

QR B2
L3A5

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA MENCIÓN ALIMENTOS
MÉRIDA-VENEZUELA

**LACTOBACILOS CON POTENCIAL TECNOLÓGICO Y
PROBIÓTICO AISLADOS DE PASTIZAL DE UNA FINCA
LECHERA**

Elaborado por: *Lic. Carmen C. Alvarado R.*

Tutora: *Farm. Cándida Díaz*

SERBIULA
Tullio Febres Cordero

Trabajo de grado para optar por el título de Magister Scientiae en Microbiología mención

Alimentos

RESUMEN

Considerando los beneficios probados de diversas especies de lactobacilos, se planteo su detección a partir de pasto utilizado para alimentar el ganado lechero y probar sus potencialidades tecnológicas y probióticas. Se aislaron e identificaron lactobacilos con pruebas convencionales a partir de dos muestras de pasto de pastizal de una finca lechera ubicada en la zona alta de la ciudad de Mérida (Venezuela). Se detectaron 4 especies de lactobacilos distribuidos en 10 cepas: *Lactobacillus plantarum* (cepas 1, 4, 20, 37, 50 y 58), *L. paracasei ssp paracasei* (cepas 23 y 90), *L. brevis* (cepa 11) y *L. pentosus* (cepa 67). El potencial tecnológico se estudió mediante la producción de ácido láctico en Caldo MRS y leche descremada y el potencial probiótico fue evaluado con ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos (Amoxicilina/Ácido clavulánico 2:1, 30 µg; Eritromicina, 15 µg; Ciprofloxacina, 5 µg; Amikacina, 30 µg y Gentamicina, 10 µg), resistencia a pH 3, resistencia a 0,3% de bilis bovina y efecto antagónico sobre 2 cepas de *Salmonella enteritidis*, 1 *Salmonella typhi* y 1 *Listeria monocytogenes*. La acidez producida por las cepas en leche descremada estuvo en el rango 0,12-0,52%, exhibiendo el porcentaje mas bajo la cepa 90, en Caldo MRS el ácido producido por las cepas fue de 0,58 a 1,38%; correspondiendo el valor inferior a la cepa 58. Los aislados mostraron resistencia a Ciprofloxacina, Amikacina, y Gentamicina y a 0,3% de bilis bovina; pero los porcentajes de viabilidad de las cepas al pH ensayado fue variable (0,04 -100 %) siendo las más afectadas las cepas *L. plantarum* 58. y *L. brevis*. Las cepas *L. plantarum* 50, *L. paracasei ssp paracasei* 90 y *L. brevis* no mostraron antagonismo con los patógenos ensayados, el resto de las cepas exhibieron antagonismo contra *S. typhi* y/o *L. monocytogenes* por ácidos orgánicos (*L. plantarum* 1, 4, 20 y 37, *L. paracasei ssp paracasei* 23 y *L. pentosus*) y por compuestos inhibitorios de naturaleza proteica parecidos a bacteriocinas (*L. plantarum* 37 y 58). Se concluye que la cepa *L. plantarum* 20 posee potencial tecnológico y probiótico que debe seguir investigándose.

Palabras claves: Lactobacilos, pastizal, potencial tecnológico y probiótico

www.bdigital.ula.ve
A mis hijas

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios, porque sin su voluntad no podría hacer cosa alguna

A mi familia, es el apoyo más valioso que tiene el ser humano

A mi profesora Cándida Díaz por su apoyo académico, gran paciencia, amor y dedicación para enseñarnos

A los profesores Guillermo López Corcuera y Félix Andueza por su paciencia, buena disposición y acertadas sugerencias

A Sulay y Rosalba por su amistad y apoyo

www.bdigital.ula.ve

Mencionar a todas las demás personas que aportaron un granito de arena en la realización de esta tesis ocuparía mucho espacio, así que, este espacio es de ellas

Al CDCHT de la Universidad de los Andes por el financiamiento aportado a este trabajo de grado bajo el código FA-385-06-03-EM

Al FONACIT por el financiamiento para el fortalecimiento del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes bajo el código F-2000001633

INDICE

Resumen	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice general	iv
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	1
OBJETIVOS.	2
MARCO TEORICO	
El género <i>Lactobacillus</i>	3
Clasificación	3
Hábitat	4
Aislamiento e identificación	5
Importancia en la industria alimentaria	6
Importancia como probióticos	8
Intolerancia a la lactosa	10
Desordenes e infecciones intestinales	11
Prevención de cáncer	11
Efecto inmunomodulatorio	12
Prevención de enfermedades cardiovasculares	12
Infecciones urinarias	13
METODOLOGIA	
Población y muestra	15
Aislamiento e identificación de lactobacilos	15
Identificación fenotípica de lactobacilos	16
Caracterización de las especies. Cualidades tecnológicas	
Capacidad acidificante en Leche	17
Capacidad acidificadora en Caldo MRS	17
Caracterización de las especies. Cualidades probióticas	

Estandarización del inóculo	17
Sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas	18
Resistencia de las cepas a pH 3	19
Resistencia de los aislados a 0,3 % de bilis bovina	19
Efecto antagonico preliminar de los lactobacilos contra patógenos	
Especies patógenas indicadoras	20
Inóculo	20
Obtención del sobrenadante par el ensayo	20
Ensayo de actividad antagonica	21
Indicios de la naturaleza química de los compuestos antagonicos	21
Inhibición por ácidos orgánicos	21
Inhibición por peróxido de hidrógeno	21
Inhibición por compuestos de naturaleza proteica	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
Aislamiento e identificación fenotípica	23
Caracterización de la especies de lactobacilos	
Capacidad acidificante en leche	25
Capacidad acidificante en Caldo MRS	26
Sensibilidad a antimicrobianos de los lactobacilos aislados	29
Resistencia a pH 3	31
Resistencia a 0,3% de bilis bovina	32
Efecto antagonico preliminar de los lactobacilos contra patógenos	35
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

INDICE DE TABLAS

TITULO	Página
Tabla 1. Especies de lactobacilos utilizados como cultivos iniciadores para la elaboración de alimentos fermentados	7
Tabla 2. Principales especies de uso probiótico	10
Tabla 3. Diámetro de halos de inhibición para interpretación de resultados con diferentes antimicrobianos	19
Tabla 4. Especies de <i>Lactobacillus</i> aisladas de pasto	23
Tabla 5. Sensibilidad de las cepas de lactobacilos a antimicrobianos	29
Tabla 6. Resistencia de los lactobacilos a pH	33
Tabla 7. Resistencia de los lactobacilos a 0,3% de bilis bovina	34
Tabla 8. Efecto antagónico contra <i>Salmonella typhi</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> de sobrenadantes de lactobacilos con diferentes tratamientos	37

INDICE DE FIGURAS

TITULO	Página
Figura 1. Acidificación de los lactobacilos en leche descremada	25
Figura 2. Descenso de pH de las cepas de <i>L. plantarum</i> en Caldo MRS	27
Figura 3. Producción de ácido láctico de las cepas de <i>L. plantarum</i> en Caldo MRS	27
Figura 4. Descenso de pH de las otras especies de lactobacilos en Caldo MRS	28
Figura 5. Producción de ácido láctico de las otras especies de lactobacilos en Caldo MRS	28
Figura 6. Halos de inhibición observados en los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos	30
Figura 7. Detalle de colonias la cepa <i>L. plantarum</i> 58 desarrolladas en el halo de inhibición producido por Ciprofloxacina	30
Figura 8. Detalle de halo de inhibición atípico desarrollado por <i>Salmonella enteritidis</i> con sobrenadante de cepa <i>L. plantarum</i> 37. La flecha indica colonias “intrahalo”	36
Figura 9. Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> producida por sobrenadante de <i>L. plantarum</i> 58	39

INTRODUCCIÓN

El género *Lactobacillus* tiene una gran importancia tecnológica; especies como *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. sake*, *L. plantarum* y *L. paracasei* entre otros constituyen cultivos iniciadores o adjuntos de muchos alimentos fermentados (Bruno, Glikmann e Intorno, 2003; Cintas-Izarra y Casaus-Lara, 1998; 1994; Buckenhüskes, 1993); pero no solamente contribuyen al desarrollo de las propiedades organolépticas, sino que muchos de estos ejercen efectos beneficiosos o probióticos (De Vuyst, 2000; González-Martínez, Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003).

En las últimas dos décadas en casi todo el mundo se ha dirigido la atención a encontrar nuevas cepas y a caracterizar mejor las existentes para el aprovechamiento óptimo de sus potencialidades, lógicamente la búsqueda se ha dirigido hacia los alimentos fermentados, sobre todo, los autóctonos de cada región (Savadojo y col., 2004; Durlu-Ozkaya y col., 2001; López y Mayo, 1997; Leisner y col., 1999). Uno de los nichos ecológicos de este género que han sido poco estudiado con ese objetivo es el pasto que se utiliza para alimentar ganado; estas gramíneas poseen una microbiota epifita muy variada en la que se encuentran algunas especies de lactobacilos; de hecho, se ha descrito la presencia de *L. plantarum*, *L. buchneri*, y *L. brevis* *L. casei* en forraje verde (Bourgeois y Larpent, 1995) y en ensilado de algunas especies de pasto de Australia y Camerún (Danner y col., 2003; Kanga y Kanga, 1988). En Venezuela existe una gran variedad de pastos, pero lamentablemente, se conoce poco acerca de las especies de lactobacilos presentes y sus potencialidades; por otra parte; en nuestro país la industria láctea utiliza cultivos iniciadores importados y además el consumo de probióticos es limitado por lo que la búsqueda de lactobacilos con potencial tecnológico y probiótico no ha sido un tema de mucho interés, por ello, deben aportarse bases científicas que permitan el aprovechamiento de nuestra microbiota láctica autóctona para el desarrollo de estos campos importantes de nuestra industria alimentaria

HIPÓTESIS

El pasto que se utiliza para alimentar ganado lechero contiene una microbiota epifita variada donde se incluyen varias especies de lactobacilos que poseen potencialidades tecnológicas y probióticas

OBJETIVOS GENERALES

- 1) Detectar lactobacilos a partir de muestras de pasto de finca lechera
- 2) Evaluar propiedades tecnológicas para la utilización de las cepas aisladas como cultivos iniciadores
- 3) Estudiar la capacidad probiótica de los lactobacilos aislados

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Aislar e identificar lactobacilos por métodos convencionales a partir de muestras de pasto de finca lechera
- 2) Evaluar la capacidad acidificadora de las cepas aisladas en leche descremada y Caldo MRS mediante pH y titulación del ácido
- 3) Determinar la susceptibilidad de los aislados a los antimicrobianos: Amoxicilina/Ácido clavulánico (30 µg), Eritromicina (15 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Amikacina (30 µg) y Gentamicina (10 µg)
- 4) Evaluar la resistencia de las especies aisladas a pH 3 por 3 horas
- 5) Evaluar el efecto de 0,3% de bilis bovina por 3 horas en la viabilidad de las cepas
- 6) Estudiar la presencia y características de efecto antagónico de las especies aisladas contra patógenos bacterianos de los géneros *Salmonella* y *Listeria*

MARCO TEÓRICO

El género *Lactobacillus*

Lactobacillus se considera el género más numeroso y heterogéneo del grupo de las bacterias lácticas, de hecho, en la actualidad se conocen más de 150 especies (Euzèby, 2006). En este género se agrupan bacterias en forma de bacilos, cocobacilos y algunas en forma cocoide, grampositivas, inmóviles, no esporulados además no poseen ni citocromos ni catalasa “sensu-esticto”, son microaerofílicos y algunos requieren de anaerobiosis para su aislamiento, poseen requerimientos nutricionales complejos porque necesitan de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables para su crecimiento; (aunque muchos de estos requerimientos pueden ser característicos de cada especie), son de metabolismo fermentativo y sacarolítico, el rango de temperatura óptima de crecimiento es de 30-40° C, aunque algunas especies pueden crecer en un rango de 5-53° C, son acidúricos con un pH óptimo de crecimiento entre 5,5-5,8; no reducen nitrato ni licuan la gelatina (Kandler y Weiss, 1986)

Los lactobacilos pueden producir ácido láctico como principal o único producto de la fermentación de carbohidratos; en este sentido la fermentación puede ser homoláctica o heteroláctica. La fermentación homoláctica u homofermentativa es realizada por la vía Embden-Meyerhof y el principal producto final es el ácido láctico; en tanto que, durante la fermentación heteroláctica también llamada heterofermentativa se produce ácido láctico, etanol y CO₂ por la vía de las pentosas fosfato (Prescott, Harley, y Klein, 1999). El ácido láctico producido puede tener la configuración D (+) o L (+); la producción de uno u otro va a depender de la especie; inclusive, hay especies que producen una mezcla racémica de las dos moléculas (Kandler y Weiss, 1986)

Clasificación en base a características fisiológicas

En 1919 Orla-Jensen los dividió en 3 subgéneros atendiendo a sus temperaturas de crecimiento y las vías de fermentación de hexosas (Streptobacteria, Betabacteria y Thermobacteria); esta clasificación aunque todavía es utilizada por muchos autores fue reemplazada por la actual que consiste en tres grupos definidos filogenéticamente (Kandler y

Weiss, 1986); el primer grupo está integrado por lactobacilos homofermentativos que crecen a altas temperaturas ($> 45^{\circ} \text{C}$) (Frank y Hassan, 1998) y las especies más representativas son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus helveticus*. Los lactobacilos heterofermentativos facultativos son el segundo grupo, fermentan hexosas a solo ácido láctico y cuando tienen limitación de glucosa a ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico, el azúcar es fermentado vía fosfoacetolasa y a este grupo pertenece *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sakei*. El último grupo, denominado lactobacilos heterofermentativos obligados, fermenta hexosas a ácido láctico, ácido acético o etanol y dióxido de carbono, una especie representativa de este grupo es *Lactobacillus kefir* utilizado para elaborar kéfir, otras especies de este grupo son *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus reuteri* (Frank y Hassan, 1998).

