



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 COMO
PROBIÓTICO POTENCIAL MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO* Y SU EVALUACIÓN
COMPARATIVA CON *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Ricardo Ceron Rosiles

Tutor Principal:

Dra. Adriana Llorente Bousquets
UNAM, FES-C

Comité Tutor:

Dra. Ofelia Mora Izaguirre
UNAM, FES-C

Dra. Leonor Sanginés García

Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F

JUNIO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Padres.

Sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.

Cruz Ceron Silva

Gracias papá por siempre darme tu amor desinteresado, aunque haya cometido errores y me haya equivocado muchas veces tu siempre me diste tu apoyo y ayuda, siempre confiando en mí en momentos en los que yo no lo hice.

Eres el mejor papá que puede existir, espero que las experiencias obtenidas durante el trabajo realizado en los estudios de Maestría y el logro de finalizarlos me acerque un poco más a parecerme a ti.

Quiero decirte que te dedico este trabajo porque cada uno de los días de mi vida me ha guiado tu esfuerzo diario, tu empeño, tus fuerzas y por la gran enseñanza de vida de nunca rendirme y salir adelante con mi cabeza, gran parte de este logro es tuyo también, la idea de lograr parecerme a ti es lo que me ha impulsado día a día para cumplir esta meta.

Sé que aún me falta mucho y quiero decirte que me gusta saber que estas junto a mí para no desviarme de mi camino.

Maria Angelica Rosiles Espinoza

Mamá, te dedico el trabajo realizado durante mis estudios de Maestría por todo el esfuerzo y sacrificio que has pasado por mí, por otorgarme la compañía de la persona más noble que conozco, por transmitirme tu amor, comprensión y apoyo incondicional.

Gracias mamá por estar pendiente de mí durante la realización de este trabajo y en toda mi vida, sabes que tú has sido mi pilar y escuela de emociones.

Te debo el ser una persona honesta y sincera, gracias a estos valores transmitidos por ti he podido tener la frente en alto siempre, ya que aunque el mundo gire, nadie puede verme a la cara y tacharme de tramposo o malintencionado.

Durante los dos años de los estudios de Maestría aprecie mucho tus enseñanzas, conseguir las cosas por mí mismo, no pedir ni hacer que las cosas me sean facilitadas y hacer valer mi esfuerzo han sido cosas que me han llenado de orgullo y te las debo a ti.

*Siempre trabajar duro, ser honesto y estar orgulloso de lo que eres
porque el valor de un trabajo o persona se lo da uno mismo*

AGRADECIMIENTOS

El autor de la presente, agradece:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una vez más la oportunidad de ser un individuo de una clase privilegiada y permitirme ser parte de la máxima casa de estudios en nuestro país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme apoyado económicamente durante el periodo de estudios de maestría a través de la beca con número de registro 446978.

Se agradece también al programa PAPIIT IT202312-3 por el apoyo otorgado para el financiamiento del trabajo realizado.

Un especial agradecimiento a la Dra. Adriana Llorente Bousquets por haber depositado en mí su confianza para ingresar a posgrado, por sus consejos, instrucciones y atenciones en la realización de este trabajo, contribuyendo así con el aprendizaje y fortalecimiento de la persona que soy.

A mi Comité Tutor: Dra. Ofelia Mora Izaguirre y Dra. Leonor Sanginés García, el contar con personas con un horizonte tan amplio en el campo de la investigación, lograron orientar este trabajo a la mejor forma de realizarse, por abrir mis ojos ante innumerables y desconocidas posibilidades y por poner a mi alcance herramientas que lograron fortalecerme como alumno, investigador, pero sobre todo, gracias por motivar mi pundonor.

A los Doctores Gerardo Mariscal Landín (CENID-Fisiología, INIFAP) y José Antonio Rentería Flores (AMENA), por su gentileza y disposición, por brindarme la oportunidad de aprender de ustedes no solo académicamente, también por reforzarme la idea de que el compartir el conocimiento sin tener obligación caracteriza a los más grandes maestros.

Doctor Francisco Montiel Sosa y a la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza, por brindarme la confianza, conocimientos, tiempo y facilitarme lo necesario para realizar las pruebas de

Identificación por técnicas moleculares, gracias a su amabilidad y disposición de apoyo fue posible la realización de una parte importante del presente trabajo.

Con mucho cariño, a los amigos y compañeros que encontré dentro y fuera del laboratorio 7 de la UIM, quienes han estado muy próximos a mí a lo largo de este periodo de formación, su compañía y amistad logró que el camino para alcanzar esta meta fuese inmejorable.

Idalia, tu complicidad y confianza ha llenado mis días en el laboratorio de alegría, misteriosa y afortunadamente todo conspiró para que dos personas tan raras como tú y yo se encontraran y sin remedio se volvieran amigos de esos que no se separarán, tu apoyo, sinceridad, amabilidad y cariño evitaron muchas veces el que bajara las manos, tus consejos y singular personalidad son invaluableles.

Adrianita, como agradecerte tantos detalles y motivaciones para seguir adelante, el acompañarme en este proceso con esos peculiares golpes de honestidad que nos familiarizan han hecho que seas parte de las personas que considero amigos verdaderos, gracias por la oportunidad de convivir contigo, por todas esos días llenos de risas y alegrías, por revivir junto a mí e impulsarnos a seguir con simplemente un rico café, eres una agradable sorpresa y sabes que te deseo lo mejor.

Tania, Betty, Patxy, gracias por esos excelentes momentos de esparcimiento, no puede describirse cuanto ayudaron para aligerar el camino, evitar la frustración y reactivar las ganas de seguir adelante.

Al Jurado de esta tesis, también hago extensivo el agradecimiento por haber asumido la importante tarea de la corrección perfeccionamiento de este trabajo.

Ricardo Ceron Rosiles

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
INTRODUCCIÓN	- 3 -
I. REVISIÓN DE LITERATURA	- 7 -
1.1. Probióticos.....	- 8 -
1.1.1. Definición	- 8 -
1.1.2. Contexto histórico de los probióticos.....	- 8 -
1.2. Efectos benéficos asociados al uso de probióticos	- 10 -
1.2.1. Sobre patógenos	- 10 -
1.2.2. Inmunológicos.....	- 12 -
1.2.3. Efectos nutricionales	- 20 -
1.3. Diversos usos de probióticos como bioterapia	- 21 -
1.3.1. Tolerancia oral	- 21 -
1.3.2. En alergias y enfermedades autoinmunes.....	- 22 -
1.3.3. Empleo como vacunas o coadyuvantes	- 22 -
1.3.4. Prevención de neoplasias	- 23 -
1.3.5. Enfermedades cardiovasculares	- 23 -
1.3.6. Mejoramiento de parámetros productivos	- 24 -
1.4. Criterios para la evaluación de microorganismos probióticos	- 25 -
1.4.1. Identificación del género y especie de la cepa.....	- 25 -

1.4.2.	Caracterización biológica	- 26 -
1.4.3.	Seguridad	- 26 -
1.4.4.	Estudios <i>in vitro</i> para la selección de probióticos.....	- 26 -
1.5.	Principales microorganismos empleados como probióticos	- 27 -
1.5.1.	Bacterias ácido lácticas.....	- 27 -
1.6.	Condiciones gastrointestinales de los animales domésticos monogástricos	- 32 -
1.6.1.	Condiciones gástricas	- 32 -
1.6.2.	Condiciones duodenales	- 32 -
HIPÓTESIS	- 34 -
OBJETIVOS	- 34 -
II. MATERIALES Y MÉTODOS	- 35 -
2.1	Mantenimiento de las cepas (crioconservación).....	- 36 -
2.1.1	Materiales:	- 36 -
2.1.2	Método:	- 36 -
2.2	Reactivación de las cepas crioconservadas	- 38 -
2.3	Objetivo Particular 1. Verificar la identidad de las cepa de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	- 38 -
2.3.1	Materiales:	- 38 -
2.3.2	Método:	- 38 -
2.3.2.1	Extracción de ADN cromosomal	- 38 -
2.3.3	Identificación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	- 40 -
2.3.4	Identificación de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.....	- 43 -
2.3.5	Electroforesis de los productos de la amplificación.....	- 46 -
2.4	Objetivo Particular 2. Valoración de la actividad hemolítica	- 47 -
2.4.1	Material:	- 47 -

2.4.2	Método:	- 47 -
2.5	Objetivo Particular 3. Valoración de la susceptibilidad a antibióticos	- 49 -
2.5.1	Materiales:	- 49 -
2.5.2	Método:	- 50 -
2.6	Objetivo Particular 4. Determinar <i>in vitro</i> la tolerancia de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 mediante la simulación de las condiciones gástricas e intestinales.	- 52 -
2.6.1	Preparación de las suspensiones bacterianas empleadas en las pruebas de tolerancia.....	- 52 -
2.6.2	Materiales	- 52 -
2.6.3	Tolerancia al medio gástrico.....	- 54 -
2.6.3.1	Preparación de jugo gástrico simulado.....	- 54 -
2.6.3.2	Método:.....	- 54 -
2.6.3.3	Análisis estadístico de la tolerancia al medio gástrico:.....	- 55 -
2.6.4	Tolerancia al medio Intestinal aislado.....	- 55 -
2.6.4.1	Preparación del jugo intestinal simulado.....	- 56 -
2.6.4.2	Método:.....	- 56 -
2.6.4.3	Análisis estadístico de la tolerancia al medio intestinal:	- 56 -
2.6.5	Tolerancia al Tracto Gastrointestinal	- 58 -
2.6.5.1	Método:.....	- 58 -
2.6.5.2	Análisis estadístico de la tolerancia al tracto gastrointestinal:	- 59 -
2.7	Objetivo Particular 5. Determinación de Adherencia a <i>mucus</i>	- 60 -
2.7.1	Materiales:	- 60 -
2.7.2	Método:	- 60 -
III.	RESULTADOS	- 63 -

3.1.	Verificación de la identidad de las cepas de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 y de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.....	- 64 -
3.1.1.	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	- 64 -
3.1.2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.....	- 66 -
3.2.	Valoración de la actividad hemolítica.....	- 69 -
3.3.	Valoración de la susceptibilidad a antibióticos	- 71 -
3.4.	Determinación <i>in vitro</i> de la tolerancia de las cepas de estudio a los medios gástrico e intestinal	- 73 -
3.4.1.	Tolerancia al medio gástrico.....	- 73 -
3.4.2.	Tolerancia al medio Intestinal.....	- 77 -
3.4.3.	Tolerancia al tránsito gastrointestinal	- 80 -
3.5.	Determinación de la adherencia a <i>mucus</i>	- 84 -
IV.	DISCUSIÓN.....	- 86 -
4.1.	Verificación de la identidad de las cepas de estudio.....	- 87 -
4.1.1.	<i>Pediococcus acidilactici</i>	- 88 -
4.1.2.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	- 88 -
4.2.	Valoración de la actividad hemolítica.....	- 89 -
4.3.	Susceptibilidad a antibióticos	- 90 -
4.4.	Tolerancia al tracto gastrointestinal.....	- 91 -
4.5.	Adherencia a <i>mucus</i>	- 93 -
V.	CONCLUSIONES	- 95 -
	RECOMENDACIONES	- 98 -
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 100 -

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de los <i>primers</i> utilizados en la identificación de <i>P. acidilactici</i> por PCR...	40 -
Cuadro 2. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación de <i>P. acidilactici</i>	41 -
Cuadro 3. Secuencia de los <i>primers</i> utilizados en la identificación de <i>L. plantarum</i> por PCR....	43 -
Cuadro 4. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación del género <i>Lactobacillus</i>	44 -
Cuadro 5. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación de la especie <i>plantarum</i> .	45 -
Cuadro 6. Formulación de agar sangre.....	47 -
Cuadro 7. Antibióticos y concentración empleada en la prueba de susceptibilidad/resistencia ...	49 -
Cuadro 8. Formulación de Solución Salina 0.5%	53 -
Cuadro 9. Formulación de Buffer PBS	53 -
Cuadro 10. Formulación de Agua Peptonada	53 -
Cuadro 11. Formulación de Buffer carbonato sódico 50 mM·L ⁻¹	60 -
Cuadro 12. Patrón de resistencia o susceptibilidad a antibióticos presentada por <i>Pediococcus acidilactici</i>	72 -
Cuadro 13. Patrón de resistencia o susceptibilidad a antibióticos presentada por <i>Lactobacillus plantarum</i>	72 -
Cuadro 14. Recuento de <i>P. acidilactici</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia gástrica.....	73 -
Cuadro 15. Recuento de <i>L. plantarum</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia gástrica	74 -
Cuadro 16. Tolerancia al medio gástrico (%) de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>	75 -
Cuadro 17. Prueba de múltiple rangos para TMG por tiempo (Tukey)	76 -
Cuadro 18. Recuento de <i>P. acidilactici</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal.....	77 -
Cuadro 19. Recuento de <i>L. plantarum</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal	78 -
Cuadro 20. Tolerancia al medio intestinal (%) de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>	79 -
Cuadro 21. Recuento de <i>P. acidilactici</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal.....	81 -
Cuadro 21. Recuento de <i>L. plantarum</i> (UFC·mL ⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal	82 -
Cuadro 23. TTGI (%) de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>	83 -
Cuadro 20. Adherencia a mucus (Absorbancia a 490 nm) de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>	84 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos benéficos asociados a probióticos.....	10 -
Figura 2. Tipos celulares presentes en el epitelio y lámina propia intestinal	14 -
Figura 3. Tipos de unión intercelular presentes en epitelio intestinal	15 -
Figura 4. Estimulación de células de Paneth y producción-excreción de defensinas	17 -
Figura 5. Integración de defensinas en membrana microbiana y formación de poros.	18 -
Figura 6. Reactivación, análisis de pureza y crio conservación de cultivos Primarios	37 -
Figura 7. Extracción de ADN genómico (Método).....	39 -
Figura 8. Programación del termociclador en la identificación de <i>P. acidilactici</i>	42 -
Figura 9. Programación del termociclador en la identificación del género <i>Lactobacillus</i>	44 -
Figura 10. Programación de termociclador en la identificación de la especie <i>plantarum</i>	46 -
Figura 11. Prueba de capacidad hemolítica (Método).....	48 -
Figura 12. Prueba de resistencia/tolerancia a Antibióticos (Método)	51 -
Figura 13. Diseño de placas en prueba de adherencia.....	61 -
Figura 14. Cultivo de <i>P. acidilactici</i> en agar MRS	64 -
Figura 15. Frotis y tinción de Gram de <i>Pediococcus acidilactici</i>	65 -
Figura 16. Patrón electroforético de los productos de PCR en la identificación de <i>Pediococcus acidilactici</i>	66 -
Figura 17. Cultivo de <i>L. plantarum</i> en agar MRS	67 -
Figura 18. Frotis de <i>L. plantarum</i> (tinción de Gram).....	67 -
Figura 19. Patrón electroforético de los productos de PCR obtenidos en la identificación de <i>Lactobacillus plantarum</i> :	68 -
Figura 20. Cultivo de las cepas de estudio en agar sangre	69 -
Figura 21. Detalle del crecimiento de colonias en agar sangre	70 -
Figura 22. Detalle de zonas de inhibición en prueba de difusión en agar	71 -
Figura 23. Comportamiento de <i>P. acidilactici</i> (UFC•mL-1) en medio gástrico simulado.....	74 -
Figura 24. Comportamiento de <i>L. plantarum</i> (UFC•mL-1) en medio gástrico simulado	75 -
Figura 25. TMG de <i>L. plantarum</i> y <i>P. acidilactici</i>	76 -
Figura 26. Comportamiento de <i>P. acidilactici</i> (UFC•mL-1) en medio gástrico simulado.....	78 -
Figura 27. Comportamiento de <i>L. plantarum</i> (UFC•mL-1) en medio gástrico simulado	79 -
Figura 28. TMI (%) de <i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>	80 -
Figura 29. Comportamiento de <i>P. acidilactici</i> (UFC•mL-1) en la prueba de tolerancia gastrointestinal	81 -

