

Universidad de Los Andes
Departamento de Biología
Laboratorio de biotecnología de microorganismos
“SIXTO DAVID ROJO”

Obtención de cepas de lactobacilos
Su caracterización (invitro) como
Potenciales prebióticas

www.bdigital.ula.ve

Lic. Jose A. Mejia Rodríguez

Mérida, Mayo 2001

C.C.Reconocimiento

RESUMEN

Un total de trescientas sesenta cepas de microorganismos, aisladas a partir de heces de niños lactantes sanos recolectadas en el hospital "Sor Juan Inés" en la ciudad de Mérida del Estado Mérida, de muestras vaginales de diez jóvenes sanas del Estado Mérida con edades comprendidas entre los catorce y veinticinco años y de equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos de la Planta Piloto Lácteos Santa Rosa (PROGAL) de la Universidad de los Andes, Solo veinticinco cepas se identificaron como pertenecientes al género de nuestro interés, *Lactobacillus*. Las cepas fueron resistentes a condiciones hostiles como pH 3 y 0,15% de bilis. Se detectó actividad antimicrobiana por parte de nuestras cepas contra: *Bacillus subtilis* ATCC 60519, *Candida albicans* ATCC 14053, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el ensayo también se emplearon las cepas enteropatógenas: *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* poli I y *Salmonella typhi*, aisladas de infantes con diarrea en la ciudad de Mérida. Se observó resistencia de las cepas de lactobacilos a una mezcla de 1,25 µg de Trimetoprim y 23,75 µg de Sulfametoxazol. Todas las cepas fueron sensibles a 10 µg de Ampicilina.. Con estos resultados podemos decir que nuestras cepas podrían ser utilizadas para la elaboración de una leche fermentada que probablemente tenga propiedades probióticas.

INDICE

Dedicatoria	
Agradecimiento	
I.- Introducción	2
II.1.- Justificación	12
II.2.- Hipótesis	13
II.3.- Objetivos	14
III.- Materiales y Métodos	
III.1.- Obtención y procesamiento de la muestra.....	16
III.2.- Medios de cultivo para los lactobacilos.....	17
III.3.- Medios de conservación	17
III.4.-Condiciones de cultivo	17
III.5.- Selección de las cepas	18
III.6.- Producción de ácido a partir de glucosa.....	18
III.7.- Prueba de catalasa	18
III.8.- producción de H ₂ S	19
III.9.- Selección de los microorganismos con capacidad de coagulación de la leche.....	19
III.10.- Crecimiento en medios hostiles	20
III.11.- Clasificación de los lactobacilos en los tres grandes grupos por la fermentación de las hexosas y pentosas.....	20
III.12.- Actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas sobre microorganismos de prueba 21	
III.13.- Prueba de susceptibilidad de las cepas a los antibióticos.....	22
IV.- Resultados y Discusión	
IV.1.- Aislamiento e identificación preliminar	25
IV.2.- Caracterización de las cepas como probióticos	28
IV.2.1.- Crecimiento de los microorganismos en estudio en diferentes medios hostiles.....	28

IV.2.2.- Actividad antimicrobiana de las cepas (BIO) sobre microorganismos de prueba.....	30
IV.2.3.- Susceptibilidad de las cepas aisladas (BIO) a Trimetoprim sulfametoxazol y Ampicilina.....	34
V.- Conclusiones y Recomendaciones	37
VI.- Bibliografía	40
VII.- Anexos	48

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen de las cepas (Bio) aisladas en este trabajo.....	48
Tabla 2. Clasificación de las cepas BIO en los diferentes grupos de lactobacilos.....	49
Tabla 3. Efecto del pH 3 sobre el crecimiento de las cepas (BIO) aisladas	50
Tabla 4. Efecto de 0,15% de bilis de buey sobre el crecimiento de las cepas (BIO) aisladas.....	51
Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas (BIO) aisladas ante Ampicilina (10 μ g) y Trimetropim-Sulfametoxazol (1,25 y 23,75 μ g).....	52

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

A mis padres digno ejemplo de trabajo y constancia

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

C.C.Reconocimiento

A mis padres por haber sido mis grandes maestros en la carrera de mi vida, enseñando que lo más importante es conseguir nuestras metas a través de la honestidad, disciplina y responsabilidad en el trabajo.

A mis hermanos, cuñadas y sobrinas, por su apoyo solidario en todos los momentos en que necesite respaldo.

Al profesor Guillermo López Corcuera tutor y amigo por lo que he aprendido a su lado, por tus acertadas orientaciones y por lo que hemos compartido.

Al laboratorio de Biotecnología de microorganismos “Sixto David Rojo” y todas las personas que allí laboran.

A Zarac Chacon por su apoyo profesional e incondicional durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigas Mary Maldonado y Crisalida Caballero por todos los buenos ratos compartidos, por su apoyo solidario en todos los momentos en que necesite respaldo, por ser como son.

A mis amigos Leonel Briceño, Marisol Rondon, José Alexis, Ibon y Jesús Pacheco por su apoyo incondicional.

A las profesoras Beatriz Nieves y Cándida Díaz, por su apoyo profesional.

CAPITULO I

www.bdigital.ula.ve

I.1.- INTRODUCCIÓN

C.C.Reconocimiento

La microflora intestinal normalmente entre otras funciones ejerce un efecto protector en el huésped contra la colonización del tracto intestinal por microorganismos extraños. El balance y la composición normal de la microflora intestinal puede ser afectada por enfermedades, uso de antibióticos, situaciones de “stress”, alimentación y otros (15, 37, 40).

La flora microbiana del tracto gastrointestinal está constituida por diversos grupos bacterianos (40), en general se pueden distinguir tres grupos o categorías:

Una flora dominante anaerobia estricta >90% (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*)

Una flora sub-dominante anaerobia facultativa <1% (*E.coli*, *Enterococcus*)

Una flora residual <0,01% (*Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Candida*).

La flora dominante representa de 10^7 a 10^{11} células por gramo de contenido intestinal. Estos microorganismos se encuentran en diferentes lugares del intestino, así, unos están presentes en la luz intestinal y normalmente son expulsados con facilidad, otros se encuentran en el mucus, y finalmente están aquellos que se adhieren al epitelio intestinal y en consecuencia pueden colonizarlo (40).

No se conocen con precisión los diferentes tipos de microorganismos presentes en la microflora intestinal y consisten por lo menos de cuatrocientas especies diferentes, estos desarrollan el ecosistema y mantienen un equilibrio dinámico con cada uno de sus huéspedes, aparte de contribuir con las funciones digestivas del colon humano (15). Como ya se comentó entre los anaerobios y

anaerobios facultativos existen bacterias ácido lácticas, incluyendo los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (21).

Las bacterias ácido lácticas son gram positivas, normalmente inmóviles y no esporuladas, que dan lugar a ácido láctico como principal o único producto de su metabolismo fermentativo. Los miembros de este grupo no tienen porfirinas ni citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y por tanto, obtienen la energía sólo por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias del ácido láctico crecen anaeróticamente. No obstante, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo; por tanto, son anaerobios aerotolerantes. Algunas cepas pueden usar O_2 con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa produciendo H_2O_2 , la mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el H_2O_2 mediante enzimas alternativas (peroxidasas). En la reacción de la flavoproteína oxidasa no se forma ATP, pero el sistema oxidasa puede usarse para la reoxidación del NADH generado durante la fermentación. La mayor parte de las bacterias del ácido láctico obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables; están por tanto restringidas a hábitats ricos en azúcares. Normalmente su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas y otros (18, 21, 30).