Hábitat

Este género bacteriano se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Muchas especies forman parte de la microflora epifita de las plantas (Oude-Elfenrink y col, 2005; Cai y col., 1998; Kandler y Weiss, 1986); por esa razón, especies como *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. brevis*, *L. amylophilus*, *L. homohiochii*, *L. buchneri*, *L. rhamnosus* entre otros se han aislado de alimentos de origen vegetal (Danner y col., 2003, Carr, Chill y Maida, 2002). La leche y los productos lácteos constituyen uno de los nichos ecológicos más importante de muchas especies del género *Lactobacillus*. Los microorganismos presentes en la leche recién ordeñada provienen del ambiente, equipos, agua, pasto, estiércol, (Díaz, 2000) y en general la cantidad de lactobacilos es moderada, pero cuando la leche es acidificada espontánea o intencionalmente las especies presentes comienzan a proliferar debido a su carácter acidúrico (Kandler y Weiss, 1986); por esa razón especies como *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudopantarum*, *L. paracasei* ssp. *tolerans*, *L. plantarum*, *L. maltaromicus*, *L. helveticus*, *L. brevis*, *L. fructivorans* han sido aisladas de leche y derivados lácteos (Carr, Chill y Maida, 2002; Díaz, 2000; Kandler y Weiss, 1986). Otro tipo de alimentos preferidos por especies como *L. plantarum*, *L. sakei*, y *L. pentosus* son las carnes y sus derivados debido a que son sustratos altamente nutritivos (Erkkilä, 2001, Ahn y Stiles, 1990).

Algunas especies de lactobacilos forman parte de la microbiota bucal, genital y del tracto gastrointestinal del hombre y otros animales (Kandler y Weiss, 1986; Batt ,1999); especies como *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. rhamnosus* provenientes del tracto gastrointestinal humano han sido bien caracterizadas (Dunne y col., 2001; Coconnier y col., 1998; Bernet-Camard y col., 1997)

Aislamiento e identificación

Los lactobacilos son autótrofos para muchos de los nutrientes que necesitan para su crecimiento; de allí que solo puedan crecer en medios complejos; en agar las colonias son usualmente pequeñas de 2 a 5 mm de diámetro; convexas, opacas y sin pigmentos (Kandler y Weiss, 1986). Se han diseñados medios ricos ideales para el crecimiento de estos microorganismos; tal es el caso del MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) que es un medio utilizado universalmente para el aislamiento de estos microorganismos de muchas fuentes; pero no es selectivo porque otras especies pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden utilizarlo (Carr, Chill y Maida, 2002). El medio Rogosa es también un medio complejo utilizado para el aislamiento de lactobacilos (Dave y Shah, 1996).

Cuando se sospecha la presencia de varias especies de BAL que puedan crecer en MRS se han hecho modificaciones que tienen que ver con la sustitución de la glucosa por un carbohidrato fermentable por la especie que se desea aislar con el fin de hacerlo selectivo; estas modificaciones han sido muy útiles para el aislamiento y conteo de lactobacilos en yogures probióticos que contienen hasta 3 especies. Otras modificaciones incluyen acidificación, adición de sales biliares o adición de 0,05% de cisteína para crear un potencial de oxidoreducción favorable (Coeuret y col., 2003); esto último, sobre todo para lactobacilos de origen intestinal que son los menos tolerantes al oxígeno. Adicionalmente; el MRS es de uso general como medio basal para muchos ensayos que se realizan en la identificación y caracterización de muchas especies (Carr, Chill y Maida, 2002)

Se han desarrollado otros medios que permiten el aislamiento y conteo diferencial de especies de *Lactobacillus* en diferentes fuentes, por ejemplo, para el conteo diferencial de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* en yogur se utiliza agar Lee's, y agar Reforzado para Clostridium (RCA) ajustado a pH 5,5. Para aislamiento de especies en otros alimentos, cabe citar, Agar ATP para aislar *L. viridescens* en carnes curadas, Agar Jugo de Tomate con

extracto de levadura para aislar *L. collinoides* de jugo de manzana, Agar *Lactobacillus* con 0,04% de sorbato para aislar lactobacilos de carnes, Agar *Lactobacillus bulgaricus* para aislar esta especie de quesos duro y Agar *Lactobacillus casei* para el conteo diferencial de esa especie en yogures probióticos. (Carr, Chill y Maida, 2002, Shah, 2000).

La identificación tradicional de la amplia variedad de especies de lactobacilos ha estado basada en características fenotípicas. Las primeras que se consideran son la morfología, la respuesta a la Tinción de Gram y la ausencia de la enzima catalasa; luego se consideran características fisiológicas que orientan hacia la especie como lo son crecimiento a diferentes temperaturas, tipo de fermentación e hidrólisis de arginina; finalmente el perfil de fermentación de carbohidratos en la mayoría de los casos nos ayudará a establecer la identificación definitiva. Para la identificación a nivel de cepas o especies difíciles de identificar por la variación de su perfil de fermentación de carbohidratos se recomiendan técnicas moleculares como reacción en cadena de la Polimerasa (RCP), Análisis de proteínas citoplásmicas totales e hibridación ADN/ADN (Coeuret y col., 2003).

Importancia del género *Lactobacillus*

a. Importancia en la industria alimentaria

Se considera que los alimentos fermentados son unos de los principales ecosistemas naturales de muchos miembros del género *Lactobacillus*. Estos microorganismos se encuentran en estos alimentos bien sea de manera natural o adicionados y contribuyen a su preservación, mejor digestibilidad y mejoramiento de sus características organolépticas (Elmadfa y col, 2001) debido a la producción de ácido, proteólisis y producción de compuestos aromáticos (De Vuyst, 2000). Muchas de estas especies han sido aisladas a partir de alimentos fermentados espontáneamente y bien caracterizadas para formar parte de cultivos iniciadores (en inglés “starters”) de esos mismos alimentos fermentados pero fabricados a nivel industrial (tabla 1).

La principal función de los cultivos “starters” es la producción de ácidos orgánicos principalmente ácido láctico (Kashet, 1987) que van a contribuir no solamente al desarrollo de textura y “flavor” de los alimentos fermentados; sino también aseguran su estabilidad y seguridad debido a que estos ácidos junto con otros metabolitos como peróxido de hidrógeno y acetaldehído ejercen un efecto antagónico contra bacterias indeseables (Durlu-Ozkaya y col.,

Tabla 1. Especies de lactobacilos de cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de alimentos fermentados

Producto	Especies
Lácteos	
Leches fermentadas	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. casei</i>
Quesos	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i> ,
Mantequilla ácida	<i>L. acidophilus</i>
Vegetales fermentados (legumbres, frutas, jugos y ensilaje)	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. babaricus</i> , <i>L. bifidus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. xylosus</i>
Carnes y derivados cárnicos	<i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. pentosus</i>
Vinos	<i>L. plantarum</i> , <i>L. hilgardii</i>

Información tomada de Bruno, Glikmann e Intorno, 2003; Cintas-Izarrá y Casaus-Lara, 1998; Saloff-Coste, 1994; Buckenbüskes, 1993

www.bdigital.ula.ve

2001; Van de Gauche, Ehrlich y Maguín, 2001; Shah, 2000; Tamime y Robinson, 1991). Otras moléculas con actividad antimicrobiana son las bacteriocinas y moléculas de bajo peso molecular; las primeras pueden ser producidas por especies de lactobacilos que forman parte de cultivos iniciadores como *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. delbrueckii* (González-Martínez, Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003; De Martinis, Alves y Franco, 2002); y además tienen un potencial muy grande para explotar en el campo de la bioconservación de los alimentos (González-Martínez, Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003).

Entre las moléculas de bajo peso molecular producidas por *Lactobacillus plantarum* que ejercen efecto antagónico contra bacterias gramnegativas, grampositivas, hongos y levaduras se encuentran ácidos orgánicos como ácido benzoico, ácido 3-hidroxi-feniláctico, ácido hidroxi-decanoico y otros compuestos como metilhidiatonina y mevalonolactona (Strön, 2005; Niku-Paavola y col., 1999), este tipo de compuestos están siendo objeto de intenso estudio.

Especies de lactobacilos mesófilos forman parte de cultivos adjuntos o no starters (NSLAB) de muchos quesos; tal es el caso de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. buchneri*; *L. paracasei* y *L. curvatus*.; estas bacterias producen ácido e hidrolizan la caseína lentamente, por

lo que, juegan un rol importante en las características organolépticas finales de muchos quesos madurados. (Bruno, Glikmann e Intorno, 2003, Durlu-Ozkaya y col., 2001, Fitzsimons y col., 1999). Para obtener los productos deseados debe realizarse una buena selección de los cultivos “starters” que se van a utilizar (De Vuyst, 2000), en este sentido, las cepas a ser utilizadas deben cumplir tres requisitos principales: ser seguras, efectivas tecnológicamente y cumplir con aspectos económicos como ser fácilmente propagables y que mantengan su viabilidad en el tiempo (Buckenhüskes, 1993). La seguridad e inocuidad de las BAL; y por ende, el género *Lactobacillus* se ha aceptado durante milenios y en la actualidad se consideran microorganismos GRAS (del inglés, Generally Recognized As Safe) por eso su utilización o la de sus metabolitos en la industria alimentaria ha sido objeto de gran atención durante los últimos años (Cintas-Izarra y Casaus-Lara, 1998).

El aspecto tecnológico más importante a considerar en una cepa que se quiera utilizar como cultivo iniciador de fermentación es la velocidad de acidificación o capacidad acidificadora (Bruno, Glikmann, e Intorno, 2003); el resto de propiedades tecnológicas van a depender del alimento que desea obtenerse, si es un cultivo iniciador para elaboración de quesos es deseable que tenga propiedad filante, texturizante y que produzca compuestos aromáticos y de sabor (Guerrero, Muset y Pacheco, 1997), si se trata de productos cárnicos fermentados es apropiado que sean acidificadoras lentas, homofermentativas, que no produzcan peróxido de hidrogeno en exceso ni aminas biogénicas; si se necesitan para elaborar vino deben ser cepas que resistan bajos pH, altas concentraciones de etanol, bajas temperaturas y que produzcan diacetil y acetoina (Buckenhüskes, 1993) y si se requieren para elaboración de ensilaje deben ser cepas preferiblemente homofermentativas (Ennahar, Cai y Fujita, 2003).

La búsqueda BAL y en particular lactobacilos que puedan incluirse en cultivos iniciadores ha sido el objetivo de muchas investigaciones en los últimos años y ha permitido diversificar la cantidad de productos fermentados que se ofrecen en el mercado.

b) Importancia como probióticos

La microbiota intestinal de un adulto sano es relativamente estable y contiene diversas poblaciones bacterianas que juegan un rol importante en la salud del huésped (Kleerebezem y col., 2003; Liévin y col., 2000, Parodi, 1999). Las poblaciones bacterianas beneficiosas están formadas principalmente por especies de lactobacilos y bifidobacterias (Jacobsen y col.,

1999); y las especies de lactobacilos encontradas son *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* y *L. reuteri* (Dunne y col., 2001; Sillanpää, 2001; Coconnier y col., 1998; Bernet-Camard y col., 1997). Las funciones de esta microflora es variada: sintetizan vitamina K y las del grupo B, producen sustancias beneficiosas, favorecen la recuperación a absorción de calcio, hierro y magnesio, intervienen en el metabolismo de la glucosa, favorecen el metabolismo colónico de la fibra mejorando la digestibilidad y además constituyen una barrera frente a la invasión por microorganismos indeseables y patógenos (González-Martínez, Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003; Adhikari y col., 2000; Lievin y col., 2000). El desbalance de esa microbiota beneficiosa puede ocurrir por factores como dietas inadecuadas por consumo de comida chatarra y poco consumo de alimentos fermentados, estrés, infecciones intestinales y tratamientos con antimicrobianos (Amores y col., 2004; Talwalkar y Kailasapathy, 2004) que pudieran desencadenar enfermedades como infecciones del tracto gastrointestinal, constipación, síndrome de colón irritable, enfermedad inflamatoria del colón, alergias, enfermedades cardíacas y ciertos tipos de cánceres (como cáncer de colón); para prevenir estos riesgos la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado explotar el potencial terapéutico y profiláctico de las microorganismos probióticos. (Dunne y col., 2001).

En 1989 R. Fuller definió los probióticos como microorganismos vivos que son agregados como suplementos a los alimentos y que afectan en forma positiva el balance de la flora intestinal; nueve años mas tarde en el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de la Unión Europea (Bruselas) se estableció un concepto más apropiado para probióticos definiéndolos como microorganismos vivos que cuando son ingeridos en cantidades suficientes tienen efectos benéficos sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales convencionales. El concepto de probióticos no es nuevo; cerca de los años 1900 Élie Metchnikoff (microbiólogo ruso, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908) hipotetizó que la longevidad saludable de los habitantes de Bulgaria se debía al consumo de leches fermentadas, e incluso logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur y la utilizó en sus investigaciones para realizar un preparado terapéutico en forma de cápsula denominado Lactobacilin, esto dio comienzo a la era de la Probiótica. (Gómez-Daza, 2005). Entre las principales bacterias utilizadas como probióticos se encuentran varios géneros de BAL especialmente los lactobacilos, también miembros del género *Bifidobacterium*,

Lactococcus, *Enterococcus* y otros (tabla 2). La mayoría de estas especies han sido aisladas del tracto gastrointestinal humano y se le atribuyen propiedades terapéuticas (Amores y col., 2004) que se explicarán a continuación.

Tabla 2. Principales especies de uso probiótico

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	Otras especies
<i>acidophilus</i>	<i>bifidum</i>	<i>lactis</i>	<i>faecium</i>	<i>subtilis</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>lactis</i>	<i>longum</i>	<i>cremoris</i>	<i>faecalis</i>	<i>coagulans</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>infantis</i>	<i>diacetyllactis</i>			<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>rhamnosus</i>	<i>breve</i>				
GG					
<i>casei</i>	<i>lactis</i>				
<i>kefir</i>	<i>adolescentis</i>				
<i>brevis</i>					
<i>reuteri</i>					
<i>helveticus</i>					
<i>plantarum</i>					
<i>johnsonii</i>					
<i>salivarius</i>					

Tomada de Amores y col., 2004

Intolerancia a la lactosa.

Cerca del 70% de la población mundial presenta ciertos síntomas de indigestión cuando consume productos que contienen lactosa, incluso, en individuos que son intolerantes a la lactosa aparecen malestares digestivos muy desagradables como diarreas y flatulencias, en estos casos, el consumo de probióticos contribuye a mejorar la digestión de la lactosa y reducen la sintomatología gracias a que los lactobacilos y bifidobacterias poseen una actividad lactasa que sigue funcionando en el intestino favoreciendo la digestión del azúcar, esto permite que las personas intolerantes a la lactosa no se priven de los beneficios nutricionales de los derivados lácteos (Gómez-Daza, 2005).