Figura 30. Comportamiento de *L. plantarum* (UFC•mL-1) en la prueba de tolerancia gastrointestinal - 82 -

Figura 31. TTGI de *P. acidilactici* y *L. plantarum* - 83 -

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

6-PG/PK: 6-fosfogluconato/fosfocetolasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

BAL: Bacterias ácido lácticas

BHI: Brain and Heart Infusion

BLIS: bacteriocin-like inhibitory substances

BRET: Bromuro de Etidio

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

A_{600nm}: Absorbancia a 600 nanómetros

EFSA: European Food Security Authority

FAO: Food and Agriculture Organization

GRAS: Generally recognized as safe

h: horas

Ig: Inmunoglobulina

IL: interleucina

L.: *Lactobacillus*

ldh: lactato deshidrogenasa

MAMP: patrones moleculares asociados a proteínas

MRS: Man Rogosa y Sharpe

NK: natural killer

OMS: Organización Mundial de la Salud

P.: *Pediococcus*

PBS: Buffer Fosfato Salino

PBST: Buffer Fosfato Salino adicionado con Tween 20

pH: potencial de Hidrogeniones

spp.: especies

TMG: Tolerancia al Medio Gástrico

TMI: Tolerancia al Medio Intestinal

TTGI: Tolerancia al Tracto Gastrointestinal

UFC·mL⁻¹: Unidades formadoras de colonias por mililitro

var.: variedad

RESUMEN

El empleo de microorganismos probióticos en la alimentación animal permite diversos beneficios, como lograr mejores parámetros productivos y salud animal, evitando el uso indiscriminado de antibióticos. Entre los microorganismos reconocidos como probióticos, se encuentran los miembros de los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium* quienes se engloban dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas. En nuestro grupo de trabajo se ha identificado que la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 quien pertenece al mismo grupo, es capaz de producir diversas sustancias con actividad antibacteriana, sobre bacterias de interés sanitario, como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, por lo que se propuso evaluar su potencial como probiótico y realizar un análisis comparativo con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, aplicando pruebas *in vitro* que permitan evaluar su sobrevivencia en el tracto gastrointestinal, su capacidad de adherencia al mucus intestinal, capacidad hemolítica y resistencia o susceptibilidad a antibióticos empleados en medicina veterinaria. Entre los resultados más sobresalientes hemos detectado que *P. acidilactici* posee una capacidad de adherencia a *mucus* y sobrevivencia al medio gástrico similar a *L. plantarum*, asimismo no son causantes de hemólisis, sin embargo presentan diferencias en cuanto al perfil de resistencia a antibióticos y sobrevivencia al medio intestinal.

ABSTRACT

The use of probiotic microorganisms in food animal allows various benefits, such as achieve better parameters and productive animal health, avoiding the indiscriminate use of antibiotics. Among the microorganisms recognized as probiotics, are members of the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Bifidobacterium* who fall within the group of lactic acid bacteria. In our working group has identified that the strain of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 who belongs to the same group is capable of producing various substances with antibacterial activity, on bacteria of health concerns, such as *E. coli*, *Salmonella* spp. , *Pseudomonas* spp. , *Staphylococcus aureus*, which is proposed to evaluate their potential as probiotic and perform a comparative analysis with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, applying *in vitro* tests to assess their survival in the gastrointestinal tract, its capacity to adherence to intestinal *mucus*, hemolytic capacity and resistance or susceptibility to antibiotics used in veterinary medicine. One of the most salient results we have detected tha *P. acidilactici* has a capacity of adhesion to mucus and survival in the gastric environment similar to *L. plantarum*, also don't cause of hemolysis, however there are also differences in the profile of antibiotic resistance and survival in the intestinal environment.

INTRODUCCIÓN

Los efectos de las bacterias lácticas fueron descritos en 1857 por Pasteur, pero fue Elias Metchnikoff quien postuló la relación entre los fermentos de la leche y la longevidad de quienes los consumían, a partir de sus observaciones fue posible evaluar mecanismos para modificar la microbiota nativa, sustituyendo los microorganismos patógenos por aquellos que fueran útiles para el consumidor. Los estudios desarrollados en Europa sobre la microbiología de la leche y el yogurt, describieron los organismos presentes y activos en el proceso de fermentación natural como *Bacillus bulgaricus*, denominado en la actualidad como *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, en 1920, Resttger y colaboradores encontraron que esta especie no sobrevivió a las condiciones intestinales (acidez y adherencia), sin embargo, al evaluar a la especie *Lactobacillus acidophilus* encontraron que era capaz de sobrevivir al tracto gastrointestinal (TGI), establecerse en él y proliferar, posteriormente en 1935 la emplearon en pruebas clínicas en pacientes con trastornos intestinales obteniendo resultados benéficos en ellos (Ljungh y Wadstrom, 2006; Malago *et al.*, 2011).

En 1950 Freter indicó un amplio espectro de antibióticos con capacidad de destruir la microbiota intestinal en ratones, haciéndolos vulnerables a la instauración de patógenos de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, en Japón en la década de 1950 se realizaron estudios en los que se pudo demostrar que *Lactobacillus casei* y algunas especies de *Bifidobacterium* tenían la capacidad de proteger a ratones jóvenes de infecciones intestinales, por lo que los estudios sobre los beneficios de consumir estas bacterias continuaron y, a partir de 1960 fue que se comenzó a emplear la palabra probiótico para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. En 1989 Fuller redefinió el concepto como “suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de forma beneficiosa al animal huésped a través de la mejora de su balance microbiano intestinal”, esta definición fue empleada hasta 1999 cuando Gibson realizó un cambio en el concepto, considerando que un probiótico es un microorganismo vivo que al ser ingerido en cantidades suficientes ejerce un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales tradicionales, esta última definición fue adoptada por la FAO en el año 2001 y es la aceptada (Shah, 2007; Lee y Salminen, 2009).

En cuanto a las investigaciones previas sobre *Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*) ATCC 8042, Llorente (1998), probó diversas formulaciones para su cultivo, reportando que

el caldo MRS (De Man Rogosa and Sharp) modificado por la adición de 10% (w/v) de sacarosa y 0.1% (w/v) de ácido ascórbico, permitieron el óptimo crecimiento de la cepa.

Rivera (2005) reportó que el sobrenadante del cultivo a 8 h de *P. acidilactici* ATCC 8042, ejerce actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), Hernández (2005) evaluó el espectro antimicrobiano de sobrenadantes de cultivos en dos diferentes medios (MRS y Caldo Soya Trypticaseína, Extracto de levadura, Sacarosa), sobre bacterias ácido lácticas (BAL) relacionadas filogenéticamente, así como en bacterias Gram – y otras Gram +, reportando que se observa un mayor espectro antimicrobiano en los sobrenadantes de cultivos de *P. acidilactici* ATCC 8042 en caldo MRS y que las cepas más afectadas fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*. En este mismo sentido encontró que las BAL: *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* no son afectadas en su crecimiento por los sobrenadantes de los cultivos.

Llorente (2008) demuestra que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, no es una cepa productora de pediocina, ya que no posee el gen *pedB* ni los plásmidos característicos que se encuentran presentes en cepas productoras de pediocinas, sin embargo, reporta que al cultivarla en caldo MRS modificado, tiene capacidad de bioconservación y que los sobrenadantes provenientes de su cultivo en fase logarítmica poseen actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*, mostrando halos de inhibición de crecimiento en pruebas de difusión en agar, además descartó que este efecto se ejerciera por la producción de ácido láctico ya que realizó pruebas de inhibición en agar neutralizando el pH del sobrenadante, concluyendo que la cepa 8042 posee al menos tres diferentes enzimas extracelulares, dos con actividad proteolíticas y una con actividad de peptidoglucano hidrolasa, todas con efecto antibacteriano.

Al caracterizar la actividad proteolítica extracelular de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042, Granados (2009) encontró que es activo sobre la elastina, gelatina, colágeno y caseína, y con poder antibacteriano contra *Micrococcus lysodeikticus* y *S. aureus*.

En el año 2010, Velasco en su caracterización del efecto de la enzima péptido glucano hidrolasa producida por *P. acidilactici* ATCC 8042, reportó que esta enzima es capaz de inhibir el crecimiento de BAL filogenéticamente relacionadas y en las bacterias Gram- *E.*

coli y *Salmonella enterica* var. *Typhimurium*, observando en esta última el mayor efecto inhibitorio.

Martínez (2011), evaluó la actividad antibacteriana del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* (*P. cidilactici*) ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* y sobre *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando actividad inhibitora de su crecimiento.

Por lo expuesto anteriormente en el presente trabajo se ha propuesto caracterizar la cepa de *P. acidilactici* como un microorganismo probiótico, además de evaluarlo comparativamente con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 reconocido actualmente como probiótico.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Probióticos.

1.1.1. Definición

La palabra probiótico es un término de origen griego que significa [pró πρό gr. 'delante de', 'antes de' + bio- βίος gr. 'vida' + -t-ik-os/-t-ik-ē gr.] “a favor de la vida”. Este término se utiliza para definir aquellos microorganismos que sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y que producen un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo, proporcionando un mejor estado de salud y bienestar además de reducir el riesgo de enfermedad (Aguilera *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2003).

Sin embargo, la definición de probiótico continúa en evolución como un intento de adaptarse a los conocimientos que surgen día a día. Varios científicos han demostrado que algunos microorganismos inactivados, e incluso sus componentes celulares, pueden ejercer un efecto benéfico en la salud, por lo que estos hallazgos deberán considerarse en futuras revisiones del concepto probiótico (Arribas, 2009).

La Organización Mundial de la Salud define como probiótico a todo aquel organismo vivo que, administrado en la cantidad adecuada, proporciona beneficios saludables al receptor (FAO/OMS, 2006). El uso de probióticos en medicina se conoce como Bioterapia, ofrece múltiples influencias benéficas en el hospedero, ya que poseen diferentes mecanismos de acción tales como la actividad antimicrobiana, aumentar la función de barrera del intestino, maximizar el aprovechamiento de los nutrientes en la dieta, inactivación de toxinas, inmunomodulación, entre otras (Hart *et al.*, 2009).

1.1.2. Contexto histórico de los probióticos

El primer registro histórico de los microorganismos probióticos fue en 1857 cuando Luis Pasteur descubre las bacterias ácido lácticas. En el año 1907 Elie Metchnikoff observa que los habitantes de Bulgaria eran muy longevos y, asocia esta característica al elevado consumo de bebidas lácteas fermentadas de las que logró aislar al Bacilo búlgaro, por lo que sugiere que esta bacteria es capaz de modificar la microbiota intestinal eliminando los agentes patógenos presentes en el intestino humano y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida de quienes lo consumían

habitualmente. Metchnikoff fue el primer investigador en desarrollar un producto terapéutico utilizando su lactobacilo en forma de cápsula para administración vía enteral al que nombró Lactobacillin (Metchnikoff, 1907).

El pediatra francés Henry Tissier (1906), observó que en heces de niños con diarrea era escaso el contenido de bifidobacterias, por el contrario en niños clínicamente sanos el contenido de este microorganismo era elevado y, sugirió que estas bifidobacterias deberían ser administradas a sus pacientes para restaurar su microbiota intestinal y así recuperar la salud, López y Domingo (2007) reportaron evidencias similares.

En 1917 durante un brote de shigelosis, Alfred Nissle aisló una cepa de *Escherichia coli* a partir de heces de un soldado que no presentó la enfermedad y comenzó a emplearla como terapéutico en casos de salmonelosis y shigelosis (Guarner *et al.*, 2008).

Fue hasta 1920 que Rettger demostró que el Bacilo búlgaro (*Lactobacillus delbruekii*) descubierto por Metchnikoff, no era capaz de establecerse en el intestino humano por lo que comenzó a dudarse de la teoría de la longevidad asociada a los alimentos fermentados, sin embargo en 1935 se encontraron cepas de *Lactobacillus acidophilus* que presentaron la capacidad de implantarse a nivel intestinal y se efectuaron ensayos clínicos en los que se descubrió que este microorganismo era de utilidad para disminuir el estreñimiento crónico (Rettger *et al.*, 1935; Ogueke *et al.*, 2010).

Fue hasta 1965 que Lilly y Stilwell utilizaron la palabra probiótico, para nombrar las secreciones de algunos microorganismos que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo esta definición se ha transformado debido a nuevas investigaciones como las de Roy Fuller quien en 1989 señaló que la viabilidad es un requisito imprescindible para los probióticos y también fue el primero en asociar que ejercen un efecto benéfico para el huésped. Estos beneficios en la salud humana y animal son cada vez más reconocidos, sus efectos en funciones digestivas e inmunológicas propician el aumento de grupos de trabajo que estudian las propiedades y funcionalidad de nuevos agentes probióticos (FAO/OMS, 2002; Monteagudo, 2010).

1.2. Efectos benéficos asociados al uso de probióticos

Los probióticos son capaces de ejercer una gran variedad de efectos benéficos en el consumidor “huésped” ya sea humano o bien animal, estos efectos pueden agruparse en los siguientes nutricionales, inmunológicos y efectos sobre patógenos (Figura 1).