Entre estas bacterias ácido lácticas los lactobacilos son un grupo importante. Ellas son típicamente bacilares variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados, normalmente los lactobacilos resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico; pueden crecer

bien a valores de pH alrededor de 4 ó 5. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, en las que normalmente el pH desciende mucho lo que dificulta el crecimiento de otras bacterias del ácido láctico. Por consiguiente, los lactobacilos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido lácticas. Estos microorganismos casi nunca son patógenos (7, 10, 21).

Basándose en sus propiedades fermentativas, a algunas especies se les conoce como homolácticas, y utilizan la vía de Embden–Meyerhoff para la glucólisis, que convierten un mol de glucosa en dos de ácido láctico, y las heterolácticas que a partir de la lactosa y vía del 6-p-gluconato producen un mol de CO₂, un mol de etanol y/o ácido acético y un mol de ácido láctico (10, 18, 21, 33).

Respecto a su ecología y hábitat, los lactobacilos crecen en condiciones anaerobias o en tensión de oxígeno baja en los hábitats, siendo su temperatura más favorable la de un mesófilo. Sin embargo, se conocen cepas como *L. viridicens* y *L. plantarum* que son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración aunque sea muy lento (10, 18).

Existe un grupo de lactobacilos homofermentativos antiguamente conocidos como Estreptobacterias que tienen la facultad de fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético mientras que las hexosas las metabolizan homolácticamente. Por tanto, estos bacilos pueden catalogarse como heterofermentadores facultativos. Es el caso de *L. plantarum*, *L. casei* y otros (18, 25, 36).

Basándose en las propiedades ya descritas los lactobacilos se agrupan en tres grandes grupos por la fermentación de las hexosas y pentosas (18):

Grupo I: fermentan las hexosas pero no las pentosas ni el gluconato.

Grupo II: fermentan las hexosas y luego de un proceso de inducción también las pentosas.

Grupo III: fermentan siempre las hexosas y las pentosas.

Los procedimientos para el aislamiento de lactobacilos deben tener en cuenta su carácter acidófilo, sus complejos requerimientos nutritivos y su preferencia por las condiciones microaerófilas. Uno de los medios habituales para tal fin es el de Man Rogosa y Sharpe (M.R.S.) (11, 39). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que estos medios de cultivo no son totalmente selectivos, ya que pueden soportar el crecimiento de pediococos, enterococos, bifidobacterias e incluso algunas levaduras.

Como ya fue mencionado, a consecuencia de su metabolismo, el pH del medio disminuye, fenómeno que es utilizado para la conservación de los alimentos. El efecto conservador de estas bacterias lácticas no es sólo debido al descenso del pH en el medio sino que al igual que algunas otras bacterias del grupo láctico, los lactobacilos son capaces de producir sustancias inhibitoras distintas de ácidos orgánicos como: peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y sustancias de acción antibiótica, estas sustancias se producen en muy pocas cantidades (3, 6, 21, 24).

Algunas de estas propiedades y otras antes mencionadas hacen a los lactobacilos microorganismos importantes con propiedades potenciales como probióticos. Los probióticos son suplementos alimenticios a base de uno o varios

microorganismos vivos que tienen efectos benéficos sobre el huésped, gracias a un mejor equilibrio de la flora intestinal (17, 33, 40).

Los productos probióticos pueden incluir bacterias congeladas en tabletas o en cápsulas, más recientemente en productos lácteos fermentados tales como yogur, leches fermentadas y leches acidófilas dulces (13, 14, 17, 22).

Se requieren diversas propiedades básicas para una cadena probiótica efectiva de bacterias ácido lácticas, entre las propiedades más importantes está la habilidad de sobrevivir el paso a través de la boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso y la posibilidad de colonizar el intestino (19, 20, 32, 34). Aunque generalmente la adhesión al mucus intestinal es considerada como un factor importante para lograr la colonización del intestino y prerequisite esencial para ejercer una actividad probiótica, también hay quien considera que la unión no es esencial y un rápido crecimiento del microorganismo puede lograr el mismo fin (12). La habilidad de adherirse las bacterias probióticas al mucus intestinal depende no sólo de la especie o cepa de lactobacilo, sino también de la edad del huésped, siendo ésta unión más exitosa en adultos que en infantes (17). En la mayoría de los estudios sobre la adhesión de los probióticos a las células intestinales, no se había considerado cuál era el papel que en ese proceso jugaba la flora residente del huésped, y en general se aceptaba que la misma tenía un importante papel oponiéndose a la colonización del mismo (12). Sin embargo, estudios recientes realizados con cepas de lactobacilos y células inmobilizadas de mucus intestinal parecen indicar que no es cierto que exista esa resistencia a la colonización por la flora indígena (26). A pesar de las diversas opiniones, en general se considera importante, que un probiótico posea la habilidad de adherirse

a las células intestinales y excluya o reduzca la adherencia de patógenos (2, 6, 17, 20, 27, 31).

El tracto gastrointestinal humano, el lugar de la digestión de los alimentos, se compone de estómago, intestino delgado e intestino grueso. El pH de los fluidos del estómago es bajo, aproximadamente pH 2. El estómago puede considerarse, por lo tanto como una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias en el tracto gastrointestinal. El intestino delgado está dividido en dos partes, el duodeno y el íleon. El primero adyacente al estómago, es ligeramente ácido. Desde el duodeno al íleon, el pH se hace progresivamente menos ácido, el promedio del pH del intestino delgado se encuentra entre 4-5. El intestino grueso se considera como un recipiente de fermentación especializado, encontrándose su pH promedio en 7 (21, 30).

Si para controlar las bacterias en el tracto gastrointestinal la barrera primaria es el estómago con su alto contenido de ácido gástrico y con pH de 2, la segunda barrera importante la constituyen las sales biliares. Estas son esteroides producidos en el hígado como ácidos biliares y secretados en el intestino a través de la vesícula biliar. Entre otras funciones su papel es facilitar la emulsión de las grasas de la dieta para que puedan ser digeridas eficazmente. En la bilis encontramos que estas sales aparecen bajo la forma de conjugadas, en las que el ácido cólico se une a aminoácidos como la glicina o la taurina, formando ácido glicocólico o taurocólico, respectivamente, o deconjugadas como es el desoxicolato de sodio (21). Estas sales por sus propiedades detergentes también atacan los microorganismos, afectando la estabilidad de la membrana de los mismos, pudiendo ocasionarles su destrucción.

En los diversos epitelios del organismo humano y desde el momento del nacimiento, se instalan ecosistemas microbianos que contribuyen con el huésped a mantener un estado de normalidad. La ruptura de este equilibrio por diversos factores exógenos predispone a la aparición de enfermedades (28, 37). La microbiota intestinal del recién nacido se establece precozmente proviniendo esta principalmente de la madre ya que el niño al pasar por el canal natural del parto se contamina por contacto con la flora vaginal y anal, siendo los lactobacilos predominantes sobre todo en la vagina (5, 21, 40, 35). En los niños amamantados con leche materna la microbiota suele ser bastante sencilla. A medida que el niño se hace mayor y su dieta se hace más compleja, la composición de la microbiota intestinal se hace también más compleja, para terminar pareciéndose a la del adulto (5).

La microbiota intestinal ejerce una marcada influencia sobre el individuo, llevando a cabo una amplia variedad de reacciones metabólicas. No todos los microorganismos realizan estas reacciones y de ahí que los cambios en la flora intestinal, debidos a la dieta o por enfermedades, puedan afectar al individuo. Instalados en su nicho ecológico tienen acción preponderante en conservar condiciones de permeabilidad de la mucosa gastrointestinal, en definir perfiles nutricionales y principalmente en interferir en la colonización de bacterias patógenas (4, 36).

En relación con las consecuencias de las variaciones de la microflora digestiva, se puede suponer que los probióticos pueden tener dos tipos de indicaciones:

Prevenir el desequilibrio de la microflora digestiva (efecto profiláctico)

Restablecer el equilibrio luego que este es roto (efecto terapéutico)

Estos objetivos se pueden obtener por vía de medicamentos o por la de aditivos alimenticios (27, 32, 40).

