

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la
Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico
de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Cepas autóctonas de *Lactobacillus* aisladas de neonatos santafesinos
para el desarrollo de alimentos probióticos. Aspectos tecnológicos.
Herramientas moleculares para su detección en alimentos.**

Lic. Verónica Gregoret

Director: Dra. Ana Binetti

Co-Director: Dr. Gabriel Vinderola

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

A mi família.....

Índice

Abreviaturas, siglas y símbolos	1
Resumen	3
Introducción	6
1. Microbiota del tracto gastrointestinal	6
1.1 <i>Evolución de la microbiota intestinal durante la vida</i>	9
2. Inmunidad de la mucosa gastrointestinal	12
3. Las bacterias lácticas	13
3.1 <i>Relevancia del género Lactobacillus</i>	14
3.2 <i>Herramientas moleculares para identificación de Lactobacillus</i>	17
4. Alimentos funcionales	20
5. Selección de cepas destinadas a la elaboración de productos probióticos	27
5.1 <i>Criterios de seguridad</i>	28
5.2 <i>Criterios tecnológicos</i>	30
5.3 <i>Criterios fisiológicos</i>	31
5.3.1 <i>Tolerancia a acidez gástrica y a sales biliares</i>	32
5.3.2 <i>Adherencia al epitelio intestinal</i>	32
5.4 <i>Criterios probióticos o de funcionalidad</i>	33
5.4.1 <i>Ejemplo de efectos probióticos</i>	33

6. La problemática del manejo industrial de las bacterias probióticas	36
6.1 <i>Técnicas de recuento de células viables</i>	36
6.2 <i>Sobrevida de las bacterias probióticas en los productos lácteos</i>	37
Objetivos	40
Objetivo general	40
Objetivos particulares	40
Materiales y Métodos	41
1. Cepas utilizadas	41
1.1 <i>Origen</i>	41
1.2 <i>Condiciones de cultivo y conservación</i>	42
2. Identificación de las cepas y análisis de su diversidad genética .	42
2.1 <i>Extracción de ADN total</i>	42
2.2 <i>Secuenciación de un fragmento del gen 16S ADN_r</i>	43
2.3 <i>Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR)</i>	44
3. Detección e identificación de cepas en matrices alimentarias mediante técnicas moleculares	44
3.1 <i>Extracción de ADN total a partir de productos comerciales</i>	44
3.2 <i>Detección e identificación de las cepas en diferentes matrices alimentarias</i>	45
4. Capacidad de desarrollo de las cepas en diferentes medios de cultivo	46

5. Desarrollo en medios de cultivos selectivos/diferenciales para el recuento de bacterias probióticas	49
6. Resistencia a factores de estrés tecnológicos	49
6.1 <i>Tolerancia a la acidez láctica durante el almacenamiento refrigerado y resistencia a barreras gastrointestinales</i>	49
6.2 <i>Viabilidad de concentrados congelados a -20°C y -70°C durante el almacenamiento a largo plazo (12 meses)</i>	51
6.3 <i>Tolerancia a sales (NaCl y KCl)</i>	51
7. Resistencia a barreras biológicas. Digestión gastrointestinal simulada: acidez gástrica, resistencia a bilis-pancreatina	52
8. Seguridad y funcionalidad <i>in vitro</i>	53
8.1 <i>Seguridad: resistencia a antibióticos</i>	53
8.2 <i>Funcionalidad: hidrofobicidad superficial</i>	54
9. Seguridad y funcionalidad <i>in vivo</i>	55
9.1 <i>Animales</i>	55
9.2 <i>Administración oral de las cepas en estudio</i>	55
9.3 <i>Seguridad: traslocación bacteriana</i>	56
9.4 <i>Seguridad: examen histológico de la mucosa intestinal</i>	56
9.5 <i>Funcionalidad: ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales</i>	57
9.6 <i>Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino</i>	57
10. Análisis estadístico	58

Resultados	59
1. Identificación de las cepas y análisis de su diversidad genética .59	
1.1 <i>Secuenciación de un fragmento del gen 16S ADN_r</i>	59
1.2 <i>Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR)</i>	62
2. Detección e identificación de cepas en matrices alimentarias mediante técnicas moleculares	64
3. Capacidad de desarrollo de las cepas en diferentes medios de cultivo	68
4. Desarrollo en medios de cultivos selectivos/diferenciales para el recuento de bacterias probióticas	74
5. Resistencia a factores de estrés tecnológico	75
5.1 <i>Tolerancia a la acidez láctica durante el almacenamiento refrigerado y resistencia a barreras gastrointestinales</i>	75
5.2 <i>Viabilidad de concentrados congelados a -20°C y -70°C durante el almacenamiento a largo plazo (12 meses)</i>	81
5.3 <i>Tolerancia a sales (NaCl y KCl)</i>	86
6. Resistencia a barreras biológicas. Digestión gastrointestinal simulada: acidez gástrica, resistencia a bilis-pancreatina	86
7. Seguridad y funcionalidad <i>in vitro</i>	92
7.1 <i>Seguridad: resistencia a antibióticos</i>	92
7.2 <i>Funcionalidad: hidrofobicidad superficial</i>	93
8. Seguridad y funcionalidad <i>in vivo</i>	94
8.1 <i>Seguridad: traslocación bacteriana</i>	94
8.2 <i>Seguridad: examen histológico de la mucosa intestinal</i>	94

8.3	<i>Funcionalidad: ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales</i>	96
8.4	<i>Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado</i>	97
8.5	<i>Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lamina propia de intestino grueso</i>	99
Discusión		101
Conclusiones		125
Bibliografía		128

Abreviaturas, siglas y símbolos

ADN	Acido Desoxi-Ribonucleico
ADNr	Acido Desoxi-Ribonucleico ribosomal
ARDRA	Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)
ARN	Acido Ribonucleico
ARNr	Acido Ribonucleico ribosomal
BAL	Bacterias Acido Lácticas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)
dNTP	deoxi-Nucleótidos Trifosfato
DO	Densidad Optica
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetra Acético
EL	Extracto de Levadura
GALT	Tejido Linfoide Asociado a Intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue)
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro (Generally Recognized as Safe)
IgA	Inmunoglobulina A
ILSI	Instituto Internacional de la Vida y la Ciencia (Internacional Life and Science Institute)
Kpb	Kilopares de bases
λ	Longitud de onda
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/World Health Organization
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PP	Placas de Peyer
RAPD	Amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
RNAsa	Ribonucleasa
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SS	Solución Salina
TGI	Transito Gastro Intestinal
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminoetano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

UV

Ultravioleta

Resumen

Durante la primera mitad de la década del '90, la industria láctea argentina se sumó a la tendencia mundial del agregado de bacterias aisladas del intestino humano, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (grupo *L. acidophilus*/grupo *L. casei*) y *Bifidobacterium*, denominadas comúnmente "probióticos". Según la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen efectos benéficos sobre el consumidor". Existe en el mundo un gran número de estas cepas que se utilizan en una enorme variedad de productos lácteos y no lácteos, las cuales poseen efectos benéficos científicamente demostrados. En nuestro país se comercializan varias líneas de productos que contienen bacterias probióticas, como por ejemplo Leche SanCor BIO, Actimel, Activia, Yakult, Yogurísimo con Probio2, entre otros, siendo solamente la Leche SanCor BIO el único producto íntegramente desarrollado a partir de cepas de bacterias probióticas aisladas y caracterizadas en nuestro país. Todos los demás productos contienen cepas comerciales probióticas de importación, aisladas y caracterizadas en el extranjero.

Dentro de los objetivos de este trabajo de Tesis se propuso caracterizar cepas autóctonas de *Lactobacillus* (*L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64, *L. gasseri* 37) aisladas de neonatos santafesinos para ser empleadas como cultivos probióticos en alimentos funcionales. Para ello, se adecuaron herramientas moleculares para la detección de su presencia en diversos productos alimenticios, se evaluó su aptitud para desarrollar en diferentes medios de cultivo, su resistencia a factores de estrés tecnológico, su resistencia a barreras biológicas, así como su seguridad y funcionalidad *in vitro* e *in vivo*.

Se demostró que las cepas en estudio presentaron perfiles genéticos claramente diferentes a los de las cepas comerciales y de colección utilizadas

como referencia y se las pudo detectar e identificar en distintas matrices alimentarias.

Cuando se evaluó la performance tecnológica, las tres cepas mostraron un comportamiento similar, siendo capaces de desarrollar en leche, suero de queso y suero de manteca, cuando los medios fueron suplementados (0,3 % p/v) con extracto de levadura, alcanzando niveles cercanos a 10^9 UFC/ml. Estudios de sobrevivencia de las cepas en estos tres medios a -20 y -70°C , evidenciaron que el comportamiento fue muy dependiente de la cepa estudiada. No obstante, en todos los casos, -70°C fue la temperatura más adecuada para su conservación. En presencia de sales (NaCl y KCl) se registraron niveles de crecimiento comparables con los obtenidos en el medio control, indicando que, en principio, estas cepas podrían ser exitosamente incorporadas a diferentes variedades de quesos.

Los resultados del estudio de resistencia a la acidez gástrica durante el almacenamiento refrigerado, mostraron una adecuada sobrevivencia de las cepas en leche acidificada a 5°C y durante 30 días de almacenamiento, sugiriendo que las características fisicoquímicas de las leches fermentadas las hace, en general, un vehículo adecuado para asegurar su viabilidad.

En cuanto al estudio de los criterios de seguridad *in vitro*, la respuesta resultó variable, resultando *L. gasseri* 37 la cepa más sensible frente a los 5 antibióticos ensayados.

Al evaluar los criterios de seguridad y funcionalidad *in vivo*, las 3 cepas mostraron ser seguras en las concentraciones ensayadas, y capaces de estimular el sistema inmune a través de la activación de macrófagos peritoneales y del aumento de células productoras de IgA en intestino.

De este modo, y siguiendo los principales criterios de selección de

bacterias probióticas propuestos por la Organización Mundial de la Salud, se avanzó en una caracterización preliminar *in vitro* e *in vivo* de cepas autóctonas con vistas a profundizar los estudios para su posible empleo como cultivos probióticos en alimentos funcionales. Cada una de las cepas evidenció, en mayor o menor medida, aptitud en las diferentes características evaluadas. En particular, *L. gasseri* 37 demostró poseer la mayor capacidad de resistir a la digestión gástrica simulada, sensibilidad a todos los antibióticos y capacidad de estimular la respuesta inmune, lo cual la posicionaría como una cepa de elección para evaluar el efecto de parámetros tecnológicos combinados sobre la funcionalidad, una vez incluida la cepa en una matriz alimentaria.

Introducción

1. Microbiota del tracto gastrointestinal

Durante la vida intrauterina, el ser humano se encuentra protegido por un ambiente fisiológicamente adecuado y estéril. Sin embargo, el tracto gastrointestinal (TGI) del neonato es masivamente colonizado mediante un proceso gradual que evoluciona rápidamente durante los primeros días de vida, y continúa variando cuantitativa y cualitativamente durante los dos primeros años (Kliegler y col., 2007). Los microorganismos que colonizan inicialmente el tracto intestinal del neonato (provenientes de las mucosas maternas, consecuencia del paso por el canal vaginal, el contacto con la piel, el ambiente y la leche materna) son, principalmente, enterobacterias, estreptococos y estafilococos, seguidos en orden de preponderancia por bifidobacterias (Rotimi y Duerden, 1981; Tannock, 1995; Mackie, 1999; Walker, 2002). Luego del parto, el establecimiento de la microbiota intestinal resulta progresivo, representando la primera fuente de estímulo microbiano para la maduración normal del sistema inmune (Rautava y col., 2006) y contribuyendo a su desarrollo en la infancia y al control de la homeostasis inmunológica durante el resto de la vida (Rautava y col., 2002). Durante el primer año de vida, la composición de la microbiota intestinal se mantiene relativamente estable, si bien dicho equilibrio puede ser afectado por el tiempo de tránsito de los alimentos (variable para cada individuo) y la dieta, entre otros factores. Considerando cada nicho en particular, la cavidad bucal y el colon tienden a ser los más estables en cuanto a la composición de su microbiota, siendo el íleon (la porción terminal del intestino delgado) el menos estable, probablemente debido a una fuerte competencia entre las bacterias allí presentes, ya sea por los nutrientes o nichos ecológicos (Guarner, 2006). Si bien la microbiota

del tracto intestinal humano muestra una respuesta adaptativa y dinámica, la inducción de una modificación permanente de la composición de la microbiota intestinal ya establecida, resulta poco probable. En cambio, sería más factible modificar la microbiota intestinal en infantes, cuyas comunidades microbianas son relativamente simples (Ashwell, 2002; Gueimonde y col., 2011).

La microbiota del TGI humano se caracteriza por su gran diversidad poblacional y por la complejidad de sus interacciones. Según los métodos clásicos (dependientes de cultivo), está integrada por más de 400 especies diferentes, incluyendo tanto bacterias anaerobias facultativas como anaerobias estrictas (Conway, 1995; Walker; 2002; Guarner, 2006). Actualmente, gracias a la aplicación de técnicas moleculares basadas en la subunidad 16S del ADNr, se ha incrementado notablemente el conocimiento sobre el número de especies bacterianas constituyentes de la microbiota de este nicho ecológico, alcanzando valores superiores a 1000 (Zoetendal y col., 2006). De este modo, la microbiota intestinal constituye un verdadero ecosistema que varía a lo largo del TGI, tanto en número como en la composición de las especies (Fig. 1) (Guarner, 2006). En la cavidad bucal, la primera porción del TGI, la microbiota está constituida mayoritariamente por estreptococos y lactobacilos. Estos microorganismos llegan al esófago a través de la saliva y los alimentos y desde allí al estómago, donde la acidez gástrica – la primera barrera antimicrobiana – los inactiva en su mayor proporción. Estas condiciones determinan que la microbiota del estómago resulte integrada por un bajo nivel ($<10^3$ UFC/g) de bacterias Gram positivas, capaces de resistir la acidez extrema de este ambiente (valores de pH que oscilan entre 1,6 y 3,2). En la primera porción del intestino delgado, el duodeno, el pH es relativamente ácido (entre 5 y 7) para controlar parcialmente la incidencia de

microorganismos patógenos que puedan ingresar con la dieta. Como consecuencia, la microbiota preponderante es similar, en cantidad y composición, a la del estómago. En el yeyuno, en cambio, disminuye la acidez debido a la dilución de los ácidos y sales biliares, estableciéndose un medio alcalino (pH entre 7 y 9) que facilita la colonización bacteriana. La microbiota presente en el yeyuno y el íleon se incrementa progresivamente, desde valores cercanos a 10^5 UFC/g (yeyuno) hasta 10^8 UFC/g (extremo ileal). Contrariamente a lo que ocurre en los primeros tramos del TGI, en el intestino grueso, el tiempo de tránsito es lento, lo que posibilita la proliferación de los microorganismos, mediante el metabolismo de los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas. De este modo, este nicho se halla densamente poblado, fundamentalmente por microorganismos anaerobios (bacteroides, eubacterias, bifidobacterias y peptoestreptococos) y en menor medida enterobacterias, estreptococos y lactobacilos (Walker, 2002; Guarner, 2006). Estas bacterias se establecen principalmente en el colon, alcanzando niveles cercanos a 10^{10} - 10^{11} UFC/g, estando representadas por entre 500 y 2000 especies bacterianas (Eckburg y col., 2005), de las cuales 50-60 especies constituyen el 90% de la población total (Sonnenburg y col., 2004; Guarner, 2006). Los géneros predominantes son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* y diversos cocos gram-positivos anaeróbicos y, en menor proporción, *Enterococcus* (Guarner y col., 2003). Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* representan el 1 % y entre el 6 y el 11 %, respectivamente, de la flora intestinal de individuos adultos sanos (Walker y col., 1993). Cada individuo se caracteriza por una combinación particular de especies predominantes y subdominantes en su microbiota intestinal, que lo diferencia claramente de la microbiota de otros sujetos. En este sentido, la

especificidad de la microbiota intestinal resulta comparable a las huellas dactilares (Ashwell, 2002).

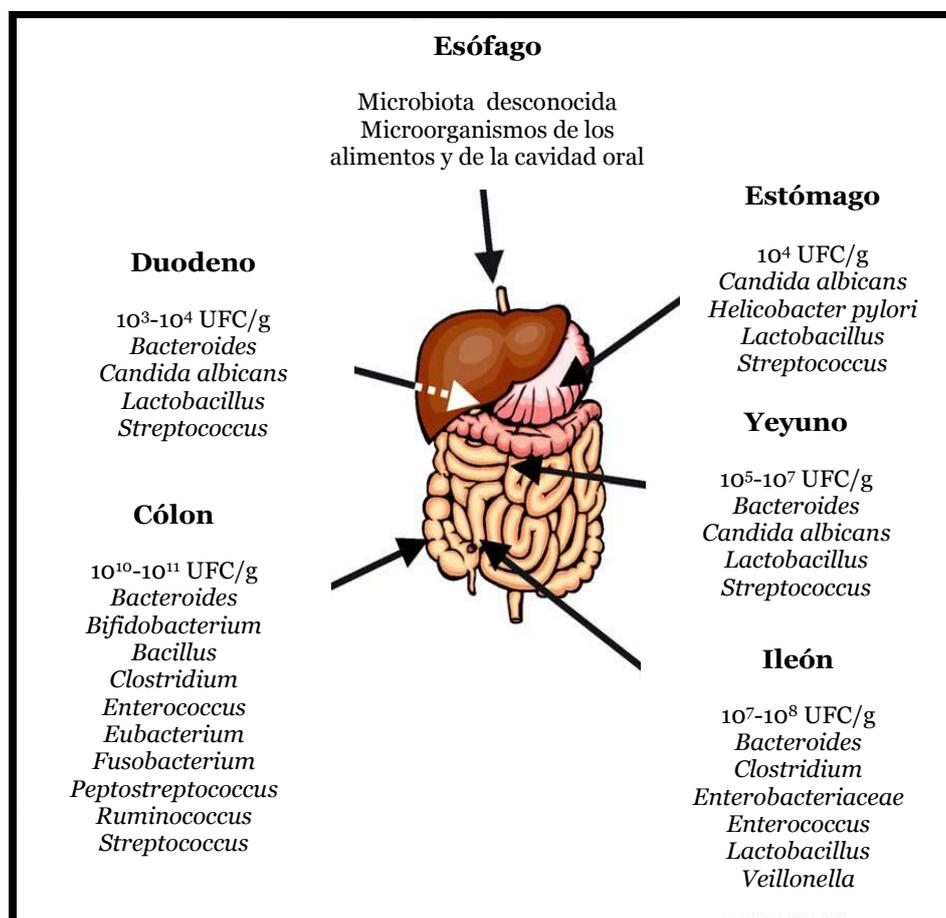


Figura 1- Distribución de la microbiota a lo largo del sistema digestivo (Guarner, 2006).

1.1 Evolución de la microbiota intestinal durante la vida

La microbiota intestinal está siempre activa y, debido a la influencia de factores externos, se renueva aproximadamente cada 48 horas. Hacia las 24 hs del nacimiento está gobernada por *Enterococcus* sp. y *Escherichia coli*, en niveles que oscilan entre 10⁸-10¹⁰ UFC/g. Se considera que estas bacterias son las responsables de crear un ambiente reductor en este nicho ecológico, favoreciendo el establecimiento (durante los días 4 y 7 postparto) de otros géneros anaeróbicos

como *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Gueimonde y col., 2011). En el caso de niños alimentados con leche materna, a partir de esta etapa se registra un incremento progresivo en los recuentos de bifidobacterias, hasta niveles de 10^{10} - 10^{11} UFC/g, en detrimento de otras especies presentes (Mackie y col., 1999; Sonnenburg, 2004; Gueimonde y col., 2011).

La leche materna es el alimento más adecuado para los neonatos porque provee una combinación única de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales y vitaminas que aseguran el correcto crecimiento y desarrollo de los niños. Sumado a esto, también contiene compuestos bioactivos responsables de un gran número de efectos benéficos, promoviendo la maduración del sistema inmune y la protección contra infecciones. Entre estos agentes bioactivos, recientemente se han aislado bacterias lácticas y bifidobacterias con capacidad probiótica a partir de leche materna (Lara-Villoslada y col., 2007; Martin y col., 2009; Solís y col., 2010; Zacarías y col., 2011). Al comenzar la suplementación de la dieta con otros alimentos, la diversidad de la microbiota intestinal de los bebés alimentados con leche materna resulta similar a la de aquellos que reciben fórmulas infantiles, dejando de ser dominantes las bifidobacterias. En etapas posteriores, cuando se comienzan a incluir sólidos en la dieta, esta microbiota se asemeja a la de los adultos, ya que se incrementan los niveles de bacteroides y cocos Gram-positivos (peptococos y peptoestreptococos, principalmente) (Mackie y col., 1999). En adolescentes y jóvenes, los recuentos de bifidobacterias descenden, predominando otras especies que formarán parte de la flora intestinal estable del adulto. Con la edad, también puede observarse un cambio de pH en las heces hacia la neutralidad, favoreciendo de este modo fermentaciones bacterianas de mayor toxicidad para la salud (Naidu y col., 1999). Durante la tercera edad,

aumentan los niveles de ciertas especies “putrefactivas”, como *Clostridium perfringens*, disminuyendo considerablemente el número de bifidobacterias. Esta modificación de la microbiota podría explicar la mayor incidencia de patologías entéricas y no entéricas relacionadas al envejecimiento de los órganos y al deterioro del sistema inmunológico (Nakasawa y col., 1992; Cruchet, 2007). En la Figura 2 se representa la distribución de la microbiota del TGI humano durante las diferentes etapas de la vida.

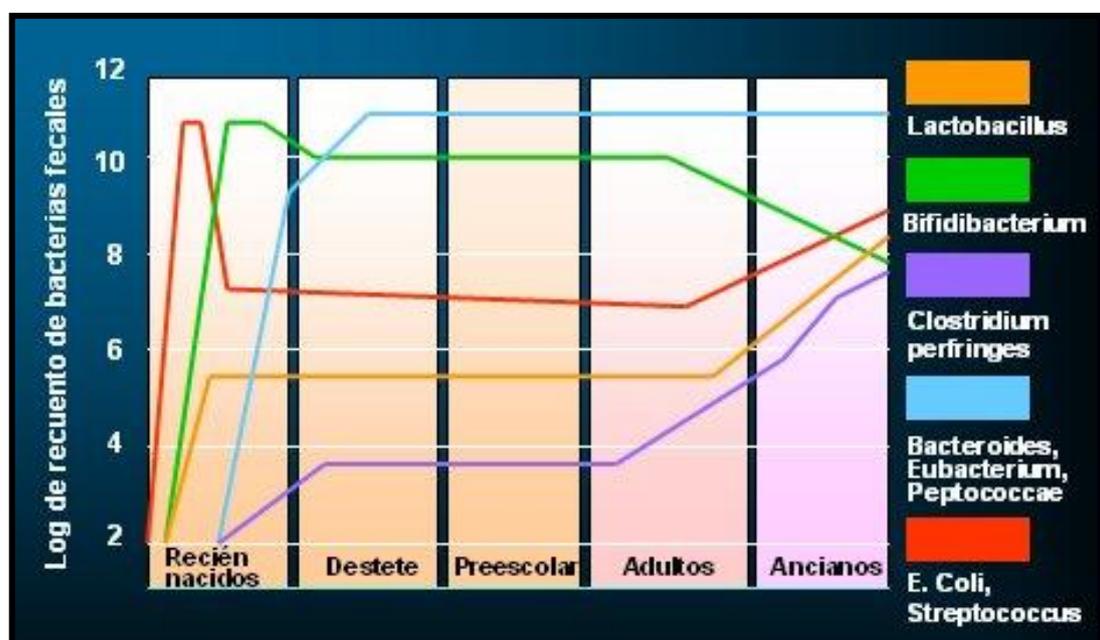


Figura 2 – Evolución de la microbiota intestinal humana con la edad (Cruchet, 2007).

2. Inmunidad de la mucosa gastrointestinal

Las mucosas son la principal vía de entrada de microorganismos, alérgenos, y carcinógenos. Dentro de las mismas podemos distinguir a la mucosa gastrointestinal, las mucosas de las vías aéreas, urinaria y genital, y la conjuntiva que recubre los ojos. Este sistema protector está formado por la mayor colección de células inmunocompetentes del organismo.

En particular, la mucosa gastrointestinal representa la superficie más vulnerable y extensa (400 m²) del cuerpo humano, aproximadamente 200 veces mayor que la superficie cutánea. Las células epiteliales intestinales se encuentran en estrecho contacto con el contenido luminal y desempeñan un papel decisivo en la señalización y la mediación de las respuestas inmunitarias naturales y adaptativas de la mucosa del huésped (Arranz y Garrote, 2006).

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés), constituye el principal sitio de inducción de respuestas del sistema inmune mucoso y, debido a su tamaño y características, también de la inmunidad adaptativa. Está formado por tejido linfoide organizado y especializado con rasgos anatómicos que lo diferencian de otros tejidos linfoides secundarios. Contiene órganos bien definidos, entre ellos, las placas de Peyer (PP) que se encuentran en el intestino delgado, en un número cercano a 200. Estos órganos están formados por agregados de células B (folículos linfoides), rodeados por áreas ricas en células T y células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas). En la superficie que recubre las PP se hallan dispuestas las células M (células epiteliales aplanadas con pocas microvellosidades y mucus). Las células M pueden transportar antígenos a las áreas inferiores pobladas de células B y T, que contienen también macrófagos y células dendríticas capaces de procesar y

presentar antígenos. Cuando la estimulación antigénica se produce en las PP, las células B y T activadas migran a la sangre, proliferando y diferenciándose en el bazo antes de volver a poblar la lámina propia. Las células B blásticas sufren diferenciación terminal a células plasmáticas, la mayoría de las cuales secretan IgA (Arranz y Garrote, 2006). La IgA es la inmunoglobulina predominante en la mucosa intestinal. La mayoría de las células productoras de inmunoglobulinas del organismo (80 %) se localizan en el intestino, principalmente en las PP y en la lámina propia (Neish, 2009). A nivel intestinal, la IgA es la principal inmunoglobulina encargada de la remoción de microorganismos patógenos y proteínas foráneas (Walker, 2002).

3. Las bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas o bacterias lácticas (BAL) son microorganismos Gram positivos, catalasa negativos, no móviles, no esporulados que producen ácido láctico como producto principal o único del metabolismo fermentativo. Estas bacterias crecen en anaerobiosis, sin embargo, a diferencia de muchas otras, la mayor parte de ellas no son sensibles al oxígeno y pueden crecer en su presencia o ausencia, por lo que son consideradas aerotolerantes o microaerofílicas (Vasiljevic y Shah, 2008).

La mayor parte de las BAL pueden obtener energía sólo del metabolismo de los carbohidratos y compuestos relacionados y, por esta razón, su desarrollo se halla restringido a hábitats en los que existan carbohidratos altamente solubles. Por lo general, tienen una capacidad biosintética limitada y sus requerimientos nutricionales complejos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. De este modo, se hallan asociadas a hábitats ricos en nutrientes, tales como ciertos

productos alimenticios (leche, carne, vegetales, etc.) y el TGI, membranas y mucosas de mamíferos, como integrantes de su microbiota normal (Brock, 1991).

Una diferencia importante entre especies de bacterias lácticas se basa en la naturaleza de los metabolitos que se forman por la fermentación de los azúcares. Por un lado, las BAL homofermentantes producen ácido láctico como único producto de fermentación, mientras que las BAL heterofermentantes producen, además de ácido láctico, otros metabolitos (principalmente etanol y dióxido de carbono) (Brock, 1991). Desde el punto de vista industrial, los géneros de mayor importancia incluyen: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Su participación es fundamental en la mayoría de los procesos de obtención de alimentos fermentados ya que, de un modo parcial o total, intervienen en el desarrollo de textura y de caracteres organolépticos y/o en la preservación de una gran variedad de productos alimenticios, tanto de origen vegetal (pickles, vino, cerveza, ensilados) como de origen animal (quesos, leches fermentadas, embutidos) (Vasiljevic y Shah, 2008).

3.1 Relevancia del género *Lactobacillus*

Dentro de las BAL, el género *Lactobacillus* es uno de los más heterogéneos en cuanto a sus características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas. Las BAL que pertenecen a este género se caracterizan por ser bacilos no formadores de esporos, de morfología variable (bacilos largos y delgados o cortos y curvos) y ocasionalmente nitrato reductores. Fermentan la glucosa (Kandler y Weiss, 1986) y pueden ser tanto homofermentantes (produciendo más del 85 % de ácido láctico a partir de glucosa), como heterofermentantes (produciendo ácido láctico, CO₂, etanol, y/o ácido acético en cantidades equimolares). El género *Lactobacillus* es

integrante, al igual que el género *Pediococcus* de la familia *Lactobacillaceae* y comprende 80 especies y 15 subespecies. Desarrolla en hábitats con baja tensión de oxígeno, ricos en carbohidratos solubles, productos derivados de las proteínas y vitaminas. Son bacterias acidúricas o acidofílicas, ya que pueden tolerar las elevadas concentraciones de ácido que producen como producto de su metabolismo fermentativo. De este modo, al disminuir el pH de los sustratos donde desarrollan, inhiben la proliferación de un gran número de microorganismos. En general, son microorganismos beneficiosos para el ser humano en varios aspectos: son microorganismos indispensables para llevar a cabo la fermentación de numerosos alimentos y son integrantes de la microbiota intestinal humana, ejerciendo efectos benéficos para la salud del hospedador. El rol saludable de los lactobacilos en el ecosistema intestinal ha recibido mucha atención, especialmente durante las últimas dos décadas, evidenciado por el gran auge de la incorporación de lactobacilos probióticos a alimentos funcionales (Hammes y Hertel, 2006).

Las distintas especies de *Lactobacillus* sólo representan una fracción minoritaria de la microbiota intestinal, variando en su composición para cada individuo (Mitsuoka, 1992; Sghir y col., 2000), habiéndose aislado diversas especies en heces, en niveles cercanos a 10^9 UFC/g (Mitsuoka, 1992; Kimura y col., 1997; Tannock y col., 2000; Gueimonde y col., 2011). Estudios realizados por Tannock y col. (2000) indican que algunos lactobacilos como *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. fermentum* son transientes en el intestino, persisten por tiempos limitados, y sólo están presentes en niveles bajos, que suelen incrementarse en respuesta a factores dietarios o cambios en las condiciones del huésped.

A partir del análisis de las secuencias de 16S y 23S ADNr, el género *Lactobacillus* fue subdividido en dos grupos filogenéticos mayoritarios: el grupo *Lactobacillus casei-Pediococcus* y el grupo *Lactobacillus delbrueckii*. El grupo *L. casei-Pediococcus* comprende tanto lactobacilos homofermentantes obligados como heterofermentantes facultativos y obligados, incluyendo especies de gran interés industrial, altamente relacionadas, como *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. zae*, *L. rhamnosus* y *Pediococcus pentosaceus*. El grupo *L. delbrueckii* está constituido, en su gran mayoría, por lactobacilos homofermentantes estrictos como *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* y *L. johnsonii* (Axelsson, 2004; Hammes y Hertel, 2006; Makarova y Konnin, 2007).

Desde el punto de vista comercial, los lactobacilos representan los microorganismos de mayor relevancia en la industria alimenticia. Si bien resultan muy numerosas las especies que se incluyen en la formulación de diferentes alimentos, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es la más ampliamente utilizada, junto a *Streptococcus thermophilus*, para la elaboración de yogur. Ambas bacterias son termófilas (requieren entre 37 y 42°C para su crecimiento), y desarrollan en la leche beneficiándose mutuamente, mediante protooperación. La acción proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre la caseína da lugar a la formación de dipéptidos y aminoácidos que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus*, y éste a la vez produce ácido fórmico, un factor de crecimiento necesario para el lactobacilo (Hammes y Hertel, 2006). Por otro lado, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* se usa principalmente en la elaboración de quesos que requieren altas temperaturas durante su manufactura como el queso Emmental, Parmesano, Provolone y Gruyere. Otra especie de gran importancia económica es *L. helveticus*, que se emplea en la elaboración de quesos de pasta cocida (Grana,

Sardo, Reggianito, etc.) debido a sus propiedades acidificantes, a su termorresistencia y a la capacidad de algunas cepas de producir bacteriocinas. Además, ciertas cepas de esta especie son autolíticas, permitiendo la liberación de enzimas (proteasas y peptidasas) que degradan la caseína y aceleran la maduración de ciertos tipos de quesos (Hynes y col., 2003).

Más allá de la utilidad tecnológica de las BAL tradicionalmente utilizadas en los procesos de fermentación, los lactobacilos reciben actualmente una mayor atención como probióticos, debido a los efectos benéficos sobre la salud que se asocian a su consumo (Señoranz y col., 2003; Collado, 2009). Enfatizando estas propiedades, diferentes cepas probióticas de lactobacilos se utilizan en la elaboración de alimentos funcionales como, por ejemplo, la leche acidófila (que contiene *L. acidophilus* junto a *S. thermophilus*) el Yakult (leche fermentada con *L. casei* Shirota); el kefir (bebida láctea fermentada producida por acción de levaduras, bacterias acéticas y diferentes especies de lactobacilos, como *L. kefir*, *L. kefiranofaciens*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, etc.) (Heller, 2008); el Bioqueso Ilolay Vita (que contiene *L. paracasei* A13, *B. bifidum* A1 y *L. acidophilus* A3); los quesos blandos probióticos de La Serenísima (que incluyen *L. rhamnosus* GG), la leche fermentada SanCor Bio (que contiene *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730) y la leche fermentada Actimel (que contiene *L. paracasei* Defensis) (Vinderola y col.; 2009).

3.2 Herramientas moleculares para identificación de *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es fenotípicamente muy heterogéneo y su identificación se ha basado tradicionalmente en ensayos fisiológicos y bioquímicos. Estas técnicas, además de demandar una gran cantidad de tiempo, arrojan

resultados generalmente ambiguos o poco confiables debido a que muchas especies responden de manera similar frente a diferentes condiciones de cultivo o ensayos bioquímicos (Matsuki y col., 1999). Durante la última década se ha verificado un notable auge en el desarrollo y aplicación de herramientas moleculares para la identificación de microorganismos y el análisis de su actividad, entre ellos, las BAL. Particularmente en el caso de los lactobacilos, han permitido la correcta identificación de especies y subespecies altamente relacionadas, imposibles de diferenciar por otros medios (Ben Amor y col., 2007).

Estas metodologías pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos y otras macromoléculas, y aquellas tendientes a analizar la actividad de las células completas. Los métodos basados en la utilización de ácidos nucleicos son los más frecuentemente utilizados, debido al alto potencial de la amplificación mediante la **Reacción en Cadena de la Polimerasa** (PCR, por sus siglas en inglés) y la hibridación *ex situ* o *in situ* con ADN, ARN o sondas peptídicas. En general, se fundamentan en el análisis de secuencias de la subunidad 16S ADNr, que permiten realizar diagnósticos filogenéticos mediante la comparación con más de 100000 secuencias disponibles en bases de datos públicas. Estos métodos ofrecen una robustez y exactitud muy superior a aquellos basados en determinaciones fenotípicas, cuyo poder de resolución es limitado cuando se pretende analizar la composición microbiana y la actividad de poblaciones bacterianas (Ben Amor y col., 2007). Entre las metodologías basadas en la PCR, se pueden mencionar la secuenciación de regiones genómicas de la subunidad 16S del ADNr, el uso de sondas específicas de especie, el análisis por restricción del ADNr amplificado (PCR-ARDRA, **A**mplified **R**ibosomal **D**NA **R**estriction **A**nalysis) y la amplificación con primers arbitrarios (RAPD, **R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**NA). Los dos primeros métodos

son los más ampliamente utilizados, y la reacción RAPD es especialmente útil para el estudio de la diversidad genética (polimorfismo) de cepas pertenecientes a una misma especie (Cocconcelli y col., 1997; Andrighetto y col., 1998).