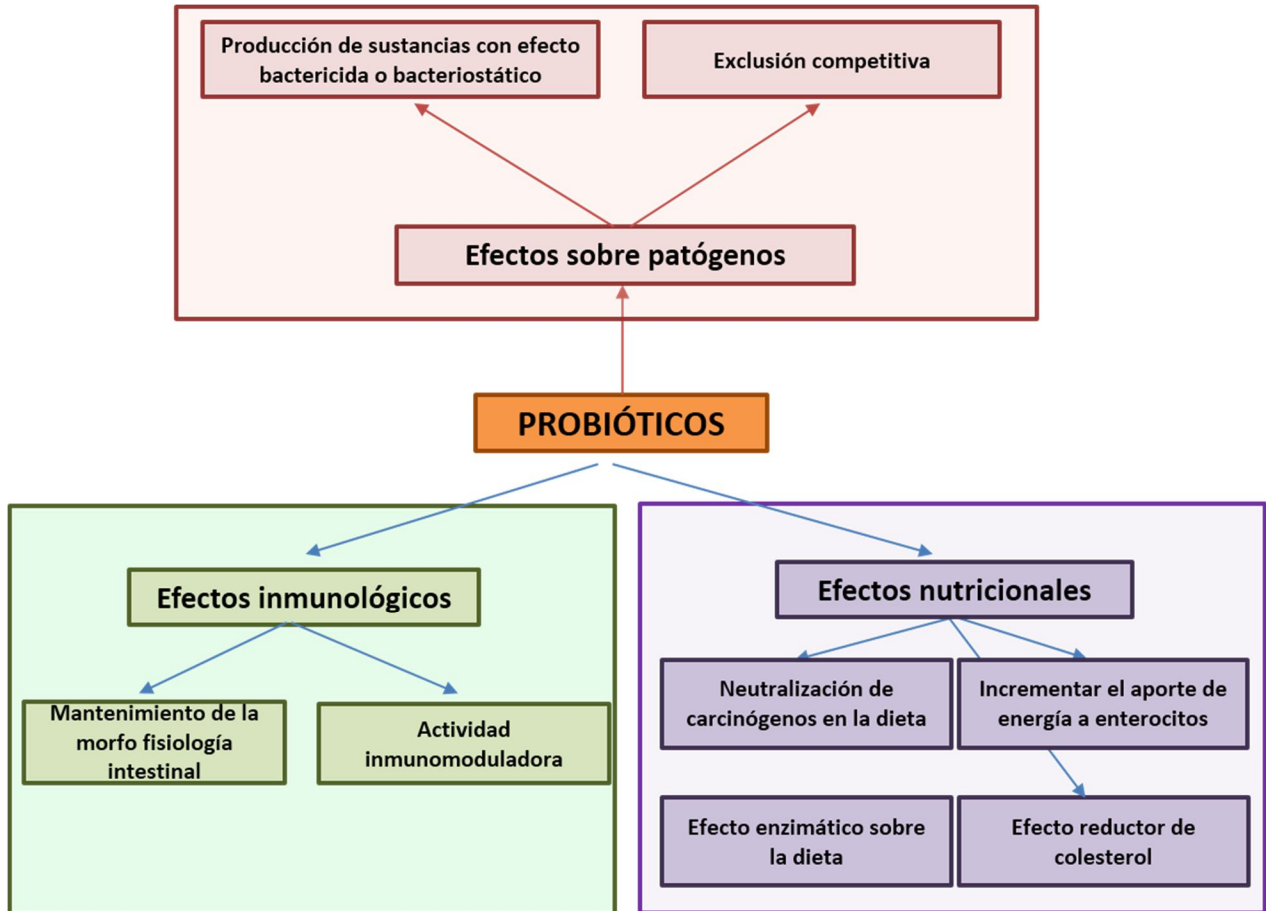


Figura 1. Efectos benéficos asociados a probióticos

(Adaptado de Saito, 2004)

1.2.1. Sobre patógenos

El tracto gastrointestinal es un ecosistema en el que habitan tanto bacterias benéficas como otras potencialmente dañinas, actualmente es reconocido que un desequilibrio en esta microbiota puede originar o favorecer el desarrollo de diversas enfermedades,

incluido el cáncer. Se ha observado que los agentes potencialmente carcinógenos de algunos alimentos como los pigmentos, aflatoxinas, pesticidas, nitritos y otros, pueden ser bioactivados por sistemas enzimáticos de las bacterias intestinales cuando se produce este desequilibrio.

Se ha atribuido a los probióticos la capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal potencialmente dañina a beneficiosa para el huésped. Sin embargo, el estudio de estos microorganismos ha permitido establecer diferentes acciones a través de los cuales ejercen este efecto (Arribas, 2009):

- Producción de sustancias antimicrobianas. Algunas de las bacterias comprendidas dentro del grupo de las BAL utilizadas como probióticos, tienen la capacidad de producir sustancias con actividad antibacteriana tales como bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, entre otras.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antibacteriana, su efecto inhibitorio es muy variable, algunas de ellas tienen efecto sobre otras bacterias Gram positivas relacionadas taxonómicamente con ellas, otras en cambio son activas sobre un espectro mayor de Gram positivas así como Gram negativas. Entre las bacteriocinas más representativas están: Nisina, Lactococina A, Pediocina PA-1, Divergicina A, y Enterocina P, producidas por *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Caernobacterium divergens*, *Enterococcus faecium* respectivamente (Dolz, 2008; Hart *et al.*, 2009)

Ha sido estudiado este mecanismo antagónico en varias ocasiones, e incluso se ha reportado que la bacteriocina curvacin producida por *Lactobacillus curvatus* LTH1174 contribuye eliminando *E. coli* y hasta un 90% de *Listeria innocua* en el compartimento gástrico (Cross, 2002; Gänzle *et al.*, 1999).

- Disminución del pH intestinal. Este efecto se debe a la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias probióticas, principalmente ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), como

consecuencia de su capacidad fermentativa (Vondruskova *et al.*, 2010; Castro & De Rovetto, 2006).

De acuerdo a sus efectos, los ácidos orgánicos producidos por los probióticos pueden categorizarse en dos grupos. El primero de ellos en el que se agrupa al ácido láctico se caracteriza por una acción indirecta sobre los patógenos, inhibiendo su crecimiento. El segundo grupo que comprende a los ácidos grasos volátiles se caracteriza por un efecto directo sobre los microorganismos patógenos, actuando sobre su pared celular o bien evitando la replicación del ADN (Vondruskova *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2007).

El desplazamiento de bacterias nocivas no necesariamente implica actividad bacteriostática o bactericida, sino que puede ser consecuencia de la competencia física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles en la luz intestinal por lo que las bacterias patógenas comienzan a morir al no encontrar un ambiente adecuado y sustratos para su desarrollo, a este mecanismo se le conoce como **exclusión competitiva** (Min-Tze, 2011; Arribas, 2009).

1.2.2. Inmunológicos

El tracto gastrointestinal cuenta con diversos mecanismos inmunológicos de defensa, tanto los mecanismos innatos como adquiridos en su conjunto se comportan como una barrera que previene el ingreso de sustancias ajenas al sistema a la lámina propia o bien al torrente sanguíneo, a continuación se describe cómo es que actúan los microorganismos probióticos sobre este sistema (Gutiérrez P. J. A., 2010).

1.2.2.1. En el *mucus* intestinal

El epitelio intestinal se encuentra cubierto por una capa denominada *mucus*, esta sustancia compuesta de agua, electrolitos y glicoproteínas, es sintetizada por los exocinocitos caliciformes epiteliales y secretada hacia la luz intestinal. La capa de *mucus* es la primera barrera de defensa que las bacterias intestinales se encuentran, y los patógenos deben penetrar en ella para alcanzar los enterocitos y causar infección.

Los microorganismos han desarrollado diversos métodos para degradar el *mucus*, tales como la ruptura de enlaces disulfuro (*Helicobacter pylori*), o bien actividad de proteasas y glicosidasas que les permiten invadir y absorber sus nutrientes, por estas razones la producción y mantenimiento de la capa de *mucus* es importante para evitar la implantación y traslocación de bacterias patógenas (Ohland & MacNaughton, 2010; Johansson *et al.*, 2011; Kocevar Nared, Kristl & Smid-Korvar, 1997).

Se ha establecido que algunos de los microorganismos probióticos tienen la capacidad de inducir la secreción de *mucus*, lo que ayuda en la prevención de la adhesión, migración y colonización bacteriana patógena. Caballero y colaboradores (2007) demostraron que el producto comercial VSL#3 que contiene los microorganismos probióticos *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacteria infantis*, *B. breve*, *B. longum* y *Streptococcus salivarius* al ser administrado por vía oral a ratas, tiene la capacidad de aumentar la expresión del gen MUC2 que codifica la producción de *mucus*, ellos sugirieron que esta capacidad se debe a que contiene al menos un elemento que activa su secreción (Madsen, 2012).

Mattar y colaboradores en 2002 utilizaron como modelo experimental cultivos celulares Caco-2 adicionados con cultivos del probiótico *Lactobacillus casei GG*, encontrando que esta cepa se unía a sitios receptores específicos del enterocito y estimulaba positivamente la regulación de mucina tipo 2 (MUC-2), concluyeron que *Lactobacillus casei GG* tiene la capacidad de inhibir la traslocación bacteriana aumentando la producción de *mucus*.

1.2.2.2. Sobre uniones celulares de tipo estrecho en el epitelio intestinal.

El epitelio intestinal se encuentra constituido por una monocapa celular en la que se encuentran presentes diferentes tipos celulares (Figura 2), entre ellos los enterocitos, las células caliciformes, células de Paneth y células enteroendocrinas (Brandtzaeg y Pabst, 2004).

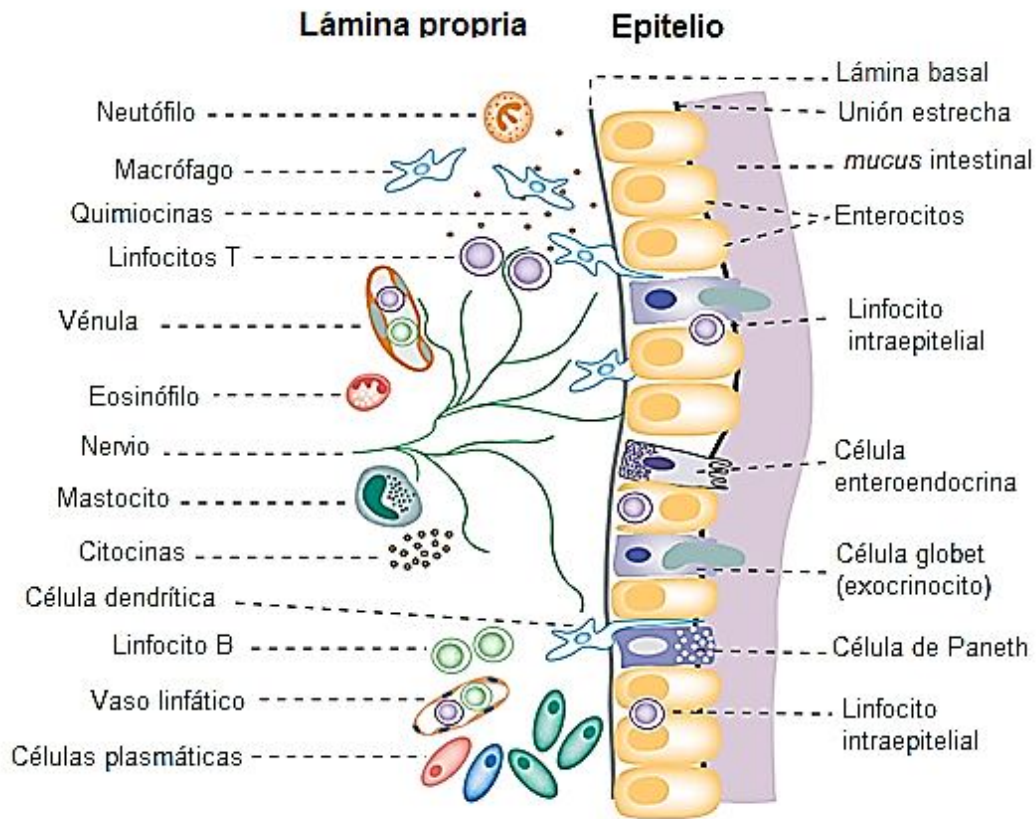


Figura 2. Tipos celulares presentes en el epitelio y lámina propia intestinal (Adaptado de Brandtzaeg y Pabst, 2004)

Los tipos celulares presentes en el epitelio intestinal se encuentran comunicados y unidos entre sí a través de uniones de tipo estrecho denominadas: *zonula occludens* (tight junction), *zonula adherens* y desmosomas (Figura 3). Estos tipos de unión se caracterizan por estar constituidos por arreglos proteínicos específicos de citoesqueleto (Ross y Wojciech, 2008; Hart *et al.*, 2009).

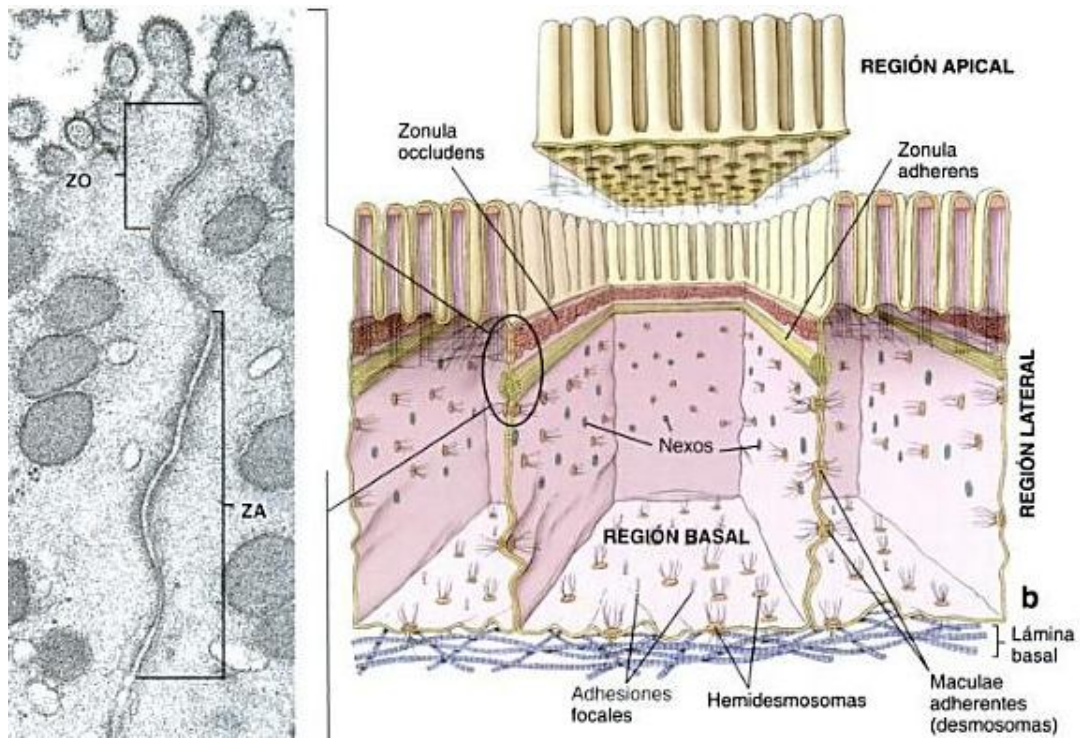


Figura 3. Tipos de unión intercelular presentes en epitelio intestinal
 ZO: *Zonula occludens*, ZA: *Zonula adherens*. (Fuente: Ross, 2008)

En conjunto, estos tipos de unión permiten que el epitelio actúe como una barrera a la difusión y establece una separación entre el espacio luminal y el espacio intercelular. En caso de fallar estas uniones, la barrera intestinal se ve alterada permitiendo el paso de antígenos provenientes de la dieta, toxinas bacterianas e inclusive su traslocación hacia la mucosa. Esta situación genera respuestas inmunológicas exacerbadas (alergias alimentarias) y permite la implantación-infección de patógenos.

Se ha observado que el uso de microorganismos probióticos tiene una influencia positiva en las interacciones célula-célula, mejorando la estabilidad celular e incrementando la función de barrera mediante la modulación de las proteínas del citoesqueleto presentes en este tipo de uniones intercelulares. Por ejemplo, Otte y Podolsky (2004) determinaron que las proteínas conformadoras de la *zonula occludens* se separan y redistribuyen cuando se exponen a bacterias patógenas tales como *Salmonella dublin*, sin embargo, al realizar un cultivo epitelial al que le fueron adicionados los probióticos contenidos en el producto VSL# y *Salmonella dublin*,

observaron que se impidió la redistribución de la proteína ZO-1 por lo que se estabilizó la *zonula occludens* y por ello la función de barrera. Resta-Lenert y Barrett (2003), realizaron un experimento en el que emplearon cultivos de células Caco-2 expuestos a la colonización por *Escherichia coli* (*E. coli*) enteroinvasiva (EIEC), determinaron que la infección por esta bacteria causó una reducción en la fosforilación de la ocludina y de la proteína ZO-1 presentes en la *zonula occludens*, sin embargo al realizar esta misma prueba con cultivos celulares pretratados con *Lactobacillus acidophilus* observaron que los efectos causados por *E. coli* fueron prevenidos completamente. Estos estudios han propuesto que los probióticos estimulan la función de barrera intestinal fortaleciendo y estabilizando las proteínas presentes en las uniones intercelulares de tipo estrecho.