Es conocido que diferentes cepas de lactobacilos están involucradas en la producción de muchas leches fermentadas que poseen valor probiótico. También se conoce que el consumo de estos productos con un alto valor de células vivas es una buena forma de restablecer el balance de la flora intestinal (13, 37).

La elección de cepas de lactobacilos probióticas para ser empleadas como cultivos adecuados para la fabricación de leches fermentadas implica escogerlas de acuerdo a los siguientes criterios:

Deben crecer y vivir en la leche dando un producto final de propiedades organolépticas aceptables

- Los lactobacilos vivos presentes en la leche fermentada, deben soportar el paso por todo el sistema digestivo sobreviviendo a la acción de los ácidos gástricos, a las enzimas digestivas y a las sales biliares. Además tener una influencia favorable sobre el intestino

Deben ser resistentes a algunos antibióticos utilizados frecuentemente en los síndromes diarreicos y a microbicidas vaginales incluyendo espermaticidas

Deben poseer la habilidad de adherirse a las células intestinales

Impedir o reducir la adherencia de patógenos

Producir sustancias antagónicas hacia los patógenos

A escala industrial deberían poder ser cultivadas en gran número obteniéndose hasta 10^{10} cel/g de producto.

Deberían ser fácilmente conservables bien como medicamentos o como preparaciones alimenticias (2, 6, 14, 32, 40).

Enmarcado en estas ideas la presente investigación tuvo como objetivo primordial buscar cepas de lactobacilos con algunas características probióticas procedentes de heces de niños lactantes sanos recolectadas en el hospital "Sor Juan Inés" en la ciudad de Mérida del Estado Mérida, de muestras vaginales de diez jóvenes sanas del Estado Mérida, con edades comprendidas entre los catorce y veinticinco años y de equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos de la Planta Piloto Lácteos Santa Rosa (PROGAL) de la Universidad de los Andes.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

www.bdigital.ula.ve

II.1.- JUSTIFICACIÓN

Es conocido el grave problema de las muertes en niños a causa de los diferentes tipos de síndrome diarreicos de origen microbiano, y la intolerancia a la lactosa de algunos seres humanos, debido a esto se hace necesario buscar un coadyudante de origen natural que actué en dichos síndromes con algunos medicamentos para que sea una recuperación más rápida.

Una alternativa para esto, es el consumo de leche fermentada con cepas de *Lactobacillus*, que son microorganismos que entre otras propiedades pueden adherirse al intestino compitiendo con los microorganismos patógenos, regulando la flora intestinal.

www.bdigital.ula.ve

II.2.- HIPÓTESIS

Es conocido que cepas de *Lactobacillus* se encuentran en leche, productos lácteos, vagina humana y también forman parte de la flora intestinal del ser humano sano. Algunas cepas de estos microorganismos son buenas productoras de ácido láctico y de sustancias antimicrobianas, además, pueden poseer otras propiedades que las hacen adecuadas como posibles probióticos. Es de suponer que a partir de aislamientos hechos en productos lácteos, en vagina de mujeres sanas y/o de heces de niños lactantes sanos sea posible encontrar cepas que una vez identificadas y caracterizadas puedan utilizarse como probióticas.

www.bdigital.ula.ve

II.3.- OBJETIVOS

II.3.1.- GENERAL

II.3.1.1.- Obtener cepas de lactobacilos que posean características que las identifiquen como potenciales probióticas.

II.3.2.- ESPECIFICOS

II.3.2.1.- Aislar cepas de lactobacilos en equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos, vagina de jóvenes sanas y heces de niños lactantes sanos.

II.3.2.2.- Caracterizar hasta género las cepas.

II.3.2.3.- Seleccionar las cepas que por fermentación coagulen la leche.

II.3.2.4.- Comprobar la capacidad de crecimiento de las cepas en medios hostiles (alcalinos, ácidos y con sales biliares).

II.3.2.5.- Evaluar el efecto inhibitorio de estas cepas contra algunos microorganismos de prueba.

II.3.2.6.- Determinar la susceptibilidad de las cepas caracterizadas ante algunos de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de los síndromes diarreicos de origen bacteriano.

CAPITULO III

www.bdigital.ula.ve

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- Obtención y procesamiento de la muestra

Las cepas de microorganismos se obtuvieron de: a) muestras vaginales de diez jóvenes sanas del Estado Mérida, con edades comprendidas entre los catorce y veinticinco años , b) de heces de niños lactantes sanos recolectadas en el hospital “Sor Juana Inés” en la ciudad de Mérida del Estado Mérida y c) de implementos utilizados en la elaboración de productos lácteos de la Planta Piloto Lácteos Santa Rosa (PROGAL) de la Universidad de Los Andes. El tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y su procesamiento en el Laboratorio fue de aproximadamente 20 minutos.

Las muestras vaginales se recolectaron con un hisopo estéril que las jóvenes introducían en su vagina. En el caso de las heces de los niños las muestras se recogieron en un recolector de heces estéril. En los equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos, también se utilizó un hisopo estéril que se frotó sobre el equipo. Una vez colectadas las muestras, tanto los hisopos como una pequeña porción de las heces, se introdujeron directamente en tubos con 5 ml de caldo M.R.S., donde se resuspendió la muestra, luego de ello los tubos inoculados se incubaron a 37°C, sin agitación durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones seriadas en agua fisiológica y se sembró 0,1 ml de cada dilución en placas de MRS., que fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.

En los tres casos se escogieron aquellas placas en las que el número total de colonias crecidas se encontraba entre 100 y 150, se tomaron entre 10 y 12 colonias equivalente a la raíz cuadrada del total de ellas, de esta manera se garantizó tomar muestras representativas de la totalidad de los microorganismos presentes (8).

III.2.- Medios de cultivo para los lactobacilos.

Todos los microorganismos aislados en este estudio fueron directamente crecidos en leche estéril o en medio MRS cuya composición por litro es la siguiente: (39)

Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Tween 80	1 g
Citrato de amonio	2 g
Acetato de sodio 3 H ₂ O	5 g
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0,1 g
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0,05 g
Fosfato dipotásico	2 g

El pH del medio se ajusto a 5,4 con ácido acético. En aquellos casos en que se necesitaba preparar el medio en forma sólida se adicionaba 15 g de agar.

III.3.- Medio de conservación

Como método de conservación a corto plazo durante este trabajo, las cepas se guardaron a 12°C en cuñas de agar MRS, con repiques mensuales para mantenerlas activas. Para conservar las cepas a largo plazo se congelaron a -20°C en caldo MRS con 30 % de glicerol.

III.4.- Condiciones de cultivo

Las bacterias ácido lácticas se crecieron a 37°C en medio MRS, sin agitación y en atmósfera rica en CO₂ empleando para ello jarras de anaerobiosis Gas Pack.

III.5.- Selección de las cepas

De las cepas se hicieron observaciones al microscopio, conservándose únicamente aquellas con morfología de bacilos. Posteriormente se realizaron coloraciones de Gram, Ziehl-Neelsen, y Bartolomeo y Mittwer, pruebas que respectivamente permitieron seleccionar aquellos microorganismos que eran gram positivos, alcohol ácido sensibles y carentes de endosporas, características propias de lactobacilos (18, 39).

III.6.- Producción de ácido a partir de glucosa

Para demostrar la producción de ácido a partir de la glucosa se utilizó medio Api modificado, su composición por litro es:

Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Tween 80	1 ml
Fosfato Dipotásico	2 g
Acetato de Sodio 3H ₂ O	5 g
Citrato de Amonio	2 g
Sulfato de Magnesio 7H ₂ O	0,20 g
Sulfato de Manganeso 4H ₂ O	0,05 g
Púrpura de Bromocresol	0,17 g
Glucosa	10 g
pH final:	6,4 – 6,8

La glucosa se esterilizó por filtración. Para el preinóculo las cepas se cultivaron durante 8 h a 37°C en caldo MRS y luego fueron inoculadas con asa de platino en 15 ml del medio descrito. Se incubaron a 37°C, sin agitación durante 12 horas, el cambio de color del medio de púrpura a amarillo, se toma como una reacción positiva.

