del tiempo y la incubación.

Collado *et al.*, (2008) obtuvo valores del 3-7% de co-agregación después de dos horas de interacción bacteria láctica-patógeno durante 2 horas. En el caso de las bacterias que evaluamos, los porcentajes de co-agregación son mayores al 50% y llegan en algunos casos arriba del 70% después de 24 horas con cepas como NAT5 y K. Basson *et al.*, 2008, también evaluaron la co-agregación de 12 cepas de BAL con bacterias patógenas después de 2 horas, encontrando porcentajes que van del 10-59%.

Las interacciones de autoagregación se potencian por una mayor hidrofobicidad y tienden a ser más fuertes que la co-agregación. La co-agregación ocurre a menudo entre las bacterias que son taxonómicamente distantes (co-agregación intergenérica) y ocasionalmente entre las cepas que pertenecen a la misma especie (co-agregación intraespecie) (Rickard *et al.*, 2004).

Tabla 7. Porcentajes de co-agregación a diferentes intervalos de tiempo

Cepa mix	Co-agregación (%)				
	0h	2h	4h	20h	24h
<i>L. rhamnosus</i> GG / <i>S. aureus</i>	51.03 ± 2.10	58.46 ± 0.45	58.04 ± 0.51	75.46 ± 0.12	70.29 ± 1.50
<i>P. pentosaceus</i> L06 / <i>S. aureus</i>	52.91 ± 1.08	56.00 ± 0.91	54.24 ± 0.76	58.01 ± 3.21	69.35 ± 2.24
<i>L. plantarum</i> L08 / <i>S. aureus</i>	53.72 ± 0.17	57.53 ± 1.48	47.40 ± 0.04	56.84 ± 0.43	56.22 ± 1.16
<i>L. plantarum</i> NAT 5 / <i>S. aureus</i>	48.09 ± 0.53	58.44 ± 0.35	56.90 ± 1.53	74.87 ± 3.12	70.33 ± 0.46
<i>P. pentosaceus</i> NAT38/ <i>S. aureus</i>	51.62 ± 1.50	54.79 ± 0.06	52.84 ± 3.22	52.28 ± 0.88	21.46 ± 2.13
<i>L. plantarum</i> K/ <i>S. aureus</i>	54.98 ± 0.88	62.97 ± 1.03	64.55 ± 0.73	78.06 ± 0.32	80.63 ± 1.03
<i>L. rhamnosus</i> GG / <i>S. enterica</i>	52.69 ± 0.94	55.29 ± 2.20	57.63 ± 1.17	40.09 ± 0.46	29.57 ± 1.53
<i>P. pentosaceus</i> L06/ <i>S. enterica</i>	55.24 ± 2.02	56.18 ± 1.16	58.39 ± 2.21	76.36 ± 0.52	48.67 ± 2.31
<i>L. plantarum</i> L08/ <i>S. enterica</i>	55.40 ± 0.62	56.71 ± 0.85	47.21 ± 1.73	39.89 ± 2.18	41.07 ± 1.17
<i>L. plantarum</i> NAT 5/ <i>S. enterica</i>	53.17 ± 1.21	58.63 ± 0.49	58.50 ± 0.34	74.85 ± 1.57	71.07 ± 0.61
<i>P. pentosaceus</i> NAT38/ <i>S. enterica</i>	51.93 ± 0.47	53.15 ± 2.14	52.84 ± 2.40	27.13 ± 1.31	15.15 ± 0.48
<i>L. plantarum</i> K/ <i>S. enterica</i>	56.55 ± 2.13	58.70 ± 0.95	60.32 ± 4.04	78.64 ± 0.74	73.68 ± 1.93

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que las cepas seleccionadas poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probiótico: resistencia a condiciones gástricas simuladas durante un intervalo de 3h, tolerancia a 0.3% de concentración de sales biliares, sensibilidad a antibióticos, propiedades hidrofóbicas altas y con buenos porcentajes de agregación y co-agregación, relacionadas con su capacidad al epitelio intestinal.

Cabe destacar que la clasificación de una bacteria láctica con potencial probiótico necesita diversas pruebas para determinar su efectividad y seguridad, por lo que es importante completar la caracterización con estudios *in vivo* para evaluar su efecto benéfico.

BIBLIOGRAFÍA

- Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Clasification and Physiology*. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. Third edition, Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, USA, 18-37.
- Basson, A., Fleming, L. A. and Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of the adherence, hydrophobicity, aggregation and biofilm development of *Flavobacterium jhonsoniae*-like isolates. *Microb Ecol*, 37: 1-14.
- Bove P, Russo P, Capozzi V, Gallone A, Spano G, Fiocco D (2013) *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiol Res* 168: 351–359.
- Collado, M. C., Meriluoto, J. and Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. *J Microbiol Methods*, 71: 71-74.
- Conway. P. L., Gorbach, S. L. and Golding, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*, 70: 1-12.
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23(1):130-135.
- Dunne, C., O' Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O' Halloran, S., Feebney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*, 73: 386S-392S.
- FAO/WHO. (2001). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
- Garvie, E.I, and L.A. Mabbitt (1967). Stimulation of the grow of *leuconostoc oenos* by tomato juice. *Arch. Microbiol*. 55:398-407.
- Hayward, A.C. (1957). Detection of Gas Production from Glucose by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria, *J. gen. Microbiol*. 16, 9-15.
- ISO, 2010. 10932:2010 (IDF 223:2010) Milk and milk products – determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB). *Int. Organ. Stand* 1–31 ICS: 67.100.01.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., Zink, R., (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J. Bacteriol*. 185, 3288–3296.
- Mac Faddin J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición Médica Panamericana, S. A. De C. V. México.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Susuzi, T., Tochigi, M. and Kakki, K. (2003). Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Appl Environ Microbiol*, 69: 6056-6063.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis In't Veld, J.H. (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 80:1031–1037.
- Muck, R.E., and L. Kung, Jr. (1997). Effects of silage additives on ensiling, p. 187-199 *Silage: Field to Feedbunk*, Vol. NRAES-99.
- OMGE (2008). Probióticos y prebióticos. España: *World Gastroenterology Organization*.
- Picazo, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos de microbiología clínica*. 9-17
- Rickard, AH, McBain, AJ, Stead, AT, Gilbert, P (2004) Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70: 7426–7435.
- Rivera, Y., Gallardo, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology Journal*, 27:1–11.
- Stefanie J.O. WE. Driehuis, J. Gottscha, S. Spoelstra (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. FAO. Institute for Animal Science and health (ID-DLO). Pp. 3-15.
- Sánchez, L. and Tromps, J. (2014). Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim*, 2: 124-129.
- Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria Antigua: los alimentos fermentados. *Revista digital universitaria*, Vol. 15, Núm. 8.
- Walker, D. K. and Gilliland, S. E. (1993). Relationship among bile tolerance, bile salt be conjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, 76: 956-961.