Uno de los métodos más confiables y ampliamente utilizado en la actualidad para la identificación bacteriana, en general, y de lactobacilos en particular, es la secuenciación de la subunidad 16S del ADNr. Para ello, se amplifica y secuencia el fragmento genómico de interés utilizando sondas (primers) universales, que hibridan en regiones genómicas conservadas, pero que amplifican regiones genómicas variables para cada especie bacteriana. Posteriormente, mediante análisis y comparación de la secuencia nucleotídica con las disponibles en las bases de datos, se deduce (por similitud) a qué especie pertenece el microorganismo de interés. Por otro lado, una sonda específica de especie es un fragmento de ácido nucleico de cadena simple que se une (hibrida) específicamente a una región complementaria de un ácido nucleico, de cadena simple, ya sea de ADN o ARN (Schleifer y col., 1995) que puede ser luego amplificada mediante PCR. El producto de reacción resulta, de este modo, específico de una especie bacteriana en particular, lo que permite su identificación. Se dispone actualmente de una amplia variedad de sondas específicas que son complementarias a regiones de 16S o 23S del ADNr para distintas especies de *Lactobacillus* (Walter y col., 2000; Kwon y col., 2004). Otra de las metodologías utilizadas para la diferenciación de especies es la conocida como PCR-ARDRA, en la cual, el producto de amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr es sometido a una restricción con enzimas específicas. Los productos resultantes se separan luego mediante electroforesis, generando un perfil de bandas característico para cada especie (Giraffa, 1998). Por último, la amplificación arbitraria o RAPD, ha sido ampliamente reportada como un método rápido, sensible y de relativamente bajo costo para la tipificación

genética de diferentes cepas de BAL. Esta técnica, basada en la PCR, hace uso de primers arbitrarios o al azar, generalmente cortos (10-15 nucleótidos) que son capaces de hibridar un número parcial o perfectamente complementario de secuencias, con localización desconocida en el genoma del organismo. Si la unión ocurre en un sitio donde el espacio y la orientación permiten la amplificación de fragmentos de ADN, se generan patrones o perfiles que son específicos de cada cepa (Ben Amor y col., 2007), posibilitando el análisis de diversidad para una especie bacteriana en particular. Asimismo, cuando se dispone de un importante banco de perfiles RAPD, este método permite la identificación rápida de algunas cepas (Rossetti y Giraffa, 2005).

4. Alimentos funcionales

La noción de alimentación equilibrada surge como resultado de más de un siglo de investigaciones en nutrición y ha determinado la elaboración de numerosas recomendaciones nutricionales y orientaciones alimentarias. No obstante, es a partir del siglo XXI cuando la nutrición afronta nuevos desafíos. Según los criterios actuales de salud, se reconoce que un alimento no es sólo necesario para el sustento, desarrollo y crecimiento del cuerpo, sino que desempeña un papel clave en la calidad de vida. De este modo, el concepto de “alimento funcional” surgió originalmente en Japón, durante la década de 1980, donde se desarrollaron distintos productos alimentarios denominados “alimentos de uso específico para la salud” (FOSHU, **F**ood for **S**pecific **H**ealth **U**se) y fue posteriormente ampliado en Estados Unidos y Europa. Si bien no existe una definición universal para los alimentos funcionales, la Comisión Europea establece, a través de su documento consenso FUFOSSE (**F**unctional **F**ood **S**cience

in Europe, 1999), que un alimento puede ser denominado “**funcional**” si se demuestra científicamente que **beneficia la salud humana más allá de ejercer un simple efecto nutricional, pudiendo mejorar el estado de salud y bienestar del consumidor y/o reducir su riesgo de enfermedad.**

Los alimentos funcionales no incluyen cápsulas ni píldoras, y sus efectos deben ser ejercidos en las cantidades que normalmente se espera que sean consumidos con la dieta. Pueden comprender tanto alimentos naturales como alimentos a los que se les han incorporado o eliminado ciertos componentes por medios tecnológicos o biotecnológicos. De este modo, pueden considerarse como tales aquellos alimentos donde la naturaleza y/o biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada y/o suprimida. Estos productos están dirigidos a todos los individuos de una población o a grupos con necesidades particulares como, por ejemplo, individuos de una edad determinada (Howlett, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el intestino grueso (particularmente, el colon) es uno de los órganos más activos del organismo humano desde el punto de vista metabólico, ya que posee un ecosistema microbiano extremadamente complejo. Por esta razón, el sistema gastrointestinal representa un blanco ideal para el desarrollo de alimentos funcionales, ya que actúa como una interfase entre la dieta y las funciones del organismo. En nuestro país, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) define, basándose en los conceptos establecidos por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), tres estrategias alimentarias que promueven el mantenimiento del equilibrio más saludable de la microbiota intestinal. Dichas estrategias se basan en la utilización de probióticos, prebióticos y simbióticos como componentes alimentarios

funcionales

(http://www.anmat.gov.ar/consumidores/alimentos/Alimentos_Funcionales_Probioticos.pdf). En las tres definiciones se halla implícita la alteración beneficiosa de la composición de la microbiota, que suele lograrse mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos, o de ambos (Ashwell, 2002). Por definición, un **probiótico** es un **ingrediente alimentario microbiano vivo que, ingerido en cantidades suficientes, produce efectos benéficos en la salud del consumidor** (FAO/WHO, 2002). Un **prebiótico** es un **ingrediente alimenticio no digerible que produce efectos beneficiosos, mediante la estimulación selectiva del crecimiento o la modificación de la actividad metabólica de una o varias especies bacterianas del colon, mejorando en consecuencia la salud del huésped**. Un **simbiótico** es una **mezcla de probióticos y prebióticos tendiente a aumentar la supervivencia de las bacterias que favorecen la salud, con el objetivo último de modificar la microbiota intestinal y su metabolismo** (Ashwell, 2002).

Los productos lácteos, principalmente las leches fermentadas, representan una de las alternativas más interesantes para el desarrollo de alimentos funcionales. En primer lugar, la matriz alimentaria y el proceso de elaboración son adecuados para la incorporación de diferentes cultivos microbianos, como son los probióticos. Por otro lado, son productos ricos en proteínas, vitaminas y minerales y, posiblemente, el aspecto más relevante, son alimentos reconocidos como saludables por la mayoría de los consumidores e incorporados en su dieta desde tiempos remotos, lo que incrementa el éxito comercial de esta categoría de alimentos funcionales (Joppen, 2006). Por otro lado, las leches fermentadas están instaladas en la dieta de los consumidores y presentan una oferta comercial

diversificada en sabores y presentaciones, siendo fáciles de transportar y conservar para ser incluidas en cualquiera de las comidas diarias.

La definición de bacterias probióticas que cuenta actualmente con mayor consenso científico es la que considera a los **probióticos** como **“microorganismos vivos que, administrados en dosis adecuadas, confieren un beneficio en la salud del consumidor”** FAO/WHO (2002), El número de productos del mercado que contienen probióticos (especialmente *Lactobacillus* y bifidobacterias) se halla en constante expansión desde principios de la década de 1980. Algunos ejemplos de cepas probióticas de uso industrial se listan en la Tabla 1.

Tabla 1 – Cepas de BAL y bifidobacterias probióticas empleadas en la industria (la nomenclatura de las cepas es la utilizada comercialmente y puede no coincidir con la identificación taxonómica actual) (Vasiljevic y Shah, 2008).

Cepa	Propietario/Proveedor
<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5 <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> Lb12 <i>L. paracasei</i> CRL 431 <i>B. animalis ssp. lactis</i> Bb12	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>L. acidophilus</i> NCFMs <i>L. acidophilus</i> La <i>L. paracasei</i> Lpc	Danisco
<i>L. acidophilus</i> LAFTIs L10 <i>B. lactis</i> LAFTIs B94 <i>L. paracasei</i> LAFTIs 126	DSM Food Specialities
<i>L. johnsonii</i> La1	Nestle
<i>L. acidophilus</i> SBT-20621 <i>B. longum</i> SBT 29281	Snow Brand Milk Products Co. Ltd.
<i>L. rhamnosus</i> R0011 <i>L. acidophilus</i> R0052	Institute Rosell
<i>L. casei</i> Shirota <i>B. breve</i> Yakult	Yakult
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10) <i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	Fonetera
<i>L. plantarum</i> 299V <i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB
<i>L. casei</i> Inmunitas <i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)	Danone
<i>L. rhamnosus</i> LB21 <i>Lactococcus lactis</i> L1A	Essum AB
<i>L. reuteri</i> SD2112	Biogaia (Raleigh, N.C.)
<i>L. rhamnosus</i> GG1	Vailo Dairy (Helsinki, Finlandia)
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College Cork
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co. Ltd.
<i>L. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory
<i>L. paracasei</i> F19	Medipharm

Tradicionalmente los probióticos se han utilizado en la formulación de leches fermentadas, sin embargo, obedeciendo a la búsqueda de un estilo de vida más sano y natural por parte de los consumidores, los alimentos que actualmente incluyen probióticos son muy diversos (quesos, mayonesas, helados, jugos de frutas, barras de cereal, etc. (Ashwell, 2002).

Si bien las industrias alimenticias de Estados Unidos, Japón y Europa se encuentran a la vanguardia en el desarrollo de alimentos funcionales, tanto en variedad como en cantidad (Ashwell, 2002), nuestro país no ha quedado al margen en el interés por el agregado de bacterias probióticas a leches fermentadas y otros alimentos. Desde principios de la década del 1990 se comercializan en Argentina productos que declaran contener cepas de bacterias probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Algunos ejemplos de estas cepas son: *L. casei* (cepa *L. casei* Defensis, Actimel, Danone) y *L. paracasei/Bifidobacterium* (Probio2, Yogurísimo, La Serenísima); *L. casei* CRL 431 y *L. acidophilus* CRL 730 (Leche Bio, SanCor-CERELA); *L. rhamnosus* GG (quesos blandos probióticos, La Serenísima); etc. Por otro lado, durante 10 años, se comercializó en nuestro país un queso fresco adicionado de cultivos probióticos, el denominado BioQueso (Ilolay), desarrollado por Sucesores de A. Williner S.A. (Bella Italia, Santa Fe) en colaboración con el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET, Santa Fe), siendo el primer queso de Latinoamérica en adicionar simultáneamente cepas de *L. paracasei*, *L. acidophilus* y *B. bifidum* a un queso fresco (Vinderola y col., 2000b).

El Código Alimentario Argentino (CAA) no hace mención a la incorporación de este tipo de microorganismos en leches fermentadas y por lo tanto, no reglamentó todavía su uso. Por otro lado, la legislación del MERCOSUR para

leches fermentadas (FEPALE, Federación Panamericana de Lechería, 1996) sólo exige para productos que contienen bifidobacterias, niveles mínimos de 10^6 UFC/g (Pagano, 1998), sin hacer referencia al uso de cepas de *L. casei* o *L. acidophilus* ni a las metodologías para el control de la viabilidad celular en alimentos.

Se considera, aunque es una característica cepa dependiente, que la dosis y la frecuencia de consumo para garantizar la efectividad de un probiótico es de entre 10^9 y 10^{10} organismos viables diariamente. Por ello, se sugiere que los productos que los contengan, mantengan niveles de células viables de 10^7 - 10^8 /ml o g, de modo que la ingesta diaria recomendada debe ser de, al menos 100 ml ó g de producto (Sanders y Huis in't Veld, 1999; Ouwehand y col., 2002).

Actualmente, en Argentina se comenzó a trabajar sobre una normativa al respecto, conformándose en el año 2006 un grupo de trabajo *ad hoc*, a solicitud de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL). El principal objetivo es evaluar la definición y los parámetros de estos productos para luego tratar su incorporación al CAA (Codigo Alimentario Argentino). Dicho grupo está coordinado por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL), y en el mismo participan representantes de la SAGyPA, la Universidad de Buenos Aires (UBA), la Universidad Nacional del Litoral (UNL) a través del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), el Centro de la Industria Lechera (CIL) y la Cámara de Fabricantes de Alimentos Dietéticos y Afines (CAFADYA), entre otros. Hasta el momento, se han centrado en la elaboración de dos protocolos, uno relativo a cepas probióticas y el otro referente a alimentos probióticos, destinados a establecer las exigencias necesarias para demostrar las funciones benéficas de éstos. En una etapa siguiente se abordará el tema de los prebióticos (SAGyPA, 2007).

5. Selección de cepas destinadas a la elaboración de productos probióticos

La correcta selección de cepas constituye uno de los aspectos fundamentales para su inclusión en un alimento probiótico. Tradicionalmente, para la incorporación de lactobacilos a alimentos destinados a consumo humano, se exigía que la cepa fuese segura y de origen humano (criterio de especificidad de especies), así como que fuese capaz de llegar viable al TGI en altas concentraciones ($10^7 - 10^9$ UFC/ml) y colonizarlo (Dunne y col., 2001), además de poseer alguna propiedad que le otorgara funcionalidad al alimento. Existen estudios que demuestran que tanto cepas de origen intestinal como no-intestinal pueden ejercer efectos funcionales (Dogi y col., 2010) y que no es posible la colonización permanente del tracto intestinal por una cepa exógena (Gueimonde y col., 2006) por lo que, en la actualidad, el criterio de especificidad (cepas de humanos para humanos) ha perdido vigor. En el futuro, probablemente, las cepas probióticas podrán ser seleccionadas combinando los resultados del análisis genómico (que predeciría el potencial genético de una bacteria para sobrevivir en el TGI y brindaría información sobre algunas características probióticas, como la estimulación inmune), de ensayos *in vitro* y de ensayos *in vivo* (Morelli, 2007). Hasta el momento, si bien se han sugerido numerosos criterios, existe un cierto acuerdo que establece los criterios generales para la selección de probióticos, incluidos en el trabajo publicado por la FAO/WHO (2002).

De acuerdo a la revisión de Valsijevic y Shah (2008), los criterios de selección de cepas probióticas pueden agruparse en cuatro categorías (Tabla 2).

Tabla 2 – Criterios de selección de cepas probióticas.

Tipo de criterio	Propiedades
Criterios de seguridad	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Origen ◆ Patogenicidad e infectividad ◆ Factores de virulencia (toxicidad, actividad metabólica y propiedades intrínsecas, por ej., resistencia a antibióticos)
Criterios tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Estabilidad genética ◆ Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento ◆ Propiedades sensoriales adecuadas ◆ Resistencia a fagos ◆ Producción a gran escala
Criterios fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Tolerancia a jugos gástricos ◆ Tolerancia a bilis ◆ Adhesión a la superficie de la mucosa intestinal ◆ Alta hidrofobicidad
Criterios funcionales	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Inmunomodulación ◆ Actividad antagónica frente a patógenos gastrointestinales (<i>Helicobacter pylori</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Escherichia</i>, <i>Candida albicans</i>, etc.) ◆ Metabolismo del colesterol ◆ Propiedades antiinflamatorias ◆ Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas

5.1 Criterios de seguridad

El primer paso en la selección de probióticos comprende la identificación del género y especie al que pertenece cada cepa, lo que permitirá inferir

información relativa a su fisiología y a su potencial probiótico. La guía publicada por la FAO/WHO (2002) aconseja la identificación combinando ensayos fenotípicos y genotípicos. Entre los primeros, se recomienda el análisis de patrones de fermentación de azúcares y de productos finales de fermentación a partir de glucosa; en relación a los ensayos genotípicos, las herramientas moleculares más utilizadas para la identificación de microorganismos son aquellas basadas en la comparación de moléculas altamente conservadas (como el gen que codifica para el ARNr, conocido como ADNr) y la secuenciación de las subunidades 16S y 23S del ADNr. A los fines de diferenciar cepas muy relacionadas dentro de una misma especie bacteriana, se sugiere el análisis de perfiles de restricción de ADN, perfiles plasmídicos, perfiles RAPD-PCR, etc. (Vasiljevic y Shah, 2008).

Las BAL tienen una larga tradición como microorganismos seguros, razón por la cual son consideradas organismos GRAS (**G**enerally **R**ecognized **A**s **S**afe). A pesar de esto, se ha reportado, en escasísimas oportunidades, el aislamiento de ciertas cepas de *Lactobacillus* en el torrente sanguíneo y como agentes de infecciones locales, episodios generalmente asociados a individuos inmunocomprometidos (Husni y col., 1997; Ishibashi y Yamazaki, 2001; Cannon y col., 2005; Salminen y col., 2006), sin constituir estas excepciones una preocupación en relación a la seguridad de las BAL. Coincidiendo con lo anterior, y aunque no se trata de una BAL, en un trabajo publicado recientemente por Ohishi y col. (2010) se ha reportado un caso de sepsis provocada por la administración de *Bifidobacterium* como terapia probiótica en pacientes vulnerables. Otro aspecto importante a considerar es el riesgo de que los probióticos presenten resistencia a antibióticos, ya que los genes de resistencia a antibióticos (especialmente de codificación plasmídica) podrían ser transferidos horizontalmente a microbiota gastrointestinal indeseable del individuo. En este sentido, se han publicado

numerosos reportes con recomendaciones relativas a la virulencia y transferencia de resistencia a antibióticos, tendientes a establecer criterios de seguridad para la selección de probióticos (FAO/WHO, 2002; AFFSA, 2003; Agostoni y col., 2004). La Autoridad Europea en Seguridad de Alimentos (EFSA, por sus siglas en inglés) sugirió un esquema para evaluar la seguridad de microorganismos incluidos en alimentos, similar a la propuesta de los alimentos GRAS, pero tomando en cuenta la “experiencia en el uso” para su presunción de seguridad. A pesar de esto, en Europa aún no existe un documento consenso donde se establezcan los métodos a utilizar para evaluar la seguridad de los probióticos. Durante el período 2002 - 2006 se llevó a cabo por EU-PROSAFE (Product Safety Enforcement Forum of Europe) el proyecto denominado Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria used for Human Consumption, en el marco del cluster PROEUHEALTH (<http://proeuhealth.vtt.fi/>), cuyos objetivos incluyeron, entre otros, el ensayo de la susceptibilidad a antibióticos en BAL de origen humano, el estudio de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, la detección de factores de virulencia, la evaluación de efectos inmunológicos adversos, la supervivencia, colonización y estabilidad genética de probióticos y BAL tanto un modelo intestinal *in vitro* como en voluntarios. El objetivo final del EU-PROSAFE fue proponer recomendaciones dirigidas a ensayos de seguridad para probióticos de uso humano, en base a la evidencia de estos estudios (Vankerkhoven y col., 2007).

5.2 Criterios tecnológicos

Además de los efectos beneficiosos deseados, el microorganismo probiótico seleccionado debe ser robusto en relación al proceso de producción de biomasa y del alimento que le servirá como vehículo. Uno de los requisitos más relevantes es

garantizar su supervivencia en altas concentraciones en el producto final, así como su estabilidad genética y funcional durante el almacenamiento. De este modo, durante todo el período de vida útil del alimento, el probiótico deberá ser capaz de expresar sus efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor, objetivo final de su inclusión en el alimento. Para ello, mediante ensayos apropiados, se sugiere determinar la resistencia de la cepa a los numerosos factores de estrés (oxidativo, mecánico, osmótico, térmico, químico y el relativo a las interacciones con otras cepas presentes en el alimento durante la fermentación) a que estará expuesta durante el proceso de elaboración y almacenamiento. Se deberá garantizar también que su incorporación no modifique negativamente las propiedades sensoriales del alimento. De ese modo, sólo el estricto control de todas estas variables de forma simultánea hará posible la producción a gran escala del alimento probiótico sensorialmente aceptado (Heller, 2001; Valsijevic y Shah, 2008).

5.3 Criterios fisiológicos

La guía para la evaluación de probióticos en alimentos redactada por la FAO/WHO (2002) destaca especialmente la relevancia de la acción específica del probiótico y, contrariamente a lo que consideran muchos autores, resta importancia al origen del microorganismo. Por esta razón, se enfatiza la necesidad de implementar ensayos *in vitro* para predecir la performance de los probióticos en humanos, previo a los ensayos *in vivo*.

5.3.1 Tolerancia a acidez gástrica y a sales biliares

En el estómago, la secreción de ácido gástrico constituye una barrera primaria frente a la mayoría de los microorganismos ingeridos. En el duodeno, son los ácidos biliares conjugados y, principalmente, los ácidos biliares deconjugados, los que ejercen actividad antimicrobiana (Dunne y col., 1999). Los probióticos deben ser capaces de sortear estas barreras fisiológicas para garantizar su supervivencia y funcionalidad en el TGI. La guía FAO/WHO (2002) sugiere evaluar preliminarmente, mediante ensayos *in vitro*, la tolerancia al pH y a las sales biliares. Si bien existen diferentes procedimientos, recientemente, en el documento resultante del proyecto europeo EU-PROSAFE (Vankerkhoven y col., 2007) se recomienda la utilización de un modelo dinámico que simule la digestión gástrica (Marteau y col., 1997; Minekus y col., 1999; Mainville y col., 2005).

5.3.2 Adherencia al epitelio intestinal

La adhesión a las células epiteliales y/o a la mucosa permite un mayor tiempo de retención del probiótico en el ámbito intestinal, ya que la colonización permanente no ha sido demostrada aún para ninguna cepa, ni siquiera en neonatos, donde la microbiota no está aún firmemente establecida (Walker, 2002). En consecuencia, una característica de interés de una cepa probiótica es su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal. Para evaluar esta propiedad, se han propuesto numerosos métodos y modelos, desde la determinación de hidrofobicidad (como una medida predictiva) hasta los ensayos de adhesión a mucus intestinal y a células epiteliales (Vesterlund y col., 2005; Gueimonde y col., 2006; Morelli, 2007).

5.4 Criterios probióticos o de funcionalidad

La guía FAO/WHO (2002) establece que los efectos funcionales demostrados *in vitro* para una cepa servirán para realizar una “preselección” de microorganismos potencialmente probióticos. Posteriormente, estos ensayos deberán ser validados mediante ensayos *in vivo*, pasando desde modelos animales hasta ensayos en humanos.

Numerosos efectos beneficiosos adjudicados a los probióticos han sido extensamente documentados en ensayos clínicos aleatorizados, a doble ciego y con control de placebos, mientras que otros sólo aparecen como efectos potencialmente promisorios demostrados en líneas celulares o modelos animales. Es importante remarcar que, como se mencionó anteriormente, los efectos probióticos son específicos de una cepa y por lo tanto, no se puede extrapolar ninguno de sus beneficios a otras cepas, aunque pertenezcan a la misma especie. De este modo, para cada cepa en particular será necesario demostrar claramente qué propiedad(es) probiótica(s) ejerce(n) sobre la salud del consumidor. A continuación se describen brevemente algunos de los efectos funcionales adjudicados a los probióticos.

5.4.1 Ejemplo de efectos probióticos

La estimulación de la respuesta inmune es uno de los criterios probióticos de selección que han adquirido mayor relevancia en la actualidad, ya que es la base fisiológica de otros efectos como la prevención de infecciones, el control de la enfermedad inflamatoria intestinal, la prevención de ciertos cánceres, etc. Las células del epitelio intestinal se hallan en contacto directo con la microbiota

intestinal, interactuando asimismo con el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal. Una de las hipótesis sugiere que las bacterias probióticas activarían de algún modo el sistema inmunitario, mediante mecanismos altamente complejos, al interactuar con las células epiteliales y las células inmunes de la lámina propia (Valsijevic y Shah, 2008). Sin embargo, y a pesar de que numerosos estudios demuestran el potencial inmunomodulatorio de los probióticos (mediante la prevención de alergias e infecciones por patógenos intestinales, desórdenes inflamatorios, etc.), aún existen incertidumbres vinculadas con la validez de estos resultados, debido a que muchos de los experimentos no han sido adecuadamente diseñados (Valsijevic y Shah, 2008). Por esta razón, actualmente se recomienda investigar los efectos inmunomodulatorios de los probióticos en modelos animales mediante estudios cuidadosamente diseñados, que incluyan análisis de proliferación de células productoras de IgA e IgA secretoria en contenido intestinal, de citoquinas reguladoras y proinflamatorias, estudios de alergias, autoinmunidad, etc. (Ezendam y van Loveren, 2006; Valsijevic y Shah, 2008). En este sentido, numerosos trabajos han demostrado los efectos benéficos de las BAL y los productos fermentados en la activación de la respuesta inmune tanto específica como no específica (Gill, 1998; Matar y col., 2001; Perdigón y col., 2001; Isolauri y col., 2004; Vinderola y col., 2004). Así por ejemplo, algunas cepas de *Lactobacillus* (DN 114 001, por ejemplo) disminuyen la síntesis de interleuquina-8 y puede regular la liberación espontánea de TNF- α por tejido inflamado y, asimismo, la respuesta inflamatoria inducida por *E. coli* (Llopis y col., 2009). Dentro de los productos lácteos fermentados que contienen BAL, se ha demostrado que tanto el Bioqueso Ilolay Vita (Medici y col., 2004) como el kefir (Vinderola y col., 2006), son capaces de inducir un efecto benéfico sobre la mucosa intestinal, lo cual se ve reflejado por un aumento en el número de células productoras de IgA y

en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sin ejercer daños en los tejidos. Asimismo, a partir de estudios realizados en humanos se puede concluir, por ejemplo, que la administración de *L. rhamnosus* GG aceleraría el período de curación del eczema atópico, aunque no resulta efectiva para el tratamiento de otras alergias (asma, rinitis, etc.) (Ezendam y van Loveren, 2006).

Otros efectos adjudicados al consumo de ciertas cepas de bacterias probióticas incluyen actividad antagónica frente a patógenos intestinales, prevención de ciertos tipo de cánceres (Hirayama y Rafter, 2000), mejora de alergias (Aldinucci y col., 2002), disminución de los niveles de colesterol (Liong y Shah, 2005), capacidad antimutagénica y anticarcinogénica (Ohashi, 2000). Se ha relacionado además, al consumo de leches fermentadas con la mejora de cuadros de diarrea infantil ocasionada por rotavirus, diarrea inducida por tratamientos con antibióticos (Sazawal y col., 2006), diarrea del viajero, constipación, encefalopatía hepática y gastritis por *Helicobacter pylori*, entre otros (Wang y col., 2004), además de prevenir la vaginitis recurrente en mujeres (Chandan, 1999) y el síndrome del intestino irritable (Guandalini, 2002). Asimismo, muchos estudios demuestran el efecto benéfico de las bacterias del yogur (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*) frente a ciertos desórdenes intestinales (Fuller, 1991; Goldin, 1998; de Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004; Guarner y col., 2005).

6. La problemática del manejo industrial de las bacterias probióticas

6.1 Técnicas de recuento de células viables

Actualmente los productos probióticos se estandarizan basándose en los recuentos de células viables, con la presunción de que es éste el factor determinante de la funcionalidad de los mismos (Sanders y Huis in't Veld, 1999). Para llevar a cabo dicho control de viabilidad, es necesario disponer de métodos de rutina rápidos y confiables, que permitan hacer un seguimiento de los cambios microbiológicos desde el momento de la elaboración y durante su almacenamiento refrigerado hasta la fecha de vencimiento del producto. Los diferentes organismos internacionales dedicados a la regulación de alimentos han establecido estándares de requerimientos mínimos de $10^6 - 10^7$ UFC/g para *L. acidophilus* y/o bifidobacterias en leches fermentadas (IDF, 1992; Shah, 2000; Bibiloni y col., 2001). Este tipo de productos lácteos representan los alimentos probióticos más populares, siendo *L. acidophilus*, *L. casei/paracasei* y *B. lactis* las especies predominantes (Yeung y col., 2002; Fasoli y col., 2003; Gueimonde y col., 2004; Masco y col., 2005). La presencia de múltiples especies fisiológicamente relacionadas en un mismo producto determina que la enumeración selectiva o diferencial de las bacterias probióticas resulte compleja o imposible, debido a su similitud en los requerimientos nutricionales y al solapamiento de perfiles bioquímicos entre especies (Tabasco y col., 2007). Este hecho dificulta el control de calidad y el establecimiento de normas oficiales, ocasionando una situación de verdadera confusión a nivel de industrias y de organizaciones de regulación en lo que respecta a la recomendación de medios de cultivo apropiados para el control

de células viables en productos lácteos fermentados. Por esta razón, las empresas que elaboran alimentos probióticos manifiestan permanentemente su interés en el desarrollo y la aplicación de metodologías que permitan obtener un recuento confiable de las bacterias probióticas y que, además, sean rápidas, y económicas (Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Se han propuesto numerosos medios de cultivo para una enumeración selectiva y/o diferencial de lactobacilos y bifidobacterias, aislados o combinados en cultivos comerciales o en productos (Charteris y col., 1997; Shah, 2000; Roy, 2001; Talwalkar y Kailasapathy, 2004; Masco y col., 2005; Van de Castele y col., 2006). Con el objetivo de cubrir un amplio espectro de especies, la mayoría de dichos medios de cultivo posee una composición compleja que incluye antibióticos, colorantes, sales orgánicas o minerales como agentes selectivos (Tabasco y col., 2007). Diversos estudios de este tipo han informado resultados satisfactorios para diferentes combinaciones de especies microbianas (Dave y Shah, 1997; Vinderola y Reinheimer, 1999; Lourens y col., 2000; Vinderola y col., 2000). No obstante, la gran variedad de productos y cepas determinan que no exista un medio universal para el recuento de un probiótico (Roy, 2001), sino que para cada producto se deba adaptar o diseñar un medio de cultivo particular.

6.2 Sobrevivencia de las bacterias probióticas en los productos lácteos

Para cumplir el rol probiótico es altamente deseable que la célula bacteriana llegue viable al TGI. Para ello, el microorganismo no sólo debe superar las barreras fisiológicas a lo largo de este nicho ecológico sino que, previamente, debe sobrevivir en el alimento que le sirve como vehículo durante la elaboración y almacenamiento del mismo hasta el momento del consumo (Sanz y col., 2003;

Señoranz y col., 2003).

La gran susceptibilidad de ciertas cepas a condiciones de estrés (acidez, temperatura, baja actividad acuosa, etc.) ha llevado, tanto a investigadores como a industriales, a la búsqueda de nuevas cepas funcionales, más adecuadas para su aplicación tecnológica. Los primeros pasos en la producción de cultivos probióticos incluyen su cultivo a gran escala en un medio apropiado, una serie de lavados de las células y su posterior deshidratación o congelamiento. En general, estos microorganismos pueden soportar manipulaciones bajo condiciones rigurosas como el almacenamiento a -20°C o temperaturas aún inferiores o la liofilización, siendo mucho más susceptibles al secado spray (Joppen, 2006). Cuando se requieren períodos de almacenamiento muy prolongados o bien, cuando el producto va ser expuesto a condiciones desfavorables durante su conservación, la microencapsulación surge como una opción (Mattila-Sandholm y col., 2002; Champagne y Furtier, 2007), aunque no esté desarrollada aún a nivel comercial.

En la actualidad, son cada vez más diversas las matrices alimentarias usadas como vehículos de bacterias probióticas, entre ellas, productos vegetales fermentados (aceitunas, chucrut, productos a base de soja y cereales) y productos cárnicos (pescados fermentados, salchichas y otros embutidos), entre otros (Cruchet, 2007). No obstante, son los productos lácteos fermentados los que representan la mayor parte del mercado de los probióticos. Algunas propiedades fisicoquímicas de ciertos alimentos limitan de un modo importante la viabilidad de las cepas probióticas. Son numerosos los estudios destinados a monitorear la supervivencia de las bacterias probióticas presentes en leches fermentadas durante su almacenamiento refrigerado (Rius y col., 1994; Vinderola y col., 1999; Shah, 2000) encontrándose resultados muy variables que parecen depender, entre

otros factores, de las cepas empleadas y el tipo de producto usado. En Argentina, aún existe la tendencia de elaborar yogures y leches fermentadas con niveles de acidez relativamente elevados (valores de pH de 4,5 a 4,0 e incluso menores). Estas condiciones estresantes pueden ocasionar, dependiendo de las cepas empleadas, pérdidas importantes en la viabilidad de la microbiota probiótica (Vinderola y col., 1999).

Desde hace más de una década y, obedeciendo a las exigencias del mercado, se han comenzado a emplear bacterias probióticas como starters adjuntos para la elaboración de diferentes tipos de quesos (Shah, 2004). La mayoría de estos quesos probióticos utilizan cultivos puros o mixtos de bifidobacterias, *L. acidophilus* y/o *L. casei/paracasei* (Vinderola y col., 2000b; Ong y col., 2006). La incorporación de microorganismos probióticos a quesos resulta una alternativa interesante para afrontar el problema de la sobrevida hasta el momento del consumo, debido a las condiciones de acidez menos marcadas (en relación a las leches fermentadas), la existencia de una matriz más cerrada y compacta (que determina niveles de oxígeno relativamente bajos) y el mayor contenido de grasa, que podrían ejercer un efecto protector sobre las cepas probióticas agregadas (Stanton y col., 1998).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar cepas autóctonas de *Lactobacillus* aisladas de neonatos santafesinos para ser empleadas como cultivos probióticos en alimentos funcionales. Adecuar herramientas moleculares para la detección de su presencia en diversos productos alimenticios.

Objetivos particulares

- 1) Identificar las cepas mediante técnicas moleculares.
- 2) Detectar su presencia en alimentos fermentados.
- 3) Determinar la capacidad de desarrollo y sobrevivencia en medios lácteos.
- 4) Determinar la resistencia a factores de estrés tecnológicos.
- 5) Determinar la resistencia a barreras biológicas.
- 6) Evaluar la seguridad y funcionalidad de las cepas.

Materiales y Métodos

1. Cepas utilizadas

1.1 Origen

Las cepas utilizadas en este estudio se indican en la Tabla 3. Las 3 primeras cepas fueron aisladas a partir de neonatos santafesinos como parte de un trabajo de investigación previo (Vinderola y col., 2008) y fueron conservadas en la colección del INLAIN. Los resultados obtenidos preliminarmente indican que poseen potencial probiótico, razón por la cual fueron seleccionadas para este estudio. Asimismo, se incluyeron como referencia cepas comerciales (con propiedades probióticas ya demostradas) y una cepa de colección, pertenecientes a las mismas especies bacterianas que las cepas en estudio.

Tabla 3 – Microorganismos utilizados en el presente estudio.

CEPA	ORIGEN	REFERENCIA
<i>L. paracasei</i> JP1 ^a	Colección INLAIN	Vinderola y col., 2008
<i>L. rhamnosus</i> 64 ^a	Colección INLAIN	Vinderola y col., 2008
<i>L. gasseri</i> 37 ^a	Colección INLAIN	Vinderola y col., 2008
<i>L. paracasei</i> DN114001	Danone	
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio	
<i>L. gasseri</i> ATCC 33323	ATCC	Azcárate y col., 2008

^a La identidad de las cepas fue confirmada por secuenciación de un fragmento del gen 16S ADNr.

1.2 Condiciones de cultivo y conservación

Las cepas se cultivaron en caldo o agar MRS (Britania, Argentina), a 37°C en aerobiosis. Para su conservación en el cepario del INLAIN, cultivos overnight (12-16 h) se inocularon (10 % v/v) en 1 ml de caldo MRS adicionado de glicerol (15 % v/v) como agente crioprotector, y se congelaron (-20°C y -70°C).

2. Identificación de las cepas y análisis de su diversidad genética

2.1 Extracción de ADN total

A partir de cultivos (10 ml) overnight (caldo MRS, 37°C) de las cepas, se aisló ADN total de acuerdo a Foley y col. (1998) con la siguiente modificación: las células se lavaron con buffer TSE (Tris pH 8,0 50 mM, sacarosa 6,7 % p/v, EDTA 1 mM) y se resuspendieron en el mismo buffer adicionado con 30 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y 200 U/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich), incubando la suspensión durante 1 h sobre hielo. El lisado se trató con 125 µl de SDS 10 % (p/v) y 0,4 mg/ml de proteinasa K (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), durante 30 min a 65°C, agregando 50 mg/ml de RNasa A (GE Healthcare) e incubando durante 30 min adicionales a la misma temperatura. Se realizaron tres extracciones con fenol-cloroformo (50 % v/v) en presencia de 0,3 M de acetato de sodio (pH 5,0), precipitando luego el ADN con isopropanol frío (4°C). El pellet se lavó dos veces con etanol 70 % (v/v) y se resuspendió en 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) para luego ser conservado a -20°C. Se determinó su concentración mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v) (Sambrook y Russell, 2001).