III.7.- Prueba de catalasa.

Para realizar el ensayo se tomó 2 ml de cultivo fresco, se le añadió 1 ml de Tween 80 al 1 % en un tubo de ensayo con tapa de rosca, se adicionó 0,5 ml de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes y se cerró. La efervescencia indica la presencia de catalasa.

III.8.- Producción de H₂S

Se utilizó el medio triple azúcar hierro para observar la producción de ácido y la producción de H₂S. Su composición es:

Polipeptona	20g
Cloruro de Sodio	5g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Dextrosa	1g
Sulfato de Hierro	0,2g
Sulfato de Amonio	0,2g
Disulfato de Sodio	0,2
Rojo Fenol	0,025g
Agar	13g
Agua Destilada	1000ml
pH 7,3 +/- 0,2	

El volumen de medio utilizado fue el necesario para permitir que una vez vertidos en los tubos se cree un taco y una cuña. La siembra se realizó con asa de platino introduciendo ésta hasta el taco, y luego al salir sembrando en forma de zigzag en la superficie de la cuña. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se observó si en la zona del taco había un precipitado de color negro, tomándose esto como una reacción positiva.

III.9.-Selección de los microorganismos con capacidad de coagulación de la leche.

10ml de leche estéril pH 6,6 fueron inoculados estérilmente con 0,1 ml de cada una de las cepas a ensayar, provenientes de un cultivo de 12 h a 37°C en caldo MRS. Se incubaron a 37 y 42°C, sin agitación durante 10 y 8 horas respectivamente. Pasado el tiempo de incubación se observó la formación o no de un coagulo uniforme, tomándose su presencia como criterio de selección.

III.10.- Crecimiento en medios hostiles.

Las cepas se cultivaron en caldo MRS ensayándose con un pH inicial igual a 3,0, también se hicieron pruebas en caldo MRS con 0,15 % de Bilis de Buey. Se tomó como control el crecimiento de las cepas en caldo MRS con un pH inicial de 7,0. Todos los ensayos se realizaron a 37°C, sin agitación durante 8 horas. Durante ese tiempo se siguió el crecimiento por incremento de turbidez efectuándose lecturas a 550 nm cada hora.

III.11.- Clasificación de los lactobacilos en los tres grandes grupos por la fermentación de las hexosas y pentosas.

Para demostrar la capacidad fermentativa de las cepas se utilizó el medio Api modificado, su composición se indica en el punto III.6.

Los azúcares a ensayar fueron: gluconato, ribosa, arabinosa , xilosa, fructosa, maltosa, sacarosa y lactosa, éstos se esterilizaron por filtración y se añadieron a una concentración final de 1%. Para el preinóculo las cepas se cultivaron durante 8 h a 37°C en caldo MRS y luego fueron inoculadas con asa de platino en 15 ml del medio descrito. Se incubaron a 37°C, sin agitación durante cinco días con observación diaria, el cambio de color del medio de púrpura a amarillo, se toma como una reacción positiva.

III.12.- **Actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas sobre microorganismos de prueba.**

Algunos de los microorganismos utilizados en este estudio provienen de la colección de cepas de nuestro Laboratorio y los mismos fueron:

Bacillus subtilis ATCC 60519

Candida albicans ATCC 14053

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

En el ensayo también se emplearon cepas enteropatógenas aisladas de muestras de heces de niños afectados con diarrea, amablemente cedidas por el Cepario de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios coordinado por la Prof. Luisa Vizcaya de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. Las cepas empleadas fueron:

Shigella sonnei

Escherichia coli poli I

Salmonella typhi

En esta prueba cada una de las cepas ácido lácticas seleccionadas fue crecida en medio líquido MRS. a 37°C y un pH inicial de 6,6 sin agitación durante 8 horas. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos se centrifugaron a 13000 g durante 15 minutos, el sobrenadante se esterilizó filtrando a través de un filtro marca Millipore con un poro de 0,45 µm y un diámetro de 25 mm.

El filtrado estéril se agregó en una proporción de 10 y 50% v/v a un medio de caldo nutritivo fresco estéril, a este se le agregó un preinóculo de 1% de cada uno de los microorganismos arriba indicados. Se incubó por 8 horas a 37 °C sin agitación leyéndose cada hora la D.O a 550 nm.

También a los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las bacterias ácido lácticas se les determinó la acidez titulable (1). Normalmente el punto final

se determina por el cambio de color de la fenolftaleína empleada como indicador, sin embargo, en nuestro caso debido a que la coloración normal del medio impedía visualizar la coloración rosada propia del punto final, se decidió titular hasta alcanzar un pH final de 8,4 valor en el que vira el indicador empleado. Una vez conocida la concentración de ácido láctico presente en los sobrenadantes, los microorganismos arriba indicados fueron cultivados durante 8 h a 37°C, en caldo nutritivo que contenía ácido láctico en concentraciones equivalentes a las presentes en 10 y 50% de los sobrenadantes de cultivo de las bacterias ácido lácticas. Luego de la incubación se midió la absorbancia del cultivo a 550 nm y se comparó con el control crecido en ausencia de ácido láctico.

III.13.- Prueba de susceptibilidad de las cepas a los antibióticos.

Se empleó Ampicilina y Trimetoprim- Sulfametoxazol.

Se utilizó el método de difusión en discos como recomienda el National Committee for Clinical Laboratory Standards (23), para ello se empleó el Agar de Mueller Hinton (23, 39). La composición del agar Mueller Hinton es:

Extracto de carne	300,00 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,50 g
Almidón	1,50 g
Agar	17,00
H ₂ O (csp)	1 L
El pH final fue de 7,3	

Cada una de las cepas seleccionadas se creció en caldo MRS, sin agitación a 37°C durante 8 horas. Pasado el tiempo de incubación 0,5 ml de cultivo de cada una de las cepas a ensayar se sembraron en superficie con un hisopo estéril en placas con agar Mueller Hinton, las placas fueron colocadas a 37 °C durante 30 minutos para que secan. Las concentraciones que se probaron de los antibióticos fueron: 10 µg para la Ampicilina y una mezcla de 23,75 µg de Sulfametoxazol y 1,25 µg de Trimetropin. Los antibióticos estaban en discos de 6

mm de diámetro (BBL), estos discos se ubicaron con una pinza estéril sobre las placas inoculadas. Las placas fueron incubadas en atmosfera de CO₂ en campanas GasPak a 37°C durante 1 día, midiéndose luego en caso de existir, el diámetro de la zona de inhibición.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

www.bdigital.ula.ve

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1.- Aislamiento e identificación preliminar.

En los estudios realizados se aislaron 360 colonias, encontrándose entre ellas cocos y bacilos. Luego de observar al microscopio las muestras en fresco se hizo una preselección, descartándose 80 colonias que morfológicamente correspondían a cocos, y conservándose 280 con las características morfológicas de bacilos.

La primera etapa en la identificación de las cepas fue realizar una coloración de Gram, luego de este proceso se descartaron las cepas gram negativas y se retuvieron 96 gram positivas característica de lactobacilos. Con estas cepas y a fin de procurar identificar a que género pertenecían los microorganismos aislados, se realizaron las pruebas indicadas en la metodología. Se encontró que todas las cepas presentaron las características propias del género *Lactobacillus*, es decir: endospora y tinción ácido resistente negativas, producción positiva de ácido a partir de glucosa y catalasa y producción de sulfuro de hidrógeno negativos (10,18).