Desordenes e infecciones intestinales.

Como se mencionó anteriormente el tracto gastrointestinal humano posee un ecosistema microbiano extremadamente complejo y tiene funciones fisiológicas muy importantes para la salud. La flora colónica constituye una barrera natural contra la invasión de organismos indeseables, pero, cuando ocurren alteraciones en el equilibrio poblacional los patógenos foráneos o los integrantes indeseables de la flora intestinal tienen la oportunidad de colonizar o proliferar el intestino y producir infecciones gastrointestinales.

El consumo de leche fermentada con *Lactobacillus casei* además de aumentar la recuperación de lactobacilos en leche ha demostrado la disminución de actividad enzimática perjudicial (β -glucoronidasa y nitrorreductasa) de la microbiota indeseable (Amores y col., 2004); este efecto se debe principalmente a los cambios de la microecología intestinal; si incrementa la cantidad de lactobacilos en el intestino estos son capaces de suprimir el crecimiento de patógenos, bien sea por competencia por sitios de adhesión o por producción de sustancias antimicrobianas tales como ácidos orgánicos, metabolitos de oxígeno, acetaldehído y bacteriocinas (Van de Guchte, Ehrlich y Maguin, 2001; Cintas, Casaus y Hernández, 2000; Piard y Desmazeaud 1991^a y 1991^b); de hecho varias especies han mostrado efecto antagónico contra patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Escherichia. coli* (Jacobsen y col., 1999).

Prevención del cáncer

La mutagénesis por la alteración de la secuencia genómica del ADN, especialmente en genes críticos en la supresión de tumores juega un papel importante en el estado de iniciación de la carcinogénesis (Ames y col, 1995; citado por Parodi, 1999).

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* muestra que algunas BAL comúnmente usadas para la elaboración de yogurt y otras leches fermentadas pueden inhibir la actividad mutagénica de compuestos que son producidos en el intestino debido al metabolismo de la flora intestinal. (Parodi, 1999); unos de estos compuestos son los ácidos grasos y ácidos biliares derivados de altas cantidades de grasas saturadas consumidas en la dieta que en algún momento pudieran estimular la hiperproliferación celular en el epitelio colónico dando origen a primeros estadios de procesos carcinogénicos. Se considera que un alto contenido de lactobacilos en el intestino puede reducir la biotransformación de grasa y por tanto disminuye el riesgo de padecer ese tipo de cáncer.

Se conoce acerca de un efecto de inhibición de la proliferación de células tumorales; en este sentido, estudios llevados a cabo en la Escuela de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Ulster (Irlanda del Norte) mostraron que la administración conjunta de lactobacilos y bifidobacterias con azoximetano (agente carcinogénico de colón) a ratas reducen la incidencia de focos de cáncer. (Gómez-Daza, 2005); también se ha observado un efecto inhibitorio de leches fermentadas con BAL sobre una línea celular de cáncer (Amores y col., 2004). Los resultados obtenidos son prometedores en el campo de la terapia contra el cáncer, pero existen muchos aspectos que deben ser dilucidados. (Parodi, 1999)

Efecto inmunomodulatorio

La pared bacteriana de las BAL está constituida principalmente por peptidoglicano (30-70%) polisacáridos y ácidos teicoicos. Cuando las BAL llegan al intestino sufren la acción de la lisozima secretada por las células paneth del intestino dando como resultado un compuesto de bajo peso molecular denominado muramil dipéptido (MDP) que estimula en los macrófagos la producción de Interleucina 1, induce la producción de Interferon- γ por parte de los linfocitos y estimula la producción de Interleucina 6 y Factor de Necrosis Tumoral- α en monocitos. La digestión enzimática de la pared celular de las BAL muestra un incremento de la inmunidad del huésped contra *Listeria monocytogenes* en ratones, infecciones por *Klebsiella* y tumores celulares (Meydani y Ha, 2000).

Esta hipótesis es apoyada por estudios recientes que han mostrado que el consumo de leches fermentadas con *Lactobacillus* activa el mecanismo de fagocitosis acompañado de la producción de varias citocinas como el γ -Interferón, la Interleucina 10 y 12 (Amores y col., 2004).

Prevención de enfermedades cardiovasculares

El riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular es mayor cuando el colesterol sérico está elevado. En 1974 unos investigadores encontraron que los guerreros massai tenían concentraciones muy bajas de colesterol sérico y lo atribuyeron a que consumían varios litros de leche fermentada al día. Este hallazgo motivó las investigaciones acerca del efecto hipocolesterolémico del yogurt y otras leches fermentadas pero, los resultados no han sido

muy convincentes porque el efecto no se mantiene en el tiempo; sin embargo, en un estudio recientes se ha observado que el consumo diario a largo plazo de 300 mg de yogur suplementado con *L. acidophilus* y *B. longum* incrementaba la concentración sérica de HDL y conducía a una mejora de la proporción LDL/HDL (Amores y col., 2004). También se ha sugerido que cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* tienen la capacidad de desconjugar las sales biliares lo que produciría una disminución de los esteroides disponibles para sintetizar colesterol (Macedo, 2002^a; Brashears, Gilliland, y Buck, 1998).

Infecciones urinarias

Se han utilizado especies de *Lactobacillus* en la prevención y tratamiento de enfermedades del tracto urinario. La presencia de lactobacilos en la vagina está asociada con un bajo riesgo de padecer vaginosis bacterianas e infecciones del tracto urinario, incluso la administración oral de lactobacilos también ha demostrado un efecto protector (Amores, 2004).

Para que estas bacterias probióticas puedan ejercer estos efectos profilácticos o terapéuticos debe consumirse una dosis diaria no menor a 10^8 - 10^9 bacterias; por eso legislaciones internacionales han regulado la cantidad de probióticos en leches fermentadas (que son los principales alimentos probióticos) entre 10^6 - 10^7 UFC por ml o gramo de producto (Gómez-Daza, 2005; Talwalkar y Kailasapathy, 2004; De Vuyst, 2000; Hamilton-Miller y Gibson, 1999).

Los alimentos probióticos forman un subgrupo muy importante de los llamados “alimentos funcionales” (Sanz, Collado y Dalmau, 2003; Stanton y col., 2001). Este tipo de alimentos aparecieron por primera vez en el mercado japonés en los años 80 y se refiere a alimentos fortificados con ingredientes capaces de producir beneficios a la salud del consumidor (Macedo, M, 2002^b; Stanton y col, 2001). El yogur y las leches fermentadas se consideran vehículos idóneos para bacteria probióticas (sobre todo de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), son los más populares y con las que se han hecho la mayoría de estudios clínicos para investigar la eficacia de los probióticos (Amores y col., 2004; Talwalkar y Kailasapathy, 2004; González-Martínez, Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003; De Vuyst, 2000).; otros productos lácteos que recientemente han sido utilizados como alimentos probióticos son los quesos y helados (Haynes y Playne, 2002; Ross y col. 2002; Vinderola y col., 2000).

Debido al aumento de la demanda de alimentos funcionales alrededor del mundo la industria alimentaria se abocó a elaborar nuevos alimentos probióticos con el fin de cubrir las exigencias de este creciente mercado (Vinderola y col., 2000), pero no existía una normativa comúnmente aceptada acerca de los requisitos de selección para estas bacterias probióticas; por esa razón ; la Organización de Alimentos y Agricultura en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) publicaron en mayo de 2002 una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos (Sanz, Collado y Dalmau, 2003); dicha guía incluye los siguientes aspectos:

Identificación del género y la especie probiótica. Se debe profundizar en su identificación a nivel intraespecífico, mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica.

Pruebas “in vitro” para la selección de probióticos de uso humano. Se refiere a ensayos de resistencia a acidez y sales biliares, adherencia a mucus intestinal y actividad antagónica contra patógenos.

Seguridad de los probióticos. Si las cepas a evaluar pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se garantiza “a priori” su inocuidad; sin embargo se recomienda realizar pruebas como resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles, actividades metabólicas perjudiciales como producción de ácido D-láctico, capacidad hemolítica y producción de toxinas.

Estudios “in vivo” utilizando animals y humanos. Para demostrar las propiedades probióticas atribuidas a la cepa.

Etiquetado. Descripción detallada en la etiqueta del producto de género, especie, número mínimo de células viables al final de la vida útil del producto, efectos beneficiosos y contacto con centros de información al consumidor.

METODOLOGÍA

1. Población y muestra.

Los pastizales donde se recolectaron las muestras pertenecen a la finca lechera PROGAL-ULA (Programa de Ganadería de Altura de la Universidad de los Andes) ubicada en el sector Santa Rosa de la ciudad de Mérida, estado Mérida. Estos pastizales consisten en parcelas con áreas entre 1.900 y 3.000 M² cultivadas con diversas especies de pasto; las dos parcelas muestreadas estaban cultivadas con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), pasto cataria (*Cetaria anceps*) y pasto estrella (*Cynodon plectostachyum pilger*). En dos ocasiones muestras de pasto fueron tomadas al azar en diferentes zonas del pastizal; las plantas se cortaron asépticamente a una altura aproximada de 10 cm. del suelo y se colocaron en envases estériles; posteriormente estas muestras fueron trasladadas al laboratorio, guardadas a temperatura ambiente en un lugar fresco por un lapso de 8 días y luego fueron procesadas.

2. Tratamiento de la muestra y aislamiento de lactobacilos.

Trabajando en condiciones de asepsia se reunieron las plantas en un "pool" a partir del cual se pesó 25 g de muestra que se colocó en 500 ml de agua peptonada modificada (APM) preparada con 0,1% de peptona, 0,1% de Tween y 0,05% de cisteína, esto último para disminuir el potencial de oxidación-reducción del diluyente (Haddadin, Awaished y Robinsón, 2004; Coeuret, 2003), a continuación se enjuagó la muestra por 20 minutos con agitación mecánica (120 movimientos por minuto en una incubadora con agitación marca Precisión, GCA, Corporation). A partir del enjuagado se realizaron 6 diluciones seriadas en APM y fueron sembradas con los métodos en superficie y profundidad por duplicado en Agar MRS modificado (3% de leche descremada y 0,02 % de azida sódica) y en Agar Rogosa. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37 °C por 5 días.

En las placas donde se desarrollaron colonias bien aisladas se tomaron aquellas sospechosas de pertenecer al género *Lactobacillus* (2 a 5 mm de diámetro, convexas en la superficie del agar o de forma ovalada en el interior del agar, opacas y sin pigmentos, Kandler y Weiss, 1986); y fueron subcultivadas en tubos de caldo MRS con 20 % de glicerol e incubados a 37 °C por 24 horas para su conservación en refrigeración.

3. Identificación fenotípica de lactobacilos

3.1. Determinación del género de los aislados.

Se realizaron 3 pruebas distintivas del género *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986):

a) Tinción de Gram. Se realizó tinción de Gram a los aislados a partir de cultivos de 24 horas utilizando la metodología correspondiente (García-Rojas, 1990).

b) Detección de catalasa. Se detectó la presencia de catalasa en los aislados a un cultivo de 24 horas en Agar MRS utilizando la metodología correspondiente (Mc Faddin, 2003)

c) Producción de ácido. Se inoculó por duplicado tubos con 10 ml de caldo MRS con 1% de las cepas aisladas, se incubaron a 37 °C por 24 horas, se tituló el ácido producido por las cepas utilizando NaOH 0,1 N y los resultados fueron expresados en % de ácido láctico según se explica en De Rodríguez y Martín (1980), considerando que 1 ml de NaOH 0,1 N equivale a 0,009 g de ácido láctico.

3.2. Determinación de la especie.

Para orientar mejor la identificación de los aislados se probó la producción de gas y crecimiento a 45 °C; la identificación definitiva se realizó evaluando el perfil de fermentación de carbohidratos. Estas pruebas se explican a continuación:

a) Producción de gas.

Tubos con Caldo MRS, 5% de glucosa y tubos Durham se inocularon por duplicado con las cepas a ensayar y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se consideró positiva la presencia de gas cuando se produjo un desplazamiento del medio en el tubo Durham (Carr, Chill y Maida, 2002).

b) Crecimiento a 45°C.

Se inocularon con las cepas de ensayo y por duplicado tubos con Caldo MRS y fueron incubados a 45 °C por 48-72 horas, la presencia de turbidez indicó crecimiento de la cepa a la temperatura correspondiente. (Carr, Chill y Maida, 2002).

c) Selección de las cepas.

Utilizando como criterio de selección la producción de ácido láctico en una cantidad mayor a 0,4% en Caldo MRS se seleccionaron las cepas para determinar su perfil de fermentación de carbohidratos con el objeto de obtener su identificación definitiva.

d) Identificación fenotípica de las cepas.

Se determinó el perfil de fermentación de carbohidratos de las cepas con el fin de establecer la identificación definitiva utilizando el Sistema de identificación bioquímica API: Medio 50CHL, galerías 50CH y programa apiweb (API 50CHL V5.0) según las especificaciones del fabricante (BioMérieux, Marcy-l'étoile, France).

4. Caracterización de las especies de *Lactobacillus*. Cualidades tecnológicas.

4.1. Capacidad acidificante en leche. Se inoculó por duplicado leche descremada estéril al 10 % con 1% de la cepa a ensayar, se incubó en baño de agua a 37 °C y se midió el descenso del pH y la producción de ácido por titulación con NaOH 0,1 N (COVENIN 658-97) a las 24 y 48 horas. La producción de ácido fue expresada como % de ácido láctico.

4.2. Capacidad acidificante en MRS (Carr, Chill y Maida, 2002). Se inoculó por duplicado caldo MRS estéril con 1% de la cepa a ensayar, se incubó en baño de agua a 37 °C, se midió el descenso del pH y la producción de ácido láctico por titulación con NaOH 0,1 N cada hora durante 6 horas, luego a las 24 y 48 horas.

5. Caracterización de las especies de *Lactobacillus*. Cualidades Probióticas.

5.1. Estandarización del inóculo.

Un inóculo de 10^8 UFC/ml se consideró adecuado para realizar este tipo de ensayos por ser la cantidad promedio de bacterias probióticas que deben consumirse para lograr los efectos beneficiosos (Salas, 2004); por esta razón se tomó como referencia para la estandarización de

los inóculos de las cepas en estudio la turbidez del tubo N° 2 del Nefelómetro de Mc Farland que corresponde a $6,0 \times 10^8$ UFC/ml aproximadamente (APHA, 1992).