2.2 Secuenciación de un fragmento del gen 16S ADN_r

Debido a que en un trabajo previo (Vinderola y col., 2008) las cepas se habían identificado preliminarmente mediante el test de fermentación de azúcares (galería API 50) y el empleo de sondas específicas de especie, la identidad de las cepas se confirmó mediante la amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento de 348 bp perteneciente al gen que codifica para el 16S ARN_r, utilizando los primers universales Y1 y Y2 (Young y col., 1991). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 1 µl de ADN (diluido 10-50 veces) como templado, 2,5 U de Taq ADN Polimerasa (GE Healthcare), 200 nM de dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada primer (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX, USA), en un volumen final de 50 µl, incluyendo un control negativo (sin ADN) de reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) bajo las condiciones indicadas en la Tabla 5. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa (1,5 % p/v) en buffer TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001). Los amplicones se purificaron por medio de las columnas MicroSpin (GE Healthcare) y se determinó su secuencia nucleotídica por “primer extension” (Servicio de Secuenciación de Macrogen, Corea). Las secuencias se ensamblaron y compararon empleando el software Vector NTI 9.0.0 (Informax) y la identidad de las cepas se determinó mediante análisis BLAST de las secuencias genómicas disponibles en las bases de datos.

2.3 Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR)

Para evaluar la diversidad genética de cepas mediante RAPD se utilizó como templado 1 µl de ADN total de las cepas (diluido 10-50 veces), 200 µM de dNTPs y 2,5 unidades de Taq Polimerasa. En tres reacciones independientes, se incluyeron los siguientes primers: M13 (2 µM; Huey y Hall, 1989), B10 (0,5 µM; Binetti y col., 2007) y 1254 (0,8 µM; Akopyanz y col., 1992). Las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 4. Los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1,0-1,5 % p/v) para su posterior tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001).

3. Detección e identificación de cepas en matrices alimentarias mediante técnicas moleculares

3.1 Extracción de ADN total a partir de productos comerciales

Se seleccionaron muestras de leches fermentadas y quesos comerciales (Actimel, Activia y Bioqueso Iloley Vita), y elaborados en el INLAIN (cepas en estudio + *S.thermophilus* Jo1 para leches fermentadas y 73, 77, 90, 91 para quesos) cuya microflora está integrada por bacterias lácticas starters y bacterias probióticas. La extracción de ADN a partir de las muestras se realizó de acuerdo a la metodología de Ogier y col. (2004) modificada por Flórez y col. (2006). Para ello, se tomaron 10 g (queso) ó 10 ml (leche fermentada) del producto en esterilidad y se disolvieron en 45 ml de citrato de sodio 2 % (p/v), disgregando y homogeneizando la muestra en una licuadora (previamente esterilizada); se

agregaron 50 mg de pronasa (Roche, Basel, Suiza) y 100 μ l de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó a 52°C durante 3 h, agitando periódicamente. Posteriormente, se centrifugó (15 minutos, 5°C, 4000 x g) y el pellet se lavó dos veces con agua bidestilada estéril. Las células se resuspendieron en 500 μ l de buffer TSE, la suspensión se incubó durante 10 minutos en hielo y luego se trató con, aproximadamente, 300 mg de “glass beads” (150-200 μ m, Sigma-Aldrich) y 300 μ l de fenol-cloroformo (50 % v/v), agitando (vortex) la mezcla durante 6 minutos. Se centrifugó (10 minutos, 5°C, 9300 x g) y se pasó la fase acuosa (superior) a un tubo limpio. Se procedió a la extracción, precipitación y lavado del ADN total, de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001).

3.2 Detección e identificación de las cepas en diferentes matrices alimentarias

Teniendo en cuenta la identidad de las cepas en estudio, se seleccionaron sondas específicas de cada especie (Tilsala-Timisjarvi y Altossava, 1997; Walter y col., 2000; Kwon y col., 2004) que amplifican fragmentos genómicos comprendidos entre los genes que codifican para las subunidades 16S y 23S del ARNr. Las reacciones de PCR se realizaron empleando 1 μ l de ADN (diluido 10-50 veces) como templado, 2,5 U de Taq ADN Polimerasa, 200 nM de dNTPs y el tipo y cantidad de primer específico para cada especie, según se detalla en la Tabla 4, en un volumen final de 25 μ l, e incluyendo un control negativo de reactivos (sin ADN). Como control positivo de reacción se utilizó ADN de cepas comerciales o de colección, pertenecientes a las mismas especies bacterianas en estudio. Las

condiciones de amplificación se indican en la Tabla 5. Los productos de PCR se separaron geles de agarosa (1,5 % p/v) (Sambrook y Russell, 2001).

4. Capacidad de desarrollo de las cepas en diferentes medios de cultivo

Se determinó la capacidad de desarrollo de las cepas en leche y subproductos de bajo costo de la industria láctea (sueros de queso y de manteca) suplementados con una fuente externa de nitrógeno (Burns y col., 2008). Para ello, cultivos overnight (caldo MRS, 37°C) de las cepas en estudio se lavaron dos veces con buffer PBS (KH_2PO_4 40 mM, K_2HPO_4 60 mM, pH 7,0), resuspendiendo las células en 10 ml del mismo buffer. A partir de estas suspensiones bacterianas se inocularon (2 % v/v) 150 ml de cada uno de los medios a ensayar: leche descremada estéril reconstituida (10 % p/v); suero de manteca (7,8 % p/v) y suero de queso (5 % p/v), adicionados (0,3 % p/v) de extracto de levadura (Britania, Argentina). Asimismo, se utilizó caldo MRS como medio de cultivo control. Los cultivos se alicuotaron de a 10 ml, incubándose en un baño a 37°C durante 24 h. Cada dos horas se midió (por duplicado) el pH y se determinó el número de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h).

Tabla 4- Primers, concentración de dNTPs y tamaño de los fragmentos amplificados en las diferentes reacciones de PCR.

PRIMER	SECUENCIA 5´- 3´	[PRIMERS] (µM)	[DNTPS] (µM)	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (bp)	REFERENCIA
Y1 Y2	TGGCTCAGGACGAACGGTCGCGG CCTACTGCTGCCTCCGTAGGAGT	0,4	200	348	Young y col., 1991
1254	CCGCAGCCAA	0,8	200		Akopyanz y col., 1992
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	2	200		Huey y Hall, 1989
B10	CTGCTGGGAC	0,5	200		Binetti y col., 2007
Grupo <i>L. casei</i> ^a IDL11F IDL03R	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG CACTTCTCCGGTTTGTCA	0,4	200	727	Kwon y col., 2004
<i>L. rhamnosus</i> PRI RHA II IDL04F IDL73R	CAGACTGAAAGTCTGACGG GCGATGCGAATTTCTATTATT AGGGTGAAGTCGTAACAAGAGCC GCCAACAAGCTATGTGTTTCGCTTGC	2	200	186	Tilsala- Timisjarvi y Alatossava, 1997 Kwon y col., 2004
<i>L. gasseri</i> GASI GASII	GAGTGCGAGACACTAAAG CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT	0,4	200	245	Walter y col., 2000
<i>S. thermophilus</i> Sth1 Sth2	CACTATGCTCAGAATACA CGAACAGCATTGATGTTA	0,5	200	968	Lick y col., 1996
<i>Bifidobacterium</i> Lm26 Lm23	GATTCTGGCTCAGGATGAACG CGGGTGCTICCCACTTTCATG	1	300	1350	Kaufmann y col., 1997
<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> l-c F l-c R	CTTCGTTATGATTTTACA CAATATCAACAATTCCAT	2	200	933	Corroler y col., 1998

<i>L. plantarum</i>	AGGGTGAAGTCGTAACAAGAGCC					
IDLo4F	CTAGTGGTAACAGTTGATTAATAACTGC	0,4	200	428	Kwon y col., 2004	
IDL62R						
<i>L. delbrueckii</i>						
IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	0,4	200	184	Kwon y col., 2004	
IDLo3R	CACTTCTCCGGTTTGTC					

^a El grupo *L. casei* incluye las especies *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae*.

Tabla 5- Condiciones de amplificación utilizadas en las diferentes reacciones de PCR

PRIMER(S)	ESPECIE/ GÉNERO	CICLO INICIAL	Nº DE CICLOS	DESNATURALIZACIÓN	ANNEALING	EXTENSIÓN	CICLO FINAL
Y1/Y2		94°C 1 min	35	94°C 30 seg	61°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 7 min
1254			4	94°C 5 min	36°C 5 min	72°C 5 min	72°C 7 min
			30	94°C 1 min	36°C 1 min	72°C 2 min	
M13		94 °C 3 min	35	94°C 2 min	45°C 20 seg	72 °C 2 min	72°C 7 min
B10			30	94°C 1 min	36°C 2 min	72°C 2 min	72°C 7 min
IDL11F/IDL03R	Grupo <i>L. casei</i> ^a	94°C	35	94°C	60°C	72°C	72°C
IDLo4F/IDL22R	<i>L. acidophilus</i>	3 min		45 seg	40 seg	45 seg	7 min
IDL31F/IDL03R	<i>L. delbrueckii</i>						
PRI/RHAI	<i>L. rhamnosus</i>	94°C	35	94°C	55°C	72°C	72°C
IDLo4F/IDL73R	<i>L. rhamnosus</i>	3 min		45 seg	45 seg	1,5min	7 min
IDLo4F/IDL32R	<i>L. plantarum</i>						
GASI /GASII	<i>L. gasseri</i>						
STH1/STH2	<i>S. thermophilus</i>						
Lm26/lm23	<i>Bifidobacterium</i>						
l-cF/l-cR	<i>L. lactis</i>	94°C 3 min	35	94°C 45 seg	45°C 30 seg	72°C 2min	72°C 7 min

^a El grupo *L. casei* incluye las especies *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae*.

5. Desarrollo en medios de cultivos selectivos/diferenciales para el recuento de bacterias probióticas

Se determinó la respuesta (recuperación celular) en medios de cultivo selectivos/diferenciales empleados en el INLAIN para el control de viabilidad de bacterias probióticas en productos lácteos fermentados comerciales, según Vinderola y Reinheimer (2000).

La experiencia se llevó a cabo a partir de cultivos overnight (caldo MRS, 37°C) de las cepas en estudio, determinando el número de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h) en diferentes condiciones. Los medios ensayados fueron agar MRS-LP (agar MRS adicionado de cloruro de litio 0,2; 0,25; 0,3 y 0,4 % p/v; y ácido propiónico 0,3; 0,4; 0,45 y 0,6 % p/v) y agar MRS-B (agar MRS adicionado de bilis bovina 0,15; 0,2; 0,25 y 0,3 % p/v). Como control de desarrollo se utilizó agar MRS. Se ensayaron diferentes concentraciones de los agentes selectivos para determinar la respuesta en caso de que sea necesario aumentar las mismas para lograr una adecuada inhibición de los cultivos iniciadores que podrían acompañar a las cepas en un producto lácteo fermentado.

6. Resistencia a factores de estrés tecnológicos

6.1 Tolerancia a la acidez láctica durante el almacenamiento refrigerado y resistencia a barreras gastrointestinales

Se determinó la capacidad de sobrevivencia de las cepas en estudio suspendidas en leche descremada (10 % p/v) o leche descremada acidificada (pH 4,5 con ácido láctico 85 % v/v) durante el almacenamiento refrigerado (4 semanas, 5°C), según

Vinderola y col. (2000a). Cultivos overnight (caldo MRS, 37°C) se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,0), resuspendiendo las células en el medio correspondiente, hasta un nivel inicial de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Las suspensiones bacterianas se alicuotaron en tubos estériles (15 ml) sin dejar espacio de cabeza, y se conservaron a 5°C durante 4 semanas. A tiempo inicial y a los 30 días, se realizaron recuentos de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h). Asimismo, a partir de estas muestras se ensayó la resistencia a barreras gastrointestinales como una medida *in vitro* de funcionalidad. Para ello, cada suspensión se diluyó (1:1) con solución salina (SS) 2X (SS: CaCl₂ 0,22 g/l; NaCl 6,2 g/l; KCl 2,2 g/l; NaHCO₃ 1,2 g/l) conteniendo 0,6 % (p/v) de pepsina bovina (Merck) y se incubó en un baño termostático a 37°C, con agitación y control dinámico de pH, acidificando gradualmente desde pH 5,0 hasta pH 2,5 en un período de 90 min (Fig. 3), mediante el agregado de volúmenes variables de HCl 1 M y 0,1 M (digestión gástrica), de acuerdo a Marteau y col. (1997). A los 0, 60, 70, 80 y 90 min se realizaron recuentos de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h).

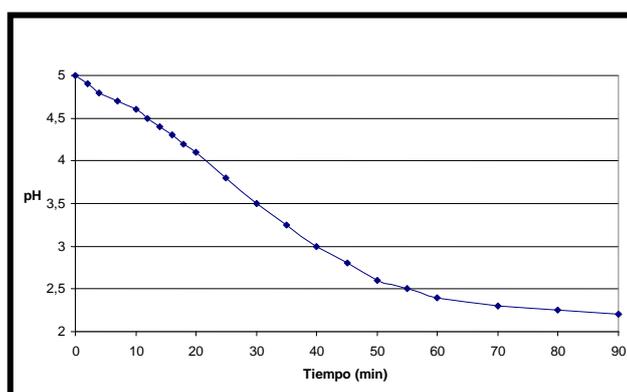


Figura 3- Evolución del pH durante la digestión gástrica simulada (adaptado de Marteau y col., 1997).

Luego de los 90 minutos se tomó una alícuota de la suspensión celular, se centrifugó (10 minutos, 5°C, 9300 x g), se eliminó el sobrenadante y el pellet se

resuspendió en una solución de bilis bovina (Sigma)-pancreatina (Sigma) (0,3 % p/v de bilis bovina y 0,1 % p/v de pancreatina) disuelta en buffer PBS (0,1 M pH 8,0). Esta suspensión se mantuvo, con agitación, a 37°C durante 60 minutos (digestión intestinal) y luego se realizó un recuento celular (agar MRS, 37°C, 48 h).

6.2 Viabilidad de concentrados congelados a -20°C y -70°C durante el almacenamiento a largo plazo (12 meses)

Cultivos overnight (caldo MRS, 37°C) de las cepas en estudio se centrifugaron (10 minutos, 5°C, 4000 x g), se lavaron con buffer PBS (pH 7,0) y se resuspendieron en leche descremada reconstituida (10 % p/v), suero de queso (10 % p/v) y suero de manteca (10 % p/v) o MRS adicionado de glicerol (15 % v/v) como crioprotector (medio de referencia). Las suspensiones se congelaron (-20°C y -70°C) y se determinó mensualmente el número de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h) durante 12 meses de conservación.

6.3 Tolerancia a sales (NaCl y KCl)

Se determinó la resistencia a sales comúnmente empleadas en la elaboración de quesos, según Vinderola y col. (2002). Para esto, se evaluó el desarrollo de las cepas en caldo MRS adicionado de NaCl y KCl.

A partir de un cultivo overnight (caldo MRS, 37°C) de cada cepa, se inocularon (2 % v/v) tubos conteniendo caldo MRS-NaCl (1 % y 2 % p/v) y MRS-KCl (1 % y 2 % p/v). Como control de desarrollo, se utilizó un cultivo de la cepa en caldo MRS. La incubación se llevó a cabo durante 24 h a 37°C en baño

termostatzado y se midió la Absorbancia a $\lambda=560$ nm. Una vez obtenidos los valores, se calculó el crecimiento relativo según la fórmula siguiente:

$$\text{Crecimiento relativo} = A_{NaCl/KCl} / A_{control} \times 100$$

donde: $A_{NaCl/KCl}$ y $A_{control}$ son los valores de absorbancia correspondiente a los cultivos desarrollados en caldo MRS+sal (NaCl o KCl) y MRS, respectivamente.

7. Resistencia a barreras biológicas. Digestión gastrointestinal simulada: acidez gástrica, resistencia a bilis-pancreatina

Un cultivo overnight (caldo MRS, 37°C) de cada cepa se inoculó al 1 % (v/v) en 40 ml de caldo MRS, incubando durante 16 h a 37°C. Las células se cosecharon y se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7,0) estéril y el pellet se resuspendió en 20 ml de solución salina (SS) o 20 ml de leche descremada estéril (10 % p/v). Asimismo, se utilizó un cultivo overnight (16 h, 37°C) de la cepa en leche (20 ml). En todos los casos, a los 20 ml de suspensión o cultivo se le adicionó un volumen igual de SS (a la suspensión original en SS) o SS 2x (a la suspensión en leche y al cultivo en leche) conteniendo 0,6 % (p/v) de pepsina bovina (Merck). La suspensión se incubó en un baño termostatzado a 37°C, con agitación y control dinámico de pH, acidificando gradualmente desde pH 5,0 hasta pH 2,5 en un período de 90 min (Figura 3), mediante el agregado de volúmenes variables de HCl 1 M y 0,1 M (digestión gástrica), de acuerdo a Marteau y col. (1997). A los 0, 60, 70, 80 y 90 min se realizaron recuentos de células viables (agar MRS, 37°C, 48 h). Luego de los 90 minutos se tomó una alícuota de la suspensión celular, se centrifugó (10 minutos, 5°C, 9300 x g), se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de bilis bovina (Sigma)-pancreatina (Sigma) (0,3 %

p/v de bilis bovina y 0,1 % p/v de pancreatina) disuelta en buffer PBS (0,1 M pH 8,0). Esta suspensión se mantuvo, con agitación, a 37°C durante 60 minutos (digestión intestinal) y luego se realizó un recuento celular (agar MRS, 37°C, 48 h).

8. Seguridad y funcionalidad *in vitro*

8.1 Seguridad: resistencia a antibióticos

Cultivos frescos de las cepas se estriaron en agar MRS (37°C, 48 h) y, a partir de una colonia aislada, se realizó una segunda estría en placas de agar LSM (90 % v/v de agar Isosensitest, 10 % v/v de agar MRS, Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra), con incubación bajo las mismas condiciones anteriores. Se suspendieron 1-10 colonias en 1 ml de solución salina (NaCl 0,9 % p/v), de modo de asegurar una densidad equivalente al estándar 1 de la escala McFarland. Con esta suspensión se impregnó un hisopo estéril y se distribuyó sobre la superficie de placas de agar LSM, 3 veces por placa, rotando la misma 60° cada vez para distribuir uniformemente el inóculo. Las placas se secaron (20 min, aproximadamente) en cabina de flujo laminar y sobre ellas se aplicaron, en esterilidad, las tiras E-test® (AB Biodisk, Oxoid Inc., Ontario, Canadá), para determinar la resistencia de las cepas frente a los siguientes antibióticos: cloramfenicol, eritromicina, estreptomina, tetraciclina y vancomicina. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y luego se leyeron los valores de **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)** según las indicaciones del fabricante.

8.2 Funcionalidad: hidrofobicidad superficial

Este ensayo cuantifica la tendencia que poseen los lactobacilos para pasar de una fase polar (buffer fosfato de potasio) a otra hidrofóbica o no polar (*n*-hexadecano u otro hidrocarburo). La medida de hidrofobicidad es un indicador primario del potencial de adhesión de las cepas a las superficies mucosas (Pérez y col., 1998).

La partición de cultivos puros en fase acuosa-fase orgánica fue determinada según Vinderola y Reinheimer (2003). Se centrifugaron (5 min, 5°C, 4000 x g) cultivos frescos (fase estacionaria) de las cepas en estudio, lavando luego los pellets dos veces con buffer PBS (pH 7,0), para resuspenderlos en el mismo buffer hasta una Absorbancia ($\lambda=560$ nm) de, aproximadamente, 1 (A_o). 3 ml de esta suspensión celular se pusieron en contacto con 0,6 ml de *n*-hexadecano y se agitó con vortex durante 2 minutos. Las suspensiones se incubaron durante 1 h a 37°C para permitir la separación de las fases y se removió cuidadosamente la fase acuosa (inferior) con aguja y jeringa, midiendo su Absorbancia (A). La hidrofobicidad celular (H %) se calculó de la siguiente manera:

$$H \% = [(A_o - A) / A_o] \times 100$$

donde A_o y A son los valores de Absorbancia antes y después de la partición en *n*-hexadecano, respectivamente.

9. Seguridad y funcionalidad *in vivo*

9.1 Animales

Se utilizaron 60 ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad (21 ± 1 g) provenientes de la colonia cerrada del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe), el cual cuenta con habilitación sanitaria del SENASA y ANMAT. Los animales se alojaron en cajas de plástico transparentes en grupos de 5 animales/jaula y se mantuvieron bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (6 am-6 pm), a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ con una renovación del aire de 20 veces el volumen de la sala por hora. Los animales se aclimataron por un período de 7 días antes de comenzar los ensayos, siendo alimentados *ad libitum* con alimento balanceado convencional rata-ratón (Cooperación, Buenos Aires) y agua de red. Los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (National Institute of Health, USA).

9.2 Administración oral de las cepas en estudio

Cultivos overnight (caldo MRS, 37°C) de las cepas se lavaron con buffer PBS (pH 7,0), se resuspendieron en 100 ml de leche descremada (1 % p/v) estéril, de modo de asegurar una concentración de 10^8 UFC/ml, y se colocaron en reemplazo del agua de bebida durante 2, 5 y 7 días consecutivos. Dichas suspensiones celulares se renovaron diariamente. Se verificó que no haya deposición de células por autoagregación ni modificaciones en el número de células viables/ml. Se establecieron tres grupos control: control de bioterio (sacrificados al comienzo de

la experiencia), control agua (recibieron agua como bebida) y control leche (recibieron leche 1 % p/v como bebida). A lo largo de la experiencia, los animales recibieron alimentación convencional *ad libitum*, se midió el consumo de agua o leche y se monitoreó el peso y el estado de los animales mediante la observación del pelaje, actividad, agresividad y comportamiento de grupo.

9.3 Seguridad: traslocación bacteriana

Al final de cada período de alimentación, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con 0,2 ml de una solución de ketamina (50 mg/ml), xilazina (20 mg/ml) y acepromacina (10 mg/ml). Los animales se pesaron y fueron sacrificados por dislocación cervical, extrayéndose macrófagos peritoneales (por lavado de la cavidad peritoneal), hígado e intestino delgado y grueso. Se registró el peso de hígado y se realizó un homogenato en 5 ml de buffer PBS. Diluciones seriales del homogenato se sembraron en profundidad en agar ABRV (Britania) y se incubaron a 37°C durante 24 h (Vinderola y col., 2005).

9.4 Seguridad: examen histológico de la mucosa intestinal

Muestras de intestino delgado (zona del íleon) e intestino grueso se fijaron en solución de formaldehído bufferada (4% v/v), aplicando luego la técnica de Sainte-Marie (1962) para su deshidratación en una serie ascendente de alcoholes e inclusión en parafina. Cortes histológicos (3-4 µm) se desparafinaron, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron mediante microscopía óptica para el estudio de la arquitectura intestinal (Vinderola y col., 2005).

9.5 Funcionalidad: ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales se extrajeron de la cavidad peritoneal por lavado con 5 ml de buffer heparina sódica (0,1 % v/v) (Heparin, 5000 UI/ml) + BSA (0,3 % p/v) (Sigma) y se conservaron en baño de hielo. La suspensión se centrifugó (10 min, 5°C, 5000 x g), se lavó dos veces con la solución de extracción y se ajustó a 1×10^6 células/ml con cámara de Neubauer. Se verificó que la viabilidad sea > 95 % mediante tinción de exclusión con azul de tripán (Sigma). Luego, 100 µl de esta suspensión de macrófagos se puso en contacto (30 min, 37°C) con 100 µl de una suspensión de *Candida albicans* (1×10^7 células/ml) inactivada por calor y opsonizada (10:1 v:v) con suero sanguíneo de ratón, durante 15 min a 37°C. El porcentaje de fagocitosis se determinó como el porcentaje de macrófagos que habían adherido o incorporado una o más células de levaduras mediante observación microscópica (40x) de 200 macrófagos (Vinderola y col., 2005).

9.6 Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino

En cortes histológicos de intestino delgado e intestino grueso se determinó el número de células productoras de IgA, en lámina propia, mediante inmunofluorescencia directa empleando un anticuerpo anti-cadena α de IgA de ratón (Sigma-Aldrich) conjugado con isotiocanato de fluoresceína (Vinderola y col., 2005). Luego de la incubación de las muestras histológicas con el anticuerpo, se contó el número de células fluorescentes (microscopía de fluorescencia, 400 x) y se expresó el resultado como N° de células IgA+/10 campos observados.

10. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó utilizando el software SPSS 15.0 para Windows (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., 2006). Los datos obtenidos a partir del desarrollo en medios de cultivo selectivos/diferenciales, de la tolerancia a sales y de los ensayos *in vivo* se analizaron aplicando un test ANOVA de un factor, asumiendo varianzas iguales (pruebas de Tukey y de Duncan). El nivel de significancia estadística se estableció en $P < 0,05$.

Resultados

1. Identificación de las cepas y análisis de su diversidad genética

1.1 Secuenciación de un fragmento del gen 16S ADNr

En la Figura 4 se observan los productos de reacción obtenidos por amplificación de un fragmento interno del gen 16S ADNr de las cepas en estudio, utilizando los primers Y1 e Y2. En los 3 casos (calles 1-3) se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado (348 bp).

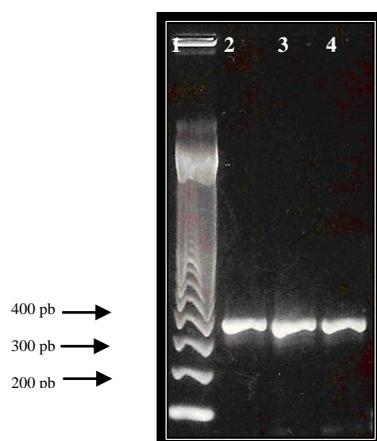


Figura 4- Amplificación de fragmentos del gen 16S ADNr de las cepas en estudio. 1: marcador de peso molecular (100bp, Healthcare), 2: cepa JP1; 3: cepa 64; 4: cepa 37.

Las secuencias nucleotídicas de los productos de amplificación fueron sometidas al análisis BLAST para determinar la identidad de las cepas. Las Figuras 5, 6 y 7 muestran los alineamientos múltiples de las secuencias genómicas correspondientes a las cepas en estudio y a cepas cuyas secuencias están disponibles en las bases de datos. Como puede observarse, en todos los casos se evidenció un alto grado de similitud (>98 %) con secuencias genómicas pertenecientes a cepas de las especies *L. paracasei* (cepa JP1, Fig. 5), *L. rhamnosus* (cepa 64, Fig. 6) y *L. gasseri* (cepa 37, Fig. 7). De este modo, las cepas fueron identificadas como *L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37.

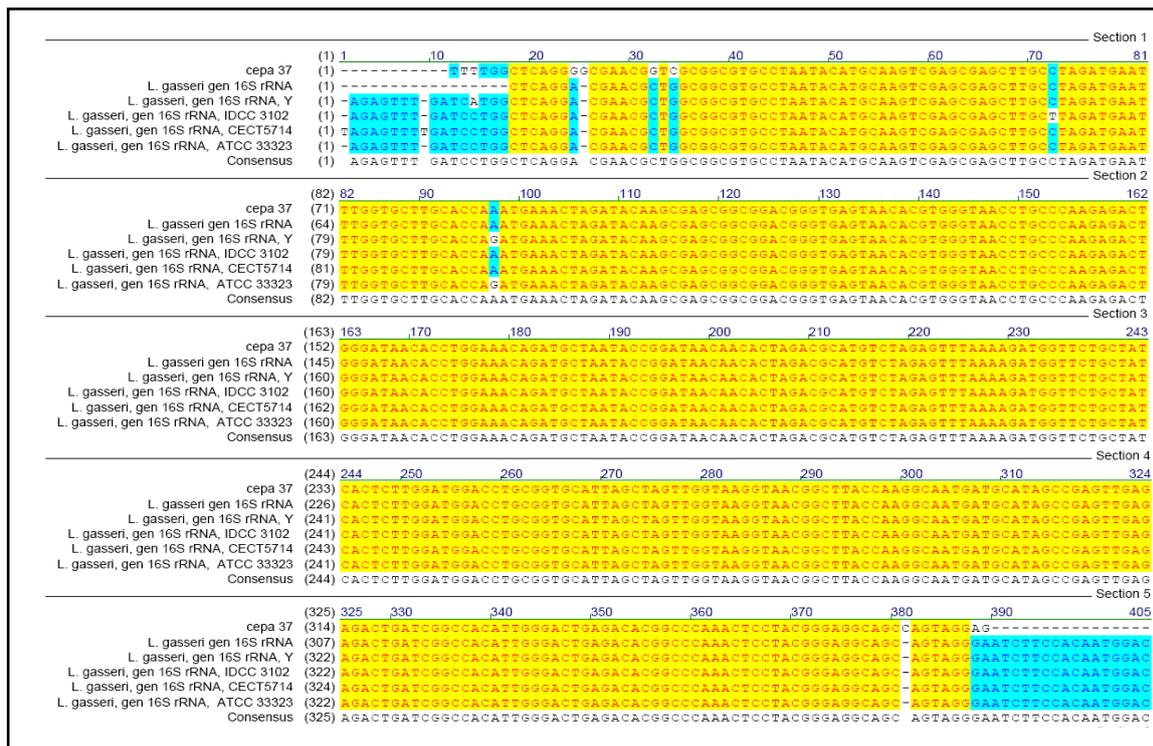


Figura 6- Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del fragmento Y1/Y2 del gen 16S ADNr, correspondiente a la cepa 64 y cepas con secuencia disponible en las bases de datos (el sombreado amarillo indica identidad entre las secuencias analizadas).

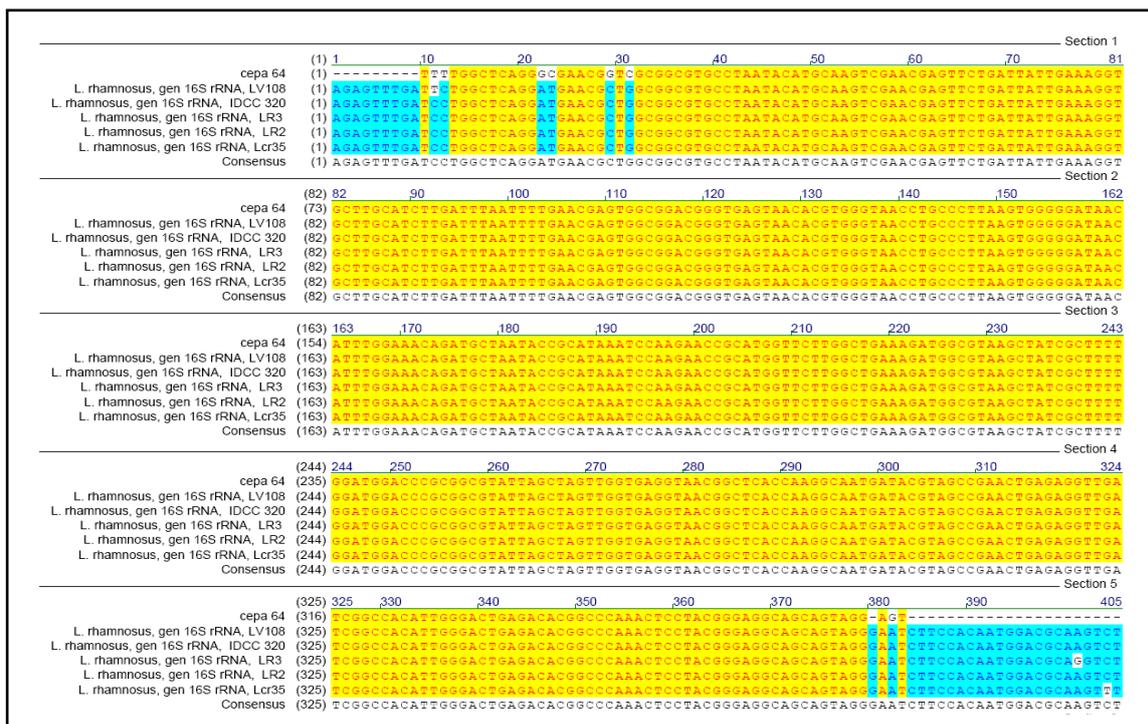


Figura 7- Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del fragmento Y1/Y2 del gen 16S ADNr, correspondiente a la cepa 37 y cepas con secuencia disponible en las bases de datos (el sombreado amarillo indica identidad entre las secuencias analizadas).

1.2 Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR)

Las Figuras 8, 9 y 10 muestran los resultados obtenidos mediante amplificación del ADN genómico de las cepas en estudio con los primers 1254, B10 y M13, respectivamente. En todas las reacciones se incluyeron cepas comerciales y de colección (pertenecientes a las mismas especies bacterianas) como referencia. Si se compara el perfil RAPD obtenido para *L. paracasei* JP1 (calle 2) con el correspondiente a la cepa comercial *L. paracasei* DN114001 (calle 3) en la Figura 8, se observan sólo algunas bandas comunes para el primer utilizado (1254), resultando los perfiles particulares para ambas cepas. Lo mismo ocurre cuando se comparan los perfiles RAPD, producto del uso del primer B10, de las cepas *L. paracasei* JP1 (calle 3) y *L. paracasei* DN114001 (calle 4) de la Figura 9. Cuando se

utilizó el primer M13, no se observó señal de amplificación para *L. paracasei* JP1 (Fig. 10, calle 2). A pesar de ello, los perfiles RAPD obtenidos con los otros dos primers permiten asegurar que *L. paracasei* JP1 y *L. paracasei* DN114001 son cepas diferentes, pertenecientes a la misma especie bacteriana. Resultados similares se observan al comparar los productos de amplificación obtenidos para las cepas *L. rhamnosus* 64 y *L. rhamnosus* GG. En este caso, se observa un mayor número de fragmentos en común (Fig. 8, calles 4 y 5; Fig. 9, calles 5 y 6; Fig. 10, calles 4 y 5), pero cada uno de los perfiles presenta bandas características que permiten diferenciar ambas cepas. Finalmente, si se comparan los perfiles RAPD correspondientes a las cepas *L. gasseri* 37 y *L. gasseri* ATCC 33323 (Fig. 8, calles 6 y 7; Fig. 9, calles 7 y 8; Fig. 10, calles 6 y 7), se evidencia diversidad genética a partir de sus perfiles RAPD, indicando que se trata de 2 cepas diferentes.

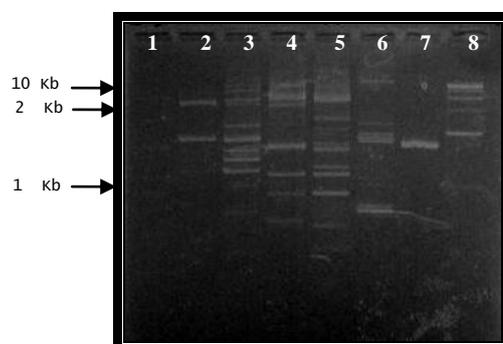


Figura 8- RAPD (primer 1254) de las cepas en estudio y las cepas de referencia. 1: control negativo; 2: *L. paracasei* JP1; 3: *L. paracasei* DN114001; 4: *L. rhamnosus* 64; 5: *L. rhamnosus* GG; 6: *L. gasseri* 37; 7: *L. gasseri* ATCC 33323; 8: marcador de peso molecular (1 Kb, Amersham).

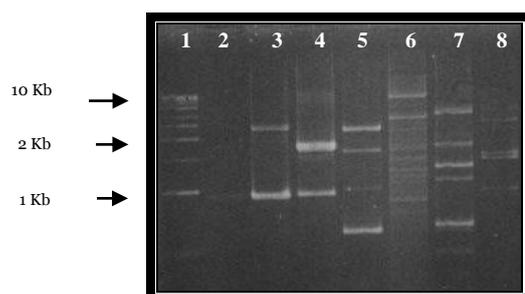


Figura 9- RAPD (primer B10) de las cepas en estudio y las cepas de referencia. Calle 1: marcador de peso molecular (1 Kb, Amersham); 2: control negativo; 3: *L. paracasei* JP1; 4: *L. paracasei* DN114001; 5: *L. rhamnosus* 64; 6: *L. rhamnosus* GG; 7: *L. gasseri* 37; 8: *L. gasseri* ATCC 33323.