Como el objetivo del aislamiento y selección de las cepas de lactobacilos era producir una leche fermentada que podría utilizarse en el tratamiento de las diarreas infantiles, de las 96 cepas ensayadas sólo 25 pudieron coagular la leche. El tiempo de coagulación fue de 8 horas a 42°C y 10 horas a 37°C, las cepas que no coagularon la leche fueron descartadas. Aquellas que se

conservaron fueron numeradas para los posteriores estudios desde la Bio 1 a la Bio 25. Es importante señalar que las cepas Bio 1 hasta Bio 12 fueron aisladas de heces de infante lactante, Bio 15, 16 y 21 a partir de utensilios lácteos y las 10 restantes a partir de vaginas de mujeres sanas (Tabla 1, anexos).

Para continuar caracterizando taxonómicamente las cepas aisladas se realizaron ensayos de fermentación de pentosas y hexosas que permitieron suponer que entre las cepas aisladas en este trabajo habían representantes de los tres grandes Grupos en los que se encuentran clasificados los lactobacilos (10, 18). De todas las cepas ensayadas, sólo la cepa 3 no logró fermentar el gluconato ni las pentosas, por ello la ubicamos en el Grupo I. Hubo otras cepas que fermentaban el gluconato y las pentosas rápidamente (12 horas de incubación), por ello estas cepas se consideraron pertenecientes al Grupo III y el resto de las cepas ensayadas fermentaban el gluconato luego de 12 horas de incubación, mientras que las pentosas en general fueron fermentadas luego de 2 días de incubación, siendo necesario en algunos casos hasta 5 días para lograr fermentar la xilosa e incluso la ribosa, azúcar éste que en general fue rápidamente utilizado por la mayoría de las cepas. Suponemos que este último grupo de cepas requiere de un periodo de incubación suficiente para la inducción y síntesis de una fosfocetolasa indispensable para la fermentación de las pentosas (10, 18), por estas características este conjunto de cepas lo ubicamos en el Grupo II. En la Tabla 2 (anexos) se presentan las cepas en estudio agrupadas de acuerdo a los resultados obtenidos.

También se probaron las hexosas fructosa y manosa y los disacáridos sacarosa, lactosa y maltosa, todas las cepas ensayadas fermentaron rápidamente todos esos azúcares.

Entre las bacterias lácticas, los lactobacilos son el grupo más ubicuo que colonizan hábitats ricos en azúcares fermentables. Como son buenos productores de ácido y a veces de sustancias antibacterianas, logran dominar numéricamente y limitan o impiden el crecimiento de otros microorganismos a veces peligrosos (10, 35).

Es extraño haber aislado tan solo un representante del Grupo I (cepa BIO 3) ya que es un grupo vasto de lactobacilos que abunda no sólo en la leche y sus derivados lácteos, sino también en el tracto digestivo y los órganos genitales del humano donde mantienen un justo equilibrio con el resto de la flora, y son una garantía de buen funcionamiento del organismo (10, 35). El resto de las cepas y que por sus características fermentativas suponemos pertenecientes a los otros dos grupos tienen hábitats variables, así especies pertenecientes al Grupo II y III pueden estar en vegetales y carnes fermentadas y también en productos lácteos e incluso en las vías digestivas y urogenitales (10).

Las especies pertenecientes a cada grupo se encuentran en la bibliografía citada anteriormente (10, 18)

IV.2.- Caracterización de las cepas como probióticos

IV.2.1.- Crecimiento de los microorganismos en estudio en diferentes medios hostiles.

Las sales biliares y la acidez gástrica son barreras a superar por los microorganismos que puedan actuar como probióticos. De aquí parte nuestro interés en realizar el crecimiento de nuestras cepas en diferentes medios hostiles como se explicó anteriormente en la metodología. Cuando las cepas se crecieron a pH 3, todas ellas presentaron inhibición en su tasa de crecimiento con valores entre 38 y 48%, con un promedio general de casi 43% con respecto al control (Tabla 3, anexos). En las experiencias con concentración de bilis deshidratada de buey de 0,15%, también se obtuvieron inhibiciones en la tasa de crecimiento, aunque en este caso el efecto fue un poco mayor con un rango entre 48 y 60% y un promedio general de 53% (Tabla 4, anexos). En general, la respuesta de todas las cepas a esas condiciones hostiles fue similar, sin embargo, de realizar una selección escogeríamos como mejores las cepas Bio8, Bio21 Bio4 y 9 y Bio1 y 7, ya que fueron las que presentaron mayor resistencia a las condiciones descritas. Es conocido que en el estómago es posible encontrar cantidades importantes de *Lactobacillus* sp. (36, 40), por eso no nos sorprendió que nuestras cepas pudieran crecer a pH 3, aunque con lentitud, lo cual no deja de ser interesante ya que existen reportes

que indican que cepas de *Lactobacillus acidophilus* M92 sólo pueden sobrevivir durante 3 horas a ese pH, produciéndose al cabo de ese tiempo la lisis de alrededor del 60% de la población inicial (37). Nuestros resultados son prometedores ya que nuestras cepas no son muy afectadas por esas condiciones adversas ya indicadas y que son propias del tracto gastrointestinal. Con respecto a las sales biliares es conocido que algunas cepas de *Lactobacillus* no crecen en presencia de sales conjugadas de la bilis, pero si en presencia de las deconjugadas, probablemente por la ausencia de las enzimas que hidrolizan las sales conjugadas. Sin embargo, aunque muchas cepas no crecen en presencia de las sales conjugadas, un porcentaje importante de la población inicial logra sobrevivir (37). En nuestras cepas pareciera que la situación es diferente, ya que la bilis deshidratada empleada posee una mezcla de ambos tipos de sales, y a pesar de la presencia de sales conjugadas, nuestras cepas, aunque un poco lento, lograron crecer.

En relación con este punto las opiniones son contradictorias. Hay autores que opinan que la presencia de actividad hidrolítica para las sales biliares no es deseable en una bacteria probiótica ya que podría disminuirse la concentración de las sales conjugadas a niveles por debajo de los necesarios para la óptima digestión y absorción de los lípidos, además las formas deconjugadas pueden sufrir una modificación posterior y se suponen participan en procesos responsables en el desarrollo de cáncer de colon (9, 37). Sin embargo, otros trabajos reportan que haciendo ensayos in-vitro empleando cepas de *Lactobacillus reuteri* con actividad hidrolítica para las sales biliares no se detectaron efectos perjudiciales, atribuyéndose esta propiedad probablemente a

que las sales deconjugadas se adsorben sobre la superficie celular del lactobacilo, disminuyendo así su biodisponibilidad (9).

También hay autores que consideran que *Enterococcus faecium* CRL 183 y *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, tienen características deseables de microorganismos probióticos, ya que poseen actividad hidrolítica sobre las sales biliares, ejerciendo su efecto inhibitorio por las sales deconjugadas por ellas producidas (9), además encontraron que ambas cepas podían inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, este efecto se detectó sólo cuando las bacterias ácido lácticas eran crecidas en presencia de ácido glicocólico o taurocólico, ácidos sobre los que ejercieron actividad hidrolítica.

Con estos resultados podemos decir que nuestras cepas crecen en un pH medianamente ácido y en presencia de sales biliares, propiedades que las hacen adecuadas para ser empleadas en la elaboración de una leche fermentada con propiedades probióticas.

IV.2.2.- Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas sobre microorganismos de prueba.