1.2.2.3. En la producción de defensinas

Las defensinas son moléculas englobadas en la inmunidad innata, son polipeptidos constituidos por menos de 100 aminoácidos, estas moléculas poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro que abarca bacterias, hongos y virus, además tienen capacidad de neutralizar toxinas. Las defensinas son sintetizadas por leucocitos y células epiteliales, en el caso específico del intestino las células de Paneth localizadas en las criptas de Lieberkühn son las encargadas de su síntesis y secreción (Figura 4), ambas actividades son reguladas por señales microbianas, señales de desarrollo y citosinas (Ganz, 2003; Lebeer *et al.*, 2010).

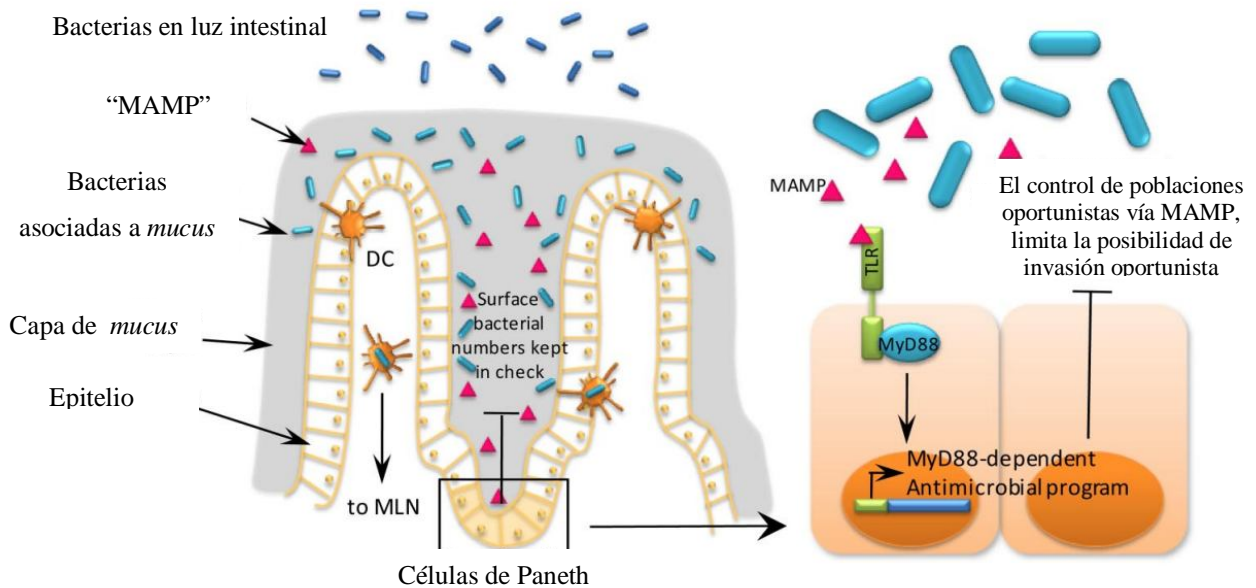


Figura 4. Estimulación de células de Paneth y producción-excreción de defensinas (Adaptado de Vaishnava *et al.*, 2004)

El mecanismo por el cual las células de Paneth son estimuladas para sintetizar y secretar defensinas se atribuye a la interacción entre patrones moleculares asociados a microorganismos, por sus siglas en inglés “MAMP” y los receptores de reconocimiento de patrones expresados por las células epiteliales (Vaishnava *et al.*, 2008).

El efecto antimicrobiano causado por las defensinas se atribuye a su composición anfipática que al interactuar con las membranas negativamente cargadas provoca una desestabilización y disrupción debido a la formación de poros que provocan un aumento en la permeabilidad (Figura 5) e inhibición en la síntesis de proteínas, ADN y ARN. También se ha reportado que las defensinas poseen actividad quimiotáctica hacia monocitos, linfocitos T y células dendríticas (Ganz, 2003).

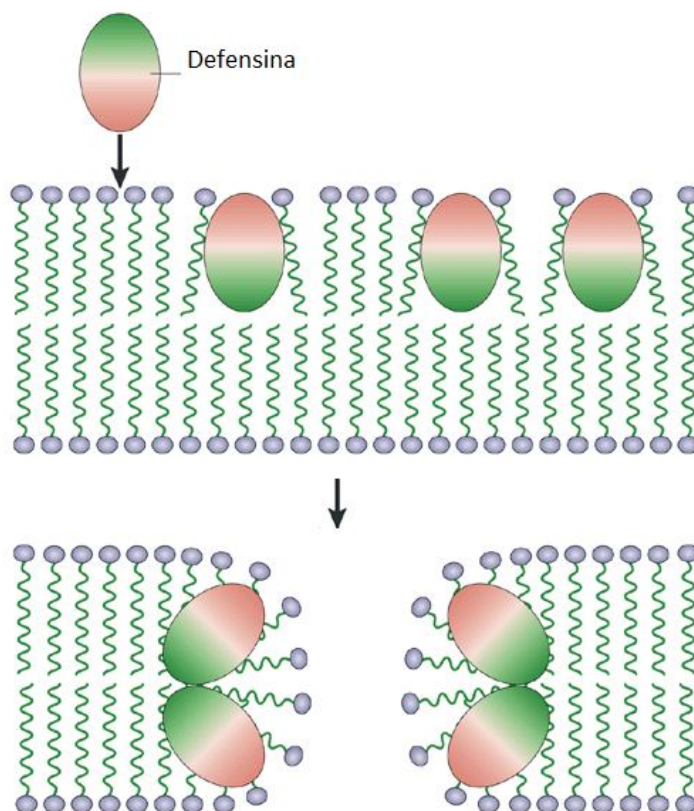


Figura 5. Integración de defensinas en membrana microbiana y formación de poros.
(Fuente: Ganz, 2003)

1.2.2.4. En células inmunológicas

Tras el consumo de probióticos, la interacción con las células epiteliales intestinales (enterocitos, células M, células dendríticas) desencadena una respuesta inmunomoduladora relacionada con la producción y liberación de citosinas y quimiocinas con efecto *anti* o *pro* inflamatorio dependiente de la cepa probiótica empleada.

Ha sido reportado que algunos probióticos influyen en mecanismos inmunológicos innatos tales como la fagocitosis. Perdigon y colaboradores (2008) demostraron que *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* incrementan la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales de murinos, Pelto (1998) encontró que al emplear *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) en individuos sanos, se produjo una mayor

expresión de receptores asociados a la fagocitosis en neutrófilos, posteriormente Arunachalam *et al.*, (2000) reportaron que *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) HN019 tiene la capacidad de mejorar la fagocitosis de células mononucleares en sangre periférica.

En cuanto a los efectos sobre células Natural killer (NK), se ha demostrado que durante el consumo de microorganismos probióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN109 producen un incremento en la actividad citotóxica y este efecto se ve reducido al cesar el consumo de probióticos. Se ha propuesto que este incremento en la actividad es debido a la expresión de interleucinas (IL) 12 y 15. Estas observaciones sugieren que los probióticos tienen la capacidad de desempeñar un papel importante en la inmunovigilancia, ayudando a prevenir el desarrollo de neoplasias gracias a una eficiente actividad por parte de las células NK (Harharnjit S., Kay J., Martin L, & Pramod K., 2001).

Adicionalmente los probióticos tienen la capacidad de estimular a las células dendríticas y dirigir su maduración a la producción de interleucinas 10 (IL-10), esta citosina promueve la diferenciación de linfocitos T CD4+ (cooperadores) hacia la clasificación Th2 y no hacia Th1. Los linfocitos Th2 tienen la capacidad de promover la inmunidad humoral local y sistémica, mientras que los linfocitos Th1 promueven una respuesta de tipo inflamatorio. Por estos motivos es que se considera a los agentes probióticos como reguladores del sistema inmunológico, promoviendo una reducción en la generación de citosinas *pro* inflamatorias a nivel local y sistémico (Moreno *et al.*, 2009).

1.2.2.5. Producción de anticuerpos

En caso de las células inmunológicas asociadas a la inmunidad adquirida, se ha propuesto que los probióticos ejercen un efecto benéfico al modular positivamente la respuesta a antígenos vía linfocitos B, promoviendo su maduración hacia células plasmáticas productoras de inmunoglobulina de tipo A (IgA), G (IgG) y M (IgM), incrementando la respuesta tanto a nivel local como sistémico (Hart *et al.*, 2009).

Por ejemplo, la administración de *L. rhamnosus* GG a niños con gastroenteritis aguda aumentó la respuesta inmune humoral no específica, provocando un incremento en el título de anticuerpos IgG, IgA e IgM circulantes. En otro estudio, se reportó que *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) incrementó la respuesta humoral a la ovoalbúmina, yogurts adicionados con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *B. bifidum* y *Bifidobacterium infantis* estimularon la producción de anticuerpos IgA en respuesta a la toxina del cholera en ratones (Tejeda, Lee y Ustunol, 1999).

Se han estudiado los efectos que ejercen los probióticos sobre linfocitos B en la producción de anticuerpos en ensayos de vacunación, Isolauri y colaboradores en 1995 observaron un incremento en la inmunogenicidad de la vacuna de rotavirus en infantes, de forma similar Fang y colaboradores (2000) observaron un incremento en los niveles de IgA específicos vs *Salmonella* en sujetos que recibieron una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y la vacunación contra este patógeno.

1.2.3. Efectos nutricionales

Los probióticos tienen la capacidad de intervenir en la digestión de algunos componentes de la dieta, mejorando su disponibilidad en la luz intestinal y asimilación por el hospedero (Vrese *et al.*, 2001).

En cuanto a su acción sobre los componentes proteicos en la dieta, es reconocido que los probióticos además de la actividad proteolítica sobre la ingesta, tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, por estas razones se ha sugerido que aumentan la biodisponibilidad de aminoácidos (Sanz *et al.*, 2004).

También es reconocido que debido a su capacidad hidrolítica y fermentativa de carbohidratos no digeridos en las porciones proximales del intestino o bien de la fibra dietética, los probióticos aumentan la disponibilidad de ácidos grasos volátiles de cadena corta, principalmente de acetato, propionato y butirato, los cuales son la principal fuente de energía para los colonocitos, regulando su desarrollo y diferenciación. Gracias a esta capacidad hidrolítica de carbohidratos es que los

probióticos ejercen un beneficio más, metabolizando sustratos que el huésped es incapaz por ejemplo, el uso de probióticos como terapia en pacientes con intolerancia a la lactosa. (Kindt *et al.*, 2007; de Vrese *et al.*, 2001).

El efecto sobre nutrientes no se limita a carbohidratos y proteínas, las vitaminas sintetizadas por las bacterias probióticas constituyen también un aporte para el hospedero, principalmente en lo referente a las vitaminas K y del complejo B (Parvez *et al.*, 2006).

1.3. Diversos usos de probióticos como bioterapia

1.3.1. Tolerancia oral

Normalmente el sistema inmune intestinal logra diferenciar entre aquellos antígenos hacia los que debe generar una respuesta activa como en el caso de los microorganismos invasores o bien una respuesta de tolerancia frente a antígenos alimentarios solubles. La administración oral de antígenos alimentarios resulta a menudo en un estado de no respuesta inmunológica tanto a nivel de mucosas como de forma sistémica, este fenómeno es conocido como tolerancia oral, su establecimiento previene respuestas de hipersensibilidad mediada por inmunoglobulina, esta respuesta depende de diversos factores tales como la edad del huésped, la naturaleza y dosis del antígeno, frecuencia de consumo y del contenido proteico en la dieta (Chen y Weiner, 1996; Isolauri, Joensuu y Suomalainen, 2000).

Se ha determinado que la composición de la microbiota intestinal juega un rol importante en la modulación (ausencia o presencia) de la tolerancia oral, ya que se observó que la administración de varios antígenos alimentarios inducen tolerancia en ratones convencionales más no así en ratones axénicos (libres de gérmenes), adicionalmente la tolerancia en estos últimos se presentó al permitir la colonización de sus intestinos por bacterias del género *Bifidobacterium* (Prioult, Fliss y Pecquet, 2003; Moreau y Corthier, 1996).

De tal forma que los probióticos pueden emplearse para generar o bien restaurar la tolerancia oral a diversos antígenos alimentarios, evitando de esta forma reacciones de tipo inflamatorio a nivel intestinal.

1.3.2. En alergias y enfermedades autoinmunes

Estudios realizados en animales sugieren que la microbiota intestinal juega un papel muy importante en la activación y maduración de la respuesta inmune durante el las primeras etapas de vida para limitar o evitar las respuestas disfuncionales entre las que se incluyen las alergias. Aunque la etiología exacta por la cual se producen los trastornos alérgicos no está clara, la evidencia apunta a que los tanto factores ambientales como la microbiota intestinal aberrante causan un desequilibrio entre las poblaciones linfocitarias Th2 y Th1 favoreciendo esta última, se ha demostrado que los probióticos logran modular al sistema inmunológico restableciendo la respuesta Th2, estimulando la producción de Interleucina 12 (IL-12) e interleucina 2 (IL-2), suprimiendo la activación de linfocitos Th1 por tanto conducen a una mayor producción de IgA (asociada a tolerancia) y disminuyen la IgE (asociada a alergias), de esta forma evitan reacciones del tipo 1 de hipersensibilidad. En la actualidad se realizan diversos estudios para constatar los beneficios que pueden causar al huésped al evitar o disminuir la presentación de alergias (Michail, 2009; Ouwehand, 2007).

1.3.3. Empleo como vacunas o coadyuvantes

Las herramientas moleculares que hoy son disponibles para manipular genéticamente bacterias ácido lácticas, representan una estrategia novedosa y prometedora para la vacunación, ya que el desarrollo de bacterias vivas como adyuvantes para patógenos atenuados como *Salmonella*, *Bordetella*, *Vibrio* y *Micobacterium* por técnicas de ADN recombinante logran desencadenar una respuesta inmunitaria protectora, de tal forma que los probióticos pueden ser usados como vacunas contra patógenos (Reid, Jass, Sebulsky y McCormick, 2003).

En estudios previos, se emplearon cerdos gnotobioticos a los que se les proporciono una vacuna oral vs rotavirus con o sin la adición de una mezcla de lactobacilos (*L. plantarum* y *L. reuteri*), el resultado fue una mayor cantidad de linfocitos T CD8+

productores de interferón gamma en íleon y bazo, un aumento de linfocitos productores de anticuerpos IgA e IgG en íleon y títulos significativamente elevados de anticuerpos IgM, IgA e IgG específicos para el rotavirus en comparación con los cerdos a los que no se les proporciono la mezcla de Lactobacilos (Zhang *et al.*, 2008).