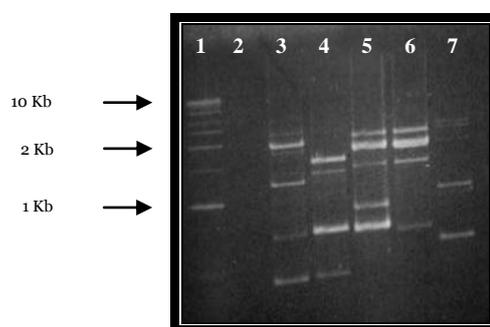


Figura 10- RAPD (primer M13) de las cepas en estudio y las cepas de referencia. 1: marcador de peso molecular (1 Kb, Amersham); 2: *L. paracasei* JP1; 3: *L. paracasei* DN114001; 4: *L. rhamnosus* 64; 5: *L. rhamnosus* GG; 6: *L. gasseri* 37; 7: *L. gasseri* ATCC 33323.

2. Detección e identificación de cepas en matrices alimentarias mediante técnicas moleculares

En la Figura 11 se pueden observar los resultados obtenidos al amplificar el ADN (aislado a partir de cultivos puros) de las cepas en estudio, utilizando primers específicos de especie. Como puede verse, utilizando los primers específicos de *L. rhamnosus* (Fig. 11 A, calles 1-4), se obtuvo un producto de amplificación mayoritario del tamaño esperado (186 bp), si bien se observan también bandas inespecíficas de mayor peso molecular. Cuando se utilizaron los primers específicos del grupo *L. casei* (calles 5 a 9), se detectó un único producto de amplificación del tamaño esperado (727 bp). En la Figura 11 B, se observa el producto de

amplificación de *L. gasseri* 37, utilizando los primers específicos de especie, cuyo producto de reacción mayoritario tiene un tamaño de 245 bp.



Figura 11 A- Identificación de las cepas mediante el empleo de sondas específicas de especie. 1-4: primers específicos de *L. rhamnosus*, 1: *L. paracasei* DN114001, 2: *L. rhamnosus* 64, 3: *L. rhamnosus* GG 4: control negativo. 5-9: primers específicos del grupo *L. casei*, 5: *L. rhamnosus* GG, 6: *L. paracasei* DN114001, 7: *L. rhamnosus* 64, 8: *L. paracasei* JP1, 9: control negativo, 10: marcador de peso molecular (100bp, Healthcare).

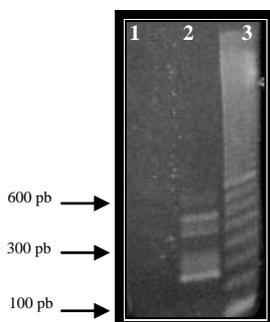


Figura 11 B- Identificación de las cepas mediante el empleo de sondas específicas de *L. gasseri*. 1: control negativo, 2: *L. gasseri* 37, 3: marcador de peso molecular (100 bp, Healthcare).

En la Figura 12 se observan los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN total extraído de productos lácteos (comerciales y elaborados en la planta piloto del INLAIN). En el caso de la Figura 12 A, se utilizó como templado ADN extraído a partir de quesos frescos, amplificándolo con primers específicos para los microorganismos integrantes de su microflora. En todos los casos se observan fragmentos del tamaño esperado, según la especie, grupo o género bacteriano

involucrado: *L. acidophilus*, 606 bp (calle 2); grupo *L. casei*, 727 bp (calles 3 y 7); *S. thermophilus*, 968 bp (calles 4 y 8); *Lactococcus lactis*, 933 bp (calle 5); género *Bifidobacterium*, 1,35 Kbp (calle 6) y *L. plantarum*, 428 bp (calle 9). La Figura 12 B muestra los productos de amplificación obtenidos con los diferentes primers especie-específicos, a partir de ADN total extraído de diferentes leches fermentadas (comerciales y elaboradas en el INLAIN con las cepas en estudio). Del mismo modo, se detectaron fragmentos de amplificación correspondientes a cada una de las especies, grupos o géneros bacterianos implicados: grupo *L. casei*, 727 bp (calles 2, 9 y 12); *L. delbrueckii*, 184 bp (calles 3 y 5); género *Bifidobacterium*, 1,35 Kbp (calle 6); *S. thermophilus*, 968 bp (calles 7, 13, 15 y 17); *L. rhamnosus*, 186 bp (calles 10 y 14) y *L. gasseri*, 245 bp (calles 11 y 16). En la Figura 12 C se muestran los resultados obtenidos mediante amplificación de ADN extraído de diferentes matrices alimentarias (quesos y leches fermentadas) utilizando dos parejas de primers específicos para *L. rhamnosus*.

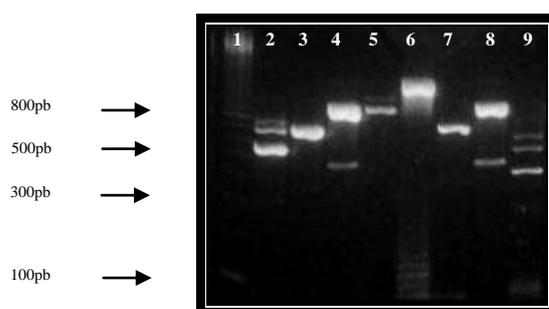


Figura 12 A- Detección e identificación de las cepas en muestras de productos comerciales mediante el empleo de primers específicos de especie. 1: marcador de peso molecular (100bp, Healthcare), 2: Bioqueso (*L. acidophilus*, IDL04F/IDL22R), 3: Bioqueso (grupo *L. casei* IDL11F/IDL03R), 4: Bioqueso (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 5: Bioqueso (*L. lactis* l-cF/l-cR), 6: Bioqueso (*Bifidobacterium* lm26/lm3), 7: Queso INLAIN 90 (grupo *L. casei* IDL11F/IDL03R), 8: Queso INLAIN 90 (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 9: Queso INLAIN 91 (*L. plantarum* IDL04F/IDL62R).

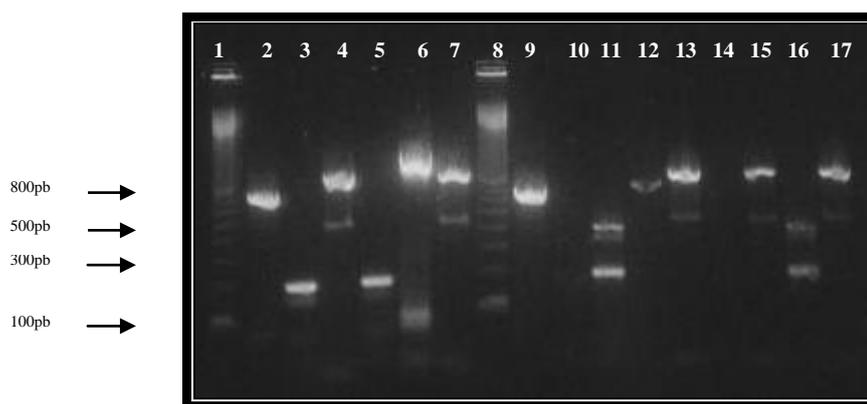


Figura 12 B- Detección e identificación de las cepas en muestras de productos comerciales mediante el empleo de primers específicos de especie. 1: marcador de peso molecular (100bp, Healthcare) , 2: Actimel (grupo *L. casei* IDL11F/IDLo3R), 3: Actimel (*L. delbrueckii* IDL31F/IDLo3R), 4: Actimel (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 5: Activia (*L. delbrueckii* IDL31F/IDLo3R), 6: Activia (*Bifidobacterium* lm26/lm3), 7: Activia (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 8: marcador de peso molecular, 9: *L. paracasei* JP1 (grupo *L. casei* IDL11F/IDLo3R), 10: *L. rhamnosus* 64 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 11: *L. gasseri* 37 (*L. gasseri* GasI/GasII), 12: leche fermentada JP1+ S.th Jo1 (*L. casei* IDL11F/IDLo3R), 13: leche fermentada JP1+ S.th Jo1 (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 14: leche fermentada 64+ S.th Jo1 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 15: leche fermentada 64 + S.th Jo1 (*S. thermophilus* Sth1/Sth2), 16: leche fermentada 37 + S.th Jo1 (*L. gasseri* GasI/GasII), 17: leche fermentada 37 + S.th Jo1 (*S. thermophilus* Sth1/Sth2).

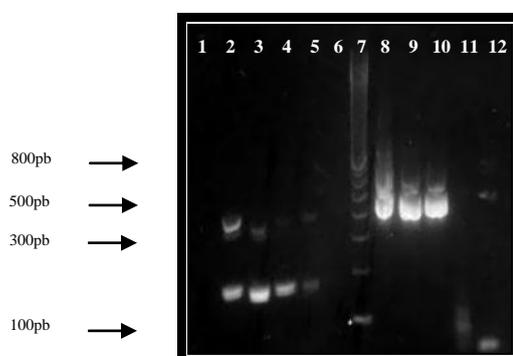


Figura 12 C- Detección e identificación de las cepas en muestras de productos comerciales mediante el empleo de primers específicos de especie. 1: control negativo, 2: *L. rhamnosus* 64 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 3: *L. rhamnosus* 64 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 4: leche fermentada 64 + S.th Jo1 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 5: Queso INLAIN 73 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 6: Queso INLAIN 77 (*L. rhamnosus* PrI/RhaII), 7: marcador de peso molecular (100bp, Healthcare), 8: *L. rhamnosus* 64 (*L. rhamnosus* IDLo4F/IDL73R), 9: *L. rhamnosus* 64 (*L. rhamnosus* IDLo4F/IDL73R), 10: leche fermentada 64 + S.th Jo1 (*L. rhamnosus* IDLo4F/IDL73R), 11: Queso INLAIN 73 (*L. rhamnosus* IDLo4F/IDL73R), 12: Queso 77 (*L. rhamnosus* IDLo4F/IDL73R).

3. Capacidad de desarrollo de las cepas en diferentes medios de cultivo

La Figura 13 muestra la cinética de crecimiento de *L. paracasei* JP1 en distintos medios (leche, suero de manteca y suero de queso) enriquecidos con extracto de levadura (EL). Como puede observarse, tanto en leche, suero de manteca y suero de queso suplementados con extracto de levadura, el desarrollo fue similar, alcanzando luego de 24 h, un nivel de células viables de, aproximadamente, 10^9 UFC/ml.

La Figura 14, por su parte, muestra la cinética de crecimiento de *L. paracasei* DN114001, utilizada como referencia, en los medios antes mencionados. En este caso, a partir de las 6 h de incubación, la cepa desarrolló a una velocidad mayor en los dos sueros con respecto a la leche, pero a tiempo final, las curvas se solaparon, alcanzando prácticamente el mismo nivel final (6×10^9 UFC/ml).

En la Figura 15 se grafican las cinéticas de crecimiento de las cepas *L. paracasei* JP1 y *L. paracasei* DN114001 en caldo MRS. Durante las primeras 10 h de incubación, se evidenció un mayor crecimiento para *L. paracasei* JP1, alcanzando su nivel máximo (2×10^9 UFC/ml). En cambio, *L. paracasei* DN114001 desarrolló hasta un nivel ligeramente inferior ($9,3 \times 10^8$ UFC/ml) luego de 24 h de incubación. Entre ambas cepas no se detectaron diferencias significativas hacia el final del período de desarrollo.

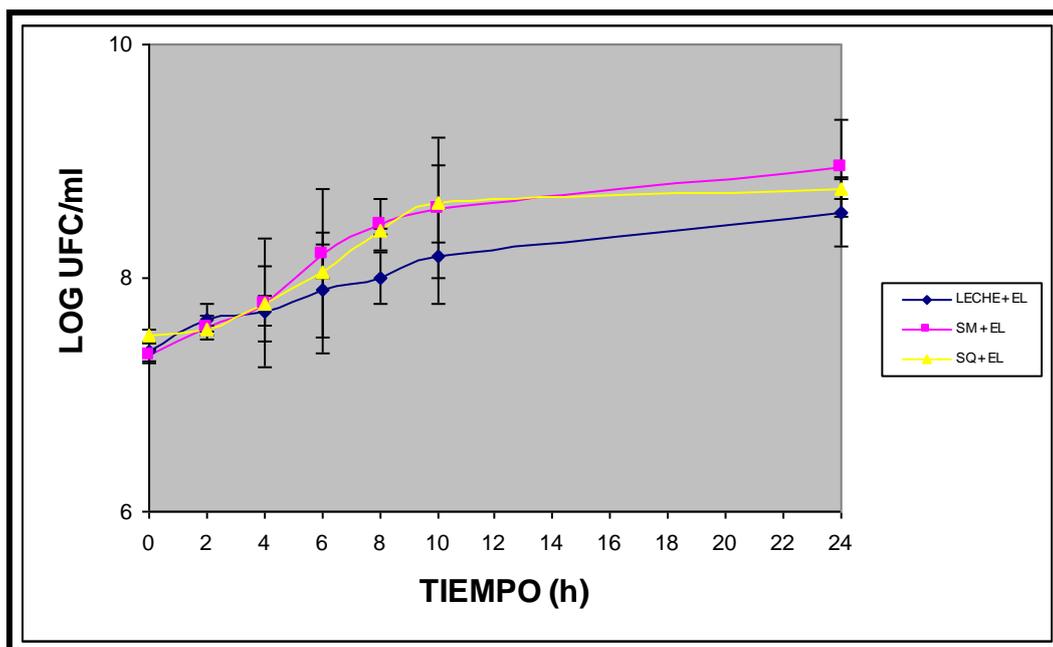


Figura 13- Curva de crecimiento (37°C) de *L. paracasei* JP1 en leche + extracto de levadura (EL), suero de manteca (SM) + EL y suero de queso (SQ) + EL. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

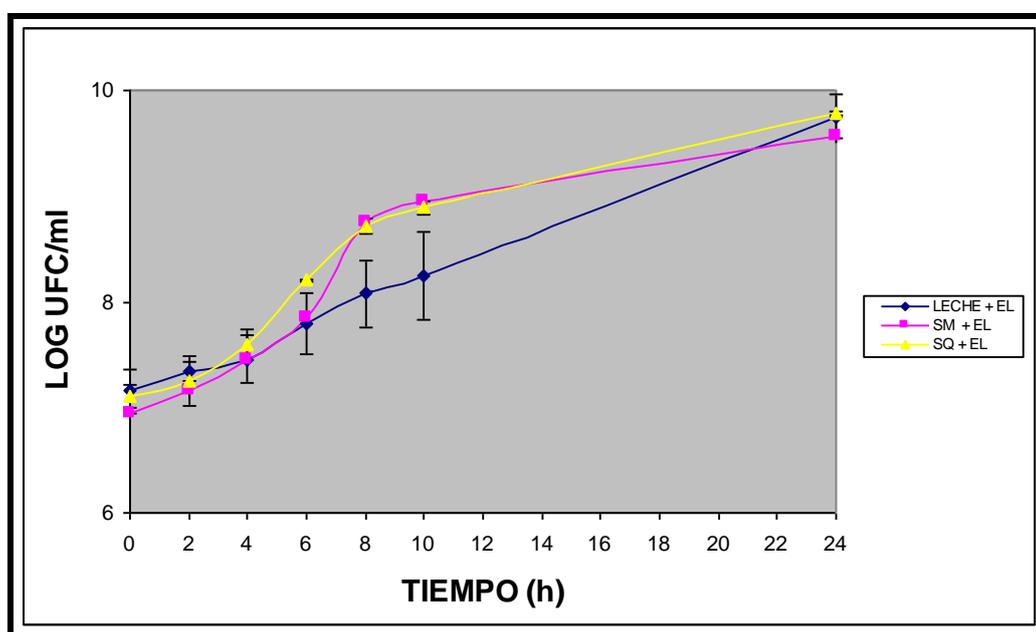


Figura 14- Curva de crecimiento (37°C) de *L. paracasei* DN114001 en leche + extracto de levadura (EL), suero de manteca (SM) + EL y suero de queso (SQ) + EL. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

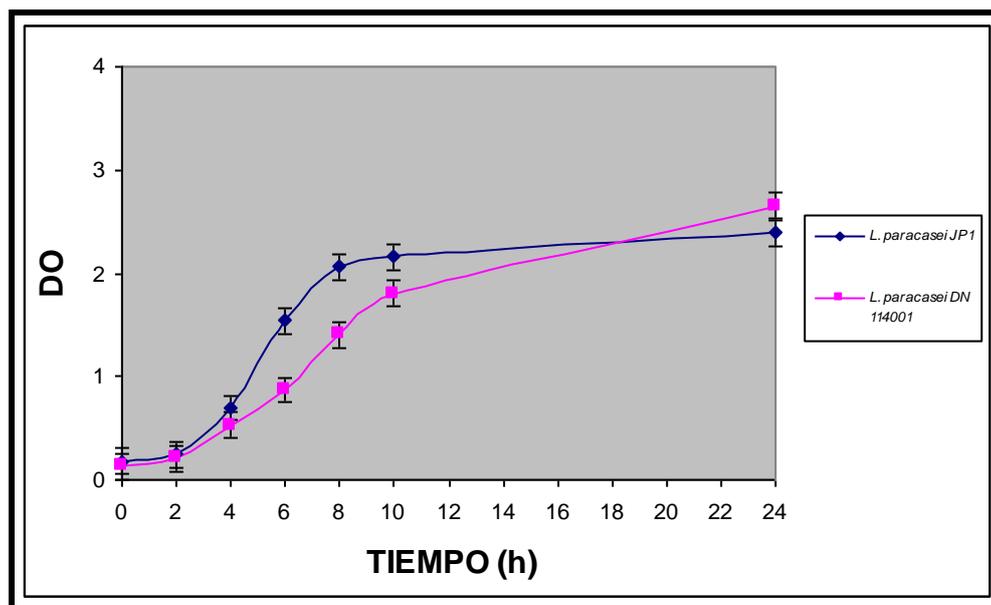


Figura 15- Curva de crecimiento en caldo MRS (37°C) de *L. paracasei* JP1 y *L. paracasei* DN 114001. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 16 muestra la cinética de desarrollo de *L. rhamnosus* 64 en suero de manteca, suero de queso y leche, suplementados con extracto de levadura. En este caso, las curvas resultaron prácticamente idénticas durante las 24 hs de incubación, alcanzando un desarrollo celular de, aproximadamente, $3,5 \times 10^9$ UFC/ml al final del ensayo. Cabe destacar que la cepa comercial *L. rhamnosus* GG, utilizada como referencia, no fue capaz de crecer en ninguno de los medios ensayados.

La Figura 17 presenta la cinética de crecimiento de *L. rhamnosus* 64 y *L. rhamnosus* GG en caldo MRS. En este caso, el desarrollo de *L. rhamnosus* GG fue comparable al de la cepa en estudio durante las primeras 10 hs de experiencia. Luego de 24 hs de fermentación, *L. rhamnosus* GG alcanzó un nivel de desarrollo aproximadamente 1,5 ordenes log superior al observado para *L. rhamnosus* 64.

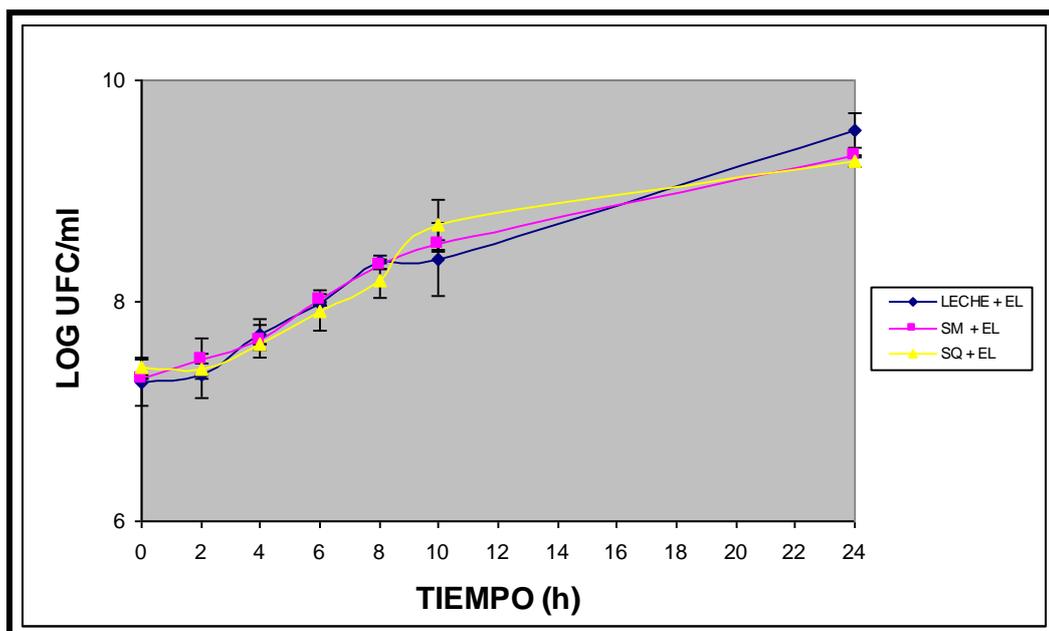


Figura 16- Curva de crecimiento (37°C) de *L. rhamnosus* 64 en leche + extracto de levadura (EL), suero de manteca (SM) + EL y suero de queso (SQ) + EL. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

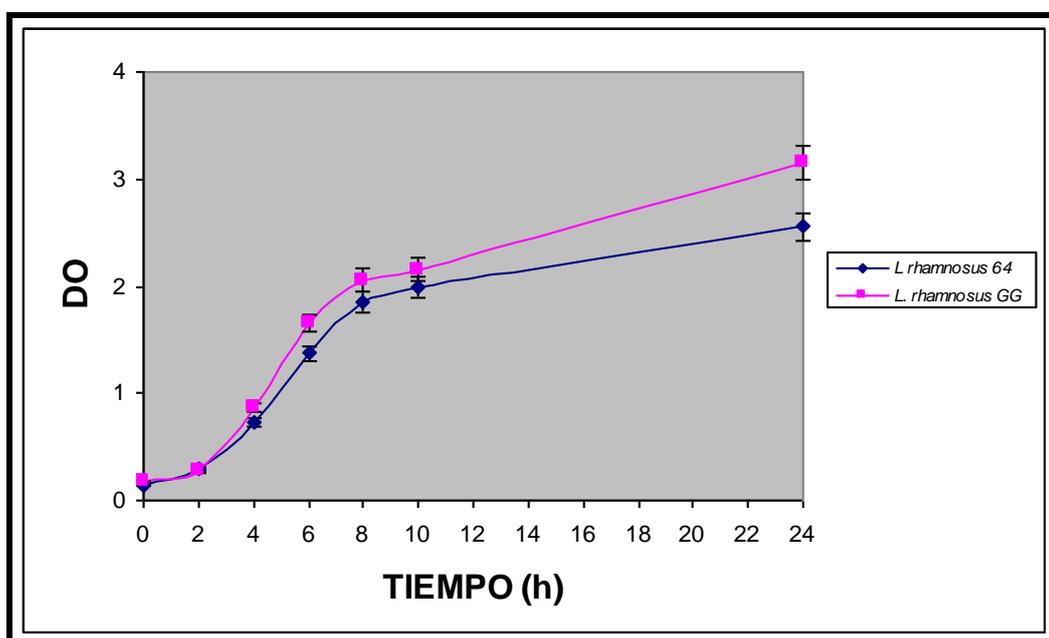


Figura 17- Curva de crecimiento en MRS (37°C) de *L. rhamnosus* 64 y *L. rhamnosus* GG. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

En la Figura 18 se representa la curva de crecimiento de *L. gasseri* 37 en diferentes condiciones. El desarrollo fue más rápido en los sueros de manteca y

queso hasta las 10 hs de incubación, en relación a la leche como sustrato. Luego, el desarrollo en los tres medios se equiparó, alcanzando valores finales de recuento cercanos a 1×10^9 UFC/ml. La Figura 19 muestra la cinética de crecimiento de *L. gasseri* ATCC 33323 en las 3 condiciones. En este caso, el mayor desarrollo se evidenció al usar leche como sustrato, mientras que en suero de queso fue ligeramente inferior y, en suero de manteca, el nivel de células viables sólo se incrementó en 1 orden log después de las 24 hs de fermentación.

Finalmente, en la Figura 20 se muestra la curva de crecimiento en caldo MRS de *L. gasseri* 37 y *L. gasseri* ATCC 33323. En este caso, el desarrollo de la cepa de colección fue mayor al de la cepa en estudio, durante las 24 h de fermentación, alcanzando niveles de células viables de 5×10^9 UFC/ml y $7,5 \times 10^8$ UFC/ml, respectivamente.

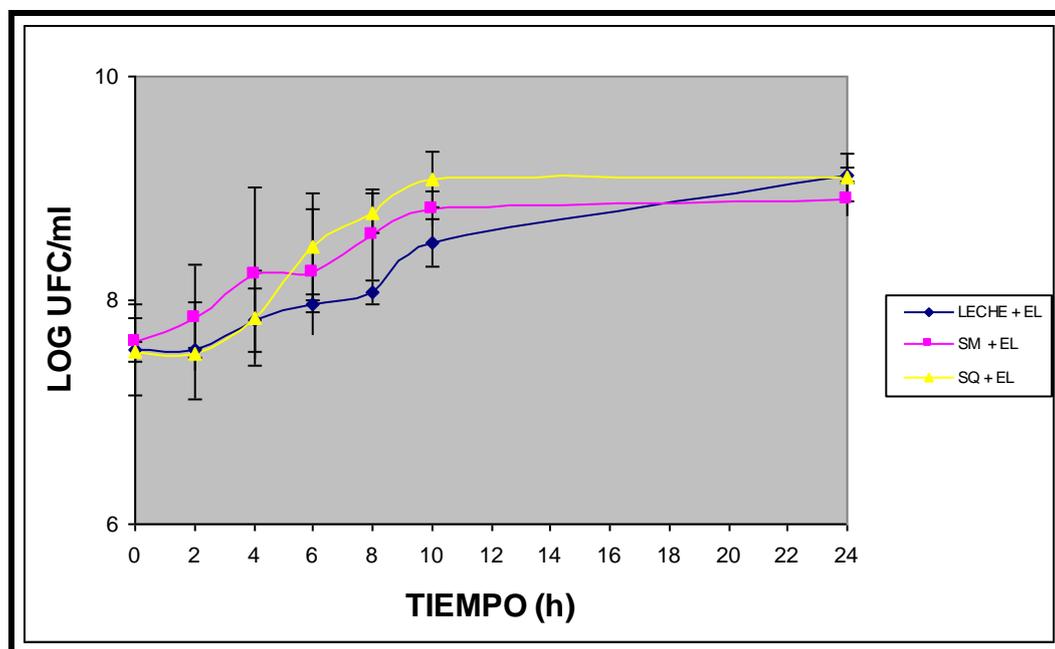


Figura 18- Curva de crecimiento (37°C) de *L. gasseri* 37 en leche + extracto de levadura (EL), suero de manteca (SM) + EL y suero de queso (SQ) + EL. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

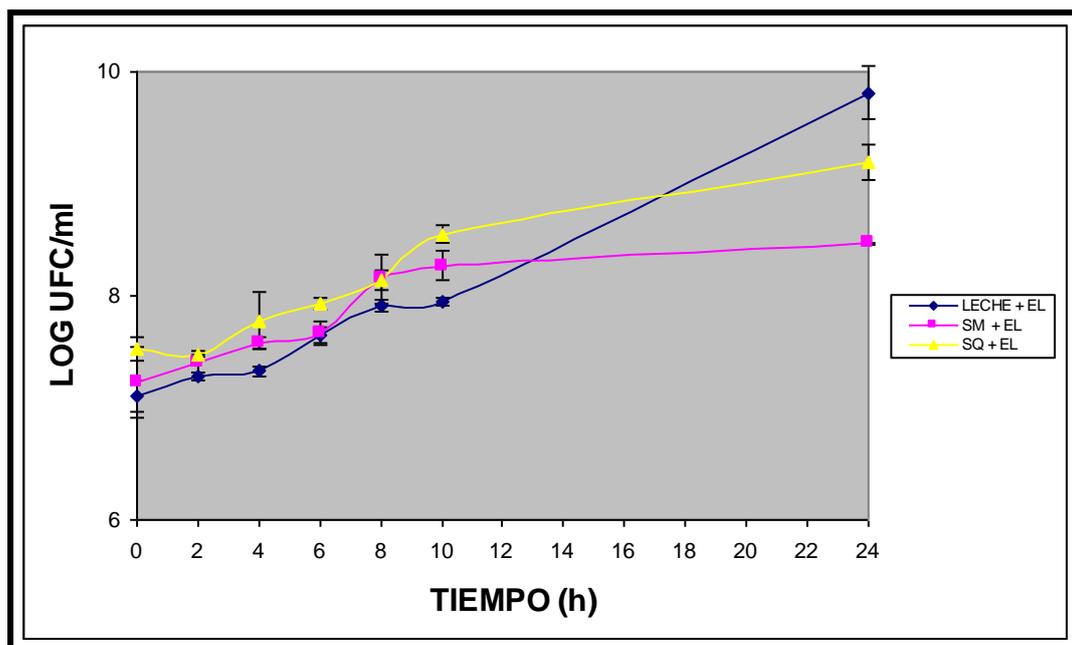


Figura 19- Curva de crecimiento (37°C) de *L. gasseri* ATCC 33323 en leche + extracto de levadura (EL), suero de manteca (SM) + EL y suero de queso (SQ) + EL. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

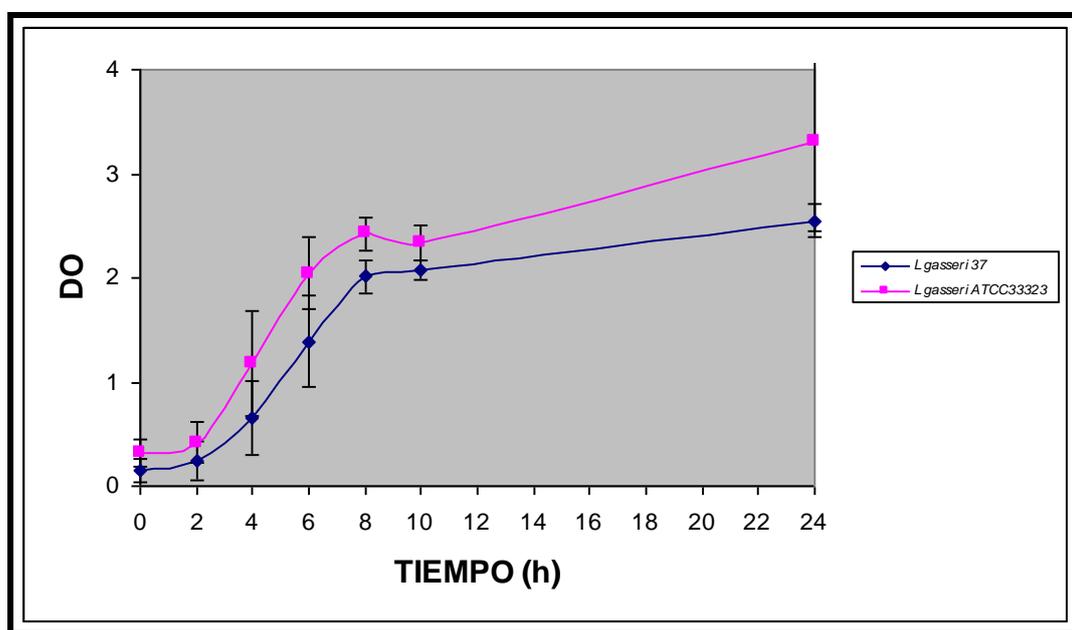


Figura 20- Curva de crecimiento en MRS (37°C) de *L. gasseri* 37 y *L. gasseri* ATCC 33323. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

4. Desarrollo en medios de cultivos selectivos/diferenciales para el recuento de bacterias probióticas

En la Tabla 6 se muestran los resultados del desarrollo de las cepas en estudio en agar MRS-LP (MRS adicionado con concentraciones crecientes de cloruro de litio + propionato de sodio) y agar MRS-B (MRS adicionado con concentraciones crecientes de bilis bovina). Si bien las cepas desarrollaron en ambos medios, se puede ver que la presencia de bilis en concentraciones crecientes, afectó significativamente el desarrollo de *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64, sin afectar el desarrollo de *L. gasseri* 37. En MRS-LP, al agregado de las sales, en las concentraciones ensayadas, no modificó el desarrollo de *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64, mientras que una concentración de 0,4% y 0,6% (p/v) de LiCl y propionato de sodio, respectivamente, disminuyó significativamente la recuperación celular de *L. paracasei* JP1. El desarrollo de *L. gasseri* 37 no se vio influenciado por la presencia de ambos agentes selectivos en ninguna de las combinaciones de concentraciones ensayadas.

Tabla 6- Recuento de células viables (log UFC/ml) de las cepas en estudio en distintos medios de cultivo selectivos/diferenciales, a partir de un cultivo en caldo.

CEPA	Log UFC/ml (valor medio \pm SD)*								
	MRS	MRS-LP**				MRS-B**			
		0,2/0,3	0,25/0,4	0,3/0,45	0,4/0,6	0,15	0,2	0,25	0,30
<i>L. paracasei</i> JP1	8,44 $\pm 0,19^a$	8,34 $\pm 0,06^a$	8,42 $\pm 0,11^a$	8,42 $\pm 0,09^a$	7,45 $\pm 0,01^b$	7,57 $\pm 0,08^b$	7,68 $\pm 0,10^b$	7,27 $\pm 0,04^b$	7,29 $\pm 0,04^b$
<i>L. rhamnosus</i> 64	8,59 $\pm 0,26$	8,19 $\pm 0,02^a$	8,13 $\pm 0,07^a$	8,35 $\pm 0,33^a$	8,35 $\pm 0,40^a$	7,84 $\pm 0,19^b$	7,56 $\pm 0,22^b$	7,79 $\pm 0,26^b$	7,57 $\pm 0,12^b$
<i>L. gasseri</i> 37	9,19 $\pm 0,38^a$	9,18 $\pm 0,09^a$	9,29 $\pm 0,20^a$	9,26 $\pm 0,16^a$	9,07 $\pm 0,29^a$	9,18 $\pm 0,38^a$	9,15 $\pm 0,32^a$	9,19 $\pm 0,40^a$	9,12 $\pm 0,42^a$

* SD: desviación estándar; ** concentración (% p/v) de LiCl/propionato de sodio (MRS-LP) y bilis (MRS-B). *a,b*: valores en filas con diferente superíndice son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

5. Resistencia a factores de estrés tecnológico

5.1 Tolerancia a la acidez láctica durante el almacenamiento refrigerado y resistencia a barreras gastrointestinales

Como puede observarse en la Figura 21, cuando *L. paracasei* JP1 fue suspendido en leche acidificada y sometido al tratamiento de digestión gástrica simulada, no se observó disminución significativa (0,2 orden log) en el nivel de células viables durante los 90 min de tratamiento. En cambio, cuando la suspensión se almacenó refrigerada (5°C) durante 30 días, si bien la viabilidad celular se mantuvo prácticamente inalterada, la resistencia a la acidez gástrica simulada se vio afectada, disminuyendo el recuento celular en, aproximadamente, 2 órdenes log luego de 90 min de tratamiento. En ninguno de los 2 casos se

detectaron células viables luego de someter la cepa al tratamiento con solución de bilis y pancreatina.

En la Figura 22 se puede observar la resistencia a la acidez gástrica de *L. paracasei* JP1 resuspendido en leche y conservado durante 30 días a 5°C. A tiempo cero, se evidenció una leve disminución (1 orden log) en el recuento celular después del tratamiento con solución gástrica. Luego de los 30 días, se observó una leve pérdida de viabilidad en la suspensión (aproximadamente, 0,5 orden log), mientras que la resistencia gástrica de la cepa no sufrió modificaciones respecto al perfil determinado al inicio de su conservación en estas condiciones. La cepa no resistió el tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina.