Como se explicó en la metodología, en los estudios realizados se creció cada una de las cepas de los microorganismos de prueba en medios y condiciones adecuadas para cada uno de ellos. En ausencia de sobrenadante

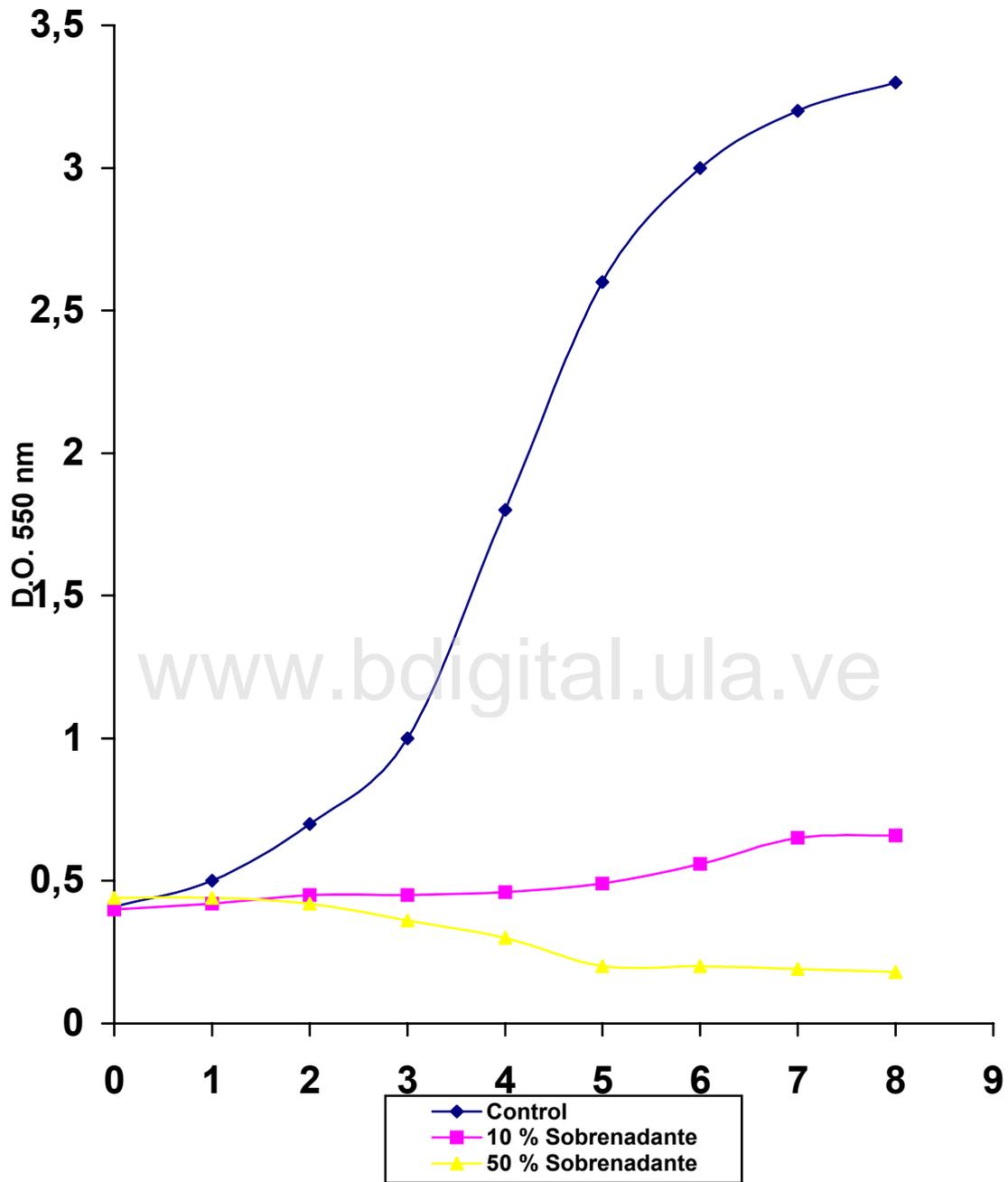
proveniente del cultivo de los lactobacilos, en todos los casos se observó una curva de crecimiento con fases de latencia, exponencial y estacionaria.

Cuando a los medios de crecimiento de las cepas de prueba se les agregó sobrenadante de los cultivos de las cepas de lactobacilos a concentraciones de 10 y 50% v/v., independientemente del microorganismo de prueba empleado, se observó poco o nada de crecimiento para ambas concentraciones ensayadas. Como un ejemplo representativo de esta situación se presenta el caso de *E. coli* ATCC 25922 (Figura 1). Cuando se utilizó 50% de sobrenadante se observó que había una disminución de la densidad óptica inicial luego de tres horas de incubación, lo que pareciera indicar que se estaba produciendo la lisis de los microorganismos de prueba. De esta experiencia suponemos, que en esta proporción de sobrenadante (50%), el agente responsable de la muerte celular está actuando como un agente bacteriolítico. Los agentes bacteriolíticos pueden incluir antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, así como agentes que dañan la membrana citoplasmática (21). Como el agente causante de esta supuesta lisis se encontraba desde el comienzo en el medio de ensayo, es difícil establecer que tipo de acción esta ejerciendo. Para confirmar si se trata realmente de un agente bacteriolítico, se debería implementar una experiencia en que el sobrenadante se añadiera una vez que los microorganismos de prueba hubieran alcanzado la fase exponencial (21).

Durante el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y como consecuencia del metabolismo de la lactosa los lactobacilos producen

cantidades importantes de ácido láctico, este ácido orgánico de por si es un inhibidor de muchos microorganismos (29), para determinar si el efecto inhibitorio ocasionado por la adición del sobrenadante se debía a algún metabolito diferente al ácido láctico, se procedió a realizar ensayos en presencia de este ácido. Luego de determinar en el sobrenadante de 8 horas de cultivo la acidez titulable para cada una de las 25 cepas seleccionadas, se encontró que la misma variaba entre 4,55 y 5,13 g de ácido láctico/L. Decidimos realizar los ensayos a la mayor concentración, lo que implicaba para 10% de sobrenadante una concentración de ácido láctico de 0,05% y para 50% de 0,25%. Tanto para 0,05% como para 0,25% de ácido láctico, se observó inhibición del crecimiento de los organismos de prueba, en relación al control crecidos en ausencia de ácido láctico, así, *C.albicans* presentó inhibición entre 6 y 14%, *S. aureus* entre 20 y 43%, *S. sonnei* entre 28 y 31% y *S. typhi* entre 28 y 51% respectivamente. *E. coli* pol I no fue afectada en absoluto por la adición de ácido láctico. Comparando estos resultados con los obtenidos con la adición de sobrenadante, en los que se observo efecto lítico podemos suponer que la inhibición registrada en presencia de este, no sólo se debe al ácido láctico sino a algún otro metabolito. La naturaleza de este otro compuesto es en estos momentos motivo de estudio en nuestro Laboratorio.

Figura 1. Crecimiento de *E.coli* ATCC 25922 en presencia de sobrenadante del cultivo de las cepas de lactobacilos seleccionadas (BIO 1 al BIO 25).



Control: Microorganismo crecido en ausencia de sobrenadante.
10 %: Microorganismo crecido con 10% de sobrenadante.
50 %: Microorganismo crecido con 50% de sobrenadante.

IV.2.3.- Susceptibilidad de las cepas de lactobacilos (Bio) a Trimetoprim-Sulfametoxazol y Ampicilina.

Con frecuencia las personas afectadas por diarreas de origen microbiano son tratadas con antibióticos, que no sólo pueden afectar a los patógenos, sino también a microorganismos normales del huésped que son beneficiosos para su salud. Entre estos últimos podrían estar los probióticos, es por ello que otra propiedad deseable hasta cierto punto es que estos sean resistentes a antibióticos. Por esta causa se probó la sensibilidad de nuestras cepas frente a dos antibióticos normalmente usados en casos de diarreas, ellos fueron: Trimetoprim-Sulfametoxazol y Ampicilina. Casi todas las cepas (80%) fueron resistentes al primero de ellos, a excepción de Bio 3, 4, 14, 19, 20 y 25 (20%), que fueron susceptibles (Tabla 5, anexos). Para el caso de la Ampicilina, todas las cepas fueron susceptibles, con halos de inhibición entre 12 y 30 mm de diámetro (Tabla 5, anexos). Resultados preliminares realizados con concentraciones de Ampicilina de 0,5 y 2,5 μg revelaron que todas nuestras cepas fueron resistentes a 0,5 μg y varias a 2,5 μg .