1.3.4. Prevención de neoplasias

Se han realizado estudios en animales que indican que el uso de lactobacilos y de bifidobacterias como probióticos, tienen el potencial de reducir el riesgo de presentar cáncer gracias a un amplio rango de mecanismos abarcando efectos intraluminales, sistémicos y directos sobre la mucosa intestinal. Entre los efectos intraluminales se incluye la exclusión competitiva y la alteración de la actividad enzimática de la microbiota intestinal, disminuyendo la cantidad de enzimas fecales (glycosidasa, β -glucoronidasa, azoreductasa y nitroreductasa) asociadas con la conversión de precarcinógenos a carcinógenos, e inhibiendo directamente la formación de células tumorales inactivando o bloqueando al carcinógeno. Adicionalmente, la acidificación del medio intestinal por la producción de ácidos grasos de cadena corta se asocia a un menor riesgo de presentarse cáncer colorrectal. Se ha encontrado que pueden emplearse probióticos para aliviar los efectos secundarios durante quimioterapia, evitando complicaciones postoperatorias y evitar la remisión, sin embargo el estudio de las propiedades y mecanismos por los cuales los probióticos pueden evitar la presentación o participar en el tratamiento de pacientes con cáncer es incipiente debido a la gran variedad de géneros y especies con potencial probiótico (Chong, 2013; Patel y Goyal, 2013).

1.3.5. Enfermedades cardiovasculares

Un elevado nivel de colesterol en sangre es considerado un factor de riesgo asociado a desencadenar patologías de tipo cardiovascular tales como aterosclerosis, arterioesclerosis e infartos al miocardio, se ha observado que el consumo de probióticos en lácteos fermentados tiene correlación con la reducción de los niveles de colesterol en sangre en niveles de 20 al 30% de colesterol total y 22 a 35% de triglicéridos, además de aumentar la cantidad de lipoproteínas de alta densidad y disminuir aquellos de baja

densidad, gracias a estos efectos se considera que el consumo de probióticos puede disminuir la presentación de patologías cardiovasculares, estos beneficios se asocian a la capacidad de desconjugación de ácidos biliares, principalmente el glicocólico y el taurocólico (Pavlovic, Stankov y Mikov, 2012; Bordoni *et al.*, 2013).

1.3.6. Mejoramiento de parámetros productivos

Se han probado diversas especies y cepas de bacterias ácido lácticas como probióticos, sin embargo el género *Lactobacillus* es el más empleado para mejorar parámetros productivos en distintas especies animales. Krueger y colaboradores, reportaron que la alimentación de gallinas Leghorn adicionando una mezcla de lactobacilos durante 140 días, aumentó la producción de huevo y mejoró la eficiencia alimenticia en 3.03 y 7.41% respectivamente. En 2004, Yörük y colaboradores, estudiaron el comportamiento de aves de postura al suministrarles diversos cultivos probióticos en la dieta, encontrando que su suplementación incrementó la producción de huevo y disminuyó la mortalidad, sin efecto alguno sobre la calidad del huevo. De forma similar, Ezema en el año 2012, observó que la suplementación de aves de postura con el probiótico *Saccharomyces cerevisiae* incrementó significativamente la producción diaria de huevo sin alterar su calidad.

En aves pesadas, Couch (1978) reportó que la incorporación de *Lactobacillus* en dietas de pollos en engorda sometidos a estrés por frío, elevó la tasa de crecimiento en machos en 7 a 10% y en hembras de un 5 a 6% en comparación con aves sin la adición del probiótico, en otro estudio Ezema (2007) empleando como probiótico a *Sacharomyces cerevisiae* registró mejor ganancia de peso e incrementó la digestibilidad de fibra cruda en pollos productores de carne.

Vicente y colaboradores (2007) estudiaron la capacidad de 2 cultivos probióticos para reducir los niveles de *Salmonella* presentes en naves de producción de pavo adicionándolo al alimento por un periodo de 2 semanas, reportaron una disminución significativa ($p < 0.05$) en las naves con el tratamiento probiótico en comparación con las naves sin el, estos resultados indican que la administración de ciertos probióticos

pueden reducir la cantidad de *Salmonella* en las naves de engorda de pavos y disminuir el riesgo de contaminación en las plantas procesadoras.

El uso de probióticos en rumiantes no es nuevo, el empleo de productos que contienen levaduras como fuente de proteína y energía, y es ampliamente reconocida su efectividad sobre la fermentación ruminal, por lo que se les considera promotores de crecimiento. El interés en este tipo de productos ha incrementado debido a los nuevos beneficios asociados a su uso, Sretenovic (2008) reportó un aumento del 4% en la producción láctea y 7.16% de grasa extra, adicionalmente disminuyó el conteo de células somáticas en 7.3% lo que se correlaciona con una mejor salud de la ubre.

En producción porcina, el objetivo principal del empleo de probióticos es mejorar el rendimiento y la salud, siendo la tasa de crecimiento, eficiencia alimenticia, mortalidad y número de días con diarrea los factores más estudiados. Wilcock (2011) reportó que la suplementación con levaduras en la dieta de cerdas lactantes, incrementó la cantidad y calidad de la leche producida y mejoró en un 12% la tasa de crecimiento de los lechones.

1.4. Criterios para la evaluación de microorganismos probióticos

Debido a los efectos benéficos asociados al uso de probióticos en la alimentación animal y variedad de sus usos clínicos es que en la actualidad el estudio de diversos microorganismos ha tomado gran importancia, sin embargo la gran diversidad de géneros y especies de bacterias con potencial probiótico y la multitud de centros en los que se les evalúa es que se ha tenido la necesidad de establecer diversos criterios de selección y controles de calidad que son considerados prioridad para permitir su incorporación al mercado. En Mayo de 2002, el comité FAO/OMS publicó una guía para la evaluación sistemática de probióticos, esta guía incluye los aspectos mencionados a continuación (Castro y de Rovetto, 2006).

1.4.1. Identificación del género y especie de la cepa

La correcta identificación a nivel de género y especie es requisito para garantizar que la cepa a evaluarse sea reconocida según su clasificación taxonómica como un

microorganismo presumiblemente inocuo y de grado alimentario (GRAS). De igual forma, los efectos beneficiosos que pueden ejercer al huésped no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que son dependientes de la cepa. Por eso es necesario profundizar en su identificación por métodos de caracterización genotípica, de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura (FAO/OMS, 2002).

1.4.2. Caracterización biológica

Debe demostrarse el efecto beneficioso de los microorganismos a través de pruebas *in vitro*, determinando las características de producción de bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, habilidad para inhibir la adherencia de patógenos, criterios importantes para conferir el efecto probiótico (Collado, 2004).

1.4.3. Seguridad

Los probióticos son organismos vivos, por tanto es posible que puedan causar una infección en el huésped comportándose como patógenos oportunistas, por tal razón se recomienda que las cepas con potencial probiótico sean sometidas a pruebas que determinen si son capaces de producir toxinas, la caracterización de actividad hemolítica e infectividad en modelos animales inmunocomprometidos, así como establecer su resistencia o susceptibilidad frente a antibióticos y estudio de la capacidad de transmitir esta información a través de plásmidos (Collado, 2004; Hummel, Hertel, Holzapfel y Charles, 2007).

1.4.4. Estudios *in vitro* para la selección de probióticos

Dentro de estas pruebas de selección, se incluyen: a) resistencia a la acidez gástrica y a sales biliares, condiciones que son limitantes para la supervivencia a través del tracto gastrointestinal, de lo contrario los microorganismos no llegarían viables al intestino para ejercer su acción beneficiosa para el huésped, b) adherencia a la mucosa intestinal, ya que se considera un requisito para ejercer efectos inmunomoduladores, reducción de la adhesión de la microbiota competitiva y la actividad microbiana que favorezca el desplazamiento de patógenos (FAO/OMS, 2002; Collado, 2004).

1.5. Principales microorganismos empleados como probióticos

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente bacterias y levaduras. Las especies bacterianas comúnmente utilizadas pertenecen al grupo BAL, los géneros mayoritariamente empleados son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que el género *Saccharomyces* es el más estudiado dentro de las levaduras. Estos microorganismos pueden encontrarse en la flora intestinal nativa de humanos, en animales y como habitantes normales de algunas plantas (Figueroa *et al.*, 2006; Anadón *et al.*, 2006; Min-Tze, 2011).

1.5.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas, así como del tracto digestivo y vaginal de mamíferos, dentro de este grupo se encuentran incluidos los géneros; *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, la mayoría de ellos son filogenéticamente muy distintos, en particular *Lactobacillus* y *Leuconostoc* son muy heterogéneos por lo que la cercanía filogenética no correlaciona con la clasificación basada en las características fenotípicas. La tendencia de aplicar técnicas moleculares ha llevado a la reclasificación de especies (Ramirez *et al.*, 2007; Axelsson, 1993).

Este grupo de bacterias tienen como característica común la de producir ácido láctico como metabolito único o mayoritario en la fermentación de carbohidratos. Aunque se les conoce sobre todo por su labor en la fermentación de productos lácteos, se emplean asimismo para encurtir vegetales, en la panificación y curado de pescado, carne y embutidos (Axelsson, 1993).

Microbiológicamente se describen como cocos o bacilos, que se presentan aislados, por parejas o en cadenas cortas, son inmóviles y sin flagelos, son Gram positivos, microaerofílicos, catalasa negativos. Pueden ser caracterizados por su capacidad de fermentación en tres categorías metabólicas: homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas y en heterofermentativas facultativas (Mora y García, 2007).

Las homofermentativas estrictas sólo pueden fermentar hexosas por vía de la glucólisis, mientras que las heterofermentativas estrictas solo lo hacen mediante la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) y las heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de usar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal; si se modifican algunas condiciones de cultivo, tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce en este último grupo la vía (6-PG/PK). La diferencia entre una vía y otra viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis y debido a su ausencia las bacterias heterofermentativas no pueden utilizar la fructosa 1,6-difosfato (Mora y García, 2007).

La mayoría de las BAL son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C, aunque su intervalo óptimo de crecimiento se sitúa entre 35 y 38°C, se destruyen por calentamiento a los 70°C durante 10 minutos. Son ácido tolerantes pudiendo crecer en medios con pH de 3.2, otras a valores de 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no podrían (Rodríguez, 1994).

A finales de 1980 se publicaron varios estudios sobre la sensibilidad a antibióticos de bacterias iniciadoras utilizadas en la elaboración de productos lácteos, este fenómeno provocado por la presencia de residuos de antibióticos en leche responsables de su acidificación, de este modo se desarrollaron varias técnicas, que hacen difícil la comparación de los datos obtenidos, para tener conclusiones definitivas. En general, las BAL termófilas, empleadas como iniciadoras en productos lácteos como el yogurt, parecen ser más sensibles a la penicilina en comparación con los cocos mesófilos, lo contrario ocurre con la resistencia a estreptomycin, sin embargo los resultados no permiten identificar un patrón con el cual se pueda elaborar una clasificación. También se ha demostrado que la tasa de mutación espontánea a la resistencia a los antibióticos entre BAL puede ser muy alta, por lo cual existe mucha variación entre una cepa específica y otras dentro del mismo género (Seppo *et al.*, 1998).

No todas las cepas dentro de un mismo género de las BAL cumplen con las condiciones ideales de un probiótico, por ejemplo algunas cepas del género *Bacillus* causan intoxicación y otras son inocuas, dentro de estas últimas, solamente algunas cepas

presentan propiedades probióticas y su eficacia es muy variable, por ejemplo, *Bacillus toyoi*, produce *in vitro* ácidos orgánicos y enzimas y que *in vivo* estimulan la producción de ácidos grasos volátiles y contribuyen a una reducción en la concentración de amoníaco en el intestino de los animales, también se conoce que este microorganismo se establece en grandes concentraciones a lo largo del tubo digestivo, sin embargo no existe evidencia de que se adhiera a las paredes intestinales, aunque sí se sabe que no persiste en el intestino más de 7 días. Debido a estas características, todos los microorganismos que deseen emplearse como probióticos, deben someterse a pruebas que verifiquen su eficacia como tal (Hattori *et al.*, 1984; FAO/OMS, 2006; Gaggía *et al.*, 2010)

Los géneros y especies que han sido reconocidos y aceptados como probióticos incluyen a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bacillus toyoi*, *Bifidobacterium spp*, *Propionibacterium spp.* y *Streptomices spp.*, sin embargo, debido a la gran variedad de microorganismos que conforman el grupo de las BAL y a la heterogeneidad en la eficiencia entre miembros de un mismo género, la investigación sobre el potencial uso de estos microorganismos como probióticos es de importancia actual debido a los extensas aplicaciones clínicas que ofrece su consumo (Rodríguez , 2009).

1.5.1.1. *Pediococcus*

El género *Pediococcus* (*P.*) se encuentra dentro del grupo de las BAL, incluye 7 especies (*P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. stilesii*) con diversas características morfológicas, fisiológicas, nutricionales y genéticas. Son las únicas bacterias del grupo de las BAL con forma de cocos, son Gram positivos, inmóviles, oxidasa negativos, catalasa negativos, se dividen a lo largo de dos planos de simetría por lo que nunca se presentan en forma de cadena, no son patógenos para animales ni humanos. En la industria alimentaria son utilizados como cultivos iniciadores en la fermentación industrial de carnes, lácteos y vegetales, cuentan con potencial

bioconservador en el control del crecimiento de bacterias de interés sanitario (Axelsson, 1993).

Entre las sustancias antibacterianas producidas por *Pediococcus* se reportan, el ácido láctico, las pediocinas, sustancias proteicas conocidas como BLIS (por sus siglas en inglés Bacteriocin like inhibitory substances), ácidos orgánicos, peróxido de Hidrógeno, entre otros (Magnusson, 2003). También se ha documentado que puede existir un efecto sinérgico entre varios de estos compuestos (Mora , 2003).

El término pediocina hace referencia a péptidos producidos por este género que tienen actividad bactericida, son sintetizados ribosomalmente como pre-péptidos de 62 aminoácidos que son procesados hasta su forma activa constituida por 44 residuos, tienen características anfipáticas, con carga positiva, regiones altamente hidrofóbicas y con dos enlaces disulfuro. Se han reportado las especies *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. damnosus*, como productoras de pediocinas y se ha demostrado que su biosíntesis está asociada con plásmidos (Muñoz, 2004).

1.5.1.1.1. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Esta bacteria cumple las características microbiológicas anteriormente descritas para los *Pediococcus*, en cuanto a su clasificación por el tipo de fermentación, se les ha clasificado como homofermentativos (Llorente, 2008; Seppo *et al.*, 2004) ó bien como heterofermentativos facultativos reportando que es una cepa con capacidad productora de ácido láctico, ácido acético y etanol a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, maltosa y dextrinas, algunas cepas los producen también a partir de sacarosa y lactosa (Tobía y Vargas, 2000; Mora y García, 2007).

Aunque esta cepa no presenta el plásmido que codifica para pediocina, se sabe que es capaz de producir bioconservación, este efecto atribuido a un plásmido diferente al reportado como asociado a la producción de pediocinas en otras cepas, a la producción de enzimas proteolíticas y peptidoglucano hidrolasas (Llorente, 1998).

1.5.1.2. Género *Lactobacillus*

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes, lácteos y mariscos, forman parte de la microbiota oral, intestinal y vaginal de animales y humanos. No son considerados patógenos, Tienen gran importancia industrial ya que son utilizados en diversos procesos de fermentación láctica y en la fabricación de derivados vegetales encurtidos. Morfológicamente son bacilos largos, es frecuente la formación de cadenas, son Gram positivos, generalmente inmóviles, no son esporulados, pueden ser homofermentativos u heterofermentativos de acuerdo al producto final al metabolizar glucosa, su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2 y 53°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40 °C, son acidúricos, creciendo óptimamente a valores de pH entre 5.5 y 6.2, se han descrito más de 102 especies (Claesson, Van Sinderen y O'Toole, 2007).