A partir de crecimiento en placas de MRS cultivadas en microaerofilia a 37 °C por 12-16 horas se prepararon suspensiones celulares de las cepas equivalentes al tubo N° 2 del Nefelómetro Mc Farland en solución salina (0,85 % de NaCl); a continuación, se midió absorbancia a 600 nm de estas suspensiones celulares en un espectrofotómetro digital (Genesys 20) encontrándose que los valores oscilaban alrededor de 0,130 por lo que se escogió esta absorbancia como valor fijo para preparar las suspensiones celulares.

Se prepararon suspensiones celulares de las cepas en estudio con absorbancia de 0,130 medida a 600 nm utilizando el procedimiento mencionado antes y se realizó conteo celular (Maturin y Peeler, 1998) de cada suspensión realizando diluciones decimales en agua peptonada al 0,1%, sembrando en placas de agar MRS e incubando en microaerofilia a 37 °C por 48 horas. El conteo celular de todas las suspensiones celulares estuvo en el rango 10^7 - 10^8 UFC/ml.

Minutos previos a la realización del ensayo se preparó el inóculo de las cepas que consistió en una suspensión celular con absorbancia de 0,130 a 600 nm preparada como se explicó anteriormente.

www.bdigital.ula.ve

5.2. Sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas.

Para evaluar cualitativamente la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas en estudio se utilizó el Método de difusión en Disco (Koneman y col., 2003) con modificaciones. Los resultados de susceptibilidad a Amoxicilina/Ácido clavulánico; Eritromicina; y Ciprofloxacina se interpretaron utilizando los estándares de diámetros de inhibición de BAL como *Enterococcus spp* y *Streptococcus spp* no neumocócicos (CLSI, 2006). Para interpretar los resultados de sensibilidad a Amikacina y Gentamicina se utilizaron medidas de halos de inhibición sugeridas por la casa comercial HIMEDIA (Salas, 2004) (tabla 3).

Los ensayos se realizaron como se explica a continuación. Se colocó sobre la placa de Agar MRS 0,1 ml de suspensión celular de la cepa de interés, este inóculo fue esparcido uniformemente en la superficie del agar utilizando un hisopo estéril, se dejaron en reposo las placas por un lapso de 10 minutos, a continuación, se colocaron presionando suavemente contra la superficie del agar discos comerciales de Amoxicilina/Ácido clavulánico (2:1; 30 µg, OXOID); Eritromicina (15 µg, BBL); Ciprofloxacina (5 µg, OXOID); Amikacina (30 µg,

HIMEDIA) y Gentamicina (10 µg, BBL). Después de incubar a 37 °C por 24 horas se observaron y se midieron con una regla los halos de inhibición de crecimiento desarrollados.

Tabla 3. Diámetro de halos de inhibición para interpretación de resultados con antimicrobianos

Antimicrobiano	Diámetro de halo de inhibición (mm)		
	Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)
Ampicilina 10 µg *	≤ 16	-	≥ 17
Eritromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
Ciprofloxacina	≤ 15	16-20	≥ 21
Amikacina	≤ 14	15-16	19-26
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15

*Ampicilina es de la misma clase que Amoxicilina por lo que estos estándares se puede utilizar para predecir la susceptibilidad a Amoxicilina/Acido clavulánico 30 µg. Datos tomados de CLSI, 2006 y Salas, 2004

www.bdigital.ula.ve

5.3. Resistencia de las cepas a pH 3.

Se utilizó la metodología modificada de Godward y col, 2000. El pH de Caldo MRS fue ajustado a 3,0 utilizando HCL 1 N; a continuación, fue inoculado por duplicado con 1% de suspensión celular de la cepa de interés; se incubó en baño de agua a 37 °C por tres horas y se realizó contaje celular (Maturin y Peeler, 1998) a tiempo cero y a las tres horas. Aumento o mantenimiento del contaje celular a las tres horas con respecto a tiempo cero horas indicó resistencia de las cepas a la acidez ensayada.

5.3. Resistencia de los aislados 0,3 % de bilis bovina.

Este ensayo se realizó utilizando la metodología modificada de Godward y col, 2000. Se preparó Caldo MRS con 0,3% de Bilis de Buey deshidratada (DIFCO), luego de esterilizarlo a 121 °C por 15 minutos fue inoculado por duplicado al 1% con la suspensión celular de la cepa de interés; se incubó en baño de agua a 37 °C por tres horas y se realizó contaje celular (Maturin y Peeler, 1998) a tiempo cero y a las tres horas. Se utilizó el mismo criterio del

ensayo anterior para establecer el comportamiento de las cepas a la concentración de Bilis ensayada.

5.4. Efecto antagónico preliminar de los lactobacilos contra *Salmonella* y *Listeria*.

5.4.1. Preparación de inóculos de los patógenos indicadores y de sobrenadante de lactobacilos

Especies patógenas indicadoras. Se utilizaron 4 bacterias indicadoras; 2 cepas de *Salmonella enteritidis* (la cepa 446 perteneciente a la Colección Venezolana de Microorganismos (CVM) y una cepa que ocasionó un brote epidémico alimentario en Mérida en abril de 2005); 1 *Salmonella typhi* aislada de leche cruda proveniente de una finca del estado Mérida y *Listeria monocytogenes* 497 perteneciente a la CVM.

Inóculo. Se utilizó un inóculo de aproximadamente 10^8 UFC de cada patógeno.

Se realizaron curvas de crecimiento de 3 horas de las salmonelas, para ello se inocularon en caldo BHI, se incubaron en baño de agua a 37 °C y se realizó medición de absorbancia a una longitud de onda de 600nm y contaje celular (Maturin y Peeler, 1998) en Agar BHI cada media hora hasta 3 horas. Se utilizó el mismo procedimiento para determinar la absorbancia correspondiente al inóculo requerido de *L. monocytogenes* pero el cultivo y contaje se realizaron en Caldo y Agar Tripticasa de soya respectivamente.

Dos horas antes de realizar los ensayos se prepararon los inóculos de las bacterias patógenas indicadoras; las salmonelas se cultivaron en Caldo BHI y fueron incubadas a 37 °C en baño de agua hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,038 y *L. monocytogenes* se cultivó en Caldo Tripticasa de soya incubado a 37 °C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,050.

Obtención del sobrenadante para el ensayo. Se inocularon tubos de Caldo MRS con 1% de un cultivo de toda la noche del lactobacilo a ensayar, se dejó crecer durante 24 horas a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 4000 r.p.m. por 15 minutos (Centrífuga marca Digisystem Laboratory Instruments, Inc) se separó el sobrenadante, fue pasado a través de un filtro de membrana de 0,45 micras, dispensado alícuotas de 1ml y almacenado en refrigeración (8 ° C) para su uso posterior.

5.4.2. Ensayo de actividad antagónica.

Para la realización de estos ensayos se utilizó la Técnica de difusión en pocillos de Tagg y Mc Given (1971) con algunas modificaciones. Sobre una capa base de medio Müller Hinton (10 ml) se colocó un cilindro de acero inoxidable de 8 mm de diámetro; se vertió 7 ml de Agar BHI blando (0,85% de agar) inoculado con 1 ml del inóculo del patógeno a ensayar; en el caso de *L. monocytogenes* se utilizó Agar Tripticasa de soya blando. Una vez solidificada la sobrecapa se retiraron los cilindros y en los pocillos formados se depositó 80 µl de sobrenadante de la cepa antagonista, las placas fueron incubadas a 37 °C por 12-16 horas. El efecto antagónico del lactobacilo sobre el patógeno se evidenció por el desarrollo de un halo de inhibición ≥ 9 mm.

5.4.3. Indicios de la naturaleza química del (los) compuesto (s) antagónico (s).

Aquellos sobrenadantes que exhibieron actividad antagónica con alguno de los patógenos ensayados fueron seleccionados para realizarles una investigación preliminar de la naturaleza química de los compuestos que produjeron esa inhibición. Estos ensayos fueron realizados con la técnica explicada anteriormente, por duplicado y en todos los casos incluyeron controles positivos y negativos.

5.4.3.1 Inhibición por ácidos orgánicos.

Una alícuota de cada sobrenadante antagonista fue neutralizada a pH 6,5-7,0 utilizando NaOH 1 N y se ensayó la actividad antagónica residual.

5.4.3.2 Inhibición por peróxido de hidrógeno.

A los sobrenadantes que mostraron actividad antagónica luego de ser neutralizados se les ajustó el pH a 6,5 y luego fueron tratados con 32 µg/ml de Peroxidasa (Sigma), se incubaron por 2 horas a 37 °C, luego se sometieron a 65 °C por 30 minutos para eliminar la actividad de la enzima (Oh, Kim y Worobo, 2000); finalmente se detectó la actividad antagónica residual del sobrenadante.

5.4.3.3 Inhibición por compuesto de naturaleza proteica.

Se tomó un par de alícuotas de los sobrenadantes que mostraron actividad antagónica luego de

ser neutralizados a una se le ajustó el pH a 7,5 y se trató con 2 mg/ml de Tripsina (Merck) (disuelta en Buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2); luego fue incubado por 2 horas a 37 ° C (<http://www.ugr.es/~anpenet/metodologia.html>) y calentado a 65 ° C por 30 minutos. La otra alicuota de sobrenadante fue sometida a 120 ° C por 20 minutos (Oh, Kim y Worobo, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Aislamiento e identificación fenotípica

En las dos muestras de pasto analizadas se aislaron 106 colonias sospechosas de pertenecer al género *Lactobacillus*; de las cuales 19 mostraron características propias de dicho género como bacterias en forma de bacilos cortos y en algunos casos cocobacilos, grampositivas, catalasa negativa y productoras de ácido cuando se cultivaron en Caldo MRS.

De las 11 cepas seleccionadas por producir más de 0,4% de ácido en Caldo MRS 10 se ubicaron en el género *Lactobacillus* con base en sus perfiles de fermentación de carbohidratos (tabla 4).

Tabla 4. Especies de *Lactobacillus* aisladas de pasto

CEPA	ESPECIE IDENTIFICADA (% DE IDENTIFICACIÓN) (Sistema de identificación bioquímica API)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
11	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (96,1)
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
23	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (95,6)
37	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
50	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (99,9)
58	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 (92,6)
67	<i>Lactobacillus pentosus</i> (99,0)
90	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3 (96,5)

Las especies de lactobacilos encontradas en estas muestras de pasto también fueron reportadas en trabajos previos realizados en el estado Mérida: en leche cruda (Díaz, 1992) y en queso artesanal (Salas, 2004); lo que indica que estas especies de lactobacilos están circulando en nuestro ambiente. La especie predominante en las muestras de pasto estudiadas fue

Lactobacillus plantarum, no es de extrañar, porque es la especie más encontrada en plantas, vegetales fermentados y ensilaje de pasto y otros forrajes (Danner y col, 2003, Vamanu y col, 2005; Savadogo y col., 2004; Bourgeois y Larpent, 1995; Kandler and Weiss, 1986). Las cepas típicas de *L. plantarum* no crecen a 45 °C (Carr, Chill y Maida, 2002; Kandler y Weiss, 1986); pero los aislados 20 y 50 exhibieron esta característica (resultados nos mostrados); Bourgeois y Larpent, (1995) mencionan cepas de esta especie que crecen a 45° C aisladas de forraje verde. Esta especie es considerada por algunos autores muy versátil y flexible encontrándose en una gran variedad de nichos ambientales (Kleerebezem y col, 2003) incluyendo, aparte de los mencionados anteriormente; leche cruda, productos lácteos, carne y el tracto gastrointestinal humano (Savadogo y col., 2004; Niku- Paalova y col, 1999; Leisner y col., 1999; Herrero y col., 1996; Shillinger y Lücke, 1989; Kandler and Weiss, 1986).

Lactobacillus brevis fue otra especie encontrada en este estudio, y de igual manera, se considera una especie asociada a ensilaje de forraje vegetal (Danner y col., 2003; Sparo y Mallo, 2001; Bourgeois y Larpent, 1995).

Otras especies encontradas en el pasto analizado fueron *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* y *Lactobacillus pentosus*; estas especies han sido relacionadas con leche y productos lácteos como quesos, formando parte de las llamadas bacterias lácticas no “starters” (mejor conocidas por sus siglas en inglés NSLAB), son bacterias presentes de manera espontánea que tienen un rol importante en el desarrollo de características organolépticas de algunos quesos madurados (Coeuret y col., 2003; De Angelis y col., 2001). El hallazgo en pasto de estas especies relacionadas con leche y productos lácteos nos pudiera sugerir que el pasto podría constituir una fuente de contaminación para la leche que se obtiene en muestras fincas, pero es necesario investigar más este aspecto para que esta hipótesis pueda ser sustentada.

Aunque las especies aisladas no se utilizan para la elaboración de productos lácteos fermentados pudieran ser utilizadas como “starters” para la fermentación de vegetales, ensilaje de consumo animal, carne y productos cárnicos (Shillinger y Lücke, 1989; Buckenhüskes, 1993; Cintas-Izarra y Casaus-Lara, 1998) y adicionalmente, todas son consideradas especies probióticas (Amores y col., 2004; Gómez-Treviño y Jiménez-Salas, 2003; De Vuyst, 2000; González-Martínez).