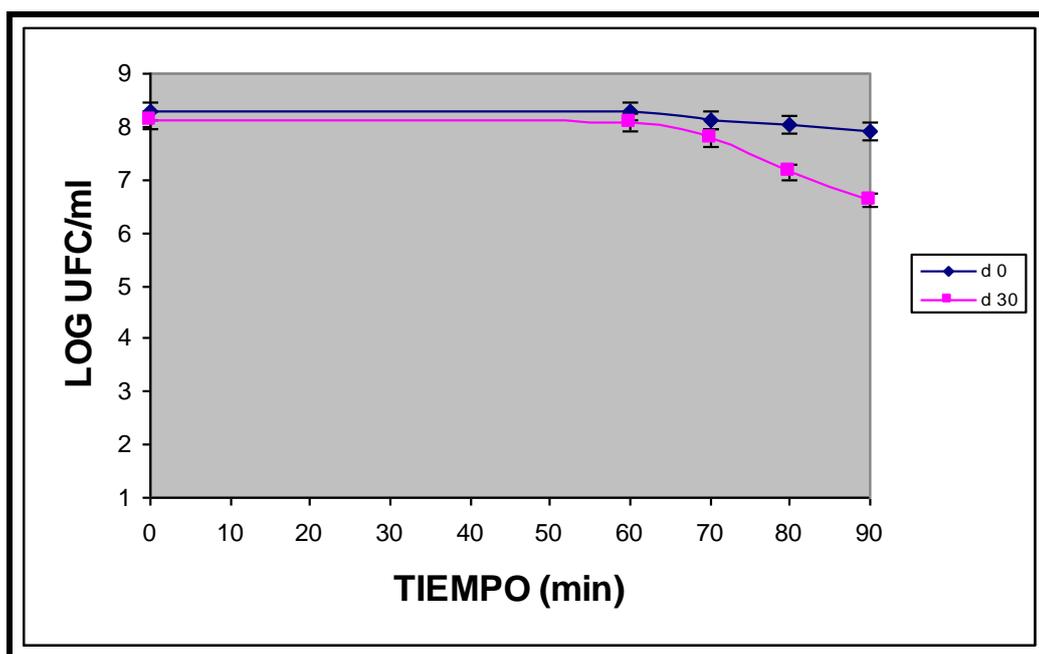


Figura 21- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. paracasei* JP1 resuspendido en leche acidificada (pH 4,5) al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

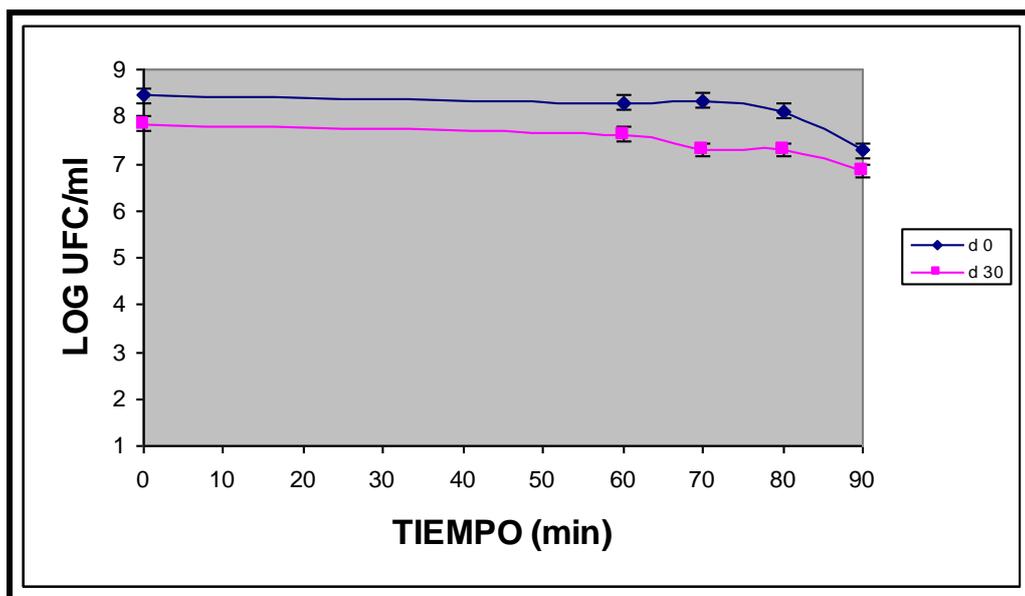


Figura 22- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. paracasei* JP1 resuspendido en leche al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 23 muestra los resultados de viabilidad y resistencia gástrica de *L. rhamnosus* 64 durante su conservación en leche acidificada. En este caso, tanto al inicio de la experiencia como a los 30 días de conservación a 5°C, su resistencia gástrica disminuyó en, aproximadamente, 3 órdenes log durante el tratamiento. Asimismo, luego del período de almacenamiento refrigerado, se verificó una ligera pérdida de viabilidad de la suspensión celular (aproximadamente, 0,5 orden log), mientras que su resistencia a la acidez gástrica simulada no se vio afectada, presentando un perfil similar que al comienzo de la experiencia. No se detectaron células viables luego del posterior tratamiento con solución de bilis y pancreatina.

Por otra parte, en la Figura 24 se observa la resistencia a la acidez gástrica de *L. rhamnosus* 64 resuspendido en leche y conservado durante 30 días a 5°C. Como puede observarse, a tiempo cero, la resistencia a la acidez se vio afectada en, aproximadamente, 2,5 órdenes log luego del tratamiento. A los 30 días de conservación, la viabilidad disminuyó aproximadamente 1,5 órdenes log, y el

tratamiento con solución gástrica afectó seriamente la sobrevida, descendiendo los recuentos de células viables en, aproximadamente, 6 órdenes log luego de 90 min.

En ninguna de las dos condiciones la cepa resistió un tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina, simulando la digestión intestinal.

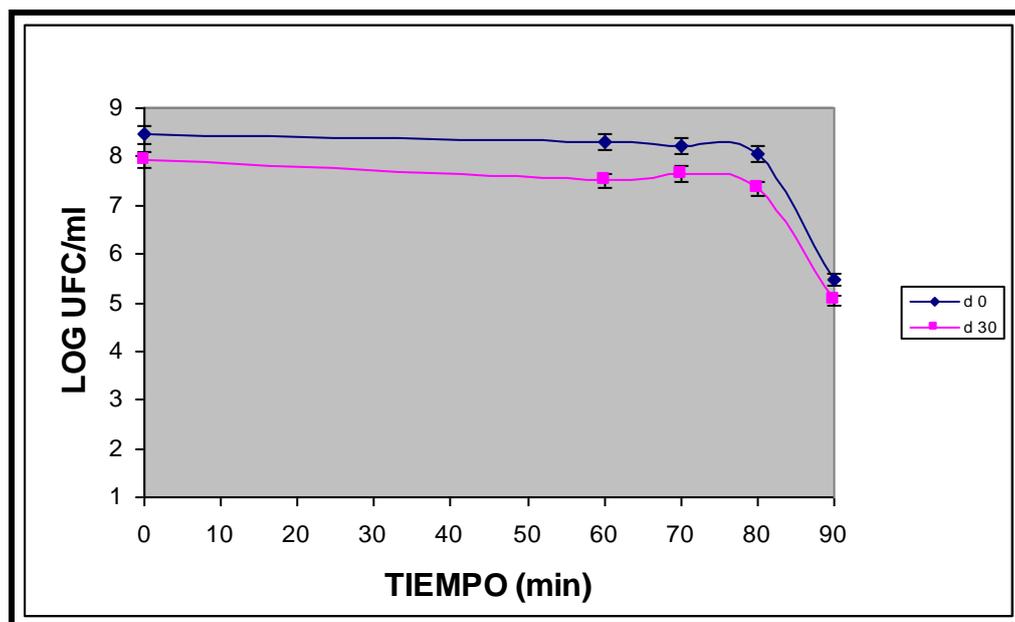


Figura 23- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. rhamnosus* 64 resuspendido en leche acidificada (pH 4,5) al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

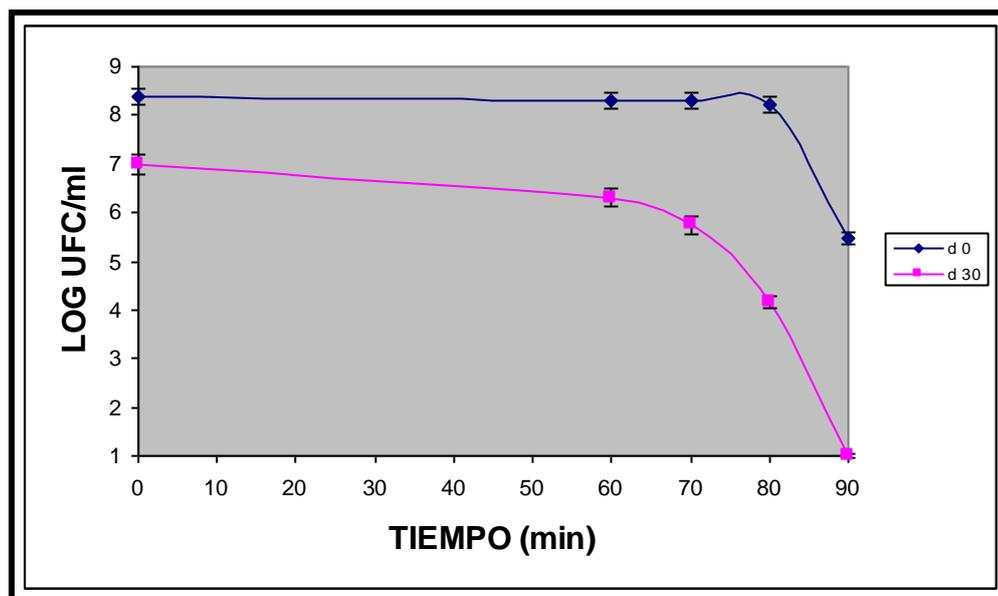


Figura 24- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. rhamnosus* 64 resuspendido en leche al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 25 presenta los resultados de resistencia a la acidez gástrica simulada obtenidos para la cepa *L. gasseri* 37 resuspendida en leche acidificada. A tiempo inicial, la resistencia a la acidez gástrica descendió, aproximadamente, 0,5 ordenes log durante los 90 min de tratamiento, mientras que luego de 30 días de conservación a 5°C, la viabilidad disminuyó en 1 orden log aproximadamente, manteniéndose sin modificaciones luego del tratamiento ácido. En este caso, cuando las 2 suspensiones celulares se sometieron a un tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina, se obtuvieron recuentos de 2×10^7 y 2×10^6 UFC/ml, respectivamente.

Cuando las células fueron resuspendidas en leche (Fig. 26), a tiempo inicial se observó una disminución de 2,5 ordenes log en su resistencia a la acidez gástrica. En cambio, luego de 30 días en refrigeración, si bien la viabilidad disminuyó levemente (aproximadamente 0,5 orden log), la viabilidad se redujo alrededor de 2

ordenes log luego del tratamiento ácido. No se detectaron células viables luego del tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina.

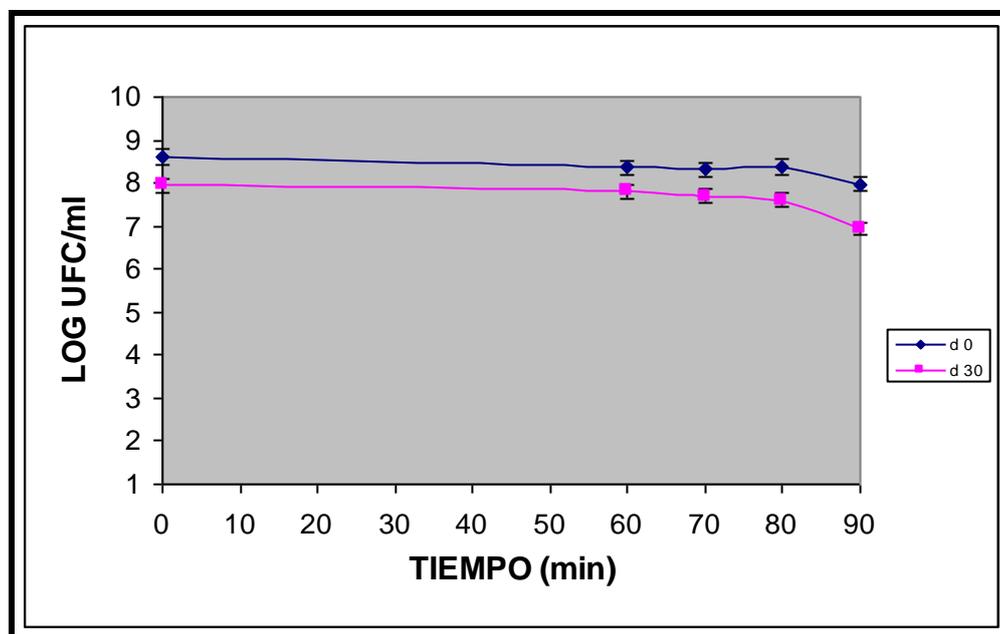


Figura 25- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. gasseri* 37 resuspendido en leche acidificada (pH 4,5) al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

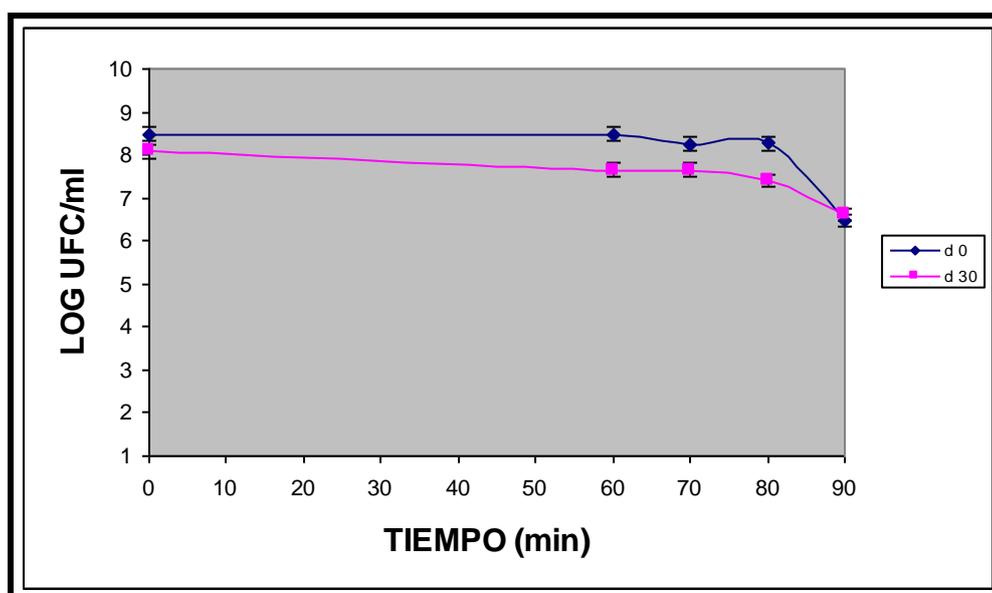


Figura 26- Resistencia a la acidez gástrica simulada (37°C) de *L. gasseri* 37 resuspendido en leche al inicio (d0) y luego de 30 días (d30) de conservación a 5°C. Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

5.2 Viabilidad de concentrados congelados a -20°C y -70°C durante el almacenamiento a largo plazo (12 meses)

La Figura 27 muestra las curvas de viabilidad de *L. paracasei* JP1 suspendido en caldo MRS + glicerol, en leche, en suero de manteca y en suero de queso, durante 12 meses de conservación a -20°C . Tanto en suero de queso como en suero de manteca, hubo ligeras pérdidas de viabilidad celular (menor a 1 orden log) durante el período en estudio. Para el caso de las células resuspendidas en leche, la viabilidad celular disminuyó sólo 0,5 orden log a los 12 meses, mientras que en caldo MRS + glicerol descendió paulatinamente hasta, aproximadamente, 5 órdenes log al final de la experiencia. Los resultados obtenidos durante la conservación de la cepa a -70°C se muestran en la Figura 28. Cuando se emplearon ambos sueros (de queso y de manteca) y leche como crioprotectores, la viabilidad se mantuvo prácticamente inalterada (reducción $< 0,5$ orden log) durante los 12 meses, mientras que cuando la cepa se conservó en caldo MRS + glicerol, la pérdida de viabilidad resultó de, aproximadamente, 1,5 órdenes log luego del período ensayado.

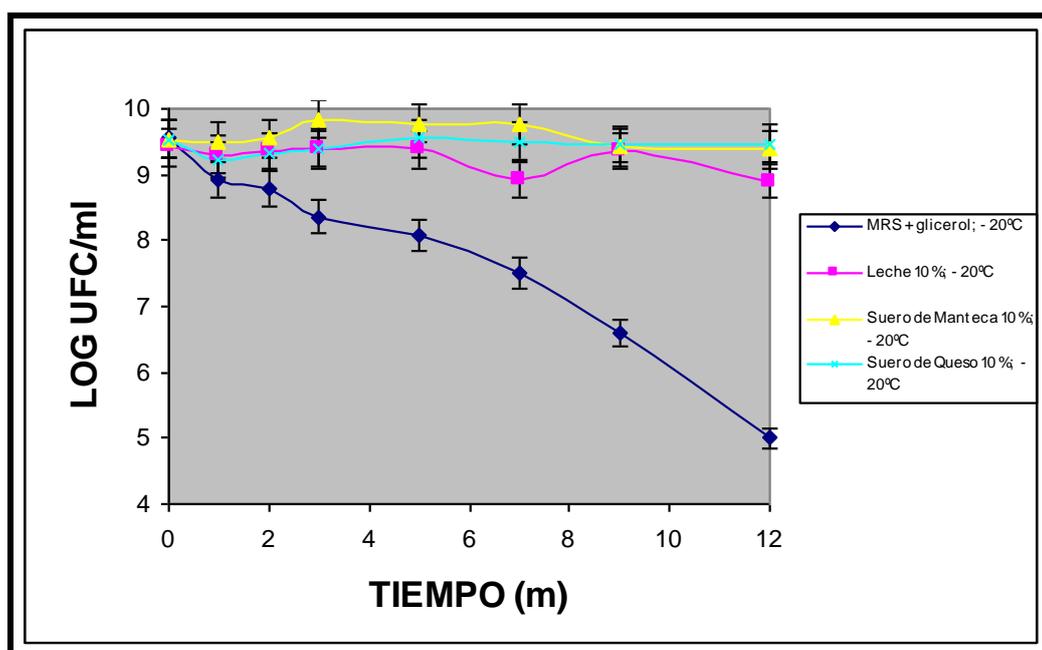


Figura 27- Viabilidad de *L. paracasei* JP1 durante su conservación (-20°C) en caldo MRS + glicerol, leche (10 % p/v), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

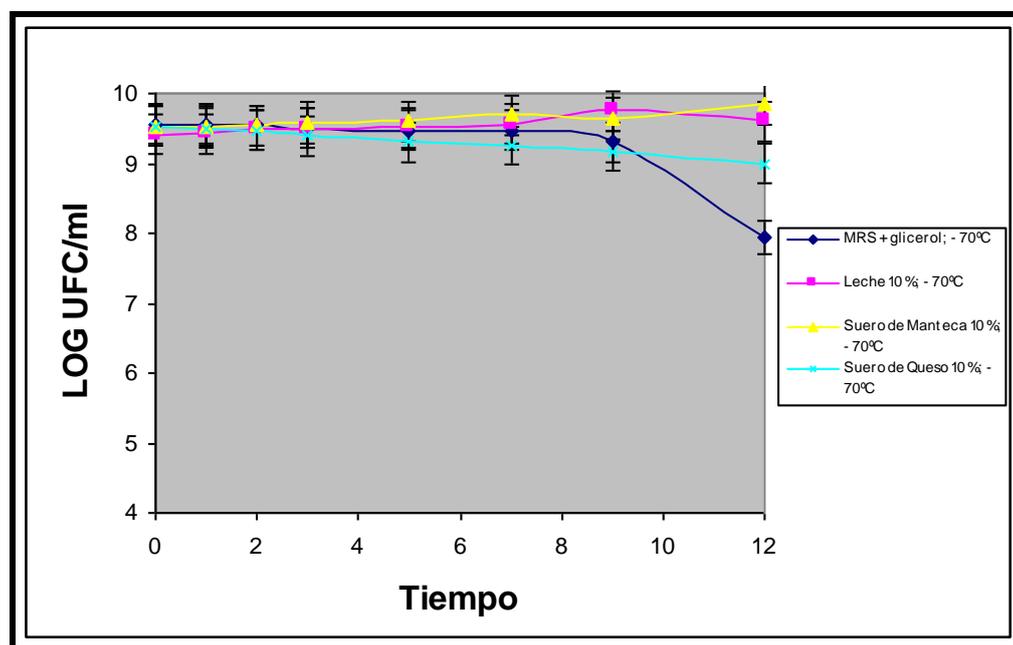


Figura 28- Viabilidad de *L. paracasei* JP1 durante su conservación (-70°C) en MRS + glicerol, leche (10 % p/v), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 29 representa las curvas de viabilidad de *L. rhamnosus* 64 durante su conservación a -20°C en los diferentes medios de suspensión. Se observa que el recuento se mantuvo prácticamente constante durante los 12 meses, tanto en los sueros (de queso y manteca) como en leche, mientras que en caldo MRS + glicerol, la pérdida de viabilidad fue progresiva, alcanzando aproximadamente 4 órdenes log al final del ensayo. La viabilidad durante su conservación a -70°C se grafica en la Figura 30. Como puede observarse, cuando se utilizó leche como medio de suspensión, el recuento celular se mantuvo invariable durante todo el período ensayado. Cuando se empleó suero de queso y suero de manteca, se observó una ligera pérdida de viabilidad hacia el final del ensayo (aproximadamente, 1 orden log). En caldo MRS + glicerol, la viabilidad se vio seriamente afectada a partir del noveno mes de conservación, reduciéndose en 3 órdenes log luego de los 12 meses.

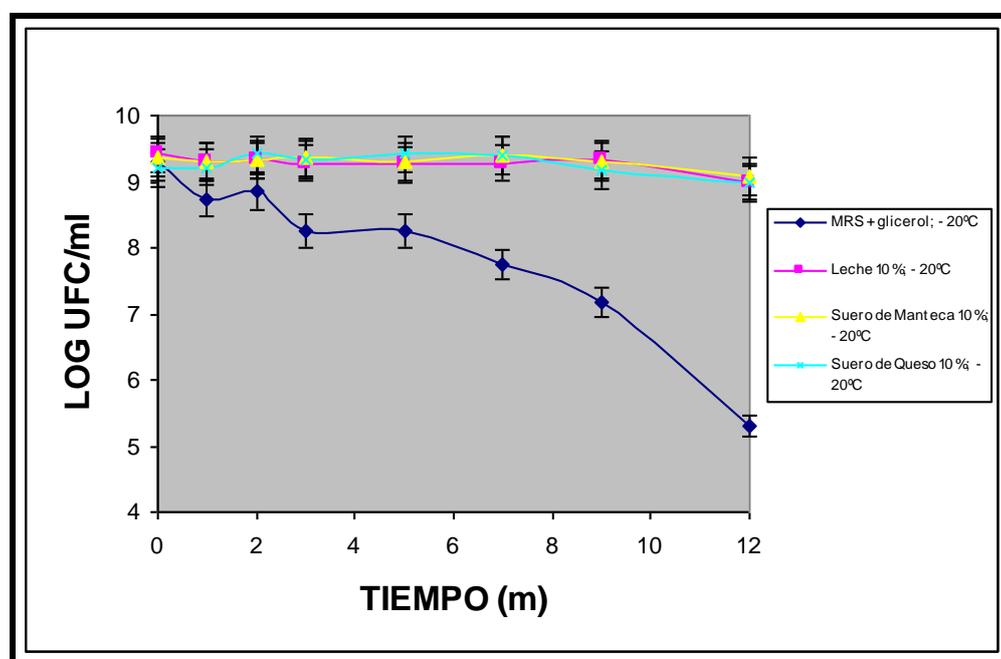


Figura 29-Viabilidad de *L. rhamnosus* 64 durante su conservación (-20°C) en MRS + glicerol, leche (10 % p/v), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

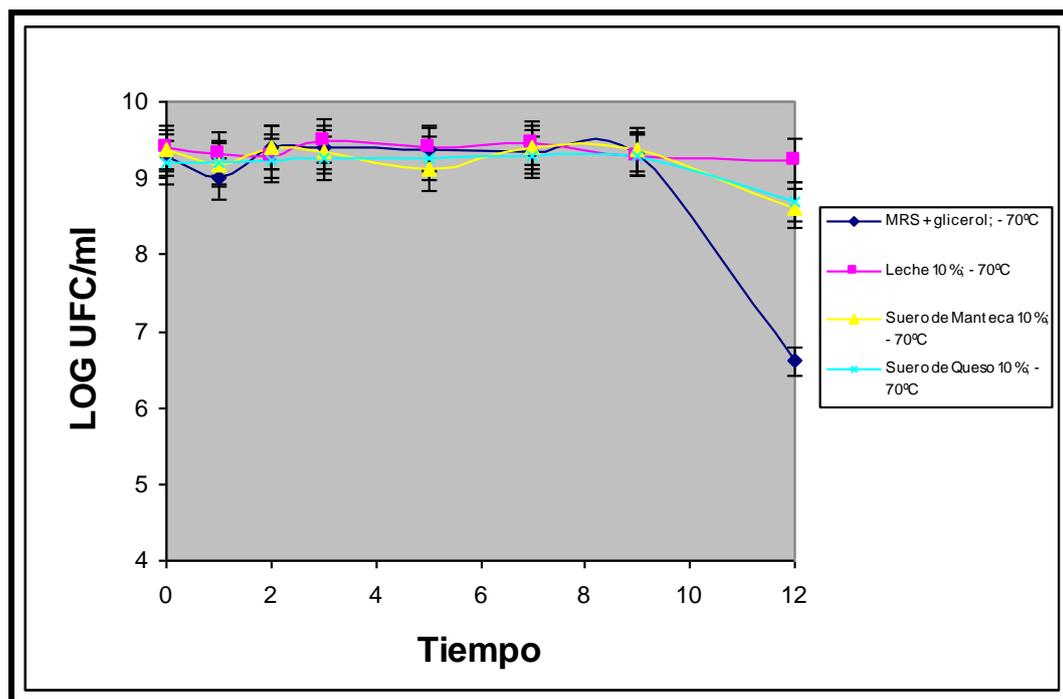


Figura 30- Viabilidad de *L. rhamnosus* 64 durante su conservación (-70°C) en MRS + glicerol, leche (10 %), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 31 muestra la viabilidad de *L. gasseri* 37 en los diferentes medios de conservación a -20 °C. En este caso, la viabilidad de la cepa disminuyó progresivamente en todas las condiciones hasta niveles que resultaron dependientes del medio de suspensión. Al final del ensayo, en suero de manteca, el recuento celular se redujo 3,5 órdenes log, mientras que en suero de queso y leche, la pérdida de viabilidad fue superior, alcanzando, aproximadamente, 5 órdenes log. De un modo similar, cuando se utilizó caldo MRS + glicerol como medio de conservación, la pérdida de viabilidad fue cercana a los 5,5 órdenes log luego de los 12 meses. Durante su conservación a -70°C (Fig. 32), la disminución no fue tan abrupta como a -20°C, alcanzando, luego de los 12 meses, menos de 1 orden log para la cepa resuspendida en suero de queso y suero de manteca, 1 orden log cuando se usó leche como medio de suspensión y 1,5 ordenes para el caso de caldo MRS + glicerol.

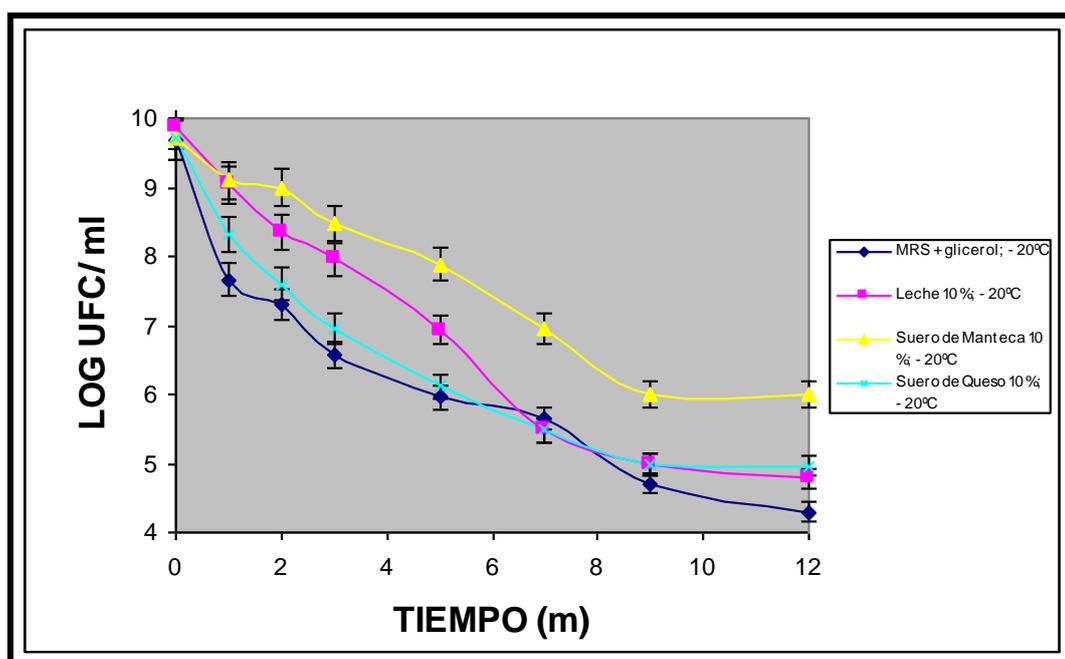


Figura 31- Viabilidad de *L. gasseri* 37 durante su conservación (-20°C) en MRS + glicerol, leche (10 % p/v), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

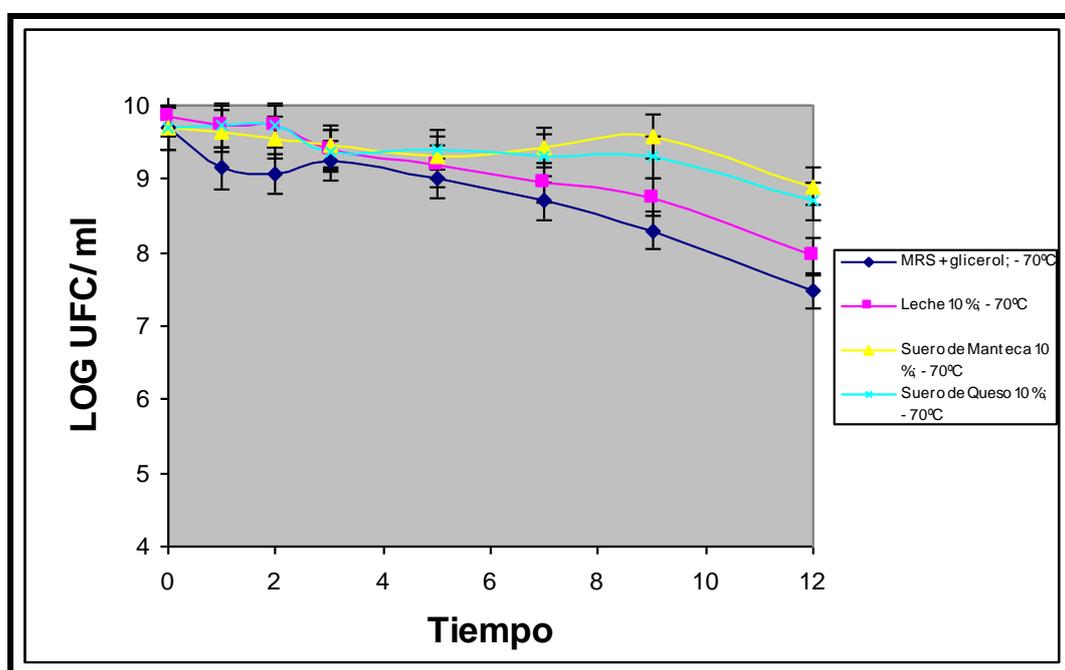


Figura 32- Viabilidad de *L. gasseri* 37 durante su conservación (-70°C) en MRS + glicerol, leche (10 % p/v), suero de manteca (10 % p/v) y suero de queso (10 % p/v). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

5.3 Tolerancia a sales (NaCl y KCl)

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos cuando las cepas en estudio fueron inoculadas en caldo MRS adicionado de sales (NaCl y KCl). La presencia de las sales, en concentraciones de 1 y 2 % (p/v), no afectó significativamente (crecimiento relativo al control > 80 %) el normal desarrollo de las cepas en estudio. Asimismo, cabe remarcar que la única cepa que vio modificado su desarrollo en presencia de 2 % (p/v) de NaCl (valor medio de crecimiento relativo de 64,1 %) fue *L. paracasei* DN114001, desarrollando normalmente en las demás condiciones.

Tabla 7- Crecimiento relativo (%) de las cepas en caldo MRS con el agregado de sales (NaCl y KCl).

Cepa	Crecimiento relativo % (valor medio \pm SD)*			
	MRS NaCl 1 %	MRS NaCl 2 %	MRS KCl 1 %	MRS KCl 2 %
<i>L. paracasei</i> JP1	95,7 \pm 2,4 ^a	91,7 \pm 2,2 ^a	91,8 \pm 9,9 ^a	95,9 \pm 0,6 ^a
<i>L. rhamnosus</i> 64	95,8 \pm 2,9 ^a	88,4 \pm 12,2 ^a	99,6 \pm 0,4 ^a	81,2 \pm 20,6 ^a
<i>L. gasseri</i> 37	96,0 \pm 5,7 ^a	95,5 \pm 6,3 ^a	96,5 \pm 5,0 ^a	97,2 \pm 3,8 ^a
<i>L. paracasei</i> DN114001	100 \pm 0,1 ^a	64,1 \pm 1,3 ^b	99,9 \pm 0,2 ^a	100 \pm 0,0 ^a
<i>L. rhamnosus</i> GG	97,6 \pm 1,28 ^a	87,9 \pm 0,69 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
<i>L. gasseri</i> ATCC33323	89,4 \pm 9,9 ^a	92,6 \pm 9,3 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a

* SD: desviación estándar. ^a: valores que no difieren significativamente ($P > 0,05$) del control (MRS); ^b: valores que difieren significativamente ($P < 0,05$) del control (MRS).

6. Resistencia a barreras biológicas. Digestión gastrointestinal simulada: acidez gástrica, resistencia a bilis-pancreatina

La Figura 33 muestra los resultados de resistencia a la digestión gástrica simulada como una medida de su funcionalidad, para *L. paracasei* JP1 resuspendido en diferentes medios (solución salina y leche). Como puede

observarse, la leche ejerció un importante efecto protector frente a la acidez gástrica para *L. paracasei* JP1, ya que la viabilidad celular disminuyó 2 órdenes log luego del tratamiento. En cambio, cuando se utilizó la solución salina como medio de suspensión, la cepa perdió completamente su viabilidad. En ninguna de las dos condiciones la cepa resistió un tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina, simulando la digestión intestinal. Cabe destacar, que la cepa fue incapaz de desarrollar en leche.

La Figura 34 muestra los resultados obtenidos para *L. paracasei* DN114001. Cuando la cepa fue resuspendida en solución salina, la pérdida de viabilidad celular fue significativa (aproximadamente, 8 órdenes log), mientras que, cuando se utilizó leche como medio de suspensión, se observó un ligero efecto protector del medio, siendo la pérdida de viabilidad celular de 6 órdenes log. Finalmente, al someter a digestión gástrica un cultivo overnight (16 hs, 37°C) de la cepa crecida en leche (Lf), el tratamiento resultó prácticamente letal (tiempo 80 y 90 minutos). En ninguno de los casos la cepa resistió la digestión intestinal simulada (tratamiento con bilis y pancreatina).