1.5.1.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Cepas de *L. plantarum* son capaces de sobrevivir en niveles bajos de pH y en las condiciones estomacales y duodenales, resistiendo los efectos de la bilis presente en el intestino proximal cuando es consumido en la dieta, también es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal adhiriéndose a la mucosa. Clínicamente se ha empleado como tratamiento al síndrome de intestino irritable, existiendo evidencia de su actividad reductora del dolor, distensión abdominal y flatulencias. Es capaz de mantener la integridad intestinal, actividad metabólica de los enterocitos y de estimular respuestas inmunológicas. Adicionalmente, la ingesta de *L. plantarum* reduce algunos signos gastrointestinales adversos durante el tratamiento con antibióticos (Bixquert, 2009; Nissen, Chingwaru y Sgorbati, 2009).

En un estudio conducido por el centro de Investigación Danone en Holanda, se emplearon como modelo experimental ratones alérgicos a ovoalbúmina para probar los efectos causados por la administración oral de *L. plantarum*, mostrando una reducción de eosinófilos en el árbol bronqueo alveolar y una reducción en los anticuerpos IgE e IgG ovoalbúmina específicos. Esta especie, también ha mostrado proteger las células

epiteliales intestinales del daño causado por *E. coli*, previniendo cambios en la morfología celular y en su permeabilidad. Por estas razones es que se considera que *Lactobacillus plantarum* tienen un gran potencial como probiótico (Hougee, Vriesema y Wijering, 2009; Qin, Zhang y Hang, 2009).

1.6. Condiciones gastrointestinales de los animales domésticos monogástricos

1.6.1. Condiciones gástricas

En este apartado se mencionara de forma indistinta el ambiente presente en el órgano estómago propiamente dicho y el abomaso, en general puede mencionarse que el jugo gástrico es producido por los diversos grupos celulares presentes tanto en la mucosa como en las criptas gástricas. Entre los diversos grupos celulares, los más representativos son: las células epiteliales superficiales secretan agua, *mucus* insoluble y bicarbonato, las células mucosas del cuello secretan *mucus* soluble, las células parietales (oxínticas) secretoras de hidrogeniones y cloruro y por último las células principales productoras de pepsinógenos. Si bien es cierto que la secreción de las células parietales permite la formación metabólica del ácido clorhídrico (HCl) quien al momento de su liberación tiene un pH de 1.0, al mezclarse con la ingesta, líquidos salivales, *mucus* y bicarbonatos se obtiene un valor de pH cercano al 2.5. Los pepsinógenos una vez liberados a la luz glandular son expuestos a la acidez del HCl causando su transformación a la forma activa nombrada Pepsina la cual tiene un pH óptimo de actividad entre 2 y 3 (Dvorkin y Cardinali, 2003; Cunningham, 2003; Shimada, 2003).

1.6.2. Condiciones duodenales

Entre las distintas porciones del intestino, el medio duodenal se considera el principal sitio de desdoblamiento de los componentes en la dieta y se encuentra conformado por el *mucus* el cual recubre la superficie del intestino y por el quimo que es un fluido compuesto por bilis, enzimas pancreáticas y las sustancias secretadas por los enterocitos. El *mucus* es una capa de glicoproteínas con función de proteger la mucosa, esta sustancia es producida y secretada por las células caliciformes presentes en la

mucosa intestinal. Debido a las secreciones de bicarbonatos por parte de los enterocitos en las glándulas de Brunner el contenido duodenal tiene en promedio un valor de pH de 7.5 a 8.0 lo cual es óptimo para la acción de las enzimas pancreáticas (enterocinasa, amilasa y colagenasa) y de los zimógenos pancreáticos (tripsinógenos, quimotripsinógenos, proelastasas, procarboxipeptidasas). La bilis una vez secretada en duodeno tiene la capacidad de activar las enzimas lipasa pancreática y colesterol estearasa adicionalmente a su función de saponificación sobre lípidos (Shimada, 2003; Dvorkin y Cardinali, 2003).

HIPÓTESIS

Ya que se ha reportado que la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tiene capacidad antibacteriana sobre microorganismos de interés sanitario, se pretende que al realizar las pruebas de hemólisis, sobrevivencia al tracto gastrointestinal, adherencia a *mucus* y prueba de sensibilidad a antibióticos se determinará que es una cepa con un potencial como probiótico similar o mayor a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

OBJETIVOS

- Objetivo general:
 - Evaluar a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como posible probiótico mediante la aplicación de las metodologías *in vitro* y comparar estas características frente a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

- Objetivos particulares:
 - Verificar la identidad de las cepas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mediante la prueba en cadena de la polimerasa (PCR)
 - Valorar de la actividad hemolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.
 - Examinar la resistencia o sensibilidad que presentan *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a antibióticos de importancia humana y veterinaria mediante pruebas de difusión.
 - Determinar *in vitro* la tolerancia al tracto gastrointestinal de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mediante la simulación de las condiciones gástricas e intestinales, en términos de acidez, alcalinidad, presencia de pepsina, ácidos biliares y pancreatina.
 - Estimar la capacidad de adherencia a *mucus* intestinal que presentan *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 sometidos *in vitro* al tránsito gastrointestinal

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Mantenimiento de las cepas (crioconservación)

2.1.1 Materiales:

- Cepas liofilizadas:
 - *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042
 - *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
- Medios de cultivo:
 - Caldo Man Rogosa Sharpe “MRS” (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Reactivos:
 - Glicerol (Sigma, Aldrich)

2.1.2 Método:

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las cepas liofilizadas de *P. acidilactici* de la colección ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014, las cuales fueron proporcionadas por la Doctora Adriana Llorente Bousquets del laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM).

Para conservar su viabilidad durante el periodo de almacenamiento y asegurar que en todas las pruebas se emplearon bacterias provenientes del mismo cultivo, las cepas liofilizadas fueron reactivadas y crioconservadas de acuerdo a la metodología propuesta por Martínez y colaboradores (2008). Para lo cual, se realizaron cultivos primarios de cada cepa reactivando los pellets liofilizados e incubándolos durante 12 h en un volumen de 500 mL de caldo MRS, se verificó la pureza del cultivo al realizar los frotis, tinción de Gram y observación bajo el microscopio óptico de campo claro. Se cosechó el paquete celular de cada cultivo primario por centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4 °C en centrífuga (Centurion Scientific, K3 Series), posteriormente fue resuspendido en 50 mL de medio crioprotector (80% caldo MRS y 20% de glicerol), se transfirió en alícuotas de 500 µL a tubos de crioprotección de 2 mL de capacidad, los cuales fueron almacenados en congelador horizontal (Frigidaire C09, Electrolux, Augusta, GA.) a -20 °C hasta su uso (Figura 6).

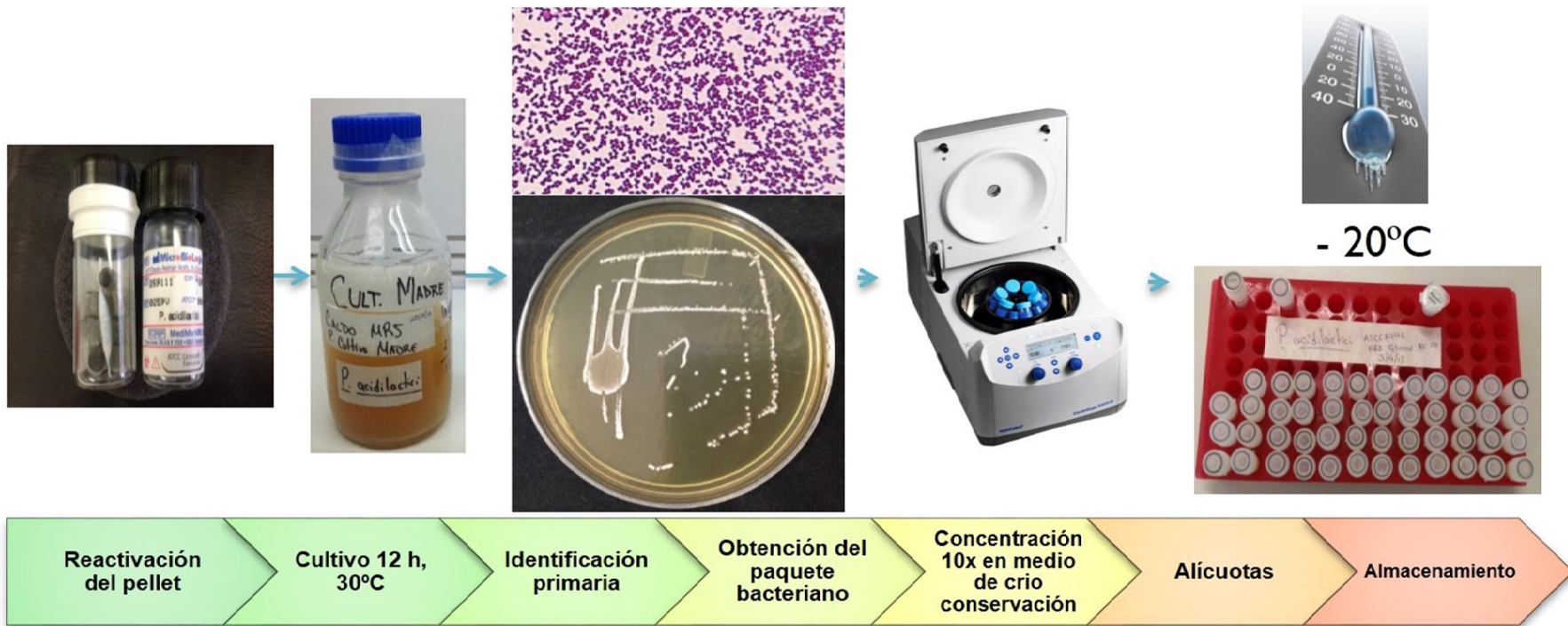


Figura 6. Reactivación, análisis de pureza y crio conservación de cultivos Primarios

2.2 Reactivación de las cepas crioconservadas

Como actividad previa a la realización de las pruebas en este trabajo, cada cepa crioconservada fue reactivada de la siguiente forma: se realizó un inóculo en concentración de 1% (v/v) en 5 mL de caldo MRS y fue incubado por 12 h a 30 °C en estufa bacteriológica (Quincy Lab, modelo 12-140).

2.3 Objetivo Particular 1. Verificar la identidad de las cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.3.1 Materiales:

- Cultivos reactivados de *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014
- GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- PCR Master Mix (Promega, USA)
- Lisozima “lysozyme” L4919 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- *Primers*:
 - Específicos para el género *Pediococcus* y especie *acidilactici*
 - Específicos para el género *Lactobacillus* y la especie *plantarum*
- Gel de agarosa al 1.5%
- Buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8)

2.3.2 Método:

2.3.2.1 Extracción de ADN cromosomal

La extracción del ADN cromosómico (Figura 7) se realizó utilizando el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA, de acuerdo con las indicaciones del producto para bacterias Gram positivas.

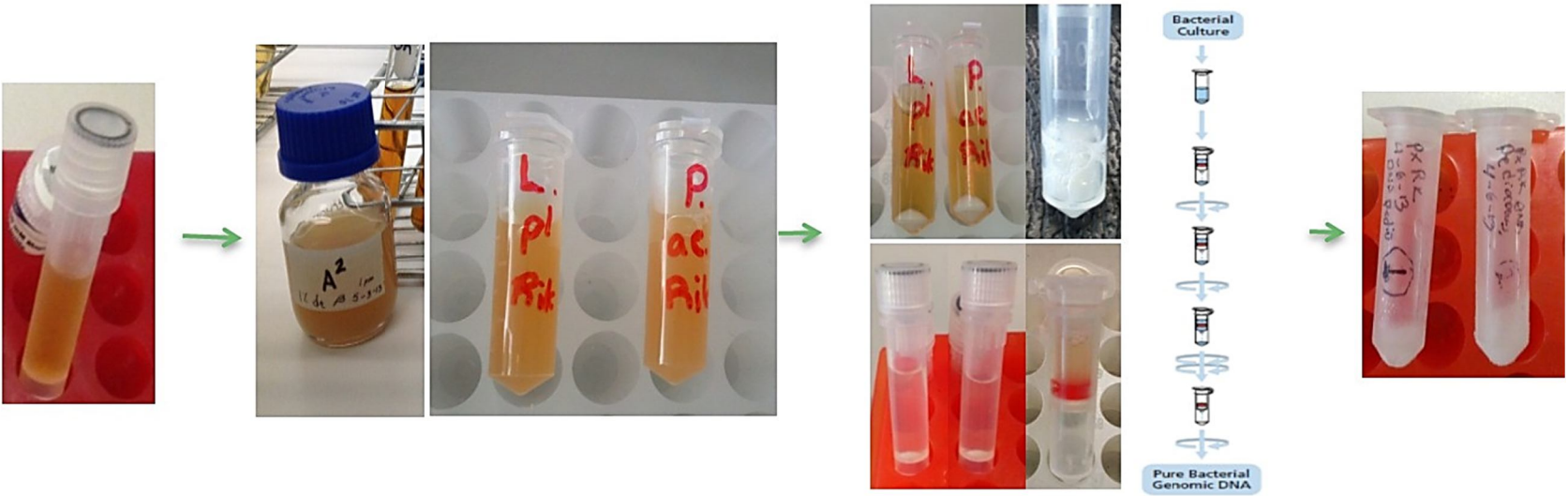


Figura 7. Extracción de ADN genómico (Método)

2.3.2.1.1 Cuantificación y verificación de pureza del ADN extraído:

La evaluación de calidad (concentración y pureza) de los extractos de ADN se realizó en espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, se determinó la concentración ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y pureza de acuerdo a la relación $A_{260/280}$ (ADN/proteínas) la cual debió ser mínimo de 1.7 para continuar con la amplificación.

2.3.3 Identificación de *P. acidilactici* ATCC 8042

La estrategia para la amplificación por PCR y la identificación de secuencias de ADN del gen 16S rARN específico del género *Pediococcus* y del gen *ldh* específico de la especie *acidilactici*, se basó en la metodología de Mora *et al.*, (1997). Los *primers* para regiones variables del gen 16S ARNr y del gen *ldh* (Cuadro 1) fueron sintetizados por la empresa IDT® (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).

Cuadro 1. Secuencia de los *primers* utilizados en la identificación de *P. acidilactici* por PCR

Primer	Nomenclatura	Longitud del amplificado (pb)	Secuencia (5'→3')
PacF	S-S- <i>P.pent</i> -67 (<i>P. pentosaceus</i>)-a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATTAT
PpeF	S.S. <i>P.acid</i> .-69 (<i>P. acidilactici</i>)-a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATCAG
PuR	S-*-Lab-940 (<i>P. acidilactici</i>)-a-A-18	872	ACCTTGCGGTCGTACTCC
<i>ldhD F</i>	<i>ldh</i> -S-Pac-1192 (<i>P. acidilactici</i>)-a-S-20	449	GGACTTGATAACGTACCCGC
<i>ldhD R</i>	<i>ldh</i> -S-Pac-1640 (<i>P. acidilactici</i>)-b-S-20		GTTCCGTCTTGCAATTTGACC

La nomenclatura está dada por Alm *et al.*, 1996

2.3.3.1 Condiciones empleadas en la PCR de identificación de *Pediococcus acidilactici*

Con objeto de contar con controles en la prueba se realizaron tres diferentes formulaciones para probarse en la PCR, las cuales se muestran en el Cuadro 2.