2. Caracterización de las especies de *Lactobacillus*. Cualidades tecnológicas

2.1 Capacidad acidificante en leche

Como se indicó, especies bacterianas como *L. plantarum*, *L. paracasei* ssp *paracasei*, *Lactobacillus pentosus* y *L. brevis* se han descrito como NSLAB en quesos madurados y

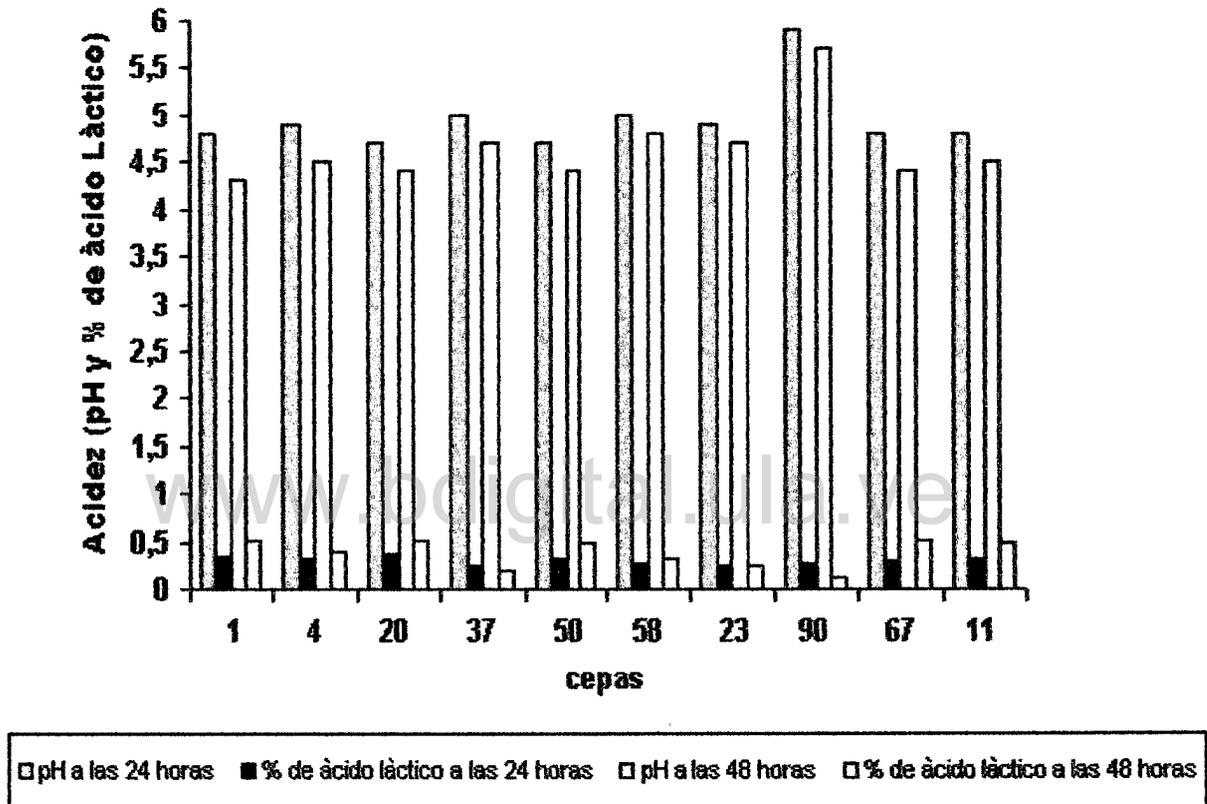


Figura 1. Acidificación de los lactobacilos en leche descremada

contribuyen al desarrollo del “flavor” de estos productos debido a la producción de ácidos orgánicos especialmente ácido láctico y otras moléculas (Fitzsimons, 1999; Durlu-Ozkaya y col., 2001; Coeuret, 2003).

Las gramíneas son ricas en glúcidos fermentables tales como glucosa, fructosa y a veces sacarosa (Bourgeois y Larpent, 1995), y las bacterias epifitas de estas plantas deben poseer la maquinaria catabólica para aprovechar esos azúcares y aunque la leche es un sustrato muy nutritivo para muchas bacterias, no lo será para aquellas que no estén adaptadas a ese sustrato; por esa razón cuando se aislaron las cepas estudiadas sólo la 23 creció en leche descremada;

pero cuando fueron repicadas en leche descremada y dejadas por largos períodos de incubación a 37 ° C todas fueron capaces de adaptarse a ese sustrato con acidificación lenta (resultados no mostrados). La cepa 90 produjo poca acidificación en leche a las 24 y 48 horas, el resto de las cepas mostraron en general capacidad acidificadora moderada con producción de ácido láctico que no superó la cantidad de 0,5%. (Figura 1). Esta acidificación lenta es adecuada en la maduración de quesos; en este sentido debe estudiarse la capacidad proteolítica, producción de compuestos de aroma y otras características que permitan evaluar el potencial de estas cepas para ser utilizadas como cultivos adjuntos (NSLAB) en la elaboración de quesos madurados (Coeuret, 2003).

2.2. Capacidad acidificante en Caldo MRS

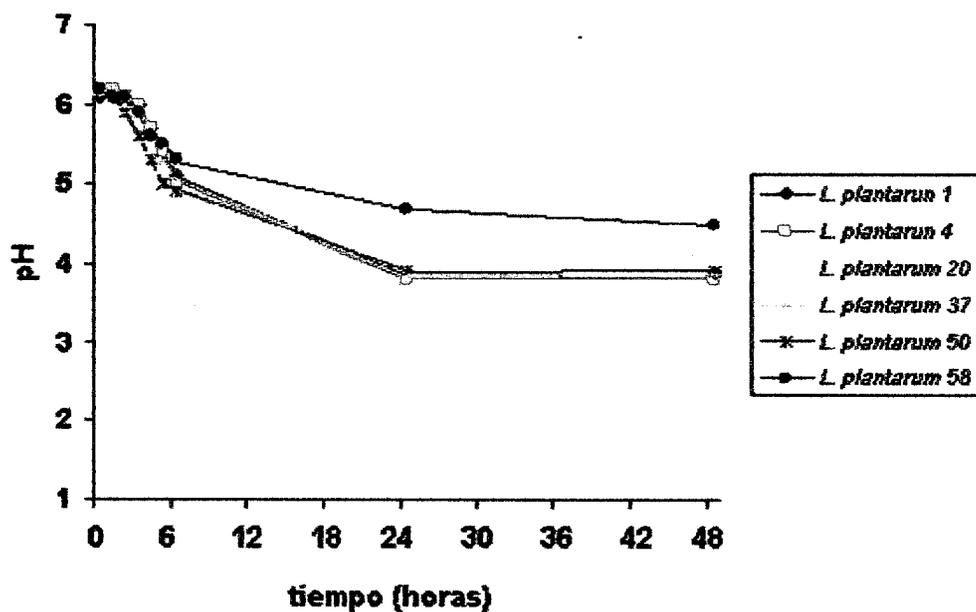
L. plantarum, *L. pentosus* y *L. brevis* son especies que se utilizan como cultivos iniciadores para fermentación de vegetales y productos cárnicos. La principal función de un cultivo iniciador o starter es la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico; que van a influir no solo en las cualidades organolépticas finales del producto, sino también, contribuyen a su seguridad y estabilidad (Van de Gauche, Ehrlich y Maguín, 2001; Shah, 2000; González de Llano, Rodríguez, y Cuesta, 1996), por estas razones es muy importante la evaluación de la capacidad acidificadora de futuros cultivos iniciadores (Morais, 2004).

Las cepas acidificaron moderadamente en leche; pero, el MRS resultó un medio idóneo para evaluar la producción de ácido de las cepas.

Las cepas *L. plantarum* 4, 20, 50, *L. pentosus* (cepa 67) y *L. brevis* (cepa 11) son las mejores acidificadoras porque disminuyeron el pH más rápidamente durante las primeras 6 horas y produjeron más de 1 % de ácido láctico a las 24 horas (figuras 2-5); de hecho, estas curvas son muy similares a la exhibida por una cepa de *L. plantarum* (*L. plantarum* 5s) que mostró cualidades tecnológicas para la producción de ensilaje (Vamanu y col., 2005); adicionalmente; las cepa 20 y 50 son atípicas porque crecen a 45° C, esta característica también puede ser beneficiosa desde el punto de vista tecnológico.

La acidificación producida por *L. plantarum* 4, 20, 50, *L. pentosus* y *L. brevis* puede ser adecuada para la fermentación de vegetales y productos cárnicos, pero, lógicamente debe ensayarse la acidificación en este tipo de sustratos, así como la realización de otras pruebas como evaluación de producción de aminos biógenas, isómeros del ácido láctico, peróxido de

hidrogeno y otras características que permitan establecer claramente el uso tecnológico más apropiado de estas cepas.



www.bdigital.ula.ve

Figura 2. Descenso de pH de las cepas de *L. plantarum* en Caldo MRS

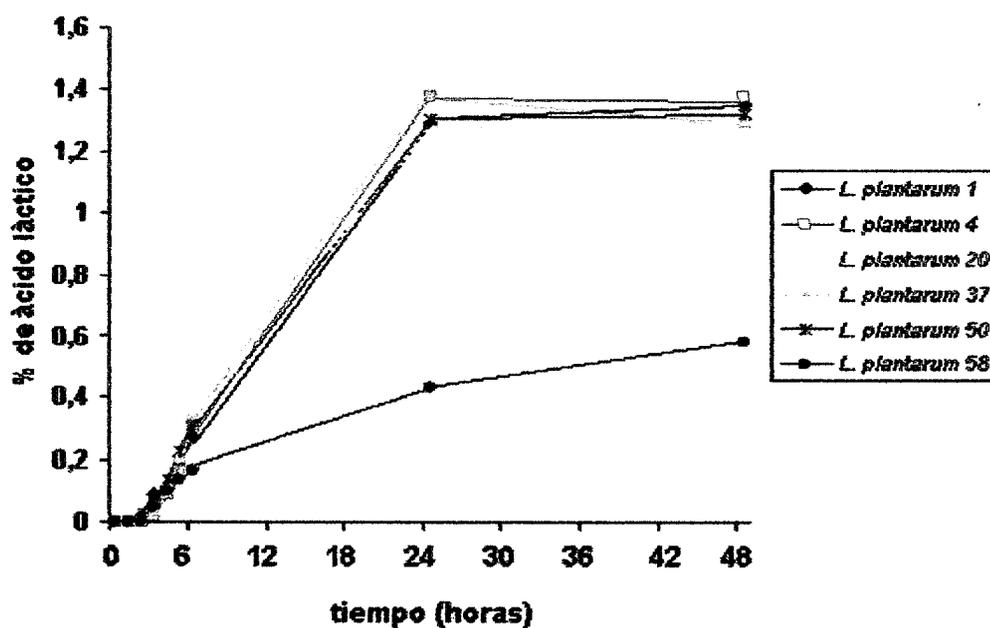


Figura 3. Producción de ácido láctico de las cepas de *L. plantarum* en Caldo MRS

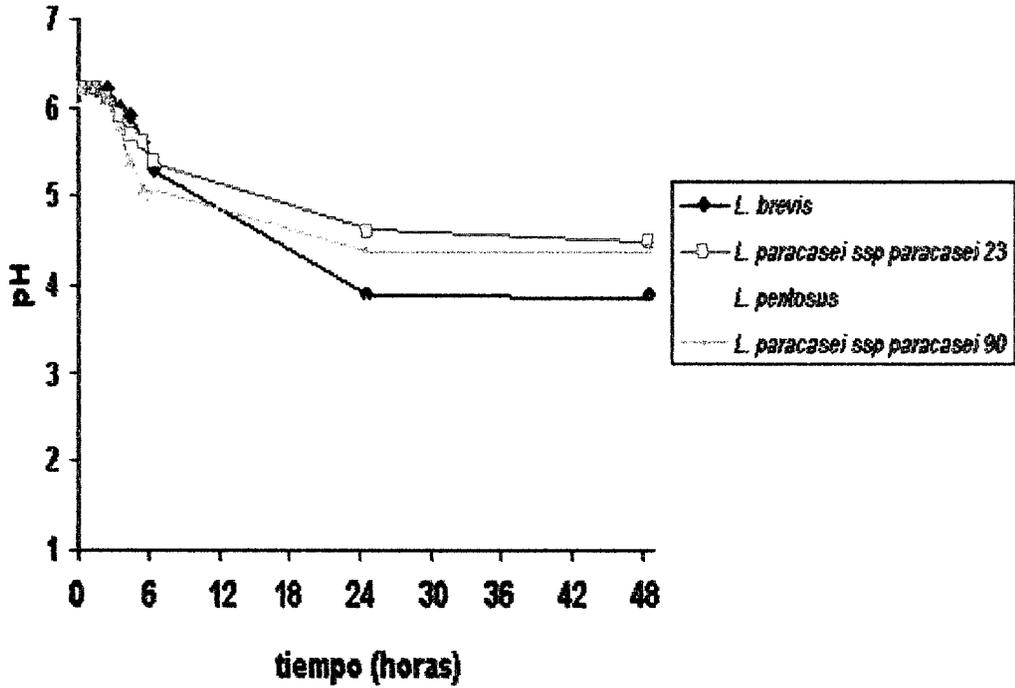


Figura 4. Descenso de pH de las otras especies de lactobacilos en Caldo MRS

www.bdigital.ula.ve

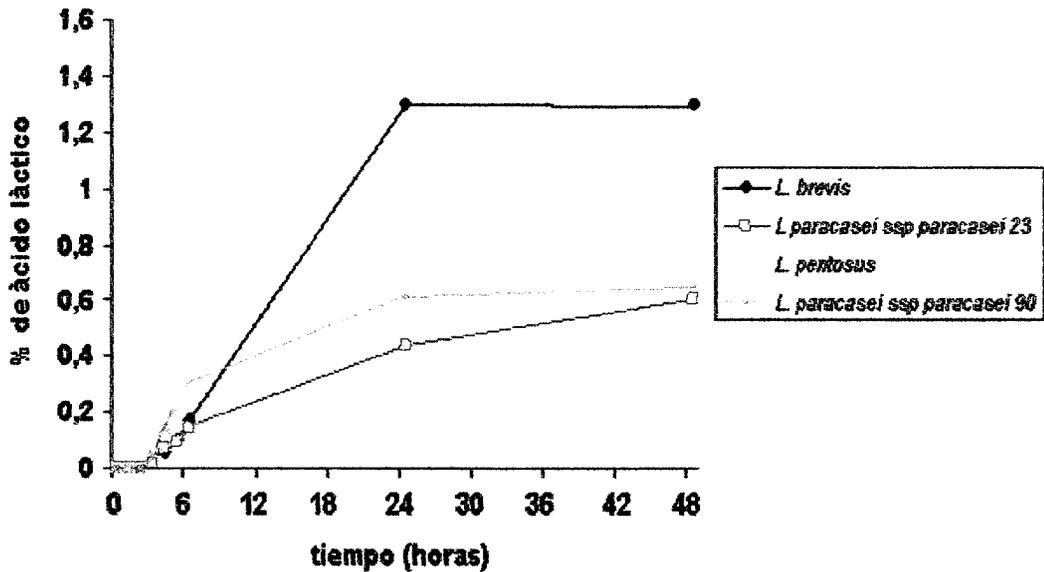


Figura 5. Producción de ácido láctico de las otras especies de lactobacilos en Caldo MRS

3. Sensibilidad a antimicrobianos de los lactobacilos aislados

Uno de los requisitos que deben cumplir las especies bacterianas probióticas es la ausencia de resistencia a antimicrobianos porque debe evitarse el riesgo de que estas cepas puedan transferir genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas o potencialmente patógenas presentes en el tracto gastrointestinal del huésped (Zhoua y col., 2005; Sanz, Collado y Dalmau, 2003), de allí que, en la caracterización y selección de especies con potencialidades probióticas se incluya la evaluación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (Charteris y col., 1998^a).