Resultados similares han sido reportados por otros autores (37), quienes trabajando con la cepa M92 de *Lactobacillus acidophilus* encontraron resistencia hacia Trimetoprim-Sulfametoxazol, incluso con concentraciones para ambos tan altas como 25 μg , sin embargo, para el caso de la Ampicilina su cepa fue sensible a concentraciones tan pequeñas como 0,5 μg . Es conocido

que la resistencia de algunos microorganismos hacia determinados antibióticos se debe a la presencia de plásmidos que codifican para determinadas enzimas. El efecto inhibitorio del Trimetoprim-Sulfametoxazol se debe a un efecto combinado sobre la síntesis de ácido fólico de una Sulfonamida y el Trimetoprim, que trae como consecuencia la inhibición por la primera de la incorporación de p-amino benzoato en el dihidrofolato y el segundo inhibiendo la dihidrofolato reductasa, impidiendo la reducción del dihidrofolato (16). La resistencia en nuestras cepas podría explicarse por la presencia de una dihidrofolato-reductasa posiblemente codificada en plásmidos que sería menos sensible a estos compuestos que la enzima normal.

Estos resultados parciales sugieren que nuestras bacterias podrían proteger el balance natural de la microflora intestinal durante el uso de algunos antibióticos empleados en las terapias antidiarreicas. Este tipo de bacterias resistentes a antibióticos también podría ser empleado en leches para la elaboración de productos lácteos, que algunas veces contienen residuos de antibióticos que pueden producir la muerte de las cepas iniciadoras de la fermentación. Por otro lado es importante considerar que las bacterias ácido lácticas que se utilicen como probióticos y sean resistentes a antibióticos, podrían transferir plásmidos de resistencia a bacterias patógenas presentes en el intestino, situación esta que podría ser perjudicial para el huésped, de hecho ya existen reportes que consideran que la resistencia a antibióticos no es una propiedad deseable en probióticos (32).

CAPITULO V

www.bdigital.ula.ve

V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten formular las siguientes conclusiones y recomendaciones.

V.1.- Se lograron aislar y mantener 25 cepas de *Lactobacillus* sp de equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos, vagina de jóvenes sanas y heces de niños lactantes sanos. Estas cepas presentaron algunas características probióticas, tales como resistencia a pH ácido y a sales biliares, además, poseen acción antimicrobiana contra algunos microorganismos de prueba (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*), algunos de ellos asociados con los síndromes diarreicos de origen microbiano.

V.2.- El 80% de las cepas aisladas presentaron resistencia sobre la concentración ensayada de Trimetropim-Sulafametoxazol, compuesto usado frecuentemente en los síndromes diarreicos, siendo esta una característica muy importante ya que luego de una terapia con antibióticos, en el intestino quedan restos de estas sustancias las cuales podrían causar la muerte de nuestros microorganismos de interés.

V.3.- La mayoría de las cepas identificadas como *Lactobacillus* sp se ubicaron en los Grupos II y III.

V.4.- Las cepas sólo fueron identificadas hasta género, y agrupados en tres grupos. No se logró llegar hasta especie ya que no se contaba con los materiales necesarios para su identificación, por lo cual se recomienda utilizar técnicas taxonómicas más finas para su identificación lo que sería necesario identificarlas hasta especie..

V.5.- Es necesario realizar una caracterización más amplia a fin de detectar otras propiedades importantes para microorganismos que vayan a actuar como probióticos. Entre ellas podemos indicar: resistencia a fenoles, resistencia a lisozima, ensayos con otros antibióticos, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), capacidad de reproducirse en fermentadores en grandes concentraciones celulares.

V.6.- Utilizar las cepas aisladas en la elaboración de una leche fermentada con propiedades probióticas, que pueda ser probada en animales de laboratorio y su posterior uso en humanos.

V.7.- Identificar la sustancia que puede estar produciendo el efecto inhibitorio sobre los microorganismos de prueba.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO VI

VI.-BIBLIOGRAFÍA

- 1) Amariglio S. (1986). **Determination de l'acidite titrable en: Controle de la qualité des produits laitiers. Analyses physiques et chimiques.** Afnor-Itsv, Francia.
- 2) Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., von Wriqth, A. (1999). **Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG* after oral consumption.** Appl. Environ. Microbiol. 65: 351-354.
- 3) Bernet-Camard, M.F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., Hudault, S. (1997). **The human *Lactobacillus acidophilus* LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance (s) active in vitro and in vivo.** Appl. Environ. Microbiol. 63: 2747-2753.
- 4) Bracho, M., Barboza Y., Faría J., Ruiz J., Márquez E. (1999). **Antimicrobianos en leche materna y su efecto en la flora intestinal aeróbica del recién nacido.** CIENCIA 7: 7-16.
- 5) Bourlioux, P. (1994). **Ecologie microbienne du tractus digestif human: en *Bactéries Lactiques*.** Vol II, Ed. H. de Roissart. Y Luquet F. M., Loriga.

- 6) Coconier, M.H., Lievin, V., Hemery, E., Servin, A.L. (1998). ***Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB.*** Appl. Environ. Microbiol. 64: 4573-4580.
- 7) Chacón, R., Z., López, C. G.(2000). **Evaluación de cepas de Lactococcus como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos de pasta prensada.** Revista Científica, X: 423-428.
- 8) Chamba, J. F., Duong C., Fazel A., Prost F., (1994). **Sélection Des Souches De Bactéries Lactiques.** en **Bactéries Lactiques.** Vol I, Ed. H. de Roissart. Y Luquet F. M., Loriga.
- 9) De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., Verstraete, W. (2000). **Protective effect of the bile salt hydrolase- active Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 709-714.
- 10) Dellaglio, F., H. de Roissart., Torriani, S., Curk, M. C., Janssens, D., (1994). **Caractéristiques Générales Des Bactéries Lactiques** en **Bactéries Lactiques.** Vol I, Ed. H. de Roissart. Y Luquet F. M., Loriga.
- 11) DIFCO., (1978). **Manual de bacteriología.** Gráficas MIRASA, S.L. Valdemoro. Madrid.

- 12) Fuller, R. (1997). Introduction. En: ***Probiotics 2, Applications and practical aspects*** (Fuller, R., Ed.). Chapman and Hall, London.
- 13) Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K.D., Wouters, R. (2000). ***Influence of a synbiotic mixture consisting of Lactobacillus acidophilus 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem*** (SHIME reactor). Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 219-223.
- 14) Godward, G., Sultana, K., Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R., Reynolds, N. (2000). **The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods.** Milchwissenschaft 55: 441-445.
- 15) Holdeman, L.C., Good, I.J., Moore, W.E.C: (1976). **Human faecal flora variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress.** Appl. Environ. Microbiol. 31: 359-375.
- 16) <http://teach.microbiol.unimelb.edu.au/micro/inter/Lab/sectionA/topic1/db/class9.html>
- 17) Kailasapathy, K., Rybka, S. (1997). ***L. acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. –their therapeutic potential and survival in yogurt.** Aust. J. Dairy Tech.52: 28-35.