Las condiciones del proceso de amplificación (Figura 8) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, en los ciclos posteriores se estableció una temperatura de desnaturalización en 94°C por 1 minuto , mientras que la extensión se realizó a 72°C por 1 min con la intención de incrementar la especificidad de alineamiento la temperatura fue establecida en 70 °C al inicio y fue disminuyendo cada dos ciclos hasta alcanzar los 67°C, se realizaron 36 ciclos adicionales (alineamiento a 67°C) seguidas de una extensión final a 72°C por 5 minutos, en termociclador Apollo ATC201 (UVItec, Cambridge, U.K.). Una vez concluida la extensión fue almacenada a -50 °C en ultracongelador Ultra II (Thermo Scientific Revco, North Carolina, USA) hasta su análisis.

Cuadro 2. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación de *P. acidilactici*

Componente	Control negativo (sin ADN) (μL)	Reacción con ADN de <i>P. acidilactici.</i> (μL)	Reacción con ADN de <i>L. plantarum</i> (μL)
PCR Master Mix	12.5	12.5	12.5
<i>Primer</i> IdhD F	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> IdhD R	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> Pac F	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> Ppe F	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> Pu R	0.5	0.5	0.5
DNA (60 ng/μL)	0	1	1
H ₂ O libre de nucleasas	10	9	9
Volumen total de la reacción (μL)	25	25	25

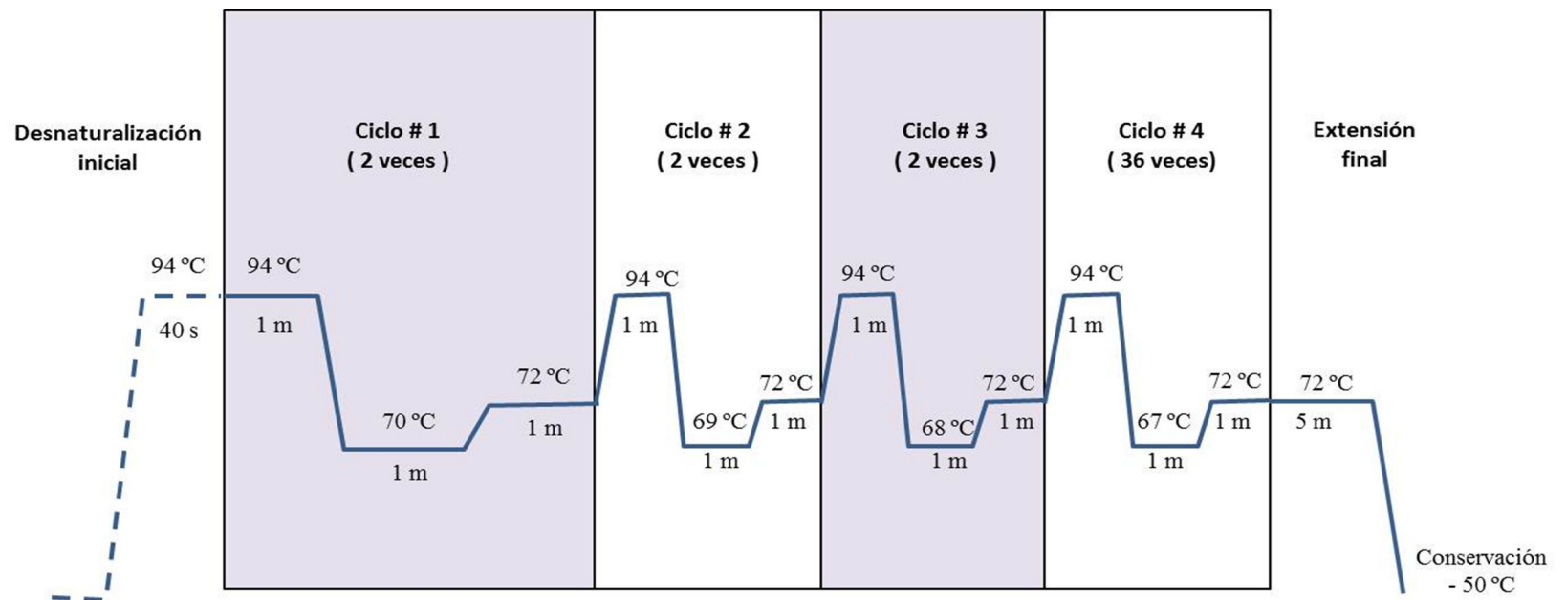


Figura 8. Programación del termociclador en la identificación de *P. acidilactici*

2.3.4 Identificación de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

La identificación de *L. plantarum* por PCR fue realizada mediante PCR multiplex basada en los protocolos establecidos por Dubernet *et al.*, (2002) y Torriani *et al.*, (2001) para la identificación de género y especie respectivamente.

Los *primers* empleados en la identificación de *L. plantarum* mostrados en el Cuadro 3 fueron sintetizados por IDT® (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).

Cuadro 3. Secuencia de los *primers* utilizados en la identificación de *L. plantarum* por PCR

Primer	Longitud del amplificado (pb)	Secuencia (5' → 3')
LbLMA1-rev	250	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC
R16-1		CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA
Prev		TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC
PlanF	318	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA
PpentF	218	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C

Se realizaron dos reacciones una para la identificación de género y otra para la identificación de especie, en cada uno de los casos se diseñaron formulaciones control a la prueba, la reacción se constituyó de 12,5 µL de Master Mix, 0.5 µL de cada uno de los *primers*, 60 ng de ADN y agua libre de nucleasas c.b.p. 25 µL.

2.3.4.1 Condiciones de la PCR para la identificación del género *Lactobacillus*

La identificación del género *Lactobacillus* se realizó al amplificar la secuencia intergénica 16S-23S codificante de ARN ribosomal. Se diseñaron diversas formulaciones con el fin de incluir controles, mismas que se muestran en el Cuadro 4.

La amplificación se realizó en termociclador Apollo ATC201 (UVItec, Cambridge, U.K.), las condiciones (Figura 9) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de veinte ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Una vez concluida la amplificación, las reacciones se almacenaron a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ultracongelador Ultra II (Thermo Scientific Revco, North Carolina, USA) hasta su análisis.

Cuadro 4. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación del género *Lactobacillus*

Componente	Control negativo (sin ADN) (μL)	Reacción con ADN de <i>P. acidilactici.</i> (μL)	Reacción con ADN de <i>L. plantarum</i> (μL)
PCR Master Mix	12.5	12.5	12.5
Primer R16-1F	0.5	0.5	0.5
Primer LbLMA1- Rev	0.5	0.5	0.5
DNA (60 ng/ μL)	0	1	1
H ₂ O libre de nucleasas	11.5	10.5	10.5
Volumen total de la reacción (μL)	25	25	25

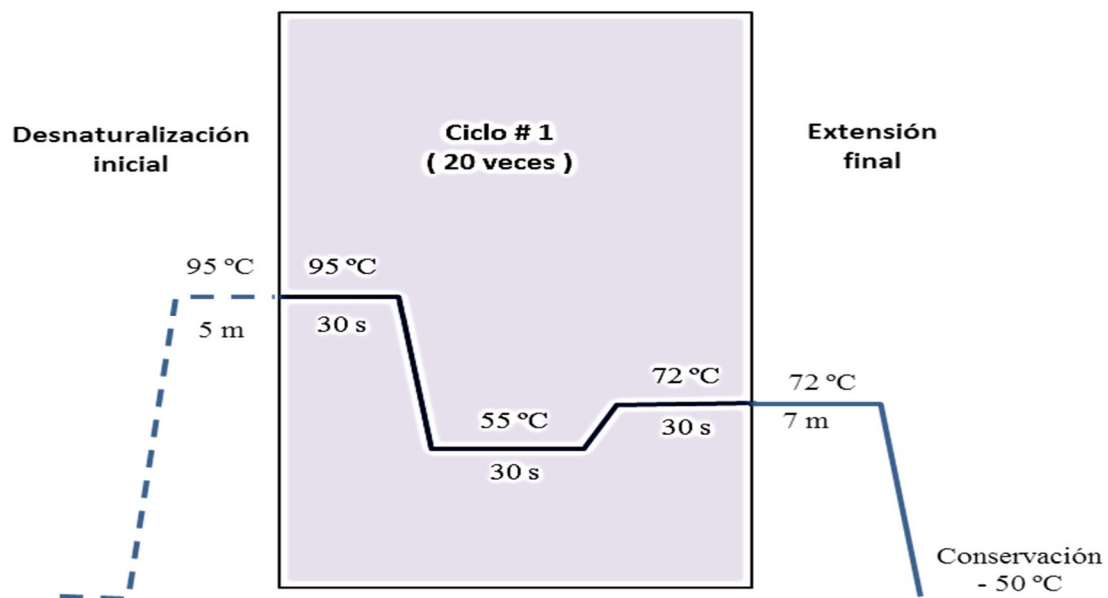


Figura 9. Programación del termociclador en la identificación del género *Lactobacillus*

2.3.4.2 Condiciones de la PCR para la identificación de la especie *plantarum*

Para la identificación de la especie *plantarum* se amplificó la secuencia del gen *recA*, considerado marcador filogenético que logra la distinción entre las especies *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum*. Se diseñaron diversas formulaciones con el fin de incluir controles, mismas que se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Formulación de las reacciones en la PCR de identificación de la especie *plantarum*

Componente	Control negativo (sin ADN) (μL)	Reacción con ADN de <i>P. acidilactici</i> . (μL)	Reacción con ADN de <i>L. plantarum</i> (μL)
PCR Master Mix	12.5	12.5	12.5
<i>Primer</i> Pent F	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> Plan F	0.5	0.5	0.5
<i>Primer</i> pREV	0.5	0.5	0.5
DNA (60 ng/ μL)	0	1	1
H ₂ O libre de nucleasas	11	10	10
Volumen total de la reacción (μL)	25	25	25

La amplificación se realizó en termociclador Apollo ATC201 (UVItec, Cambridge, U.K.). Las condiciones del proceso de amplificación (Figura 10) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de treinta ciclos consistentes en desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 10 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Una vez realizada la extensión fue almacenada a -50 °C en ultracongelador Ultra II (Thermo Scientific Revco, North Carolina, USA) hasta su análisis.

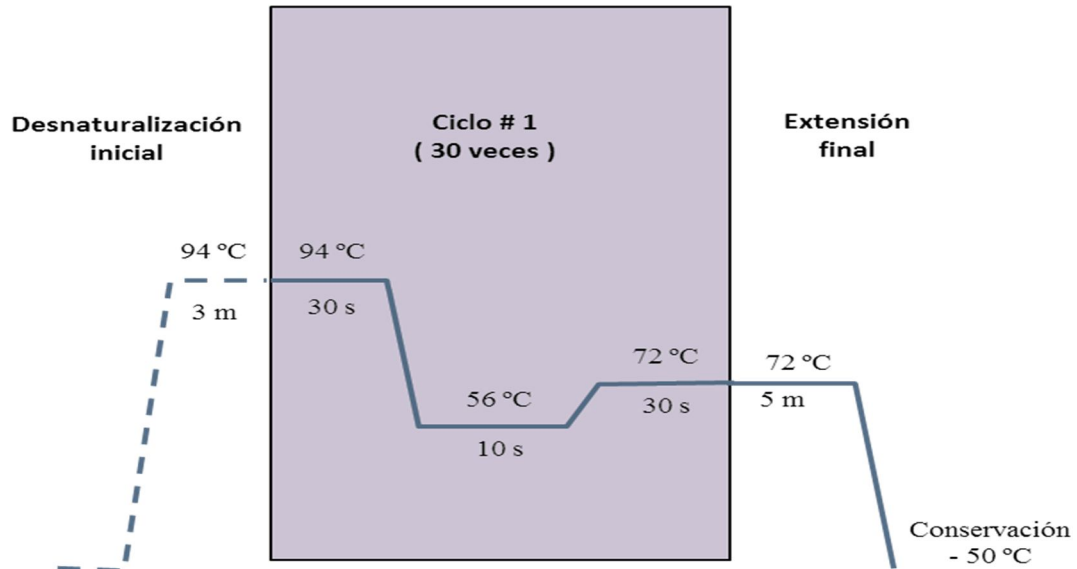


Figura 10. Programación de termociclador en la identificación de la especie *plantarum*

2.3.5 Electroforesis de los productos de la amplificación.

El protocolo de electroforesis se basó en lo descrito por Maniatis *et al.*, (1982). Se prepararon geles de agarosa UltraPure Agarose (Invitrogen, CA, USA) al 1.5% en TAE buffer (40 mM Tris acetate, mM EDTA, pH 8.2), teñidos con bromuro de etidio BRET (APEX Bioreserch Products) en concentración de 0.625 mg/mL.

Las muestras sometidas a electroforesis se constituyeron de la siguiente forma: se tomaron 5 μ L de cada una de las reacciones amplificadas, se mezclaron con 3 μ L de BrEt (5 μ g/ mL) y 3 μ L de colorante Blue/Orange Loading Dye 6x, adicionalmente se preparó una mezcla de 3 μ L de BrEt (Promega, WI, USA) (5 μ g/ mL), 3 μ L de colorante Orange Bluelorange 6X Loading Dye (Promega, WI, USA) y 1.4 μ L de marcador de pares de bases 100bp DNA Step Ladder (Promega, WI, USA) para identificar el peso molecular de las bandas amplificadas.

La electroforesis se desarrolló en buffer TAE mediante la aplicación de 80 Volts durante 1 h. Los geles fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta en Transiluminador CLEAVER CSL-MDOCUV312 (Clever Scientific LTD, U.K.), por último se verificó la presencia o ausencia de bandas y su longitud en pares de bases (pb).

2.4 Objetivo Particular 2. Valoración de la actividad hemolítica

2.4.1 Material:

- Biológicos:
 - Cultivos reactivados de *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014
 - Cultivo de 12 h de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caldo BHI
- Medios de cultivo:
 - Caldo MRS (Becton, Dickinson and Company, USA)
 - Caldo BHI (Becton, Dickinson and Company, USA)
 - Agar sangre (Cuadro 6)

Cuadro 6. Formulación de agar sangre

Reactivo	Cantidad
Agar sangre base (Becton, Dickinson and Company , USA)	40 g
Sangre desfibrinada de bovino	5 mL
H ₂ O destilada	1 L

2.4.2 Método:

El análisis de la capacidad hemolítica realizado en el presente trabajo se basó en la metodología previamente descrita por Santini *et al.*, (2008). Posterior a su reactivación, se realizaron cultivos por 12 h a 35°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, se utilizó caldo BHI para el cultivo de *S. aureus* y caldo MRS para los cultivos de *P. acidilactici* y *L. plantarum*. Los cultivos bacterianos fueron sembrados por agotamiento en placas de agar sangre (posterior a prueba de esterilidad) e incubadas a 30 °C por 48 h antes de proceder a su lectura.

La prueba se realizó por triplicado y se reportó el resultado en términos de cepa α -hemolítica si se observaron modificaciones de color en el medio circundante a la colonia, como cepa β -hemolítica aquella que presentó zonas translúcidas en el agar sangre alrededor de la colonia o bien como cepa no hemolítica en caso de no producirse ningún cambio en el medio de cultivo.