Las cepas mostraron resistencia a las concentraciones ensayadas de Amikacina y Gentamicina y Ciprofloxacina, mientras que, todas mostraron sensibilidad a Amoxicilina/Ácido clavulánico y Eritromicina (figura 6) con excepción de la cepa *L. paracasei* ssp *paracasei* 23 que mostró resistencia a 15 µg de Eritromicina (Tabla 5).

Tabla 5. Sensibilidad de las cepas de lactobacilos a antimicrobianos

Cepa	Amox/Ac. clav (2:!, 30 µg)	Eritr. (15 µg)	Ciprofloxac. (5 µg)	Amik. (30 µg)	Gentam. (10 µg)
<i>L. plantarum</i> 1	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 4	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 20	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 37	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 50	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 58	S	S	R	R	R
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 23	S	R	R	R	R
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 90	S	S	R	R	R
<i>L. pentosus</i> 67	S	S	R	R	R
<i>L. brevis</i> 11	S	S	R	R	R

Amox/Ac. clav.: Amoxicilina/Ácido clavulánico; Eritr.: Eritromicina; Ciprofloxac.: Ciprofloxacina; Amik.: Amikacina; R: Resistente; S: Sensible; ^b Crecimiento de colonias en el halo de inhibición

Un fenómeno interesante que se observó con la cepa de *L. plantarum* 58 fue el desarrollo de colonias en los halos de inhibición (ver tabla 5 y figura 7); en aislados clínicos estos resultados se interpretan como resistencia heterogénea; esto quiere decir que la cepa porta los genes de resistencia al antibiótico pero no todas las bacterias de la población pueden expresarlos; en estos casos debe reportarse la cepa como resistente (Cavalieri y col., 2005).

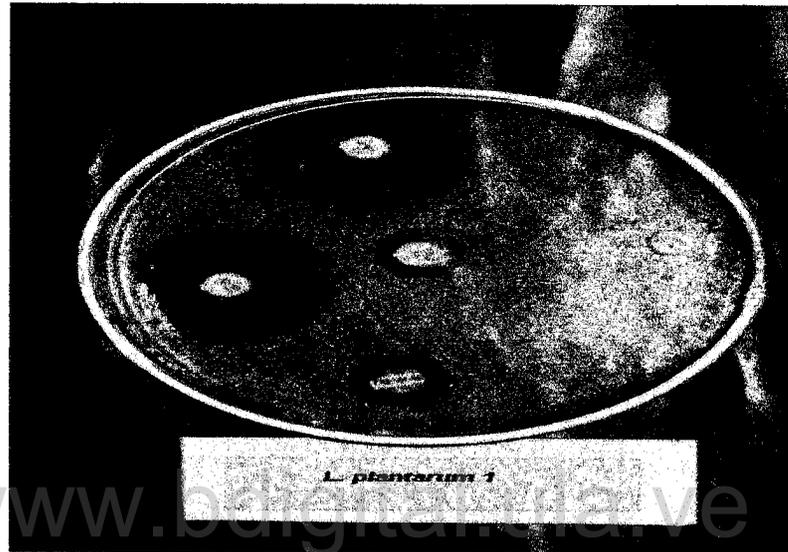


Figura 6. Halos de inhibición observados en los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos

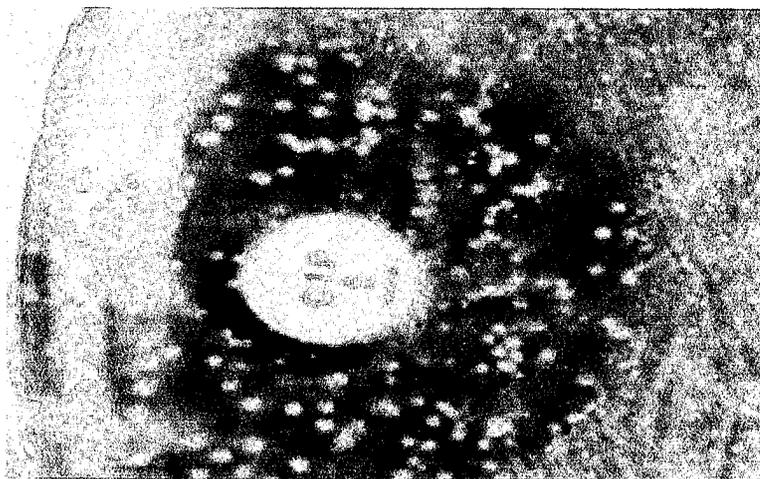


Figura 7. Detalle de colonias de la cepa *L. plantarum* 58 desarrolladas en el halo de inhibición producido por Ciprofloxacina

Se ha reportado la sensibilidad de *Lactobacillus sp* a Penicilina (Danielsen y Wind, 2005, Alvarado, 2000); por lo que no nos extraña que las cepas muestren sensibilidad a la Amoxicilina/Ácido clavulánico que es una combinación de un β -lactámico (del mismo grupo de la Penicilina) con un inhibidor de la β -lactamasa que potencia la acción del antibiótico (CLSI, 2006).

El carácter sensible a Eritromicina observado en los lactobacilos estudiados también se ha descrito en cepas de *Lactobacillus spp* estudiadas por Zarazaga y col. (1999); y en cepas de *L. plantarum* y *L. brevis* aisladas de alcaparra (Pulido y col., 2005).

La resistencia de *Lactobacillus spp* a Ciprofloxacina y Gentamicina y otros aminoglucósidos (como Amikacina) también ha sido reportada (Charteris y col., 1998^b; Mathur y Singh, 2005, Kozlova y col., 1992); en este sentido, se han encontrado cepas de *L. plantarum* resistentes a esos antimicrobianos (Zarazaga y col., 1999; Vamanu y col., 2005; Zohua y col., 2005).

La resistencia de las bacterias a antimicrobianos puede ser natural con poca posibilidad de transmisión o adquirida considerada muy transmisible (Mathur y Singh, 2005). La resistencia de las bacterias lácticas es considerada intrínseca y no transmisible (Zhoua y col., 2005); por ejemplo la resistencia natural de *Lactobacillus* a glicopéptidos (Vancomicina y Teicoplanin) está muy bien documentada (Zarazaga y col., 1999; Pulido y col., 2005; Danielsen y Wind, 2005); sin embargo, algunas especies de lactobacilos como *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. reuteri* pueden vehicular plásmidos R que codifican resistencia a antibióticos tales como Tetraciclina, Eritromicina, Cloranfenicol y Lincomicina (Mathur y Singh, 2005; Zhoua, 2005), pero hay poca referencia en la literatura de la transferencia conjugativa en este género, incluso de plásmidos nativos (Mathur y Singh, 2005)

Era deseable que las cepas estudiadas no mostraran resistencia a ninguno de los antimicrobianos ensayados; pero el hecho de presentar resistencia no quiere decir que deben ser descartadas como potenciales probióticos, deben realizarse estudios para determinar que esa resistencia no sea transmisible.

5. Resistencia a pH 3

La secreción de jugo gástrico en el estómago constituye un mecanismo primario de defensa contra los microorganismos que se ingieren (Dunne y col, 2001); por eso es considerada una

barrera limitante para la su supervivencia (Sanz, Collado y Dalmau, 2003). Por esta razón es uno de los criterios de selección para bacterias de potencial uso probiótico (Shah, 2000; Godward y col., 2000; Lick, Drescher y Heller, 2001).

El pH ensayado afectó la viabilidad de las cepas de manera variable; en las cepas de *L. plantarum* se observaron porcentajes de sobrevivencia altos medios y bajos; los porcentajes altos corresponden a las cepas 20 y 50 y el porcentaje mas bajo lo mostró la cepa 58. La cepa mas resistente a la concentración de ácido ensayada fue *L. paracasei ssp paracasei* porque aparte de sobrevivir un 100 % al tratamiento pudo reproducirse (tabla 6), pero lamentablemente esta cepa fue la única que mostró resistencia a Eritromicina (tabla 5) lo que desfavorece su potencial probiótico.

Los lactobacilos son considerados acidúricos con pH óptimo de crecimiento en el rango 5,5-6,2, y son capaces de crecer a pH inferiores a 5 (Kandler y Weiss, 1986); esto lo logran gracias a mecanismos celulares que les permiten mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad tales como bombas de extracción de protones (Piard, y Desmazeaud, 1991^a), la resistencia a determinada acidez va a depender mucho de la eficiencia de estos mecanismos celulares.

La resistencia a pH 3 se ha observado en especies de lactobacilos (Godward y col., 2000, Suskovic y col., 1997); de hecho, en ensayos realizados para evaluar las cualidades probióticas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis* se encontró que la viabilidad del primero se mantuvo en el mismo orden de magnitud del inóculo después de 3 horas de exposición al medio ácido (Vinderola y col., 2000) como sucedió con 8 de las cepas en estudio. También se han realizado ensayos con mayor acidez (2,5) y tiempos de exposición iguales o menores encontrando los mismos resultados (Jacobsen y col., 1999; Dunne y col, 2001, Bezkorovainy, 2001).

4. Resistencia a 0,3 % de bilis

Las sales biliares son surfactantes químicos producidos en el hígado a partir de un esteroil derivado del colesterol que luego de ser concentradas en un líquido viscoso denominado bilis son liberadas en el duodeno para ayudar a la dispersión y absorción de la grasa consumida en la dieta. Estos ácidos son compuestos muy inhibitorios para muchos microorganismos, y constituyen junto con la acidez producida por el estomago las principales barreras para muchos microorganismos que transitan el tracto gastrointestinal (Bron y col, 2004); por ello, es necesario que las cepas con uso probiótico deben ser capaces de resistir concentraciones de

Tabla 6. Resistencia de los lactobacilos a pH 3

Cepa	Contaje inicial (tiempo 0 horas) (UFC ^a /ml x 10 ⁵)		Contaje final (tiempo 3 horas) (UFC/ml x 10 ⁵)		% de sobrevivencia
	Control	pH 3	Control	pH 3	
	<i>L. plantarum</i> 1	7,0	12	52	
<i>L. plantarum</i> 4	5,4	6,8	32	4,5	66,1
<i>L. plantarum</i> 20	9,1	8,6	74	8,5	98,8
<i>L. plantarum</i> 37	9,8	7,4	76	3,6	48,6
<i>L. plantarum</i> 50	10	9,5	190	9,1	95,7
<i>L. plantarum</i> 58	17	14	120	0,06	0,04
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> .23	12	9,8	44	11	100 ^b
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 90	10	7,0	180	4,4	62,8
<i>L. pentosus</i> 67	13	9,2	82	8,7	58,6
<i>L. brevis</i> 11	5,6	5,4	32	0,2	3,7

^a Unidades formadoras de colonias por mililitro, ^b Supervivencia y crecimiento del inóculo

bilis parecidas a las encontradas en la microecología intestinal.

Todas las cepas, excepto *L. plantarum* 4; mantuvieron su viabilidad en un 100 % luego de ser expuestas por 3 horas a 0,3 % de bilis bovina (tabla 7); estos resultados coinciden con los obtenidos en otras investigaciones de caracterización de lactobacilos como *L. acidophilus* y *L. casei* para fines probióticos (Oh, Kim y Worobo, 2000, Jacobsen y col., 1999, Dunne y col., 2001).

La supervivencia de lactobacilos en presencia de bilis (sobre todo los de origen intestinal) se debe a su capacidad para desconjugar los ácidos biliares (Bezcorovainy, 2001; Dashkevicz y Feighner, 1989); además se afirma que la resistencia a bilis y la habilidad para habitar el tracto gastrointestinal de estos microorganismos parece estar correlacionada (Oh, Kim y Worobo, 2000). Resulta muy interesante que las cepas aisladas de pasto muestren una alta resistencia a

la concentración de bilis ensayada; una posible explicación podría ser que provienen del tracto

Tabla 7. Resistencia de los lactobacilos a 0,3% de Bilis bovina

Cepa	Contaje inicial (tiempo 0 horas) (UFC ^a /ml x 10 ⁵)		Contaje final (tiempo 3 horas) (UFC/ml x 10 ⁵)		% de sobrevivencia
	Control	Bilis	Control	Bilis	
	<i>L. plantarum</i> 1	8,5	8,2	75	
<i>L. plantarum</i> 4	10	7,5	38	4	53,3
<i>L. plantarum</i> 20	5,9	7,1	36	32	100 ^b
<i>L. plantarum</i> 37	8,3	7,3	68	32	100 ^b
<i>L. plantarum</i> 50	11	5,3	210	130	100 ^b
<i>L. plantarum</i> 58	12	12	103	39	100 ^b
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 23	23	11	650	88	100 ^b
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 90	21	17	550	120	100 ^b
<i>L. pentosus</i> 67	9,6	6,3	72	19	100 ^b
<i>L. brevis</i> 11	7,1	6,5	57	19	100 ^b

^a Unidades formadoras de colonias por mililitros, ^b Supervivencia y crecimiento del inóculo

gastrointestinal de las vacas que pacen en el pastizal donde se tomaron las muestras; en todo caso, esto constituye un aspecto a favor de la selección de las mismas como bacterias para potencial uso probiótico.

Aunque las cepas *L. plantarum* 1, 37 y *L. pentosus* mostraron una sensibilidad importante a la acidez ensayada que pudiera desfavorecer su potencial uso probiótico (tabla 5), tienen a su favor la resistencia a bilis, y adicionalmente, si se utilizaran como cultivos probióticos adjuntos en alimentos como quesos posiblemente conservarían una viabilidad adecuada al

llegar al tracto intestinal porque estos alimentos generalmente poseen características como pH alto, consistencia sólida y grasa que les sirve de protección contra las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal (Ross y col., 2002).

Los estudios de la viabilidad de bacterias probióticas en quesos se han realizado generalmente en quesos madurados como Cheddar, Cottage y Gouda; pero también se han realizado y encontrado resultados satisfactorios en queso Fresco Argentino (Vinderola y col., 2000). El consumo de queso en nuestro país es muy popular, razón por la cual, deben aportarse bases científicas que permitan el desarrollo de quesos probióticos utilizando bacterias lácticas probióticas autóctonas como las aisladas en este trabajo de investigación.