- 18) Kandler, O., Weiss N. (1986). **Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. en Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology.** 7th. Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 19) Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. (2000). **In vitro studies on probiotic properties of lactococci.** Milchwissenschaft. 55: 245-249.
- 20) Kirjavainen, P., Ouwehand, A., Isolauri, E., Salminen, S. (1998). **The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus.** FEMS Microbiology Letters. 167 185-189.
- 21) Madigan, M., Martinko J., Parker J. (1988). **Brock Biología de los Microorganismos.** PRENTICE HALL IBERIA. Madrid.
- 22) Micanel, N., Haynes, I.N., Playne, M.J. (1997). **Viability of probiotic cultures in commercial australian yogurts.** Aust. J. Dairy Tech.52: 24-27.
- 23) NCCLS. (1999). **Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility testing; Ninth Informational Supplement.** NCCLS document M 100-S9. NCCLS, 940 West valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 U.S.A.

- 24) Ocaña, V.S., Pesce de Ruíz Holgado, A.A., Nader-Macías, M.E. (1999). ***Selection of vaginal H₂O₂-generating Lactobacillus species for probiotic use.*** Current. Microbiol. 38: 279-284.
- 25) Olano, A. (1990). ***Aspectos nutricionales y terapéuticos del yogur.*** Alimentación equipos y tecnología. Nº 3. Editorial Alicón, S.A. España.
- 26) Ouwehand, A.C., Niemi, P., Salminen, S.J. (1999). ***The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro.*** FEMS Microbiol Lett. 177: 35-38.
- 27) Pascual, M., Hugos, M., Badiola, J.J., Monfort, J.M., Garriga, M. (1999). ***Lactobacillus salivarius CTC 2197 prevents Salmonella enteritidis colonization in chickens.*** Appl. Environ. Microbiol. 65: 4981-4986.
- 28) Perdigón, G., Agüero, G., Alvarez, S., Gaudio de Allori, C., Pesce de Ruíz Holgado, A.A. (1995). ***Effect of viable Lactobacillus casei feeding on the immunity of the mucosae and intestinal microflora in mal-nourished mice.*** Milchwissenschaft. 50: 251-256.
- 29) Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1991). ***Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products.*** Lait. 71: 525-541.

- 30) Prescott, L., Harley J., Klein D. (1999). **Microbiología**. 4^{ta}. Ed. McGRAW-HILL. Interamericana de España, S. A. U.
- 31) Reid, G. (1999). **The scientific basis for probiotics strains of Lactobacillus**. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3763-3766.
- 32) Relalais, G. .P., (1996). **Recent advances in the prevention and tratament of diarrheal diseases**. Current opinions in Infectious Diseases. 9: 210-213.
- 33) Salminen, S., Wright A. (1993). **Lactic Acid Bacteria**. MARCEL DEKKER, INC. New York.
- 34) Sarem, L., Sarem, F., Marchal, L., Nicolas, J. (1995). **In vitro colonization ability of human colon mucosa by exogenous Lactobacillus strains**. FEMS Microbiol. Lett. 13. 133-137.
- 35) Sold, J. D., (1996). **Vaginitis and vaginal flora: controversies abound. .** Current opinions in Infectious Diseases. 9: 42-47.
- 36) Suarez, E., Alvarez R., (1991). **Yogur y leches fermentadas. Aspectos generales**. ALIMENTACIÓN equipos y tecnología. Nº 9. Editorial Alicón, S.A. España.

- 37) Suskovic, J., Brkic B., Maticic S., Maric V. (1997). ***Lactobacillus acidophilus M92 as potential probiotic strain.*** Milchwissenschaft 52: 430-435.
- 38) Taranto, M. P., Gonzalez de Llano, D., Font De Valdez, G. (2000). ***Inhibition of Listeria monocytogenes by acid bacteria with bile salt hydrolase activity.*** Milchwissenschaft. 55. 22-24.
- 39) The HiMedia ***Manual For Microbiology Laboratory Practice*** (1998).
- 40) Tournut, J. (1994). ***Perspectives de Développement des Probiotiques Á Base De Bactéries Lactiques.*** en: ***Bactéries Lactiques.*** Vol II, Ed. H. de Roissart. Y Luquet F. M., Loriga.

CAPITULO VII

Tabla 1. Origen de las cepas (BIO) aisladas en este trabajo

Origen	Cepas (BIO).
Vagina humana	13,14,17,18,19,20,22,23,24,25.
Heces humanas	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12.
Utensilios lácteos	15,16,21.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Clasificación de las cepas Bio en los diferentes grupos de lactobacilos.

GRUPO	Lactobacilos (Bio)
-------	----------------------

I	3.
II	2-5-9-11-13-14-20-21-22-24
III	1-4-6-7-8-10-12-15-16-17-18-19-23-25

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Efecto del pH 3 sobre el crecimiento de las cepas (BIO) aisladas.

Cepa	Control	pH 3	% de inhibición
Bio 1	93	130	40
Bio 2	106	155	46

Bio 3	120	178	48
Bio 4	84	116	38
Bio 5	112	164	46
Bio 6	110	158	44
Bio 7	95	133	40
Bio 8	87	118	36
Bio 9	94	131	39
Bio 10	93	131	41
Bio 11	96	136	42
Bio 12	90	126	40
Bio 13	105	151	44
Bio 14	94	132	40
Bio 15	115	169	47
Bio 16	102	148	45
Bio 17	108	153	42
Bio 18	97	138	42
Bio 19	105	151	44
Bio 20	97	137	41
Bio 21	93	128	38
Bio 22	113	167	48
Bio 23	102	147	44
Bio 24	107	156	46
Bio 25	99	140	41

Control: tiempo de generación (min) de las cepas crecidas a pH 7

pH 3: tiempo de generación (min) de las cepas crecidas a pH 3

% de inhibición: porcentaje de inhibición del crecimiento observado a pH 3

Tabla 4.. Efecto de 0,15% de bilis de buey sobre el crecimiento de las cepas (BIO) aisladas.

Cepa	Control	0,15% Bilis	% de inhibición
Bio 1	93	141	52
Bio 2	106	165	56
Bio 3	120	192	60

Bio 4	84	128	52
Bio 5	112	177	58
Bio 6	110	165	50
Bio 7	95	144	52
Bio 8	87	129	48
Bio 9	94	141	50
Bio 10	93	143	54
Bio 11	96	149	55
Bio 12	90	137	52
Bio 13	105	164	56
Bio 14	94	143	52
Bio 15	115	184	60
Bio 16	102	153	50
Bio 17	108	164	52
Bio 18	97	147	52
Bio 19	105	164	56
Bio 20	97	145	50
Bio 21	93	136	50
Bio 22	113	174	54
Bio 23	102	157	54
Bio 24	107	169	58
Bio 25	99	149	50

Control: tiempo de generación (min) de las cepas crecidas a pH 7

0,15% de bilis: tiempo de generación (min) de las cepas crecidas en presencia de 0,15 de bilis de buey

% de inhibición: porcentaje de inhibición del crecimiento observado con 0,15% de bilis de buey

Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobianas de las cepas (BIO) aisladas ante Ampicilina (10) μg y Trimetropim-Sulfametoxazol (1,25 y 23,75 μg).

Halos de inhibición (mm)		
CEPA	Ampicilina 10 μg	Trimetropim-Sulfametoxazol 1,25-23,75 μg
BIO 1	20	R
BIO 2	25	R

BIO 3	30	10
BIO 4	30	12
BIO 5	30	R
BIO 6	30	R
BIO 7	15	R
BIO 8	20	R
BIO 9	14	R
BIO 10	16	R
BIO 11	22	R
BIO 12	25	R
BIO 13	25	R
BIO 14	28	12
BIO 15	16	R
BIO 16	18	R
BIO 17	25	R
BIO 18	30	R
BIO 19	30	25
BIO 20	25	16
BIO 21	14	R
BIO 22	15	R
BIO 23	14	R
BIO 24	12	R
BIO 25	12	R

R: resistentes”

www.bdigital.ula.ve