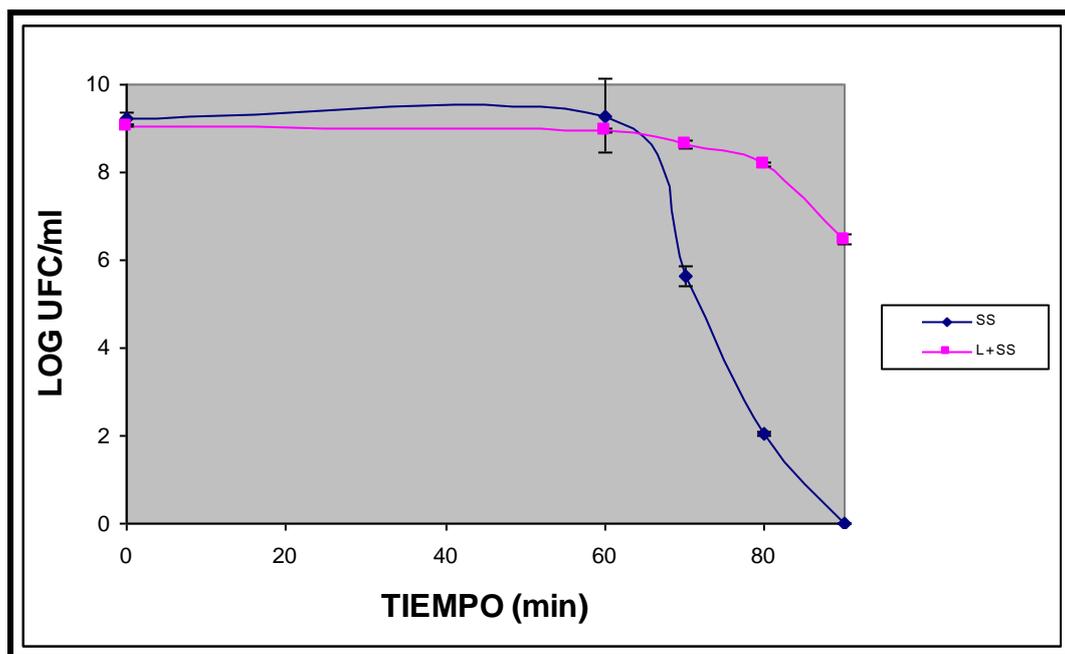


Figura 33- Resistencia en solución gástrica simulada para *L. paracasei* JP1 resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

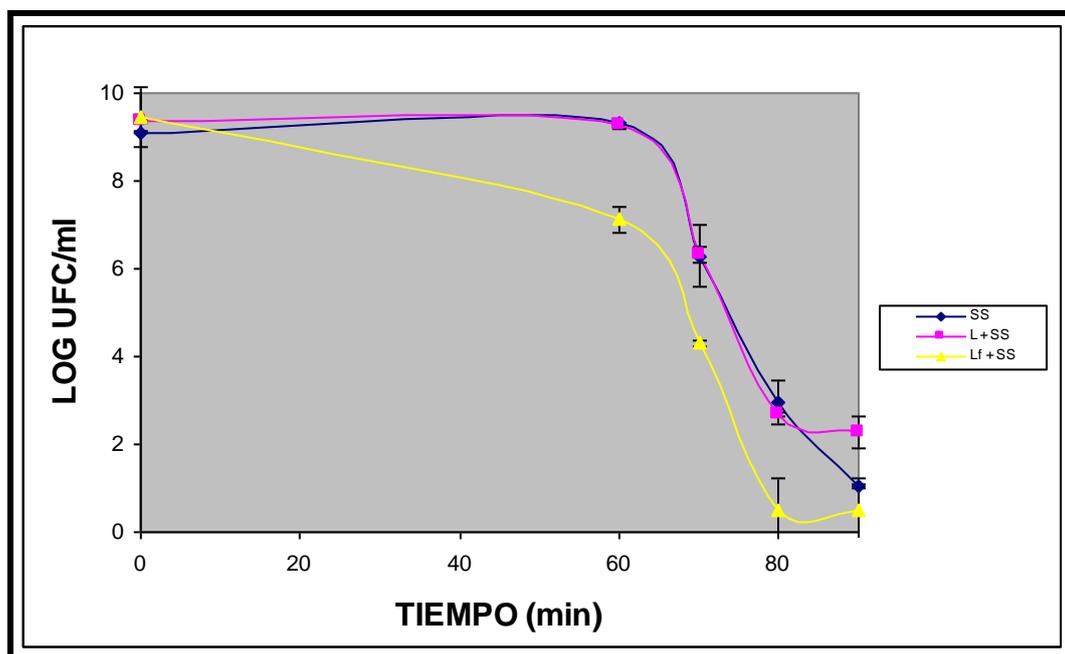


Figura 34- Resistencia a la solución gástrica simulada de *L. paracasei* DN 144001 resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L), y de su cultivo en leche (Lf). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

En la Figura 35 se grafica la resistencia a la acidez gástrica de la cepa *L. rhamnosus* 64 en distintos medios de suspensión. En este caso, al utilizar leche, se observa un leve efecto protector, aunque la pérdida de viabilidad celular fue de, aproximadamente, 6 órdenes log. Por otro lado, cuando un cultivo en leche (16 hs, 37°C) de la cepa fue sometido a la digestión gástrica simulada, el descenso fue menos drástico (4 órdenes log) evidenciándose un efecto protector del medio resultante del desarrollo de la cepa en relación a la leche sin fermentar. Contrariamente, la cepa resuspendida en solución salina se vio más afectada por el tratamiento, disminuyendo 8 órdenes log luego de los 90 min. En ninguno de los 3 casos se detectaron células viables luego de someter la cepa al tratamiento con solución de bilis y pancreatina.

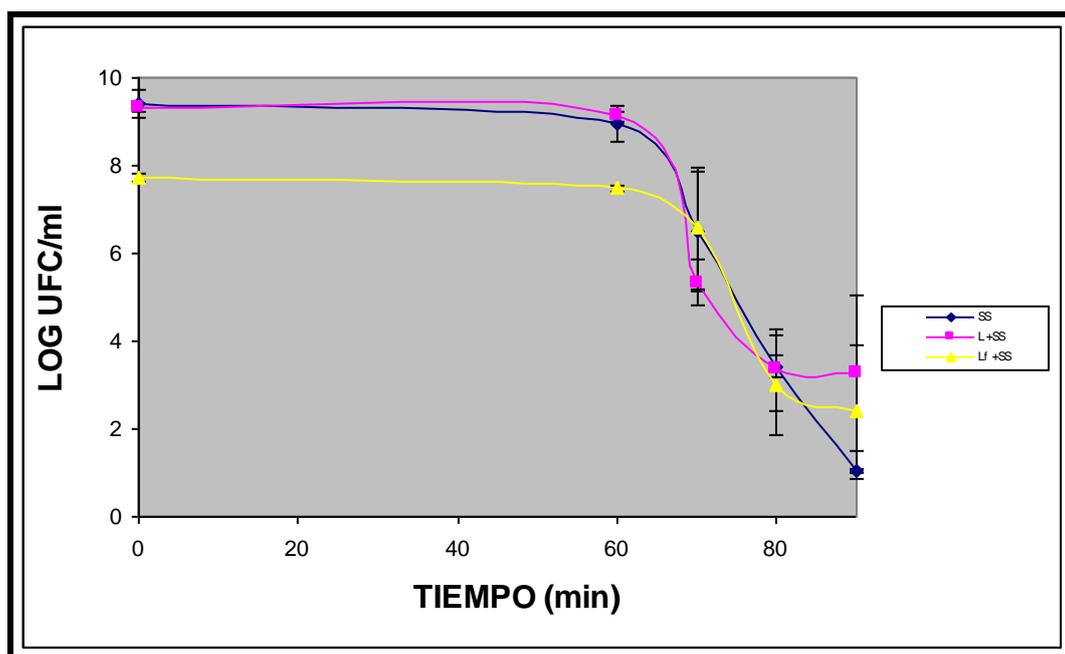


Figura 35- Resistencia a la solución gástrica simulada de *L. rhamnosus* 64 resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L), y de su cultivo en leche (Lf). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

La Figura 36 muestra la resistencia a la digestión gástrica simulada de la cepa comercial *L. rhamnosus* GG. La disminución en su viabilidad luego del

tratamiento resultó significativa (8 órdenes log) en el caso de la suspensión en solución salina. Cuando la cepa fue resuspendida en leche, resistió mejor el tratamiento, disminuyendo su viabilidad celular en 6 órdenes log. En este caso, luego de los 90 min de tratamiento con ácido, la suspensión celular se incubó durante 30 minutos adicionales, simulando la digestión intestinal (tratamiento con bilis-pancreatina), descendiendo su viabilidad hasta un valor de 1×10^2 UFC/ml. La cepa no fue capaz de desarrollar en leche.

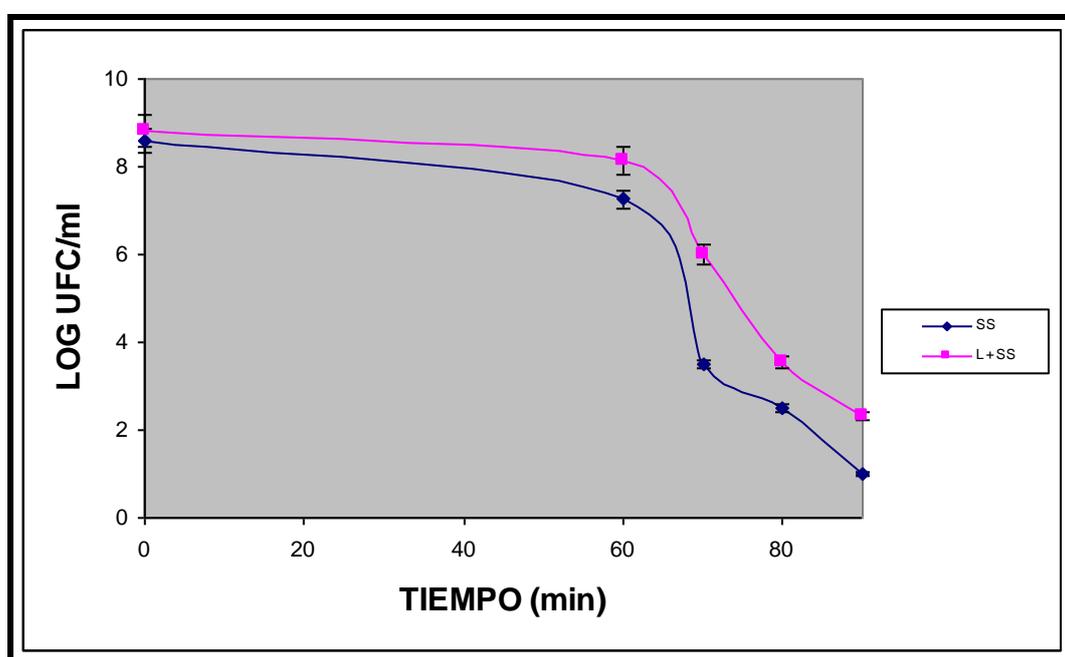


Figura 36- Resistencia en solución gástrica para *L. rhamnosus* GG resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

En la Figura 37 se grafican los resultados de resistencia gástrica simulada de *L. gasseri* 37. Como puede observarse, su viabilidad resultó menos afectada cuando fue resuspendido en leche, disminuyendo sólo 2 órdenes log, en relación a su suspensión en solución salina (aproximadamente, 5 órdenes log). Cuando un cultivo de la cepa en leche (16 hs, 37°C) fue sometido al tratamiento gástrico, su sobrevivencia se redujo en 6 órdenes log, aproximadamente. En este caso, cuando las 3

suspensiones celulares se sometieron a un tratamiento posterior con solución de bilis y pancreatina, se obtuvieron recuentos de 5×10^2 , 3×10^7 y 4×10^2 UFC/ml, para la suspensión en solución salina, en leche y para el cultivo de la cepa en leche, respectivamente.

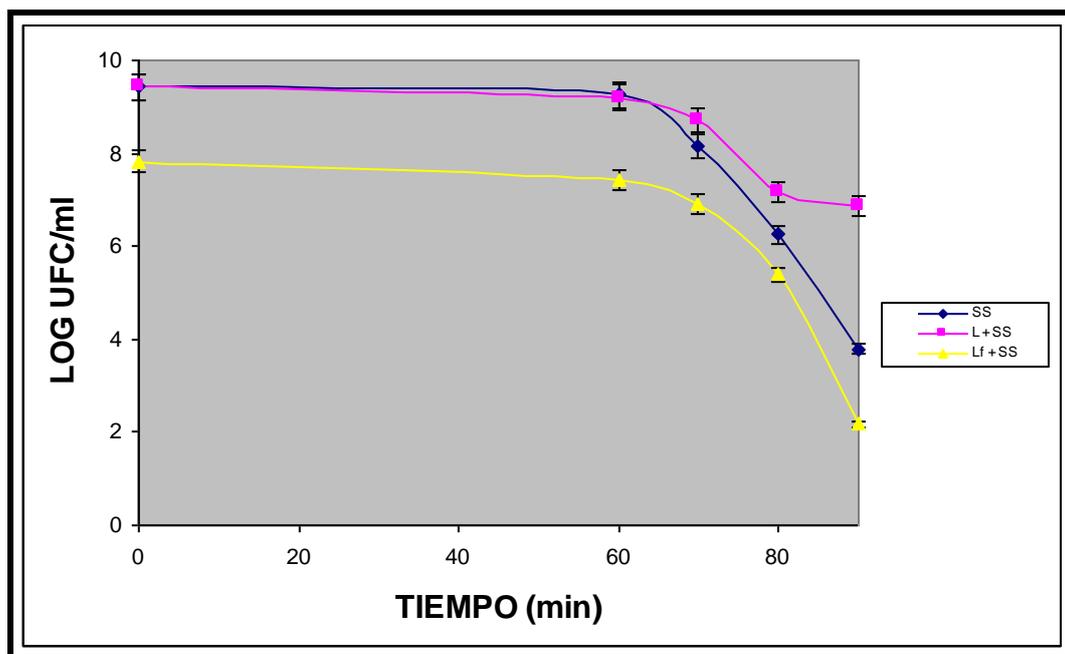


Figura 37- Resistencia a la solución gástrica simulada de *L. gasseri* 37 resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L), y de su cultivo en leche (Lf). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

Los resultados de resistencia a la digestión gástrica simulada de *L. gasseri* ATCC 33323 se muestran en la Figura 38. A diferencia de los casos anteriores, esta cepa resistió de un modo significativo el tratamiento gástrico simulado y su viabilidad no se vio prácticamente afectada hacia el final del ensayo (suspensión en solución salina y cultivo en leche) o disminuyó sólo 1 orden log (suspensión en leche). Asimismo, luego del tratamiento posterior con bilis-pancreatina, su viabilidad se vio sólo ligeramente afectada, alcanzando niveles de, aproximadamente, 10^7 UFC/ml.

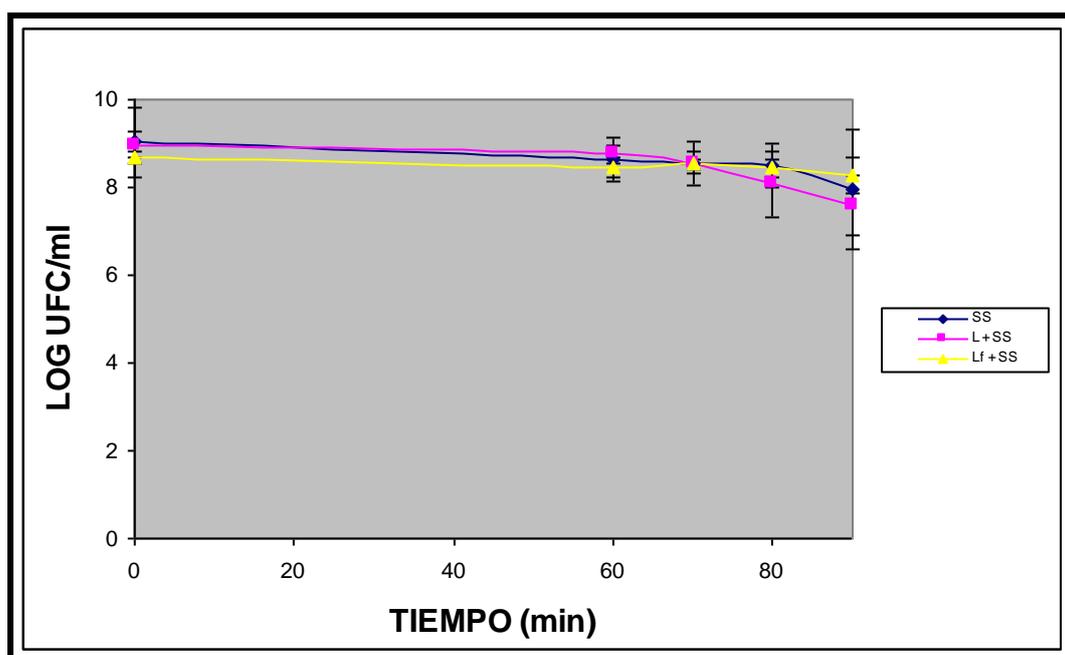


Figura 38- Resistencia a la solución gástrica simulada de *L. gasseri* ATCC 33323 resuspendido en solución salina (SS) y en leche (L), y de su cultivo en leche (Lf). Valores medios de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

7. Seguridad y funcionalidad *in vitro*

7.1 Seguridad: resistencia a antibióticos

Se analizó la resistencia de las cepas en estudio a 5 antibióticos comúnmente utilizados (cloramfenicol, eritromicina, estreptomycin, tetraciclina y vancomicina), mediante las tiras comerciales E-test, en agar LSM (48 h, 37°C). Los valores de CIM obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9 - Valores de CIM de las cepas en estudio frente a diferentes antibióticos.

Cepa	CIM ($\mu\text{g/ml}$) (valor medio \pm SD)*				
	CL	EM	SM	TC	VA
<i>L. paracasei</i> JP1	3,5 \pm 0,7	0,064 \pm 0,0	20 \pm 5,7 ^a	128 \pm 18,0 ^a	256 \pm 0,0 ^a
<i>L. rhamnosus</i> 64	3,0 \pm 0,0	0,047 \pm 0,0	12 \pm 0,0	0,44 \pm 0,4	256 \pm 0,0 ^a
<i>L. gasseri</i> 37	4,0 \pm 0,0 ^a	1,5 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0

*: desviación estándar. CL: cloramfenicol; EM: eritromicina; SM: estreptomina; TC: tetraciclina; VA: vancomicina. ^a: CIM \geq valores de corte (breakpoints) para el género *Lactobacillus*, publicados por el panel EFSA (Anadón y col., 2005).

7.2 Funcionalidad: Hidrofobicidad superficial

En la Tabla 8 se presentan los porcentajes de hidrofobicidad obtenidos para las cepas en estudio y para las cepas utilizadas como referencia. *L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37, mostraron valores de hidrofobicidad similares (valores medios comprendidos entre 4,77 y 10,24 %), resultando comparables a los determinados para las cepas comerciales y de colección (valores medios comprendidos entre 6,5 y 8,72 %).

Tabla 8- Hidrofobicidad (%) de las cepas en estudio.

Cepa	H % (valor medio \pm SD)*
<i>L. paracasei</i> JP1	4,8 \pm 3,9
<i>L. rhamnosus</i> 64	7,5 \pm 5,3
<i>L. gasseri</i> 37	10,2 \pm 1,7
<i>L. paracasei</i> DN114001	6,5 \pm 3,2
<i>L. rhamnosus</i> GG	8,7 \pm 5,8
<i>L. gasseri</i> ATCC33323	6,7 \pm 6,3

* SD: desviación estándar

8. Seguridad y funcionalidad *in vivo*

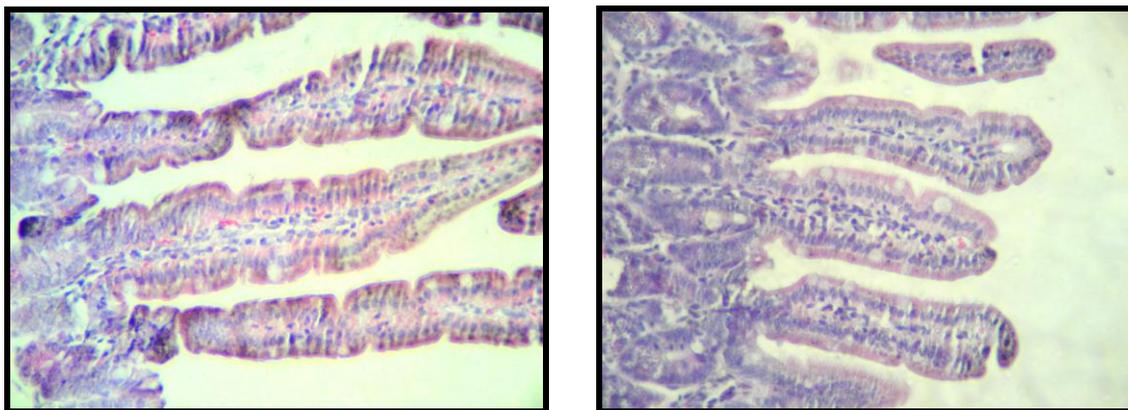
8.1 Seguridad: traslocación bacteriana

El estudio de traslocación a hígado resultó negativo, lo que indica que no hubo migración de flora entérica a sitios extraintestinales, constituyendo así una confirmación de la seguridad de las cepas en estudio para la dosis administrada.

8.2 Seguridad: examen histológico de la mucosa intestinal

Al estudiar la arquitectura de los tejidos (intestino delgado y grueso) luego de la tinción con hematoxilina-eosina, no se detectaron, en ninguno de los casos, cambios morfológicos significativos en relación a los controles. No se evidenció la presencia de infiltrados de linfocitos, edemas o atrofia de la mucosa.

En la Figura 39 se muestran imágenes de un corte histológico de intestino delgado, luego del tratamiento con *L. paracasei* JP1, durante 7 días consecutivos, comparado con el de animales control.

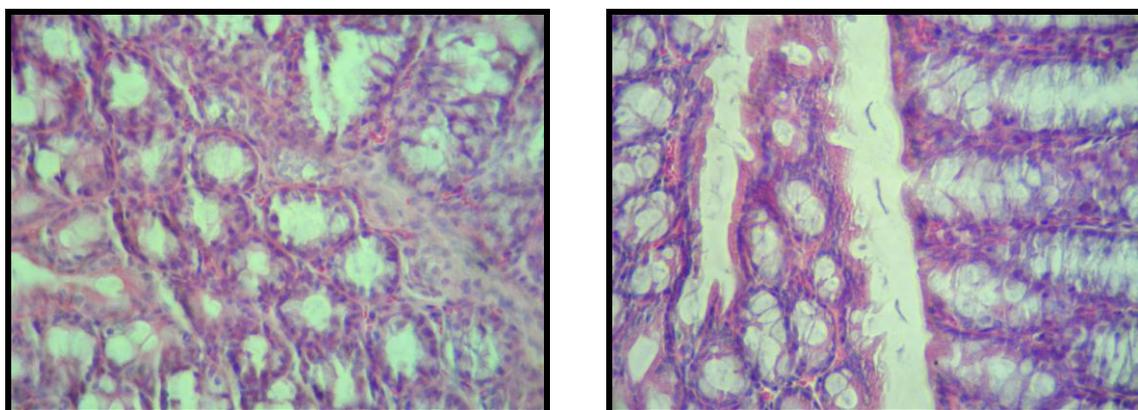


(a)

(b)

Figura 39- Cortes histológicos (tinción hematoxilina-eosina) de intestino delgado de animales control (a) y de animales que recibieron *L. paracasei* JP1 (b) durante 7 días consecutivos (magnificación 400x).

La Figura 40 muestra imágenes de cortes histológicos de intestino grueso de animales tratados con *L. paracasei* JP1, durante 7 días consecutivos y de animales control.



(a)

(b)

Figura 40- Cortes histológicos (hematoxilina-eosina) de intestino grueso de animales control (a) y de animales que recibieron *L. paracasei* JP1 (b) durante 7 días consecutivos (magnificación 400x).

8.3 Funcionalidad: ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales

La Figura 41 muestra el porcentaje de fagocitosis de macrófagos peritoneales de los animales, luego de la administración oral (2, 5 y 7 días) de las cepas en estudio. En todos los casos, luego de 5 y 7 días consecutivos de tratamiento, se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en este parámetro, comparado con el control.

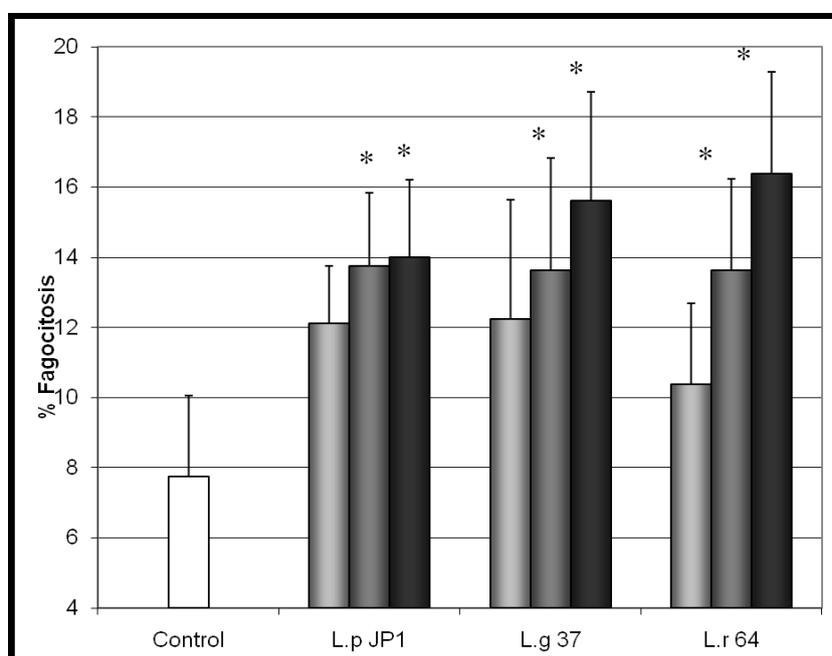


Figura 41- Efecto de la administración oral de *L. paracasei* JP1 (Lc JP1), *L. gasseri* 37 (Lg 37) y *L. rhamnosus* 64 (Lr 64) durante 2 (■), 5 (■) y 7 (■) días consecutivos, sobre el porcentaje de fagocitosis de macrófagos peritoneales. *: valores significativamente diferentes ($P < 0,05$) respecto al control (leche 1%).

8.4 Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado

En relación a las propiedades funcionales de las cepas en estudio se observó, para las tres cepas, un aumento significativo en el número de células IgA+ en lámina propia de intestino delgado (Fig. 42).

En el caso del tratamiento con *L. rhamnosus* 64, dicho incremento fue significativo ($P < 0,05$) luego de 5 y 7 días de administración, aumentando el número de células IgA+ entre 60 y 57 %, respectivamente, en relación al valor control. Para el grupo que recibió *L. gasseri* 37, sólo se registró un aumento significativo ($P < 0,05$ %, 41 % en relación al control) luego de 5 días. La administración de *L. paracasei* JP1, en cambio, si bien determinó un aumento en el número de células IgA+, sólo produjo un incremento significativo ($P < 0,05$ %, 22% en relación al control) luego de 7 días de tratamiento.

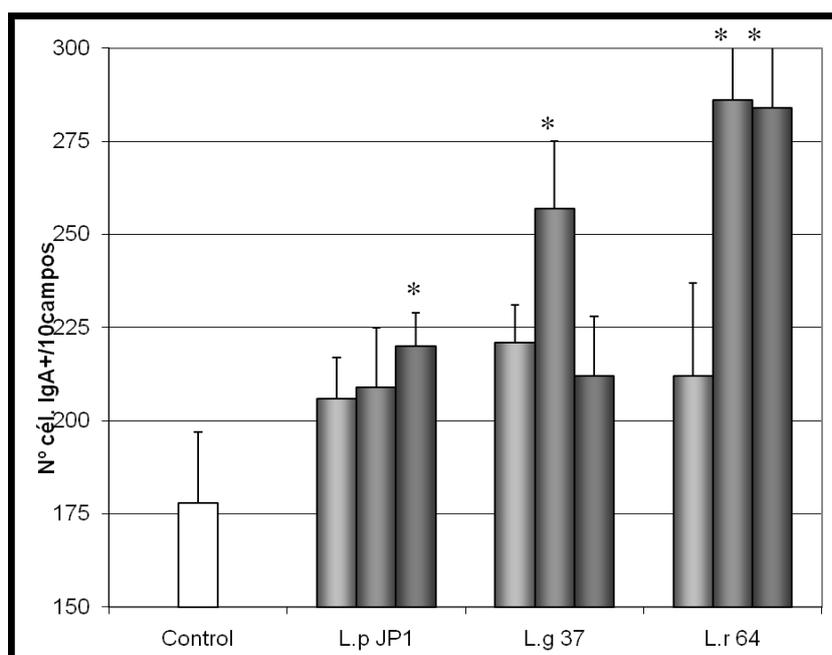


Figura 42- Efecto de la administración oral de *L. paracasei* JP1 (LcJP1), *L. gasseri* 37 (Lg37) y *L. rhamnosus* 64 (Lg64) durante 2 (■), 5 (■) y 7 (■) días consecutivos, sobre el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado. *: valores significativamente diferentes ($P < 0,05$) respecto al control (leche 1%).

En la Figura 43 se observa cualitativamente, a partir de cortes histológicos, el aumento en el número de células productoras de IgA en el interior de las vellosidades del intestino delgado, de animales tratados durante 7 días con la cepa *L. rhamnosus* 64, respecto al control.

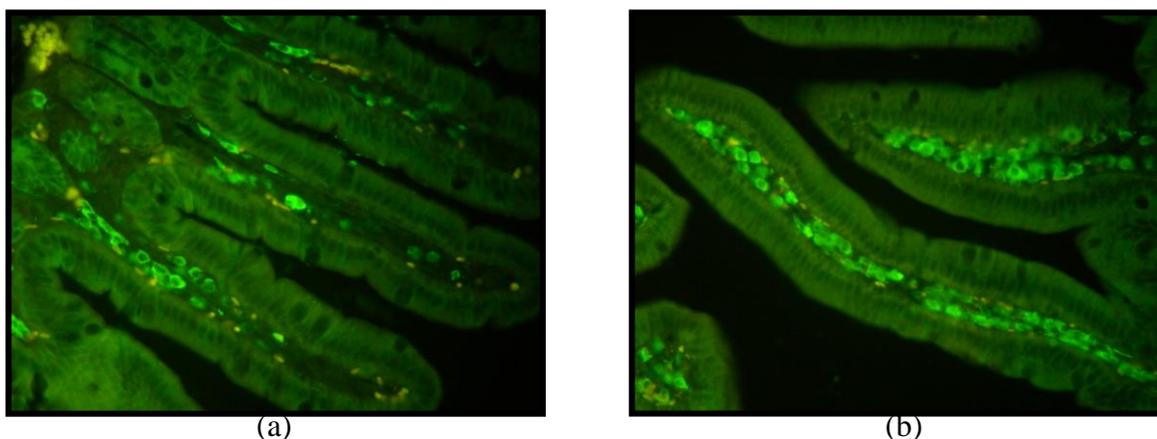


Figura 43- Células productoras de IgA en cortes histológicos de intestino delgado de animales control (a) y de animales que recibieron *L. rhamnosus* 64 (b) durante 7 días consecutivos (magnificación 400x).

8.5. Funcionalidad: estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino grueso

La administración oral de las cepas en estudio no modificó significativamente ($P > 0,05$) el número de células productoras de IgA a nivel de intestino grueso (Fig. 44).

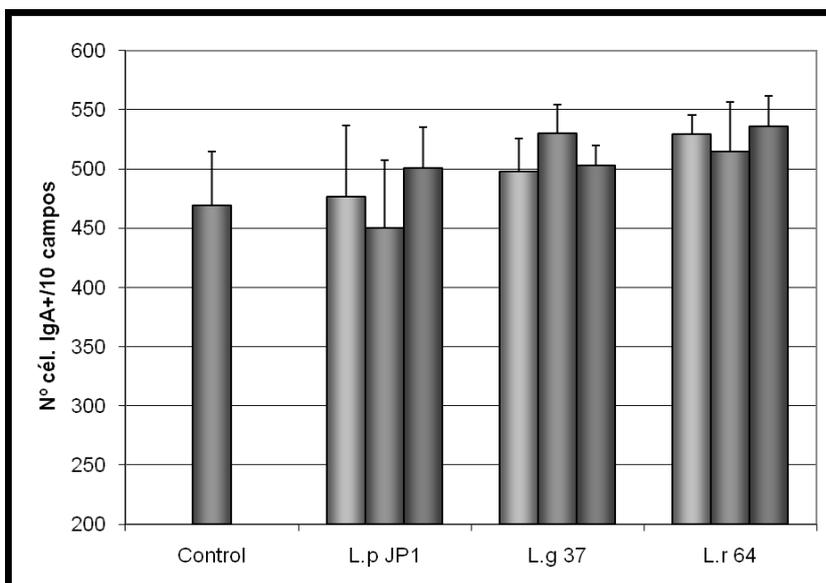


Figura 44- Efecto de la administración oral de *L. paracasei* JP1, *L. gasseri* 37 y *L. rhamnosus* 64 durante 2 (■), 5 (■) y 7 (■) días consecutivos, sobre el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino grueso.

La Figura 45 muestra un corte histológico de intestino grueso, donde se observan células fluorescentes (IgA+) entre las criptas de intestino grueso en los animales que recibieron la cepa *L. paracasei* JP1 y en animales del grupo control.

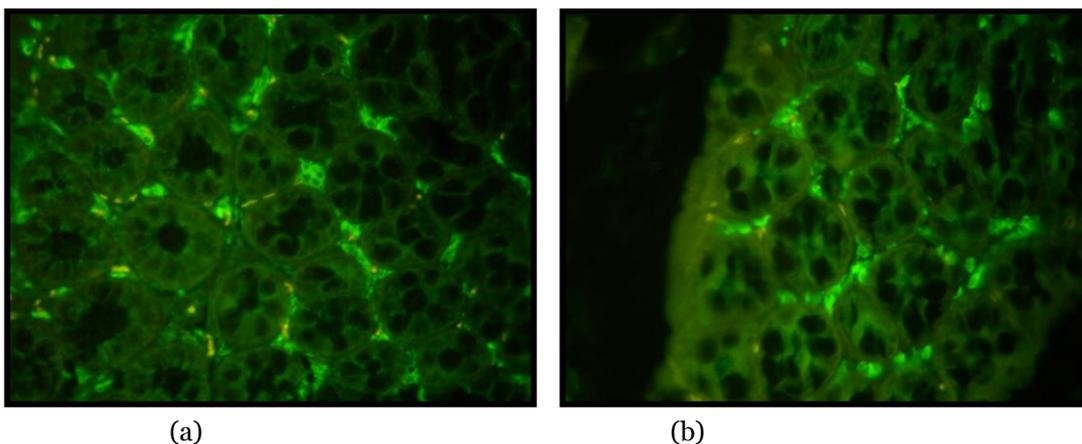


Figura 45- Células productoras de IgA en cortes histológicos de intestino grueso de animales control (a) y de animales que recibieron *L. paracasei* JP1 (b) durante 7 días consecutivos (magnificación 400x).