6. Efecto antagónico preliminar de los lactobacilos contra patógenos

La capacidad que tienen muchas especies del género *Lactobacillus* y otros géneros bacterianos pertenecientes al grupo de las BAL de producir de manera natural moléculas que ejercen un efecto antagónico contra patógenos tiene importantes aplicaciones. En el campo de las bacterias de uso probiótico se da mucha importancia a este aspecto porque uno de los beneficios que aporta el consumo de bacterias probióticas es el balance de la microbiota intestinal y el control de infecciones intestinales, por esa razón, este aspecto siempre es evaluado a la hora de seleccionar bacterias para uso probiótico (Amores y col, 2004; Dunne y col., 2001)

Otra aplicación importante es en el área de la conservación de alimentos; en la actualidad se está considerando el potencial de las bacterias ácido lácticas y/o sus metabolitos como conservantes naturales o bioconservantes (González-Martínez, Gómez Treviño y Jiménez-Salas, 2003).

Las dos cepas de *Salmonella enteritidis* estudiadas no experimentaron antagonismo por ninguna de las cepas de lactobacilos. El comportamiento de estas dos cepas con el sobrenadante de la cepa *Lactobacillus plantarum* 37 fue inusual debido al desarrollo de halos de inhibición de 12 mm difusos caracterizados por el desarrollo de colonias dentro del halo (figura 8). Se descarta la posibilidad de haber trabajado con un cultivo mixto, porque además de ser evidente cuando se trabaja en medio sólido debido a la diferencia en la morfología de las colonias contaminantes estas colonias “intrahalo” presentaron la misma morfología celular que las cepas indicadoras. En este sentido, Ahn y Stiles (1990) describen también halos

difusos donde no existe clara línea de demarcación del crecimiento de las bacterias indicadoras cuando ensayaron antagonismo de bacterias lácticas aisladas de carne utilizando el método de la gota (en inglés spot). En todo caso estos resultados se consideraron como antagonismo negativo, pero sería interesante evaluar a futuro si se trata de un efecto bacteriostático o si ese efecto puede potenciarse.

La mayoría de inhibición de *S. typhi* y/o *Listeria monocytogenes* producida por los lactobacilos en estudio está relacionada principalmente con la presencia de ácidos orgánicos, tal es el caso de las cepas *L. plantarum* 1, 20, 37, *L. paracasei* ssp *paracasei* 23 y *L. pentosus* 67 (tabla 8). Resultados similares fueron observados cuando se estudió la actividad antagónica de *L. plantarum* SK1 contra *L. monocytogenes* (Wilson, Sigee y Epton, 2005). Cabe señalar que la única cepa de *L. plantarum* que no mostró este tipo de antagonismo fue *L. plantarum* 50.

Los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico constituyen el principal producto del catabolismo de los carbohidratos (González del Llano, Rodríguez y Cuesta, 1996) y contribuyen al descenso de pH creando un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos.

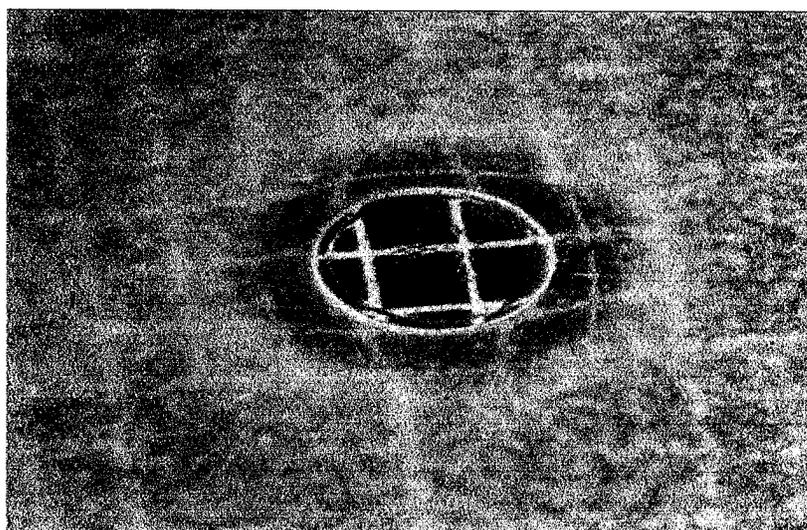


Figura 8. Detalle de halo de inhibición atípico desarrollado por *Salmonella enteritidis* con sobrenadante de la cepa *L. plantarum* 37. La flecha indica colonias “intrahalo”

Tabla 8. Efecto antagónico contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* de sobrenadantes de lactobacilos con diferentes tratamientos

Cepas antagónicas	Diámetro de halo de inhibición (mm)									
	<i>Salmonella typhi</i>					<i>Listeria monocytogenes</i> 497				
	SST	SN	SP	ST	SC	SST	SN	SP	ST	SC
<i>L. plantarum</i> 1	9	0	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 4	0	-	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 20	9	0	-	-	-	10	0	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 37	17	17	17	14	13	11	0			
<i>L. plantarum</i> 50	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 58	0	-	-	-	-	18	18	19	0	18
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> .23	9	0	-	-	-	11	0	-	-	-
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 90	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
<i>L. pentosus</i> 67	9	0	-	-	-	0	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> 11	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

SST: Sobrenadante sin tratamiento; SN: Sobrenadante neutralizado; SP: Sobrenadante tratado con 32 µg/ml Peroxidasa; ST: Sobrenadante tratado con 2 mg/ml de Tripsina; SC: sobrenadante tratado con calor; -: ensayo no realizado

Los efectos perjudiciales de estas moléculas en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana y subsiguiente alteración de la Fuerza Proton Motriz, así como, descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (Cintas , Casaus y Hernández, 2000; Magnusson,2003). El hecho que las cepas *L. plantarum* 50 y 58 y *L. brevis* no mostraran antagonismo por ácidos orgánicos aún cuando el pH de sus sobrenadantes (3,8 y 4,0 respectivamente) fue comparable al de las cepas antagonistas podría explicarse si las cepas

produjeran diferentes tipos de ácidos orgánicos como acético, y fórmico (Carr, Chill y Maida, 2002; González de Llano, Rodríguez y Cuesta, 1996) o si el antagonismo fuera producto de un efecto sinérgico entre ácidos orgánicos o ácidos orgánicos y otras biomoléculas antimicrobianas como bacteriocinas (Piard y Desmazeaud, 1991^a; Niku-Paavola y col., 1999), por ello, se dice que en la mayoría de los casos el antagonismo producido por las BAL es producto de varios factores (Shah, 2000).

El sobrenadante de la cepa *L. plantarum* 37 produjo inhibición en *L. monocytogenes* relacionada con la presencia de ácidos orgánicos, pero la naturaleza de la(s) molécula(s) que causaron inhibición de esta cepa en *S. typhi* no pudo ser determinada claramente con los tratamientos aplicados, aunque se observa una disminución en el efecto cuando el sobrenadante fue tratado con Tripsina y calor lo que pareciera ser compatible con la presencia de molécula(s) de naturaleza proteica (tabla 8).

Las BAL producen péptidos de síntesis ribosomal llamados bacteriocinas; estas biomoléculas tienen un peso molecular entre 3-10 KDa, exhiben un punto isoelectrico alto y contienen un dominio hidrofobo y uno hidrofílico, adicionalmente, son muy diversos en relación a su espectro de actividad (aunque se considera que son activas principalmente contra especies relacionadas a la bacteria productora), propiedades bioquímicas y determinantes genéticos (De Martinis, Alves y Franco, 2002). Las bacteriocinas ejercen su actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglicano (De Martinis, Alves y Franco, 2002; Cintas, Casaus y Hernández, 2000, Piard y Desmazeaud, 1991^b).

Especies de *L. plantarum* pueden producir un considerable número de bacteriocinas tales como Plantaricinas A, B, D, S, T, 1.52 α y 1.52 β (Lash, Mysliwiec y Gourama, 2005; Remiger y col., 1996; Shillinger y Lücke, 1989).

L. plantarum 58 produjo una inhibición importante en *L. monocytogenes* (figura 9); este efecto antagónico se debe a la presencia de molécula(s) de naturaleza proteica estables al calor (tabla 8). Se conoce que la estabilidad al calor y la sensibilidad a Tripsina son características de muchas bacteriocinas de bacterias grampositivas, de hecho, estas características se han observado en péptidos producidos por cepas de *L. plantarum* aisladas de derivados cárnicos y *L. sake* Lb 706 aislado de carne; en ambos casos también se detectó actividad contra *L.*

monocytogenes (Nowroozi, Mirzaii y Morouzi, 2004; Shillinger y Lücke, 1989).

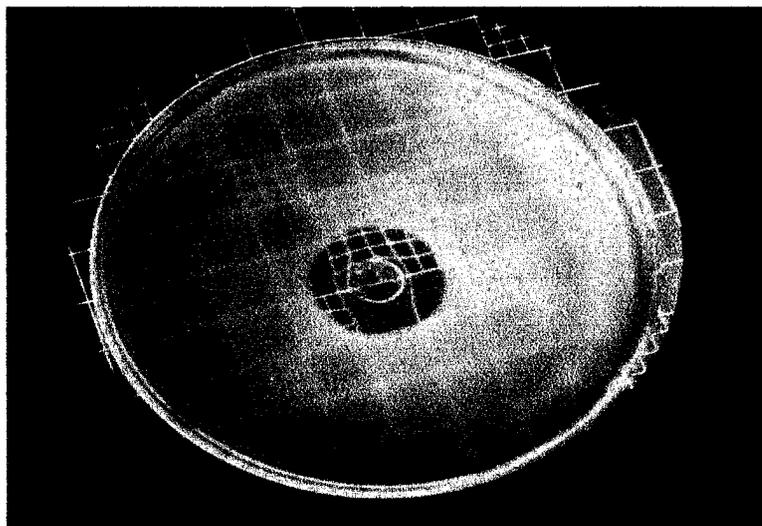


Figura 9. Inhibición de *L. monocytogenes* producida por sobrenadante de *L. plantarum* 58

Aunque los resultados obtenidos con las cepas *L. plantarum* 37 y 58 nos proporcionan evidencias lógicas de que producen compuestos inhibitorios de naturaleza proteica deben realizarse ensayos de antagonismo contra cepas de esta especie u otras especies relacionadas con el fin de tener una base más sólida de que se trata de compuestos inhibitorios de naturaleza proteica parecidos a bacteriocinas.

En un futuro sería también interesante explorar el potencial bioconservante de estas dos cepas porque en la actualidad se considera que las bacteriocinas son los metabolitos más prometedores en este campo (Loessner y col, 2003; Erkkilä, 2001)

CONCLUSIONES

1. La especie de lactobacilo más abundante en el pastizal estudiado fue *L. plantarum*
2. El estudio preliminar del potencial tecnológico y probiótico de 10 cepas aisladas de pastizal de una finca lechera muestra que la cepa *L. plantarum* 20 fue la que mostró mejores potencialidades
3. La cepa *L. plantarum* 58 puede tener uso en el área de la bioconservación de alimentos debido a su capacidad para producir compuestos inhibitorios de naturaleza proteica parecidos a bacteriocinas activos contra *L. monocytogenes*

RECOMENDACIONES

1. La cepa *L. plantarum* 20 mostró potencialidades tecnológicas y probióticas; por lo que se recomienda evaluar aptitudes de cultivos iniciadores fermentadores de vegetales y derivados cárnicos con el fin de establecer claramente el uso que se le va a dar a esta cepa.
2. Las cepas *L. plantarum* 1, 37 y *L. pentosus* 67 mostraron sensibilidad moderada a la acidez probada. Estas cepas pudieran ser utilizadas como cultivos adjuntos probióticos de quesos, y el beneficio sería mutuo: el queso podría mejorar sus características organolépticas y las bacterias estarían protegidas de las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal dentro de la matriz proteica y grasa del queso. En este sentido se recomienda evaluar las aptitudes de cultivos adjuntos (NSLAB) de quesos de estas cepas.
3. Es recomendable evaluar otras aptitudes probióticas de las cepas como adherencia a moco intestinal, producción de isómeros de ácido láctico entre otras, y profundizar las estudiadas (susceptibilidad a antimicrobianos y antagonismo por bacteriocinas) con el objeto de tener mas claras las potencialidades de estas interesantes cepas.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. and Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated Bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.*, **83**, 1946-1951.

Ahn, C. and Stiles, A. (1990). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed meats. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 302-310.

Alvarado, C. (2000). **Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias lácticas de un queso ahumado andino artesanal. Posterior uso como cultivo iniciador.** Tesis de Licenciatura. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias. [En Internet]. Disponible en: http://tesispre.serbi.ula.ve/tede/tde_arquivos/7/TDE-2005-02-15T11:28:10Z-17/Publico/carmencalvarado.pdf

Amores, R., Calvo, A., Maestre, J. y Martínez-Hernández, D. (2004). Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap.*, **17**, 131-139

APHA (American Public Health Association) (1992.). **Compendium of methods for the microbiological examination of food.** Third Edition. Vanderzant, C., and Splittstoesser, D (Eds.). EEUU, Washington : APHA.

Bacteriocinas: caracterización biológica, genética y bioquímica preliminar. Metodología utilizada en investigaciones de la Universidad de Granada. [En Internet]. Disponible en: <http://www.ugr.es/~anpenet/metodologia.html>

Bernet-Camard, F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J., Servin, A. and Hudault, S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance (s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2747-2753.

Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and grown in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 399S-405S.

Bourgeois, C. y Larpent, J. **Microbiología alimentaria** (1994). Vol. II. Traducido por José Antonio Beltrán García. Zaragoza, España: ACRIBIA, SA

Brashears, M., Gilliland, S. and Buck, L. (1998). Bile desconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. **J. Dairy Sci.**, **81**, 2103.

Bron, P., Marco, M., Hoffer, S., Van Mullecon, E., De Vos, W. and Kleerebezem, M. (2004). Genetic characterization in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. **J. Bacteriol.**, **86**, 7829-7835.

Bruno, V., Glikmann, R. e Intorno, G. (2003) Foro internacional electrónico. Producción, aplicación y acción de los cultivos lácticos. FEPALE. Del 6 al 20 de octubre. [En Internet]. Disponible en: <http://www.secnetpro.com/fepale/foro6/foro%20cultivos%20lacteos%20segunda%20parte.doc>

Buckenhüskes, H. (1993). Selection criteria for Lactic Acid bacteria to be used as starter cultures for varios foods comodites. **FEMS Microbiol. Rev.**, **12**, 253-272.

Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., Ohmomo S., Kumai, S and Nakase T. (1998). Influence of *Lactobacillus* spp from an inoculant and of *Weisella* and *Leuconostoc* spp from forage crops on silage fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**, 2982-2987

Carr, F., Chill, D. and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. **Crit. Rev. Microbiol.**, **28**, 281-370.

Cavaleri, S., Harbeck, R., Mc Carter, y., Ortez, j., Rankin, I., Saitter, R., Sharp, S. y Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Editora coordinadora: Marie Coyle. [En Internet]. Disponible en: http://www.paho.org/spanish/ad/thse/ev/labs_sucep_antimicro.pdf

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. and Collins, J. (1998^a). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Letters. Appl. Microbiol.**, 26, 333-337.

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. and Collins, J. (1998^b). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. Food Prot.**, 61, 1636-1643.

Cintas-Izarra, L. y Casaus-Lara, P. (1998). La necesidad de conservar los alimentos. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, diciembre, 89-93.

Cintas, L., Casaus, P. y Hernández. (2000). Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas (I). **Alimentación, Equipos y Tecnología**, Julio-Agosto,(6), 83-90.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). **Performance standards for antimicrobials susceptibility testing; sixteenth informational document. M100-S16**, Vol. 26, Nº 3.

www.bdigital.ula.ve

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeu, M., Gueguen, M. and Vernoux, J. (2003). Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheese and others dairy product. **Lait**, 83, 269-306

Coconnier, M., Lievin, V., Hemery, E. and Servin, A. (1998). Antagonist activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64 4573-4580.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) (1997). Norma 658:97 **Leche y sus derivados. Determinación de la acidez titulable**. Caracas, Venezuela: Ministerio de Fomento.

Danner., H., Holzer, M., Mayrhuber, E. and Braum, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69, 562-567.

Danielsen, M. and Wild, A. (2005). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International J. Food Microbiol.*, **82**, 1-11. [En Internet]. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T7K-46G4R3N-1-&_cdi=5061&_user=878642&_orig=search&_coverDate=04%2F15%2F2003&_qd=1&_sk=99179998&_view=c&_alid=448948728&_rdoc=1&_wchp=dGLbVlz-zSkWb&_md5=5c4edba499c2bea7a959d52ee8c9eccd&_ie=/sdarticle.pdf

Dashkevicz, M. and Feighner, S. (1989). Development of a differential medium for bile salt hidrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 11-16

Dave, R. and Shah. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.*, **79**, 1529-1536.

De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. and Gobbetti, M. (2001). Characterization of non starters lactic acid bacteria from Italian Ewe Cheese based on phenotypics, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2011-2020.

De Man, J., Rogosa, M. and Sharpe, M. (1960) . A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* , **23**, 130-135.

De Martinis, E., Alves, V. y Franco, B. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria in the meat products. *Food Rev. International*, **18**, 191-208.

De Rodríguez, B. y Martín, E. (1980). *Análisis de los alimentos*. Tomo I. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela- Organización de Bienestar Estudiantil.

De Vuyst, L. (2000). Technological aspects related to the application of functional starters cultures. *Food Technol. Biotechnol.*, **38**, 105-112.

Díaz, C. (1992). **Bacterias lácticas en leche cruda de vaca del estado Mérida**. Trabajo presentado en el III Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos “Dr. Josefina Gómez Ruiz”. Montevideo. Uruguay, 29 de noviembre al 5 de diciembre.

Díaz, C. (2000). **Microbiología de la Leche y de los Productos Lácteos**. Volumen I. Mérida, Venezuela: Editorial Venezolana C. A.

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., Shanahan, F., and Collins, K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*; 73(suppl), 386S–92S.

Durlu-Ozcaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 861-870.

Elmadfa, I., Heinzle, C., Majchrzak, D. and Foissy, H. (2001). Influence of a probiotic yogurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in healthy adult human. *Ann. Nut. Metab.* 45, 13-18.

Ennahar, S., Cai, Y. and Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 444-451.

Euzéby, J. **List of probiotic names with standing in nomenclature**. (2006) Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire. En Internet]. Disponible en: <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>

Erkkilä, S. (2001). **Bioprotective and probiotic meat starter cultures for the fermentation of dry sausage**. Academic dissertation. Department of Food Technology. University of Helsinki. [En Internet]. Disponible en: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/elint/vk/erkkila/bioprote.pdf>

Frank, J. and Hassan, A. (1998). **Starters cultures and their use**. In: Elmer, M. and Steele, J. (Eds). *Applied Dairy Microbiology*. New York, USA: Marcel Dekker, INC.

Fitzsimons, N., Cogan, T., Condon, S. and Beresford. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starters lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3418-3426.

García-Rojas, C. (1990). **Análisis microbiológico de los alimentos**. España: EDITORIAL CIENCIA 3 S.A.

Godward, B., Sultana, K., Kaillasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R and Reynolds, N. (2000). The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*, **55**, 441-445.

Gómez-Daza. (2005). **Los Probióticos. Una alternativa en el tratamiento de enfermedades**. [En Internet]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>

González de Llano, Rodríguez, A. y Cuesta, P. (1996). Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 570-576

González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *RESPYN*, **4**, (2). [En Internet]. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

Guerrero, L., Muset, G. y Pacheco, L. (1997). Evaluación de las actividades enzimáticas de cultivos comerciales usados para la elaboración de quesos. *Revista Científica, FCV-LUZ*, **VII**, 209-214.

Haddadin, M., Awaisheh, S. and Robinson, R. (2004). The production of yoghurt with probiotic bacteria isolated from infants in Jordan. **Pak J. Nutr.**, **3**, 290-293

Hamilton- Miller, J. and Gibson, G. (1999). Nutrition discussion forum. **Br. J. Nutr.**, **82**, 73-75

Haynes, I., and Playne, M. (2002). Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. **Aust. J. Dairy Technol.**, **51**, 10-18.

Herrero, M., González, B., and Suárez, J. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. **J. Appl. Bacteriol.**, **81**, 565-570.

Jacobsen, C., Resenfeldt, N., Hayford, A., Moller, P., Michaelsen, K., Paerregard, A., Sandström, B., Tvede, m. and Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activity of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five select strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**, 4949-4956.

Kanga, P. and Kanga, P. (1988). Isolation and identification of the predominant lactobacilli in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and Guatemala grass (*Tripsacum laxum*) silage from Bambui, Cameroon. **Word J. Microbiol. Biotechnol.**, **4**, 209-213. [En Internet]. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/t5nu3037x564q373/>

Kashet, E. (1987). Bioenergetys of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiol. Rev.**, **46**, 223-244.

Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In P.H. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. (Vol. 2). Baltimore, USA: Williams & Wilkins.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O., Leer, R., Turchini, R., Peters, S., Sandbrink, H., Fiers, M., Stiekema, W., Lankhorst, K., Brom, P., Hoffers, S., Nierop, M., Kerkhoven, R., De Vris, M., Ursing, B., De Vos, W. and Siezen, R. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. (2003). **PNAS On Line**, 100 (2). [En Internet]. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/100/4/1990>

Koneman, E., Stephen, D., Janda, W., Schereckenberger, P. and Winn, W. (2003). **Diagnóstico Microbiológico**. 5^{ta} Edición. Colombia, Bogotá: Editorial Panamericana.

Kozlova, E., Pivovarenko, T., Milinovskaja, I., Aminov, R., Kovalenko, N. y Voronin, a. (1992). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. **Antibiot. Khimioter.**, 37, 12-5. [En Internet] Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1417335&dopt=Abstract

Lash, B., Mysliwiec, T. y Gourama, H. (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014). **Food Microbiol.**, 22, 199-204

Leisner, J., Pot, B., Christensen, H., Rusul, G., Olsen, J., Whah Wee, B., Muhamad, K. and Ghazali, M. (1999). Identification of lactic acid bacteria from Chili Bo, a malasian food ingrediente. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, 599-605.

Lick, S., Drescher, K. and Heller, J. Survival of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. (2001). **Appl. Environ. Microbiol.**, 67, (9), 4137-4143.

Lièvin, V., Peiffer, L., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. and Servin, A. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut**, 46, 646-652. En Internet]. Disponible en: <http://gut.bmj.com/cgi/reprint/47/5/646>

Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S. and Sherer, s. (2003). A Pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Appl. Environ. Microbiol.**, **69**, 1854-1857.

López, S. y Mayo, B. (1997). Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheese. **Letters Appl. Microbiol.**, **25**, 233-238.

Macedo, M. (2002^a). El yogurt: un alimento funcional. **Nutr. Clín.**, **5**, 172-81

Macedo, M. (2002^b). Los alimentos funcionales: Un reto para el siglo XXI. **Nutr. Clín.**, **5**, 121-122

Mc Faddin, J. (2004). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. 3era Edición. Argentina: EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA

Magnusson, J. (2003). **Antifungal activite of Lactic Acid Bacteria**. (2003). Disertación doctoral. En Internet. Disponible en: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000247/01/jmslmy.pdf>

Mathur, S. and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. **Int. J. Food Microbiol.**, **105**, 281-291.

Maturin, L. and Peeler J. (1998). Aerobic plate count. **Bacteriological analytical manual**. (8th ed., revision A) (pp 3.01-3.10) Madison: Asociación of Official Analytical Chemists (AOAC International)

Meydani, S. and Ha, W. (2000). Immunology effect of yogurt. **Am. J. Clin. Nutr.**, **71**, 861-871.

Morais, J. (2004). **Estudio de la adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso**. Tesis Doctoral. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona.

Niku- Paalova, M., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, a. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microbiol.**, **86**, 29-35.

Nowroozi, J., Mirzaii, M. and Morouzi, M. (2004). Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. **Iranian J. Publ. Health**, **33**, 1-7.

Oh, S., Kim, H. and Worobo. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. **J. Dairy Sci.**, **83**, 2747-2752.

Oude-Elferink, S., Driehuis, F., Gottshal, J. y Spolestra, S. (2005) **Estudio 2.0 - Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación**. Depósito de documentos de la FAO. [En Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s04.htm>

Parodi, P. (1999). The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. **Aust. J. Dairy Technol.**, **54** (2), 103-121.

Piard, J. y Desmazeaud, M. (1991^a). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Lait**, **71**, 525-541.

Piard, J. y Desmazeaud, M. (1991^b). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and others antibacterial substances. **Lait**, **72**, 113-142.

Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (1999). **Microbiología**. (4ta ED). Madrid, España: MC GRAW-HILL-INTERAMERICANA.

Pulido, R., Omar, N., Lucas, R., Abriouel, H., Camero, M. y Gálvez, A. (2005). Resistance to antimicrobial agents in lactobacilli isolated from caper fermentation. **Antoine Leeuwenhoek**, **88**, 277-281. [En Internet]. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/y5785qg9wq72u161/>

Remiger, A., Eijsink, V., Ehrmann, M., Sletten, K., Nes, I. and Vogel, R. (1996). Purification and partial amino acid sequence of Plantaricin 1.52 α and 1.52 β , two bacteriocins produced by *L. plantarum* TMW1.25. **Appl. Environ. Microbiol.**, **86**, 1053-1058.

Ross, R., Fitzgerald, G., Collins, K. and Staton, C. (2002). Cheese delivering biocultures.- probiotic cheese. **Aust. J. Dairy Technol.**, **57**, 71-78.

Salas, E. (2004). **Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso no pasteurizado elaborado en forma artesanal**. Tesis de Maestría no publicada. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia.

Sanz, Y., Collado, M. y Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. **Act. Pediátrica. Esp.**, **61**, 476-482.

Savadogo, A., Ouattara, Ch., Bassole, I. and Traore, A. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. **Pak. J. Nutr.**, **3**, 174-179.

Shah, N. (2000). SYMPOSIUM: PROBIOTIC BACTERIA. Probiotic Bacteria: Selective enumeration in dairy foods. **J. Dairy Sci.**, **83**, 894-907.

Schillinger, U. and Lücke, F. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55**, 1901-1906.

Sillanpää, J. (2001). **Tissue adherence in lactic acid bacteria: Identification and characterization of the collagen-binding-layer protein of *Lactobacillus crispatus***.

Academic dissertation in General Microbiology. Departamento of Biosciences. Division of General Microbiology Universidad de Helsinki. [En Internet]. Disponible en: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/bioti/vk/sillanpaa/tissuead.pdf>

Sparo, M. and Mallo, R. (2001). Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. *Rev. Argent. Microbiol.*, 32, 75-80. [En Internet]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11494759&dopt=Abstract

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. and Ross, R. Market potential of probiotic. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, (2Suppl) 476s-483S.

Ström, K. (2005). **Fungal Inhibitory lactic acid bacteria. Characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393.** Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. [En Internet]. Disponible en: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000802/01/avhandlingstrom.pdf>

Suskovic, B., Brkic, S. and Maric, V. (1997). *Lactobacillus acipophilus* M92 as potential probiotic strains. *Milchwissenschaft*, 52, 430-435.

Tagg, J. and McGiven, R. (1971). Assay System for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 21: 34.

Talwalkar, A and Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotics yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.*, 3, 117-123.

Tamime, A. y Robinson, R. (1991). **Yogurt ciencia y tecnología.** (M. C. Díaz-Villegas y A. R. Sánchez-Arévalo, Trads.). Zaragoza, España: Acribia, S. A.

Vamanu. E., Vamanu, A., Ovidiu. P, and Câmpeanu G (2005). Isolation of a *Lactobacillus*

plantarum strain used for the preservation of fodders. **African J. Biotechnol.**, 4, 404-408. En Internet]. Disponible en:

<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2005/May/Emanuel%20et%20al.pdf>

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. and Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. **J. Applied Microbiol.** 91, 147-153

Vinderola, C., Prosello, W., Ghiberto, D. and Reinheimer, J. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. **J. Dairy Sci.**, 83, 1905-1911.

Wilson, A., Sigee, D. and Epton, H. (2005). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. **J. Appl. Microbiol.**, 99, 1516-1522.

Zarazaga, M., Sáenz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., Del Campo, R., Baquero, F. and Torres, C. (1999). In Vitro Activities of Ketolide HMR3647, Macrolides, and Other Antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* Isolates. **Antimicrob. Agents and Chemoter.**, 43, 3039-3041. En Internet]. Disponible en: <http://aac.asm.org/cgi/content/full/43/12/3039>

Zhoua, J., Pillidgec, B., Golpacl, P. and Gill, H. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, 2, 211-217.