Discusión

Los lactobacilos y bifidobacterias incluidos en la formulación de alimentos probióticos se presumen, de acuerdo a su clasificación taxonómica, microorganismos inocuos y de grado alimentario (GRAS: Generally Recognized As Safe). Asimismo, los efectos beneficiosos no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que son exclusivos de cada cepa. Por esta razón, es fundamental su correcta identificación y análisis de diversidad, a fin de asociar un efecto probiótico a una cepa determinada facilitando además su seguimiento en estudios clínicos y epidemiológicos, así como durante las etapas involucradas en un proceso industrial (Sanz y col., 2003). En el presente trabajo de tesis, siguiendo las recomendaciones recientes de la comisión EU-PROSAFE (Vankerckhoven y col., 2007), se secuenció una región interna de la subunidad 16S del ADNr de las 3 cepas en estudio, aisladas de heces de neonatos santafesinos, lo que permitió identificarlas como *L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37, confirmando la identificación preliminar previa realizada por Vinderola y col., 2008 mediante el test de fermentación de azúcares (galería API 50). Estas especies bacterianas son dominantes en heces de infantes (Xanthopoulos y col., 2000; Walter y col., 2000; Azcárate y col., 2008).

La amplificación al azar, también conocida como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ha sido extensamente empleada como un método rápido, sensible y de bajo costo para tipificar genéticamente cepas de diferentes especies (Ben Amor y col., 2007). Numerosos trabajos han reportado estudios de diversidad para especies de lactobacilos potencialmente probióticos como *L. acidophilus*, y cepas pertenecientes al grupo *L. casei* (Roy y col., 2000; Richard y col., 2001; Rosetti y Giraffa, 2005; Mercanti y col., 2011), así como bifidobacterias (Vincent y col., 1998; Matto y col., 2006). En esta tesis, para

evaluar la diversidad genética de las cepas autóctonas, se obtuvieron perfiles RAPD utilizando 3 sondas al azar, en reacciones de PCR independientes. En todos los casos, las cepas presentaron perfiles característicos, claramente diferentes a los resultantes de las cepas comerciales y de colección utilizadas como referencia. Estos resultados confirman que *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64 son diferentes a las cepas comerciales incorporadas a alimentos probióticos de amplio consumo en Argentina, como *L. paracasei* DN114001 (incluida en la leche fermentada Actimel, Danone) y *L. rhamnosus* GG (incluida en los quesos blandos probióticos de La Serenísima). Para el caso de *L. gasseri* 37, se usó como referencia una cepa de colección (*L. gasseri* ATCC 33323) ya que es una especie bacteriana que no se utiliza en nuestro país para la formulación de alimentos funcionales. De todos modos, los perfiles RAPD obtenidos para *L. gasseri* 37 resultaron característicos.

La gran diversidad de matrices que contienen bacterias probióticas y los requisitos necesarios para que un producto, por definición, sea considerado probiótico, determinan la necesidad de monitorear la viabilidad del microorganismo, en la dosis recomendada, durante todo el proceso de producción y almacenamiento del alimento (Saarela y col., 2000; Fasoli y col., 2003). Tradicionalmente, la detección e identificación de las cepas declaradas en la etiqueta del producto se basan en métodos microbiológicos, principalmente en recuentos en placa. Las desventajas que presenta esta metodología son su lentitud y la necesidad de utilizar, para cada producto en particular, medios de cultivo selectivos y/o diferenciales, adecuados para la población microbiana que integra cada alimento en particular, lo que dificulta su control microbiológico en operaciones de rutina. Asimismo, los grandes avances producidos en la última década en el campo de la biología molecular determinan que en la actualidad se

disponga de un número muy importante de secuencias de genes (especialmente el gen que codifica para el ARNr) y genomas completos de bacterias de interés industrial. Como consecuencia, se ha visto favorecido el desarrollo de numerosos métodos moleculares específicos para estas bacterias. Entre ellos, la PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real aparece como la herramienta molecular cuantitativa más promisoría para análisis rápidos en matrices complejas, ya que permitiría reemplazar, bajo ciertas condiciones, el recuento en placa (Furet y col., 2004; Ladero y col., 2010).

En el presente estudio se extrajo ADN total de diferentes alimentos (leches fermentadas comerciales, cultivos mixtos de las cepas en estudio y quesos frescos) para identificar y detectar cualitativamente cepas de las especies de interés y otras relacionadas, de una manera rápida y confiable. Para ello, mediante PCR convencional, se amplificaron fragmentos pertenecientes al gen 16S ADNr, utilizando primers específicos de especie o grupo. Todas las cepas de interés fueron satisfactoriamente detectadas en los alimentos seleccionados obteniéndose, para cada caso, los productos de amplificación esperados. Esta metodología, relativamente sencilla y de bajo costo, si bien no permite la cuantificación, resulta útil para detectar la presencia e identificar las especies de interés declaradas en la etiqueta de un producto lácteo o un fermento, de un modo muy rápido (aproximadamente, 3 h).

La viabilidad de una cepa probiótica, uno de los prerrequisitos fundamentales para garantizar su funcionalidad, puede resultar seriamente afectada por la formulación de la matriz alimentaria que le sirve como vehículo (Mattila-Sandholm y col., 2002). Previo a su adición al alimento (durante las primeras etapas de producción), el cultivo debe desarrollarse en un medio adecuado y en las condiciones óptimas, de modo de alcanzar los niveles

requeridos para cumplir su rol funcional. Para ello, se debe tener en cuenta que el crecimiento en un medio de cultivo particular puede afectar la capacidad de las cepas de sobrevivir en etapas posteriores a la producción, como la distribución y el almacenamiento (Champagne y Gardner, 2005). Consecuentemente, es necesario que las cepas utilizadas como probióticos se caractericen por un adecuado rendimiento a gran escala, así como por su capacidad de sobrevivir y mantener su funcionalidad durante los procesos de conservación como congelamiento, secado spray o liofilización (Saarela y col., 2000; Vinderola y col., 2002; Champagne y Gardner, 2005). La preparación a gran escala de cultivos probióticos suele resultar dificultosa debido a la baja tasa de crecimiento de estas especies bacterianas en medios lácteos, consecuencia de su escasa actividad proteolítica (Dave y Shah., 1997; Ross y col., 2005). En algunos casos, la combinación de probióticos con otras BAL altamente proteolíticas podría resultar beneficiosa, pero si estas últimas poseen una tasa de crecimiento muy elevada, las cepas probióticas podrían verse inhibidas (Klaver y col., 1993). Por lo tanto, una alternativa interesante es la suplementación de la leche con compuestos que favorezcan el crecimiento de las bacterias probióticas. El extracto de levadura suele ser uno de los suplementos más utilizados, (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Burns y col., 2008) si bien, en algunos casos, se recurre a la combinación de amino ácidos, minerales y ribonucleótidos o hidrolizados de caseína, aunque los costos se incrementan significativamente en estos últimos casos (Elli y col., 2000; Rodríguez y col., 2006). Por esta razón, la industria alimenticia muestra su permanente interés en la formulación de medios de cultivo económicos, que permitan el desarrollo de los probióticos hasta el nivel requerido en el proceso de elaboración y que puedan ser adicionados directamente a la leche procesada. (Ross y col., 2005).

En este sentido, los sueros de queso y manteca aparecen como dos medios de cultivo de bajo costo que, bajo ciertas condiciones, pueden ser adaptados para el desarrollo de estos microorganismos. El suero de queso es un subproducto de las elaboraciones casearias obtenido luego de la separación de la caseína y la grasa durante la coagulación de la leche. Ha sido exitosamente utilizado en la industria alimenticia, ya que su elevado valor nutricional y su costo razonable son motivadores clave para su implementación en la formulación de distintos productos (Spreer, 1998; Liu y col., 2005). Por su parte, el suero de manteca es un subproducto de alto valor nutricional derivado de la fabricación de manteca, que se utiliza para elaborar bebidas lácteas fermentadas, especialmente en el norte de Europa (Spreer, 1998; Saxelin y col., 2003). En un trabajo previo, se demostró la aptitud de ambos sueros para el desarrollo y almacenamiento congelado de cepas probióticas del género *Lactobacillus* (Burns y col., 2008). En base a estos datos, se propuso evaluar la capacidad de desarrollo de las cepas en estudio en leche, suero de queso y suero de manteca, suplementados con extracto de levadura. Las tres cepas mostraron un comportamiento similar en los medios ensayados, durante 24 hs de incubación a 37°C, alcanzando niveles cercanos a 10⁹ UFC/ml. De este modo, estos medios de cultivo resultarían sustratos adecuados y económicos para su desarrollo, incluso a mayor escala.

Una vez asegurada la propagación del cultivo probiótico en un medio conveniente y su posterior incorporación en la dosis adecuada en el alimento, el control de su viabilidad es uno de los puntos críticos para garantizar al consumidor la funcionalidad del producto hasta el momento de su consumo. En los alimentos que contienen cultivos probióticos como única microflora, la enumeración suele resultar sencilla y puede realizarse utilizando cualquier medio apropiado para el desarrollo de la especie bacteriana de interés. Sin

embargo, en la mayoría de los alimentos, principalmente en leches fermentadas, las bacterias probióticas se combinan con otras BAL, generalmente más acidificantes y presentes en elevada concentración, responsables de otorgar las características reológicas y organolépticas al producto. En consecuencia, para este control se deberá disponer de medios de cultivo diferenciales y/o selectivos que permitan discriminar las especies involucradas o inhibir aquellas que no son de interés. Por ejemplo, en el caso de yogures probióticos, será necesario diferenciar las bacterias probióticas (comúnmente bifidobacterias y *L. acidophilus* o *L. casei/paracasei*) de las bacterias integrantes del starter (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), o directamente inhibir a estas últimas. Si bien algunos de los métodos para el recuento de probióticos hacen uso de herramientas genéticas o se basan en actividades enzimáticas, los métodos tradicionales de recuento en placa son los preferidos a nivel industrial para controles de rutina, debido a su bajo costo en relación a los demás y a que no requieren de equipamiento sofisticado. La presencia de múltiples especies relacionadas, principalmente pertenecientes al género *Lactobacillus*, suele dificultar la enumeración diferencial, debido a la similitud en sus requerimientos nutricionales (Champagne y col., 2005; Tabasco y col., 2007). A lo largo del tiempo se han descrito numerosos medios para recuentos selectivos y diferenciales de lactobacilos y bifidobacterias en poblaciones bacterianas mixtas (Charteris y col., 1997; Payne y col., 1999; Shah, 2000; Roy, 2001; Coeuret y col., 2003; Talwalkar y Kailasapathy, 2004; Masco y col., 2005; Van de Castele y col., 2006; Tabasco y col., 2007). Un punto importante a destacar es que en ninguno de los casos se pueden extrapolar entre cepas los resultados obtenidos, ya que cada medio en particular debe ser evaluado para una matriz alimenticia determinada y para cada cepa o combinación de cepas de

interés (Vinderola y Reinheimer, 1999; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Por lo tanto y, a pesar de las varias tentativas llevadas a cabo por la FIL (Federación Internacional de Lechería, o International Dairy Federation: IDF), no existe al día de hoy un medio de cultivo estándar para la enumeración de probióticos. En este sentido, los medios de cultivo MRS-Bilis (MRS-B) y MRS-Cloruro de Litio/Propionato de Sodio (MRS-LP) demostraron ser exitosos y capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias lácticas de los cultivos iniciadores, permitiendo la enumeración selectiva y diferencial de tres cepas probióticas incluidas en un queso probiótico comercial: Bioqueso Iolay Vita, desarrollado por Sucesores de A. Williner (Lácteos Iolay) con el apoyo microbiológico del INLAIN a fines de la década del 90. En esta matriz se enumeraron en agar MRS-LP las cepas de *L. casei* y bifidobacterias, y en agar MRS-B las cepas de *L. casei* y *L. acidophilus* (Vinderola y Reinheimer, 1999; Vinderola y Reinheimer, 2000). En el presente trabajo de tesis, al utilizar agar MRS-LP y agar MRS-B para el recuento de las cepas en estudio, se observó una respuesta adecuada frente a concentraciones variables de bilis y cloruro de litio/propionato de sodio, en relación a la obtenida en el medio control (agar MRS). Entre las cepas estudiadas, *L. gasseri* 37 fue la que resultó menos afectada en su desarrollo por la presencia de los agentes selectivos/diferenciales. En los otros dos casos (*L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64) el Agar MRS-B resultó más inhibitorio que el MRS-LP, encontrándose concentraciones umbrales a partir de las cuales pueden registrarse inhibiciones significativas en la recuperación celular, las cuales deben tenerse en cuenta al momento de diseñar sets específicos de medios de cultivos para estas cepas. Si bien en estos ensayos se evaluó la capacidad de crecimiento de cada cepa en forma individual, el hecho de que no resulten

inhibidas en las condiciones estudiadas resulta alentador si se pretende su inclusión en matrices microbiológicamente más complejas.

Otro factor importante a considerar en los alimentos probióticos es la resistencia (mantenimiento de viabilidad y funcionalidad) de las cepas de interés frente a diferentes condiciones de estrés tecnológico como, por ejemplo, la acidez del alimento que las contiene, el almacenamiento en frío, etc. La capacidad de una cepa de sobrevivir durante su procesamiento no es determinante de su capacidad para mantenerse viable durante la etapa de almacenamiento (Naidu y col., 1999; Champagne y col, 2005). Los ensayos de resistencia a la acidez láctica en refrigeración para las cepas en estudio revelaron una adecuada sobrevivencia en leche acidificada a pH 4,5 (valor cercano al utilizado en la industria argentina para los yogures comerciales) a 5°C durante los 30 días de almacenamiento, verificándose sólo ligeras pérdidas de viabilidad (entre 0,2 y 1 órdenes log). Cuando se evaluó la resistencia a la acidez gástrica simulada de estas suspensiones, tanto al inicio de la experiencia como luego de los 30 días de refrigeración, *L. gasseri* 37 resultó ser la cepa menos afectada en su resistencia a la acidez durante el almacenamiento refrigerado. Cuando las cepas fueron resuspendidas en leche sin acidificar durante 30 días, la pérdida de viabilidad fue más importante (entre 0,5 y 1,5 ordenes log), en relación a su conservación en leche acidificada. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que la exposición a niveles subletales de un factor de estrés (en este caso la acidez láctica), puede inducir tolerancia a exposiciones sucesivas del mismo u otro factor de estrés (Noriega y col., 2004). En cuanto a la resistencia a la acidez gástrica simulada, si bien *L. rhamnosus* 64 presentó una pérdida de viabilidad importante (6 órdenes log) luego de los 30 días, las cepas restantes evidenciaron una pérdida de viabilidad menor, en relación a los resultados

obtenidos en leche acidificada. Recientemente se demostró que la resistencia a la acidez gástrica puede variar durante el almacenamiento refrigerado de cepas probióticas en productos lácteos comerciales (Vinderola y col., 2011). De un modo similar, Usman y Hosono (1999) evaluaron la viabilidad de una cepa de *L. gasseri* en leche (pH 6,3, 4°C), observando que los niveles de células viables disminuyeron menos de 1 orden log luego de 28 días de conservación. Resultados comparables fueron informados para cepas de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, cuando se analizó la influencia del almacenamiento a 7°C (en yogur) (Gillilan, 1998). Para cepas de *L. acidophilus*, Shah y col. (1995) demostraron que la conservación en yogur a pH 3, no modificó prácticamente la viabilidad durante 30 días en refrigeración. Vinderola y col. (2000) determinaron que, durante la conservación de una cepa probiótica de *B. bifidum* en leche acidificada a pH 4,5, la reducción en el recuento fue de 2,5 órdenes log, mientras que, para una cepa de *L. acidophilus*, bajo las mismas condiciones, la viabilidad se redujo 3,3 órdenes log. Por su parte, Saarela y col. (2006) evaluaron la estabilidad y viabilidad celular de cepas de *Bifidobacterium*, tanto en leche descremada como en jugo de fruta durante el almacenamiento a 4°C, encontrando que la tolerancia a la acidez gástrica disminuye levemente luego de 2 semanas de almacenamiento a 4°C de la cepa en leche, mientras que su viabilidad se mantiene prácticamente constante en ese período.

Todos estos resultados confirman que la resistencia de una cepa probiótica a las condiciones de estrés tecnológico depende, entre otros factores, de la cepa, de la composición del alimento y de las condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, la evaluación de cada cepa en particular en las condiciones del alimento

que le servirá como vehículo resulta un punto crítico a tener en cuenta durante el diseño y formulación de un nuevo producto probiótico.

El congelamiento, junto a la liofilización, es uno de los métodos más comúnmente utilizado para preservar la viabilidad de las BAL por largos períodos de tiempo. Dado que se trata de microorganismos ampliamente utilizados como cultivos starters o adjuntos durante la fermentación de una gran variedad de alimentos, la conservación de sus propiedades tecnológicas y funcionales reviste un gran interés industrial, recomendándose temperaturas de, al menos, -40°C (Frank y Hassan, 1998). Sin embargo, la resistencia de las bacterias al congelamiento y su mantenimiento a estas temperaturas depende de diferentes factores, muchos de ellos aún desconocidos. En general, se trata de factores relacionados a los propios microorganismos y a las condiciones de producción (fermentación, concentración, condiciones de congelamiento) y de almacenamiento (Fonseca y col., 2001). Si bien el contenido graso de las leches fermentadas y los quesos favorece la estabilidad de los probióticos, los valores de pH ácido, los niveles de oxígeno y las condiciones de producción del starter pueden afectar negativamente su viabilidad, por lo que merecen un análisis más exhaustivo para cada alimento en particular (Champagne y col., 2005). Durante el desarrollo de esta tesis se evaluó la sobrevivencia de las cepas en estudio durante su congelamiento y conservación a -20°C y a -70°C por un período de 12 meses, utilizando distintos medios de suspensión. En particular, se evaluó la capacidad crioprotectora de los sueros de queso y de manteca (dos subproductos de bajo costo de la industria láctea) en relación a la leche descremada y al MRS adicionado de glicerol. En ambas condiciones evaluadas (-20 y -70°C), el comportamiento fue muy dependiente de la cepa estudiada. No obstante, para todas las cepas, -70°C fue la temperatura más adecuada para conservar las

suspensiones celulares en los diferentes medios. En el caso de *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64, el suero de queso, el suero de manteca y la leche evidenciaron un efecto protector en relación al MRS+glicerol (medio de referencia), ya que prácticamente no se vio afectada su viabilidad durante el período ensayado. En cambio, *L. gasseri* 37 resultó más sensible al congelamiento, disminuyendo progresivamente su viabilidad en todos los medios estudiados, especialmente a -20°C. En un estudio previo, estos crioprotectores fueron utilizados para evaluar la sobrevivencia de *L. casei*, *L. paracasei* y *L. acidophilus* a -20 y -70°C, observándose una importante variabilidad con la cepa considerada (Burns y col., 2008). De este modo, los sueros de queso y de manteca resultarían medios de suspensión adecuados, dependiendo de la cepa utilizada, como crioprotectores de bacterias probióticas.

El NaCl y KCl son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como preservantes, para impartir características sensoriales y para satisfacer los requerimientos nutricionales diarios, así como para controlar la maduración de los quesos (Reinheimer y col., 1997). Sin embargo, el contenido de sal de los productos lácteos podría comprometer la viabilidad y funcionalidad de las bacterias probióticas (Gómez y col., 1998). Tanto en presencia de sales como de azúcares, se produce un descenso en el valor de a_w , parámetro crítico para asegurar la sobrevivencia de los microorganismos en un producto (Naidu y col., 1999) y un aumento de la presión osmótica. Son numerosos los trabajos relacionados con el efecto de las sales sobre el crecimiento de bacterias lácticas y no lácticas. Reinheimer y col. (1997) evaluaron la incidencia del NaCl y del KCl en concentraciones del 2 y 4 % sobre la actividad de distintos starters termofílicos (integrados por *L. helveticus* y *S. thermophilus*) utilizados en la producción de quesos en Argentina, y observaron que estas sales disminuyen la

capacidad acidificante y proteolítica de los cultivos. Posteriormente, Vinderola y col. (2002) estudiaron la influencia de los compuestos asociados a los productos lácteos fermentados, entre ellos, NaCl y KCl (1 y 2 %), en el crecimiento de bacterias probióticas y starters. En este caso, se concluyó que el NaCl tiene un efecto más inhibitorio sobre las cepas utilizadas como starters que sobre las probióticas y en general, el KCl fue menos inhibitorio en el crecimiento de las cepas que el NaCl. Más recientemente, se estudió la capacidad de distintas cepas del género *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. fermentum* y *L. delbrueckii*) aisladas de quesos, para desarrollar en MRS adicionado de sales (NaCl y KCl; 1 y 2 %), reportándose, en general, un buen crecimiento en todos los casos (Briggler-Marcó y col., 2007). En el presente trabajo, al evaluar la resistencia de *L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37 en MRS adicionado de NaCl y KCl (1 y 2 %), se registraron niveles de crecimiento comparables ($P > 0,05$) con los obtenidos en el medio de cultivo control (MRS). Estos resultados indicarían que, en principio, estas cepas podrían ser exitosamente incorporadas a diferentes variedades de quesos, ya que su desarrollo no se vio afectado por la presencia de las sales evaluadas.

Durante su pasaje a lo largo del TGI se verifican pérdidas en la viabilidad de los microorganismos que ingresan con los alimentos por acción de las barreras biológicas, pudiendo resultar seriamente comprometido su rol funcional. La acidez del estómago y la presencia de bilis en el duodeno son los principales factores que afectan dicha supervivencia (Vinderola y Reinheimer, 2003). Para evaluar la resistencia al tránsito estomacal se utilizó un modelo dinámico que mejora, respecto a los métodos que utilizan un pH constante, la simulación *in vitro* de los eventos que tiene lugar en el TGI superior (estómago y duodeno), mediante el control de temperatura y pH, la regulación del tiempo

de tránsito y la concentración de HCl y de bilis (Minekus y col., 1999; Mainville y col., 2005). Marteau y col. (1997) propusieron un modelo que simula los cambios de pH que se producen en el estómago durante el consumo de un yogur. En base a este reporte, variando el pH de una suspensión celular entre 5 y 1,8 en un lapso de 90 min se puede estudiar, de un modo bastante más aproximado que las formas anteriores (pH contante), el comportamiento de las bacterias lácticas y probióticas durante su tránsito por el estómago. Por otro lado, la tasa de secreción biliar y la concentración de bilis en las distintas porciones del intestino son muy variables y las concentraciones fisiológicas de bilis en el tracto intestinal oscilan entre 1,5 y 2 % en la primer hora de digestión (descarga de sales biliares a nivel de la vesícula biliar), mientras que luego disminuyen a niveles cercanos al 0,3 % (Noriega y col., 2004) dependiendo principalmente del tipo de ingesta. A pesar de que no se conoce el nivel mínimo de tolerancia a la bilis requerido, es razonable que las cepas más resistentes sean las que se seleccionen para su uso en productos lácteos (Xanthopoulos y col., 2000; Burns y col. 2008). En este sentido, resulta fundamental determinar la resistencia de bacterias potencialmente probióticas frente a los efectos de los ácidos biliares (Dunne y col., 1999; Noriega y col., 2004; Begley y col., 2005). Esta propiedad representa un importante criterio de selección (Mattila-Sandholm y col., 1999, Ouwehand y col., 2002), habiéndose observado una gran dependencia de la respuesta con la cepa considerada (Xanthopoulos y col., 2000; Begley y col., 2005).

Las cepas caracterizadas en esta tesis ofrecieron una capacidad de sobrevivida muy variable al ser expuestas a soluciones clorhídricas y posterior tratamiento con bilis y pancreatina. Para *L. gasseri* 37 se observó una sobrevivida satisfactoria (reducción < 2 órdenes log) cuando las células fueron

resuspendidas en leche. En estas condiciones, la cepa se mantuvo viable durante el tratamiento con la solución gástrica y, adicionalmente, resistió la exposición sucesiva a la digestión intestinal simulada. Estos resultados indican un efecto protector de la leche frente a ambas barreras biológicas sucesivas, cuando se los compara con los obtenidos para las otras condiciones evaluadas (cultivo de esta cepa en leche o suspensión en solución salina). Para *L. paracasei* JP1 se observó un comportamiento similar frente a la simulación gástrica cuando la cepa fue resuspendida en leche, afectándose ligeramente (2 órdenes log) su viabilidad. En el otro medio de suspensión, la reducción en el nivel de células viables resultó muy significativa (> 9 órdenes log). Bajo ninguna de las condiciones resistió un tratamiento posterior con bilis y pancreatina. Por su parte, *L. rhamnosus* 64 demostró una gran susceptibilidad a la simulación gástrica dinámica, que se evidenció por pérdidas de viabilidad superiores a 6 órdenes log, independientemente del medio de suspensión ensayado. Similarmente, Mainville y col. (2005) informaron, para *L. rhamnosus* GG, una escasa sobrevivencia en solución gástrica simulada a pH 2 durante 1,5 h (< 0,1 % de células viables). Si bien las condiciones experimentales fueron diferentes, en el presente trabajo también se observó una marcada sensibilidad de esta cepa comercial, utilizada como referencia, frente a las barreras biológicas ensayadas, detectándose un leve efecto protector de la leche cuando la cepa desarrolla previamente en este medio. En un ensayo realizado por Burns y col. (2008) se informó una marcada resistencia a la acidez gástrica para las cepas *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 133 y *L. acidophilus* DRU, utilizando como medio de suspensión una solución que simula los jugos gástricos a pH 3, durante 1 h. Por su parte, Vinderola y col. (2000b) evaluaron la viabilidad celular a pH 2 y 3 de distintas cepas de bifidobacterias y lactobacilos (*L. casei* y *L. acidophilus*)

contenidas en un homogenizado de queso fresco probiótico durante 3 h a 37°C, en una solución clorhídrica que simula las condiciones ácidas del estómago. En las experiencias controles (con cultivos puros), la capacidad de sobrevivida fue mucho menor que la observada al utilizar cepas contenidas en la matriz queso. En este sentido, un punto importante a destacar es que, en general, la pérdida de viabilidad celular, a igualdad de pH, es mayor en soluciones acuosas acidificadas que en jugos gástricos humanos, por lo que las condiciones ensayadas *in vitro* podrían subestimar la capacidad de sobrevivida bacteriana (Kos y col., 2000). De este modo, se verificó un importante efecto de la matriz o alimento en que se hallan suspendidas las cepas durante el ensayo que simula la digestión gástrica. En general, y como se observó en este estudio, los medios lácteos parecen suavizar el efecto de las barreras gastrointestinales en relación a células suspendidas en un medio acuoso. Por estas razones, se plantea la necesidad de realizar estudios adicionales con distintos alimentos (leches fermentadas, quesos, etc.) como vehículos de las bacterias de interés. La verdadera significancia de los estudios *in vitro* de tolerancia a acidez gástrica y su correlación con los valores *in vivo* de resistencia a esta barrera fisiológica aún no ha sido dilucidados (Morelli, 2007). Muchas cepas para las cuales existen efectos benéficos demostrados en humanos presentan una alta sensibilidad a la digestión gástrica *in vitro* (Morelli, 2007). Sin embargo los estudios *in vitro* son de gran utilidad al momento de seleccionar cepas más resistentes entre un grupo posible de cepas y al momento de comparar la efectividad de matrices alimenticias en otorgar una cierta protección durante la exposición a fluidos gástricos (Berrada y col., 1991).

En las últimas décadas, el uso clínico de los antibióticos ha conducido a una significativa reducción en la morbilidad y mortalidad asociada con

enfermedades infecciosas, extendiéndose su uso incluso a veterinaria y agricultura (Ammor y col., 2007). Consecuentemente, esta fuerte presión selectiva ha determinado un progresivo incremento en la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias patógenas y comensales, así como aquellas asociadas a alimentos. Estudios recientes indican que algunos de estos antimicrobianos tienen un impacto a largo plazo, contrariamente a lo que se presuponía hace unos años atrás. Adicionalmente, las cepas resistentes a antibióticos o sus genes de resistencia pueden persistir en el TGI del huésped durante períodos relativamente prolongados, debido a la ausencia de presión selectiva en este ambiente, reduciendo el éxito de futuros tratamientos frente a una infección bacteriana (Jernberg y col., 2010). Por esta razón, la comprobación de la presencia de determinantes de resistencia transferibles en estas cepas resulta otro punto crítico para garantizar la seguridad del alimento antes de incluirlas en la formulación de un nuevo producto (Ammor y col., 2007). En este sentido, se han publicado numerosos y variados reportes con recomendaciones relativas a la virulencia y transferencia de resistencia a antibióticos, tendientes a establecer un criterio de seguridad para la selección de cepas de uso alimentario, principalmente probióticas (FAO/WHO, 2002, Vankerckhoven y col., 2007). A pesar de ello, debido a la multiplicidad de métodos disponibles (E-test, dilución en agar, difusión con discos, microdiluciones en medio líquido, etc.), hasta el momento no existe un consenso internacional acerca de los valores máximos de resistencia permitidos para BAL y bifidobacterias. Si bien las recomendaciones EU-PROSAFE señalan al método de las microdiluciones como el método de “referencia tentativo” para la determinación de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CIM), el E-test es reconocido como un método muy exacto y simple, especialmente útil para

screening y selección de cepas (Vankerckhoven y col., 2007). Este test se basa en la capacidad de desarrollo de cepas de interés sembradas en placas de LSM agarizado, sobre las cuales se colocan las tiras E-test conteniendo los diferentes antibióticos. Klare y col. (2005) formularon el medio de cultivo LSM, ampliamente difundido en los últimos años para el estudio de resistencia a antibióticos de BAL y bifidobacterias.

La mayoría de las especies de *Lactobacillus* presentan un alto nivel de resistencia a los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) y aminoglicósidos (neomicina, kanamicina, estreptomicina y gentamicina), siendo generalmente susceptibles a antibióticos que inhiben la síntesis proteica como cloramfenicol, eritromicina, clindamicina y tetracilinas. En la mayor parte de los casos, estas resistencias resultan intrínsecas o naturales, es decir, inherentes a una especie bacteriana, si bien cada caso particular debe analizarse exhaustivamente (Ammor y col., 2007). De lo contrario, cuando una cepa perteneciente a una especie típica o intrínsecamente susceptible es resistente a un determinado antibiótico, se considera que dicha resistencia es “adquirida”. La adquisición de la resistencia a antibióticos puede ocurrir por medio de mutación de genes pre-existentes o por transmisión horizontal (particularmente aquellos presentes en elementos genéticos móviles) (Anadón y col., 2005; Ammor y col., 2007). Los casos de resistencia adquirida son los de mayor importancia en el momento de evaluar la seguridad de una cepa probiótica. En este trabajo, mediante el empleo del E-test en agar LSM se evaluó la susceptibilidad de las cepas en estudio a cinco antibióticos comúnmente utilizados en medicina humana y veterinaria: cloramfenicol (CL), eritromicina (EM), estreptomicina (SM), tetraciclina (TC) y vancomicina (VA). Los valores microbiológicos de corte (breakpoints) publicados por el Panel de la EFSA (European Food Safety Authority) para

cepas de *Lactobacillus* homofermentantes (sin diferenciación de especies) son: 4 µg/ml para cloramfenicol, eritromicina y vancomicina; 16 µg/ml para estreptomina y 8 µg/ml para tetraciclina (Anadón y col., 2005). De acuerdo a estos valores, *L. paracasei* JP1 presentó una alta resistencia a vancomicina (CIM=256 µg/ml), superando ampliamente el breakpoint. Asimismo es altamente resistente a tetraciclina (CIM=128 µg/ml) y a estreptomina (CIM=20 µg/ml). Por otro lado, resultó sensible a cloramfenicol (CIM=3,5 µg/ml) y altamente sensible a eritromicina (CIM=0,064 µg/ml). Por su parte, *L. rhamnosus* 64 también demostró ser altamente resistente a vancomicina (CIM=256 µg/ml), pero sensible a estreptomina (CIM=12 µg/ml, 25 % inferior al breakpoint), cloramfenicol (CIM=3 µg/ml, 25 % inferior al breakpoint), eritromicina (CIM=0,047 µg/ml, 98,85 % inferior al breakpoint) y tetraciclina (CIM=0,44 µg/ml, 94,5% inferior al breakpoint). Finalmente, *L. gasseri* 37 resultó sensible a todos los antibióticos analizados, con valores de CIM muy por debajo del breakpoint (< 50 %) para eritromicina, estreptomina, tetraciclina y vancomicina (37,5 % para todos los casos), y con un valor igual al breakpoint para cloramfenicol (CIM=4 µg/ml).

Danielsen y col. (2003), mediante el uso de tiras comerciales E-test y MRS como medio para el desarrollo de los microorganismos, estudiaron las CIM de 62 cepas de *Lactobacillus*, incluyendo 13 cepas de *L. paracasei*, 9 cepas de *L. rhamnosus* y 4 cepas de *L. gasseri*, entre otras. Los resultados indican que 15 de las 22 cepas del grupo *L. paracasei/L. rhamnosus* resultaron muy resistentes (CMI \geq 256 µg/ml) a vancomicina, siendo estos valores coincidentes con los obtenidos para *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64. Resultados similares fueron obtenidos por Delgado y col. (2005), quienes utilizaron otro tipo de test

(Sensititre Anaero3 kit) en medio Brucella standard suplementado con hemina y vitamina K1 para cepas de *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Las mismas evidenciaron una alta resistencia a vancomicina (CIM \geq 256 $\mu\text{g/ml}$) y sensibilidad a cloranfenicol (CIM \leq 4 $\mu\text{g/ml}$) y eritromicina (CIM $<$ 2 $\mu\text{g/ml}$). En este reporte se incluyeron también 20 cepas de *L. gasseri* resultando, en un 50 % de los casos, sensibles a vancomicina (CIM de, aproximadamente, 1,5 $\mu\text{g/ml}$), de un modo similar al observado en esta tesis para *L. gasseri* 37. Posteriormente, Comunian y col. (2007), evaluaron la susceptibilidad de cepas de *L. paracasei* aisladas de diferentes matrices alimentarias frente a tetraciclina y eritromicina, utilizando el método de microdilución de antibióticos en caldo LSM. De las 121 cepas genótipicamente diferentes, el 14 % resultó ser resistente a la tetraciclina (CMI \geq 8 $\mu\text{g/ml}$), siendo estos resultados comparables a los obtenidos para *L. paracasei* JP1. De un modo similar a lo observado para *L. paracasei* JP1 y *L. rhamnosus* 64., Hummel y col. 2007, utilizando E-test y agar MRS o M17 como medio de cultivo, demostraron la gran sensibilidad a la eritromicina (CIM $<$ 1 $\mu\text{g/ml}$) y a cloranfenicol (CIM $<$ 2 $\mu\text{g/ml}$), por parte de *L. casei* y *L. rhamnosus*.

El hecho de que una cepa sea resistente a un antimicrobiano no significa que sea peligrosa. Se presume que la resistencia intrínseca y adquirida por mutación presenta un bajo riesgo de transmisión horizontal, mientras que el riesgo de transferencia es máximo si la resistencia adquirida es mediada por la adición de genes (Ammor y col., 2007) . Si la resistencia ha sido adquirida por una cepa que pertenece a un grupo taxonómico naturalmente susceptible a un antibiótico, el riesgo de transferencia es sustancialmente más alto que el asociado con la resistencia intrínseca. El Panel EFSA recomienda que aquellas

cepas que contienen resistencia adquirida a antimicrobianos, no deberían ser utilizadas en alimentos, a menos que se pueda demostrar que la base genética de la resistencia adquirida es debido a una mutación cromosomal. De ser así, se considera generalmente aceptable a la cepa para su utilización en matrices alimentarias (Anadón y col., 2005). De este modo, adicionalmente a los ensayos realizados en este trabajo y con el fin de garantizar la seguridad de estas cepas para su futura inclusión en formulaciones alimentarias, se deberá probar la presencia de determinantes genéticos de resistencia a estos y otros antibióticos, mediante ensayos de PCR con sondas específicas, de modo de comprobar si la resistencia observada es intrínseca o adquirida (Anadón y col., 2005; Klare, 2007).

Otro de los criterios de selección relevante para microorganismos probióticos es su adhesión a la mucosa intestinal, ya que se considera un pre-requisito para, al menos, la permanencia temporal en las superficies mucosas o colonización transitoria. El paso a través del intestino delgado es muy rápido (2,5 horas) y se ralentiza en las etapas siguientes del TGI. Por lo tanto, para que la bacteria pueda permanecer temporalmente en este nicho ecológico, es necesaria su adhesión a la mucosa y/o al epitelio intestinal. Como el epitelio está constantemente regenerándose (cada 3-4 días), las bacterias pueden colonizarlo sólo si la tasa de generación o multiplicación celular es mayor que la tasa de recambio celular (Iñíguez-Palomares y Acedo-Félix, 2006). Para interpretar cuáles son las interacciones célula-célula y célula-superficie que se producen a nivel molecular, se pueden llevar a cabo diferentes ensayos, entre los cuales se encuentran la adhesión a líneas celulares, la aglutinación de eritrocitos y la adhesión a diferentes sustratos sintéticos, así como la determinación de las características físicas y químicas de la superficie celular (Morelli, 2007). La

naturaleza hidrofóbica de la superficie exterior de los microorganismos parece estar implicada en este fenómeno, ya que se considera fundamental que en los pasos iniciales de la adhesión exista una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto (Rosenberg y col., 1980; Kiely y Olson, 2000). Esta propiedad podría conferir una ventaja competitiva importante para el mantenimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal humano ya que les asegura mayor permanencia y colonización del tracto gastrointestinal (Vinderola y col., 2008; Burns y col., 2010). La determinación de la afinidad hacia el *n*-hexadecano por parte de una cepa, como medida de su potencial adherencia a células epiteliales, es una metodología sencilla, que ofrece un acercamiento válido al fenómeno de adhesión (Kiely y Olson, 2000). En el presente trabajo, se obtuvieron valores de hidrofobicidad que oscilan, para las diferentes cepas, entre 4,77 y 10,24 %. Para cepas comerciales y de colección pertenecientes a las mismas especies bacterianas, se han reportado valores de hidrofobicidad similares. Así, Kiely y Olson (2000), evaluando 5 cepas de *L. casei*, reportaron valores que no superaron el 30 %. Por otra parte, Vinderola y Reinheimer (2003) informaron para diferentes cepas probióticas, valores de hidrofobicidad que oscilan entre 38,1 y 67,8 % para *L. acidophilus* y entre 13,6 y 64,7 % para bifidobacterias. En cambio, para cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus* los porcentajes resultaron similares (10,9 - 24,1 %) a los obtenidos en este trabajo de tesis. Más recientemente, Burns y col. (2008), estudiando el comportamiento de cepas aisladas de productos lácteos y sus derivadas resistentes a bilis, encontraron que no existen diferencias significativas en este parámetro para las cepas originales y sus derivados desarrollados en ausencia de sales biliares. En este caso, los resultados obtenidos fueron muy variables, dependiendo de la cepa

evaluada (entre 8 y 60 % para *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, y valores cercanos al 95 % para cepas de *L. acidophilus*).

Luego de ensayar, mediante una serie de tests *in vitro*, la resistencia de una cepa a condiciones de estrés tecnológico o fisiológico (congelamiento, acidez láctica, gástrica, bilis, etc.), así como su seguridad (resistencia a antibióticos) y funcionalidad (hidrofobicidad superficial, etc.) el criterio de selección más relevante recomendado por la FAO/WHO (2002) involucra la realización de ensayos *in vivo*, adecuadamente diseñados, capaces de confirmar que una cepa es un microorganismo probiótico. Desde el punto de vista funcional, un probiótico (en su dosis adecuada) no sólo debe ser capaz de promover un efecto benéfico en el huésped (criterio de funcionalidad) como, por ejemplo, a través de la inmunoestimulación de parámetros de interés a nivel de mucosas, sino garantizar, a su vez, la ausencia de efectos colaterales, tales como la traslocación o la alteración de la permeabilidad o arquitectura intestinal causado por una fuerte respuesta inflamatoria, lo que constituye un criterio de seguridad (Perdigón y col., 2001). La traslocación de un microorganismo se define como su pasaje a través de la mucosa intestinal hacia sitios y órganos extraintestinales tales como los nódulos linfoides mesentéricos, hígado, bazo, riñón y sangre (Rodríguez y col., 2000). En este estudio, utilizando un modelo murino, no se observó el fenómeno de traslocación para ninguna de las cepas en la dosis elegida y durante los períodos ensayados. Este hecho asegura que la dosis suministrada a los animales no afectó la integridad del epitelio intestinal, ni el balance de la microflora residente (Vinderola y col., 2005). Otro parámetro importante para evaluar *in vivo* la seguridad de una cepa con potencial probiótico es que no modifique las estructuras morfológicas intestinales. En este sentido, luego de la administración de las cepas en estudio se evidenció una

arquitectura normal del intestino, así como ausencia de síntomas de edema, inflamación, excesivo infiltrado linfocitario o daño tisular, indicando que las dosis seleccionadas resultaron seguras para el modelo elegido. Estos resultados son consistentes con un trabajo publicado por Medici y col. 2004, quienes estudiaron los efectos *in vivo* de la administración de quesos conteniendo bacterias con propiedades probióticas (*B. bifidum*, *L. acidophilus* y *L. casei*). Se demostró la ausencia de efectos adversos de las cepas tanto en la salud, como en la morfología intestinal de los ratones. En 2005, Medici y col., realizaron un trabajo similar pero empleando una leche fermentada, evaluando el efecto de cepas de *L. casei* ($2,8 \times 10^9$ UFC/ml), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ($2,5 \times 10^8$ UFC/ml) y *S. thermophilus* ($1,9 \times 10^9$ UFC/ml) en ratones, obteniendo resultados del mismo tipo.

La administración oral de bacterias probióticas representa una forma de estimular la inmunidad no específica del huésped. De esta manera se puede mejorar la respuesta inmune sistémica o modular las funciones de las células inmunocompetentes (Perdigón y col., 1986). Los macrófagos son células presentadoras de antígenos y efectoras implicadas en la defensa específica y no específica del huésped. Durante este trabajo se demostró que la administración oral a ratones de las tres cepas, *L. casei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37 indujo la activación de macrófagos peritoneales. Estos resultados son consistentes con un trabajo realizado por Medici y col. (2004) con cepas de *B. bifidum*, *L. acidophilus* y *L. casei*. Vitiñi y col. (2002) estudiaron la capacidad de estimulación sobre el sistema inmune tanto específico como no específico de 14 cepas de BAL (incluyendo las especies *L. casei* y *L. rhamnosus*) en ratones, reportando aumentos porcentuales en la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales similares a los observados en esta tesis. Asimismo, Kitazawa y col.

(2002) observaron actividad quimiostática de macrófagos luego de la administración de cepas de *L. gasseri*.

La IgA es la principal inmunoglobulina a nivel de mucosas que ejerce un papel determinante en la prevención y resolución de infecciones por virus, bacterias y protozoos (Lamm, 1997). Ciertas cepas de bacterias probióticas son capaces de modificar favorablemente la función inmune cuando se ingiere un alimento conteniéndolas (Tejeda-Simon y col., 1999). En nuestro estudio, las 3 cepas ejercieron un efecto estimulante en la respuesta inmune de la mucosa intestinal, lo cual se deduce del incremento en el número de células productoras de IgA (en intestino delgado) en los ratones alimentados con las cepas en estudio, en relación a lo observado para los animales control. Este aumento resultó significativo ($P < 0,05$) luego de 5 días de administración. Por otro lado, la administración oral de las cepas no modificó el número de células productoras de IgA a nivel de intestino grueso. Resultados similares fueron obtenidos por Vinderola y col. (2007), cuando se estudió la capacidad de cepas de *L. delbrueckii* de promover las defensas innatas del intestino mediada por IgA. Vitiñi y col. (2002) obtuvieron resultados semejantes a los de este trabajo evaluando, en un modelo murino, la funcionalidad de cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus*.

Esta última etapa del trabajo de tesis destaca la importancia de los estudios in vivo como criterio de selección de probióticos, para complementar los resultados in vitro, cumplimentando uno de los requisitos más importantes que establece la FAO/WHO para la evaluación de probióticos de uso humano, como lo son los ensayos pre-clínicos en animales.

Conclusiones

-
- La secuenciación de un fragmento del gen 16S ADNr permitió identificar las cepas aisladas de neonatos santafesinos como *L. paracasei* JP1, *L. rhamnosus* 64 y *L. gasseri* 37. Mediante el uso de sondas especie específicas, fue posible su detección e identificación, incluso a partir matrices alimentarias complejas (quesos y leches fermentadas). Por su parte, la RAPD-PCR determinó que existe diversidad genética entre las cepas en estudio y las cepas comerciales y de colección utilizadas como referencia.

 - Cuando se evaluó la capacidad de desarrollo en medios lácteos (leche, suero de queso y suero de manteca) adicionados de extracto de levadura, las 3 cepas tuvieron un comportamiento similar, alcanzando niveles de crecimiento de, aproximadamente, 10^9 UFC/ml, luego de 24 h.

 - En cuanto a la resistencia a factores de estrés tecnológicos, ninguna de las cepas evidenció cambios significativos en su desarrollo en presencia de sales (NaCl y KCl, 1 y 2 %). Asimismo, cuando se evaluó su performance en medios de recuento selectivo, el Agar MRS-LP resultó el medio más adecuado para su desarrollo. Cuando se congelaron concentrados de las cepas, tanto *L. paracasei* JP1 como *L. rhamnosus* 64 se mantuvieron viables en el tiempo con ligeras pérdidas de viabilidad. En cambio, *L. gasseri* 37 vio seriamente disminuida su viabilidad durante el período de conservación. Los ensayos de resistencia a la acidez láctica en refrigeración revelaron una adecuada sobrevida en leche acidificada a pH 4,5, aún luego de 30 días de almacenamiento a 5°C, siendo *L. gasseri* 37 la cepa que vio menos afectada su viabilidad luego de la digestión gastrointestinal simulada.

-
-
- Al evaluar la seguridad de las cepas *in vitro*, se observó que *L. gasseri* 37 resultó sensible a los 5 antibióticos ensayados, *L. rhamnosus* 64 fue resistente sólo a vancomicina y *L. paracasei* JP1 fue resistente a vancomicina, tetraciclina y estreptomicina. En cuanto a la hidrofobicidad, se obtuvieron valores comparables a los de cepas comerciales.

 - A partir de los estudios *in vivo*, las cepas demostraron ser seguras (traslocación negativa y sin modificación de la arquitectura intestinal) y funcionales (capaces de estimular el sistema inmune mediante la activación de macrófagos peritoneales y el aumento de IgA en intestino delgado).

De este modo, y siguiendo los principales criterios de selección de bacterias probióticas propuestos por la Organización Mundial de la Salud, se avanzó en una caracterización preliminar *in vitro* e *in vivo* de cepas autóctonas con vistas a profundizar los estudios para su posible empleo como cultivos probióticos en alimentos funcionales. Cada una de las cepas evidenció, en mayor o menor medida, aptitud en las diferentes características evaluadas. Dichas performances podrían ser optimizadas mediante estudios adicionales (búsqueda de otros crioprotectores, por ejemplo). En particular, *L. gasseri* 37 demostró poseer la mayor capacidad de resistir a la digestión gástrica simulada, sensibilidad a todos los antibióticos y capacidad de estimular la respuesta inmune, lo cual la posicionaría como una cepa de elección para evaluar el efecto de parámetros tecnológicos combinados sobre la funcionalidad, una vez incluida la cepa en una matriz alimentaria. En este sentido, resultaría crítico considerar el estudio de parámetros funcionales en las diferentes etapas involucradas en la producción del alimento que le sirve de vehículo, desde la producción de

biomasa, su conservación (congelación, liofilización, secado spray), su inclusión en el alimento, su almacenamiento refrigerado y, finalmente, su consumo.

Bibliografía

1. AFFSA (2003). Rapport du groupe de travail: Alimentation infantile et modification de la flore intestinale. Agence française de sécurité sanitaire des aliments (<http://www.afssa.fr/ftp/actu/Floreintestinale>).
2. Agostoni, C., Axelsson, I., Braegger, C., Goulet, O., Koletzko, B. y Michaelsen, K. F. (2004). Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Comité on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38(4), 365-374.
3. Akopyanz, N., Bukanov, N., Westblom, T. y Berg, D. (1992). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research* 23(29), 6221-6225.
4. Aldinucci, C., Bellussi, L., Monciatti, G., Passali, G.C., Salerni, L., Passali, D. y Bocci, V. (2002). Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *European Journal of Clinical Nutrition* 56(12), 1155-1161.
5. Ammor, M., Flórez, A. y Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24, 559–570. Review.
6. Anadón, A., Arboix Arzo, M., Bories, G., Brantom, P., Brufau de Barberá, J., Chesson, A., Cocconcelli, P., de Knecht, J., Dierick, N., Flachowsky, G., Franklin, A., Gropp, J., Lundebye Haldorsen, A., Halle, I., Mantovani, A., Peltonen, K., Rychen, G., Sanders, P., Soares, A., Wester, P. y Windisch, W. (2005). Opinion on the antimicrobial resistance criteria. *The EFSA Journal* 223, 1-12.
7. Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L. y Giraffa, G. (1998). Molecular identification and cluster analysis of homofermentative

-
- thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Research in Microbiology* 149, 631-643.
8. Arranz, E. y Garrote, J. (2006). Tema 4: El sistema inmune de la mucosa gastrointestinal. En: *Inmunología General, 2º Medicina*. Departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, y Nutrición y Bromatología. Universidad de Valladolid.
 9. Ashwell, M. (2002). Conceptos sobre los alimentos funcionales ILSI. International Life Science Institute (<http://europe.ilsa.org>).
 10. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (eds). *Lactic Acid Bacteria*, pp. 603. CRC, Inc. New York, USA.
 11. Azcárate-Peril, M., Altermann, E., Jun Goh, Y., Richard, T., Sanozky-Dawes, R., Pfeiler, E., O'Flaherty, Buck, B., Dobson, A., Tri, D., Miller, M., Barrangou, R. y Klaenhammer, T. (2008). Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (5), 4610–4625.
 12. Begley, M., Gahan, C. G. M. y Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 625–651.
 13. Ben Amor, K. Vaughan, E. y de Vos, W. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition* 137, 741S-747S.
 14. Berrada, N., Lemeland, J.-E., Laroche, G., Thouvenot, P., y Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science* 74, 409–413.
 15. Bibiloni, R., Zavaglia, A.G. y De Antoni, G. (2001). Enzyme-based most

-
- probable number method for the enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products. *Journal of Food Protection* 64(12), 1-6.
16. Binetti, A.G., Suarez, V.B., Tailliez, P. y Reinheimer J.A. (2007.) Characterization of spontaneous phage-resistant variants of *Streptococcus thermophilus* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms. *International Dairy Journal* 17, 1115–1122.
17. Briggiler-Marcó, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A. y Hynes E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal Dairy Science* 90, 4532–4542.
18. Brock, T. y Madigan, M. (1991). *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana S.A México sexta edición 19, 837-839.
19. Burns P., Vinderola G. , Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilán C.G. y Reinheimer J. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal* 18, 377–385.
20. Burns, P., Sánchez, B., Vinderola, C. G., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., Margolles, A., Reinheimer, J. y de los Reyes-Gavilán, C. (2010). Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *International Journal of Food Microbiology* 142, 132–141.
21. Cannon, J. P., Lee, T. A., Bolanos, J. T. y Danziger, L. H. (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 24(1), 31-40.
22. Champagne, C. y Gardner, N. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 61-84.

-
23. Champagne, C. y Furtier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in Biotechnolgy* 18, 1-7.
 24. Chandan, R.C. (1999). Enhancing market value of milk by adding cultures. *Journal of Dairy Science* 82(10), 2245-2256.
 25. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 35, 1–27.
 26. Cocconcelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L. y Bottazzi, V. (1997). Use of RAPD and S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology* 25, 8-12.
 27. Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. y Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait* 83, 269–306.
 28. Collado, M.C., (2009). Handbook of probiotics and prebiotics. En: Lee, Y. K. and Salminen, S. Ed. *Role of probiotics in health and diseases*, pp. 189-376. John Wiley & Sons, Inc.. Hoboken, New Jersey.
 29. Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A. y Giraffa, G. (2007). Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 138, 151-156.
 30. Conway, P. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. En: GR Gibson & GT Macfarlane (ed). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology, and pathology*, pp-1-24. Boca Raton: CRC Press.

-
31. Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N., y Gueguen, M. (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12), 4729-4735.
32. Cruchet, S. (2007). ¿Cuándo un microorganismo se considera probiótico?. *Medwave* Año VII, No. 5 (<http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Cursos/gastroynutricioninfo7/1/3253>)
33. Danielsen, M. y Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82, 1– 11.
34. Dave, R.I. y Shah, N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
35. Delgado, S., Flórez, A. y Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology* 50, 202–207.
36. de Moreno de Leblanc, A., y Perdígón, G. (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Medical Science Monitor* 10(4), BR96-104.
37. Dogi, C.A., Perdígón, G. y Weill, F. (2010). Immune response of non-pathogenic gram (+) and gram (-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved. *Immunobiology* 215(1), 60-69.
38. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins, K. (1999). Probiotics: from myth to

-
- reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antoine van Leeuwenhoek* 76, 279-292.
39. Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 386S-392S.
40. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L. y Sargent, M. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-8.
41. Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. y Morelli, L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal of Applied Microbiology* 88(4), 695-703.
42. European Food Safety Authority (2005). Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 223, 1-12.
43. Ezendam, J. y van Loveren, H. (2006). Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews* 64 (1), 1-14.
44. FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) Fecha de último acceso: 22/04/2011.
45. Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellagio, F. y Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology* 82, 59-70.

-
46. FEPALE (Federación Panamericana de Lechería) (1996). Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de leches fermentadas ([www.fepale.org/es/noticias/reglamento tecnico para la fijación de identidad/html](http://www.fepale.org/es/noticias/reglamento_tecnico_para_la_fijacion_de_identidad/html)).
 47. Flórez, B. y Mayo B. (2006). Microbial diversity and sucesión during the manufacture and ripening of tradicional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* 110, 165-171.
 48. Foley, S., Lucchini, S., Zwahlen, M. y Brussow, H. (1998). A Short Noncoding Viral DNA Element Showing Characteristics of a Replication Origin Confers Bacteriophage Resistance to *Streptococcus thermophilus*. *Virology* 250, 377-387.
 49. Fonseca, F., Béal, C. y Corrieu, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* 43, 189-198.
 50. Frank, J.F. y Hassan, A.N. (1998). Starter cultures and their use. En: Marth, E.H. and Steel, J.L. (ed). *Applied Dairy Microbiology*, pp. 131-172. Marcel Dekker Inc., New York (USA).
 51. FUFOSÉ (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition* 81, S1-S27.
 52. Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* 32(4), 439-442.
 53. Furet, J.P., Quénee, P. y Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 97(2), 197-207.
 54. Gill, H.S., (1998). Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal* 8, 535-544.

-
55. Gilliland, S.E. y Walker, D.K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science* 73, 905-911.
56. Gilliland, S.E. (1998). Fermented milks and probiotics. En: Marth, E.H. and Steel, J.L. (ed), pp. 195-212. *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker Inc., New York (USA).
57. Giraffa, G., De Vecchi, P. y Rosetti, L. (1998). Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology* 85, 918-924.
58. Goldin, B.R. (1998). Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80 (2), 203-207.
59. Gomes, A.M.P., Teixeira, M.G.M. y Malcata, F.X. (1998). Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation* 22, 221-240.
60. Gordon, D., Macrae, J., y Wheater, D. M. (1957). A *Lactobacillus* preparation for use with antibiotics. *The Lancet* 269, 899-901.
61. Guandalini, S. (2002). Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian society of gastroenterology and the Italian Association for the study of the liver*. Suppl 2, S63-S65.
62. Guarner, F. y Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361, 512-519.

-
63. Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B. y Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *The British Journal of Nutrition* 93(6), 783-786.
64. Guarner Aguilar F. (2006). Funciones de la microflora intestinal. *Alimentación nutrición y salud. Instituto Danone* 13 (2), 41-47.
65. Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S (2004). New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and Environmental Journal* 70(7), 4165-4169.
66. Gueimonde, M., Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian society of gastroenterology and the Italian Association for the study of the liver. Suppl 2*, S242-S247.
67. Gueimonde, M., Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández, A., Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C. (2011). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. 1st Workshop on Current Challenges in Gastrointestinal Health Research, Braga (Portugal).
68. Hammes, W. P. y Hertel, C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes* 4, 320-403.
69. Heller, K. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal in Clinical Nutrition* 73, S374- S379.
70. Heller, K. J. (2008). Bacterias probióticas en alimentos fermentados. Características de los productos y microorganismos iniciadores. *Revista Mundo lácteo y cárnico*

-
- (http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLCo25_PROB_IOTICAS.pdf).
71. Hirayama, K. y Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infections* 2(6), 681-686.
72. Howlett, J. (2008). *Functional Foods from Science to Health and Claims*. International Life Science Institute (<http://europe.ilsa.org>).
73. Huey, B. y Hall, J. (1989). Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology* 171(5), 2528-2532.
74. Hummel, A., Hertel, C., Holzapfel, W. y Franz, C. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 730–739.
75. Husni, R. N., Gordon, S. M., Washington, J. A. y Longworth, D. L. (1997). *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clinical Infectious Diseases* 25(5), 1048-1055.
76. Hynes, E.R., Bergamini, C.V., Suárez, V.B. y Zalazar, C.A. (2003). Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal in Dairy Science* 86(12), 3831-3840.
77. IDF (International Dairy Federation). (1992). New technologies for fermented dairy products. *Bulletin of the International Dairy Federation* N° 277/1992.
78. Iñiguez-Palomares, C. y Acedo-Félix, E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Revista de Salud Publica y Nutricion* 7 (2).
79. Ishibashi, N. y Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *American Journal*

-
- of Clinical Nutrition 73, 465S–470S.
80. Isolauri, E. (2004). Probiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 18 (2), 299–313.
81. Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C. y Jansson, J. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. Microbiology 156, 3216–3223.
82. Joppen, L. (2006). Future of functional foods: Early stage of life critica. Food Engineering & Ingredients. Interview.
83. Kandler, O. y N. Weiss. (1986). Regular non-sporing Grampositive rods. En: P. H. Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 1208–1234. William and Wilkins. Baltimore, MD.
84. Kaufmann, P., Pferfferkorn, A., Teuber, M. y Meile, L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA targeted probes by colony hybridization and PCR. Applied and Environmental Microbiology 63(4), 1268-1273.
85. Kiely, L.J. y Olson, N.F. (2000). The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. Food Microbiology 17, 277-291.
86. Kimura, K., McCartney A. L., McConnell, M. A. y Tannock G. W. (1997). Analysis of fecal population of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. Applied and Environmental Microbiology 63, 3394–3398.
87. Kitazawa, H., Ino, T., Kawai, Y., Itoh, T. y Saito, T. (2000). A novel immunostimulating aspect of *Lactobacillus gasseri*: induction of

-
- "Gasserokine" as chemoattractants for macrophages. *Biocell.* 24(3), 223-232.
88. Klare, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M. y Swings, J. (2005). Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), 8982–8986.
89. Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. y Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 900–912.
90. Klaver, F.A.M., Kingma, F. y Weerkamp, A.H. (1993). Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 47, 151-164.
91. Kliegler, M., Hanaway, P. y Cohrssen, A. (2007). Probiotics in children. *Pediatrics Clinics of North America* 54, 949-967.
92. Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J. y Matosic, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology* 38 (2), 121-127.
93. Kwon, H., Yang, E., Yeon, S., Kang, B. y Kim, T. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 239, 267–275.
94. Ladero, V., Fernández, M., Cuesta, I. y Alvarez, M.A. (2010). Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology* 27(7), 933-939.

-
95. Lamm, M.E. (1997). Review article: Epithelial disposition of antigen. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 11 (3), 40-44.
96. Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Rodríguez, JM., Boza, J. y Xaus, J. (2007). Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition* 98 (1), S96-S100.
97. Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W. y Jochem Heller, K. (1996). Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its lacZ gene. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 74-77.
98. Liong, M.T. y Shah N.P. (2005). Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4), 1745-53.
99. Liu, X., Chung, Y. K., Yang, S. T. y Yousef, A. E. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry* 40, 13-24.
100. Llopis, M., Antolin, M., Carol, M., Borruel, N., Casellas, F., Martínez, C., Espín-Basany, E., Guarner, F. y Malagelada, J.R. (2009). *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflammatory Bowel Disease* 15(2), 275-283.
101. Lourens, A., Viljoen, B.C., Jooste, P. (2000). Levels of probiotic bacteria in South African commercial bioyoghurt. *Food Review* 27, 31-33.
102. Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11(1-2), 1-17.
103. Mackie, R.I., Sghir, A. y Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical*

-
- Nutrition 69(5), 1035S-1045S.
104. Mainville, I., Arcand, Y. y Farnworth, E.R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 99, 287– 296.
105. Makarova, K. y Koonin, E. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 189(4), 1199–1208.
106. Marteau, P., Minekus, M., Havennar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* 80, 1031-1037.
107. Martin, R., Jiménez, E., Heilig, H., F., Leónides, M., Zoetendal, E. y Rodríguez, J. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 965-969.
108. Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R. y Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Internacional Journal of Food Microbiology* 102, 221–230.
109. Matar, C., Valdez, J.C., Medina, M., Rachid, M. y Perdigon, G. (2001). Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *Journal of Dairy Research* 68, 601–609.
110. Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. y Oyaizu, H. (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora

-
- examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), 4506-4512.
111. Mattila-Sandholm, T., Blaut, M., Daly, C., De Vuyst, L., Dore, J., Gibson, G., Goossens, H., Knorr, D., Lucas, J., Lahteenmaki, L., Mercenier, A., Saarela, M., Shanahan, F. y de Vos, W. (2002). Food, GI-tract Functionality and Human Health Cluster: PROEUHEALTH. *Microbial Ecology in Health and Disease*.
112. Matto, J., Malinen, E., Suihko, M., Alander, M., Palva, A. y Saarela, M. (2006). Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 97, 459-470.
113. Médici, M., Vinderola, C.G. y Perdigón, G. (2004). Gut mucosal immunostimulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal* 14, 611-618.
114. Médici, M., Vinderola, C. G., Weill, R. y Perdigón, G. (2005). Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *Journal of Dairy Research* 72, 243-249.
115. Mercanti, D.J., Carminati, D., Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology* 144(3), 503-510.
116. Minekus, M., Smeets-Peters, M., Bernalier, A., Marol-Bonin, S., Havenaar, R. y Marteau, P. (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water

-
- absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(1), 108-114.
117. Mitsuoka, T. (1992). The human gastrointestinal tract. En: B. J. B. Wood (ed.) *The Lactic Acid Bacteria, Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, pp. 69–114. Elsevier Applied Science Publishers. London, UK.
118. Morelli, L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal* 17, 1278–1283.
119. Naidú, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (1), 13-126.
120. Nakasawa, Y. y Hosono, A. (1992). *Functions of Fermented Milk. Challenges for the Health Sciences* pp. 1-518. Elsevier Applied Science, London, UK.
121. Neish, A.S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136(1); 65-80.
122. Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and crossresistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 94, 79–86.
123. Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y. y Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 5628–5643.
124. Ohashi, Y. (2000). Habitual intake of lactic acid bacteria prevents occurrence of bladder cancer. *Urologia Internationalis* 68, 273-280.

-
125. Ohishi, A., Takahashi, S., Ito, Y., Ohishi, Y., Tsukamoto, K., Nanba, Y., Ito, N., Kakiuchi, S., Saitoh, A., Morotomi, M. y Nakamura, T. (2010). *Bifidobacterium* septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. *Journal of Pediatrician* 156(4), 679-81.
 126. Ong, L., Henriksson, A. y Shah, N.P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* 16, 446-456.
 127. O'Sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F. (2005). Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design* 11(1), 3-10.
 128. Ouwehand, A.C., Salminen, S. y Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
 129. Pagano, J.C. (1998). Nueva legislación del Mercosur para leches fermentadas. *Industria Lechera* 713, 8-13.
 130. Payne, J. F., Morris, A. E. J. y Beers, P. (1999). Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp. in milk. *Journal of Applied Microbiology* 86, 353-358.
 131. Perdigón, G., de Macías, M.E., Álvarez, S., Oliver, G., de Ruíz, Holgado. (1986). Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infection and Immunity* 53(2), 404-410.
 132. Perdigón, G., Álvarez, S., y A. Pesce de Ruíz Holgado. (1991). Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research* 58, 485-496.

-
133. Perdigón, G., Fuller, R. y Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2(1), 27-42.
134. Pérez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A. and De Antoni, G.L. (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 21–26.
135. Rautava, S., Kalliomaki, M. y Isolauri, E. (2002). Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *Journal of Allergy in Clinical Immunology* 109, 119–121.
136. Rautava, S., Arvilommi, H. y Isolauri, E. (2006). Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatric Research* 60 (2), 221-224.
137. Reinheimer, J.A., Renzulli, P.M., Rubiolo, A.C., Bailo, N.B. y Binetti, A.G. (1997). Effects of sodium and potassium chloride on growth and acid production in thermophilic lactic acid bacteria. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 15, 7-15.
138. Richard, B., Groisillier, A., Badet, C., Dorignac, G. y Lonvaud-Funel, A. (2001). Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe. *Research in Microbiology* 152,157–165.
139. Rius, N., Sole, M., Francis, A. y Loren, J.G. (1994). Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 120, 291–296.
140. Rodrigues, A. C., Cara, D. C., Fretez, S. H. G. G., Cunha, F. Q., Vieira, E. C., Nicoli, J. R. y Vieira, L. Q. (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates

-
- sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology* 89, 404–414.
141. Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. y Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal* 32, 135-142.
142. Rosenberg, M., Gutnick, D. y Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.
143. Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods—a review. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1410–1417.
144. Rossetti, L. y Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiology Methods* 63(2), 135-144.
145. Rotimi, V.O. y Duerden, B.I (1981). The development of the bacterial flora in normal neonates. *Journal of Medical Microbiology* 14(1), 51-62.
146. Roy, D., Ward, P., Vincent, D. y Mondou, F. (2000). Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology* 40(1), 40-46.
147. Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 69, 167–182.
148. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Matilla-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties—a review. *Journal of Biotechnology* 84, 197–215.
149. Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H., Sigvart-Mattila, P. y Mättö, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium*

-
- cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16, 1477–1482.
150. SAGyPA (2007). Probióticos: legislación en marcha.
http://www.alimentosargentinos.gov.ar/o-3/revistas/r_39/articulos/Probioticos.htm. Fecha de último acceso: 10/03/2011.
151. Sainte-Marie, G. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 10, 250-256.
152. Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M. y Valtonen, V. (2006). *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clinical Infectious Diseases* 42, 35-44.
153. Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
154. Sanders, M.E. y Huis in't Veld, J. H. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antoine van Leeuwenhoek* 76, 293-315.
155. Sanz, Y., Collado, M.C. y Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española* 61 (9).
156. Saxelin, M., Kopela, R. y Mayra-Makinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. En: Mattila-Sandholm T, Saarela M, (ed). *Functional dairy products*, pp. 1–16. Woodhead Publishing Limited, UK.
157. Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., y Black, R.E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-

-
- analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Disease* 6(6), 374-382.
158. Schleifer, K.H., Eharman, M., Beimfohr, E., Brckmann, E., Ludwig, W. y Amann, R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1081-1094.
159. Señorans, J., Ibáñez, E. y Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(5), 507-26.
160. Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., Dore, J. (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5), 2263-2266.
161. Shah, N.P., Laakaputhra, W.E.V., Britz, M.L. y Kyle, W.S.A. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 5, 515-521.
162. Shah, N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83 (4), 894-907.
163. Shah, N. P. (2004). Probiotics and prebiotics. *Agro-Food Industry Hi-tech* 15, 13-16.
164. Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Fernández, N., Margolles, A. y Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16(3), 307-310.
165. Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T. y Gordon, J.I. (2004). Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in

-
- our intestine? *Nature Immunology* 5, 569-573.
166. Spreer, E. (1998). *Milk and Dairy Product Technology*. Marcel Dekker pp.11-48, Inc., New York.
167. Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. (1998). Probiotic Cheese. *International Dairy Journal* (8), 491-496.
168. Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C. y Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1107–1114.
169. Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. (2004). Comparisson of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal* 14, 143–149.
170. Tannock, G. W. (1995). Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1059-1070.
171. Tannock, G. W., K. Munro, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, J. y Gopal P. K.. (2000). Analyses of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2578–2588.
172. Tejada-Simon, M. V. y Pestka, J. J. (1999). Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 62, 1435-1444.
173. Tilsala-TimisjSvi, A. y Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for

-
- identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 35, 49-56.
174. Usman y Hozono, A. (1999). Viability of *Lactobacillus gasseri* and its cholesterol-binding and antimutagenic activities during subsequent refrigerated storage in nonfermented milk. *Journal of Dairy science* 82, 2536-2542.
175. Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T. , Van Assche, P., Swings, J. Y Huys, G. (2006). Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16, 1470–1476.
176. Vankerhoven, V., Huysb, G., Vancanneytc, M., Vaela, C., Klared, I., Romonde, M., Entenzaf, J., Moreillonf, P., Windg, R., Knolg, J., Wiertzh, E., Poti. B., Vaughanjk, E., Kahlmeterl, G. y Goossens, H. (2007). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science & Technology* 19 (2), 102-114.
177. Vasiljevic T. y Shah, N.P. (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714– 728.
178. Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M. y Ouwehand, A.C. (2005). Measurement of bacterial adhesion- in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiology* 60,225–33.
179. Vincent, D., Roy, D., Mondou, F. y Dery, C. (1998). Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology* 43,185–193.
180. Vinderola, C. G., y Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the

-
- enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal* 9(8), 497–505.
181. Vinderola, C.G. y Reinheimer J.A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Internacional Dairy Journal* 10, 271-275.
182. Vinderola, C.G., Bailo, N. y Reinheimer, J.A. (2000a). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International* 33, 97-102.
183. Vinderola, C.G., Prosello W., Ghiberto D. y Reinheimer, J.A. (2000b). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83, 1905-1911.
184. Vinderola, C. G., Costa, G., Regenhardt, S. y Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 12, 579– 589.
185. Vinderola, C. G., Mocchiutti, P., y Reinheimer, J. A. (2002a). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science* 85, 721-729.
186. Vinderola, C. G., Medici, M. y Perdigon, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 96, 230–243.
187. Vinderola, C. G., Matar, C. y Perdigón, G. (2005). Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic

-
- bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(9),1075-84.
188. Vinderola, C. G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavle, D., Farnworth, E. y Matar, Ch. (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology* 211, 149–156.
189. Vinderola, C. G., Matar, Ch. y Perdigon, G. (2007). Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium* infection in mice. *Immunobiology* 212, 107–118.
190. Vinderola C. G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A. y Reinheimer J. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1678-1688.
191. Vinderola, C. G., Prosello, W., Molinari, F., Ghiberto, D. y Reinheimer, J. (2009). Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2), 171-174.
192. Vinderola, C. G., Céspedes, M., Mateolli, D., Cárdenas, P., Lescano, M., Aimaretti, N. y Reinheimer, J. (2011). Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during cold storage. *International Journal of Dairy Technology* 64(2), 269-275.
193. Vitiñi, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., de Budeguer, M.V. y Perdigón, G. (2002). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 77(1-2), 29-38.
194. Walker, D.K. y Gilliland, S.E. (1993). Relationships among bile tolerance,

-
- bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76, 956-961.
195. Walker, A. (2002). Development of the intestinal mucosal barrier. *Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutrition* 34, 533-539.
196. Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M. y Munro, K. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 297-303.
197. Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H., Wang, T.N. y Wang, W.M. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(3), 737-741.
198. Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N (2000). Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology* 17, 205-215.
199. Yeung, P.S., Sanders, M.E., Kitts, C.L., Cano, R. y Tong, P.S. (2002). Species-specific identification of commercial probiotic strains. *Journal of Dairy Science* 85(5), 1039-1051.
200. Young, J. P. W., Downer, H. L. y Eardly, B. D. (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology* 2271-2277
201. Zacarías M.F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2011). Preliminary characterization of the technological potential of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products.

International Journal of Food Microbiology, en prensa.

202. Zoetendal, E., Vaughan, G., Willem, M. y de Vos E. (2006). A microbial world within us. MicroReview. *Molecular Microbiology* 59 (6), 1639–1650.