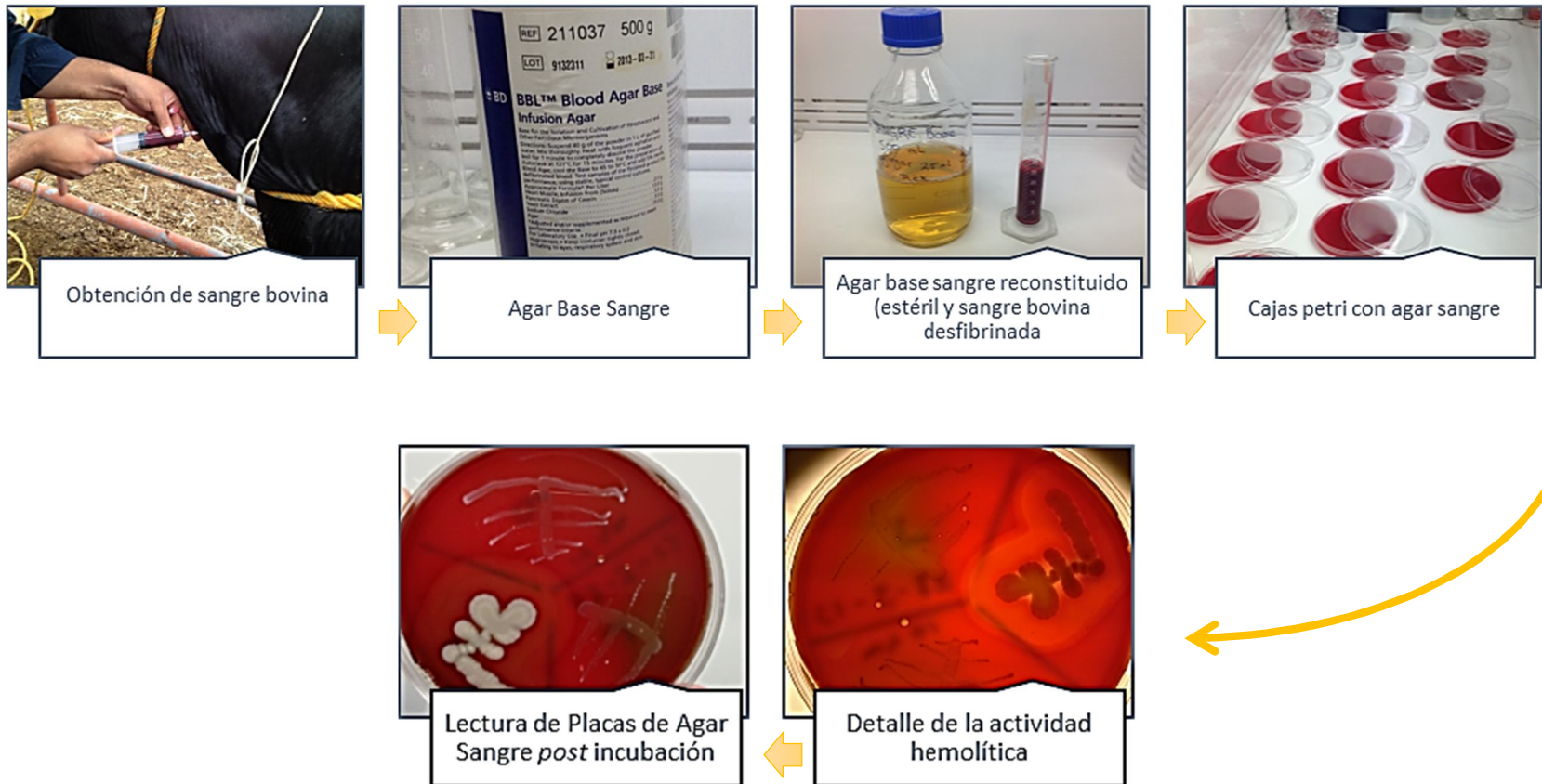


Figura 11. Prueba de capacidad hemolítica (Método)

2.5 Objetivo Particular 3. Valoración de la susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos fue evaluada de acuerdo a la guía técnica de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012), determinando la resistencia o susceptibilidad que presentaron las cepas de estudio al desafiarlos con los antibióticos indicados en el Cuadro 7 (Zhou, *et al.*, 2005).

Cuadro 7. Antibióticos y concentración empleada en la prueba de susceptibilidad/resistencia

Antibiótico	Concentración
Tetraciclina	30 mg
Vancomicina	30 mg
Estreptomina	10 mg
Kanamicina	30 mg
Amikacina	30 mg
Ampicilina	10 mg
Cefalotina	30 mg
Ceftriaxona	30 mg
Cloranfenicol	30 mg
Dicloxacilina	1 mg
Enoxacina	10 mg
Eritromicina	15 mg
Gentamicina	10 mg
Netilmicina	30 mg
Penicilina	10 U
Sulfas/trimetoprim	25 mg

2.5.1 Materiales:

- Biológicos:
 - Cultivos reactivados de *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014
- Medios de cultivo:
 - Agar Mueller Hinton (Becton, Dickinson and Company, USA)
 - Caldo MRS (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Discos de Antibióticos para antibiogramas Multidiscos^{MR} Combinados (BIO-RAD, México)

- Discos de Antibióticos para antibiogramas Unidiscos^{MR} Tetraciclina, Vancomicina, Estreptomina y Kanamicina (BIO-RAD, México)

2.5.2 Método:

A partir de cada uno de los cultivos reactivados, se realizó un pase (cultivo en caldo MRS en concentración de 1% v/v, incubado por 12 h a 30 ± 2 °C), se obtuvo del paquete celular por centrifugación (5000g por 5 min) y se resuspendió en agua destilada estéril hasta lograr una lectura de absorbancia a 600 nm de 1.0.

Para realizar la prueba de difusión, las cepas fueron sembradas en agar Mueller Hinton suplementado con 0.5% p/v con glucosa anhidra, por la técnica de agotamiento en placa en tres direcciones empleando hisopos estériles, se permitió el secado de la superficie del agar e inmediatamente después fueron colocados los discos con antibiótico con ayuda de pinzas estériles, posteriormente se incubaron las cajas a 30°C por 24 h antes de su lectura (Figura 12).

El resultado de cada cepa bacteriana fue reportado como la media y desviación estándar obtenido al realizar 5 repeticiones para cada antibiótico, este valor fue categorizado como susceptible (S) o resistente (R) de acuerdo a lo señalado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2007).

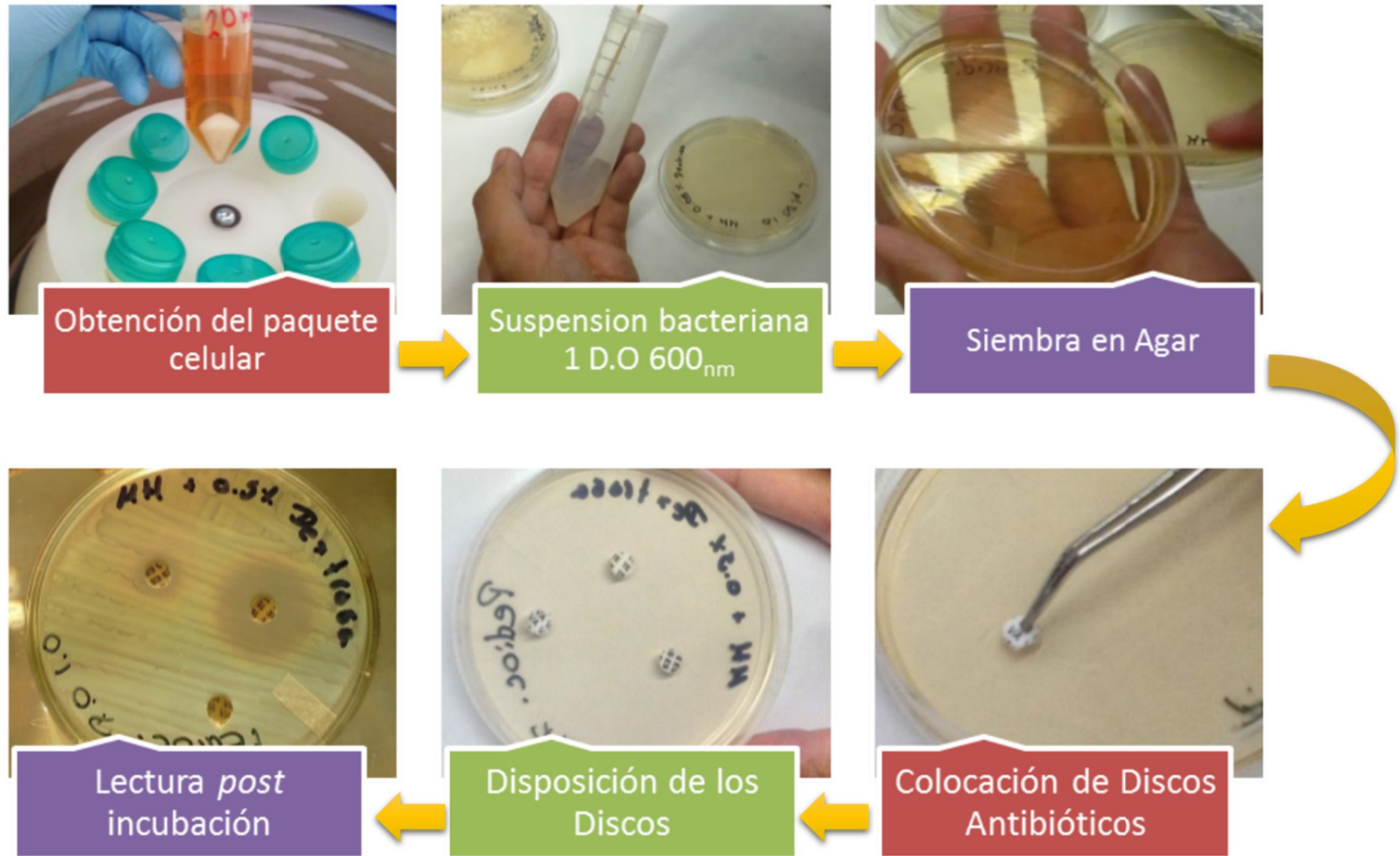


Figura 12. Prueba de resistencia/tolerancia a Antibióticos (Método)

2.6 Objetivo Particular 4. Determinar *in vitro* la tolerancia de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mediante la simulación de las condiciones gástricas e intestinales.

Para que un organismo pueda considerarse potencialmente probiótico debe tener la capacidad de resistir las condiciones de acidez, alcalinidad, presencia de enzimas digestivas y ácidos biliares en el tracto gastrointestinal para poder instaurarse en el intestino y proliferar. Con el objetivo de evaluar estas capacidades, se realizaron ensayos específicos que permitieron cuantificar la supervivencia al tracto gastrointestinal, simulando sus condiciones *in vitro* (Vidhyasagar y Jeevaratnam (2012); Dunne *et al.*, 2001).

La tolerancia al tracto gastro intestinal se realizó evaluando el comportamiento de las cepas bacterianas en tres pruebas independientes: tolerancia al medio gástrico, tolerancia al medio intestinal y tolerancia al tránsito gastrointestinal.

2.6.1 Preparación de las suspensiones bacterianas empleadas en las pruebas de tolerancia

Previamente al desarrollo de cada una de los ensayos, las cepas bacterianas crioconservadas fueron reactivadas realizando un cultivo al 1% (v/v) en 5 mL de caldo MRS a 30 ± 2 °C por 12 h, se realizó un pase bajo las mismas condiciones de inoculación e incubación, se obtuvo el paquete celular por centrifugación (5000 g por 5 min), posteriormente fue sometido a 2 lavados consecutivos (resuspendiendo en 5 mL de PBS seguido de centrifugación a 5000 g por 5 min) con la finalidad de eliminar los nutrientes del caldo MRS. Por último, se ajustó la absorbancia de la suspensión a 1.0 unidades A_{600nm} , se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹) y se reservó hasta su uso.

2.6.2 Materiales

- Biológicos:
 - Cultivos reactivados de *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014
- Medios de cultivo:
 - Caldo MRS (Becton, Dickinson and Company, USA)
 - Agar MRS (Becton, Dickinson and Company, USA)

- Reactivos:
 - HCl 1.0 M (J.T Baker, México)
 - NaOH 0.1 N (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
 - Pepsina (Pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
 - Pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
 - Ácidos biliares (Ox-bile, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
 - Solución Salina 0.5% (la formulación para 1 L se presenta en el Cuadro 8)
 - Buffer fosfatos PBS pH 7.4 (la formulación se presenta en el Cuadro 9)
 - Agua peptonada (la formulación para 1 L se presenta en el Cuadro 10)

Cuadro 8. Formulación de Solución Salina 0.5%

Reactivo	Marca	Cantidad
NaCl	(J.T Baker, México)	5 g
H ₂ O destilada		c.b.p. 1 L

Cuadro 9. Formulación de Buffer PBS

Reactivo	Marca	Cantidad
NaCl	(J.T Baker, México)	8 g
KCl	(Meyer, México)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	(J.T Baker, México)	1.44 g
KH ₂ PO ₄	(J.T Baker, México)	0.2 g
H ₂ O destilada		c.b.p. 1 L

Cuadro 10. Formulación de Agua Peptonada

Reactivo	Marca	Cantidad
NaCl	(J.T Baker, México)	8.5 g
Peptona Proteosa	(Difco, BD, USA)	1 g
H ₂ O destilada		1L

2.6.3 Tolerancia al medio gástrico

El nivel de tolerancia que *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014 presentan al medio gástrico fue determinado de acuerdo a la metodología propuesta por Ryu y Chang (2013) y Musikasang *et al.*, (2009).

2.6.3.1 Preparación de jugo gástrico simulado

El jugo gástrico se preparó minutos antes de cada prueba, realizando una solución de Pepsina a razón de 3 mg·mL⁻¹ en solución salina (0.5% m/v) con pH ajustado a 2.5, la cual fue esterilizada mediante microfiltración en membranas con poros de 0.2 µm de diámetro.

2.6.3.2 Método:

- Desafío al medio gástrico:

Para realizar el desafío al medio gástrico, se emplearon tubos falcon con capacidad de 50 mL, a los cuales se les adicionó 1.5 mL de solución salina 0.5% w/v, 1.0 mL de la suspensión bacteriana (previamente descrita en el punto 2.6.1) y 5 mL de jugo gástrico formulado. Se contó con un grupo control en el que se sustituyó el jugo gástrico formulado por PBS.

La suspensión se agitó en vortex (Thermo Scientific, modelo M16715) por 5 s, posteriormente se incubó en estufa bacteriológica a 38±2 °C. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias viables por el método de Miles y Misra (1938) a los tiempos: 0, 2 y 4 h de incubación.

Fueron realizadas cinco réplicas de la prueba de tolerancia gástrica para cada cepa bacteriana y cada replica contó con tres repeticiones. Los datos obtenidos del conteo de UFC·mL⁻¹ para cada una de las cepas evaluadas fueron transformados al porcentaje de tolerancia al medio gástrico (TMG) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TMG} = (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ tratamiento} / \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ control}) \times 100$$

2.6.3.3 Análisis estadístico de la tolerancia al medio gástrico:

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los resultados de TMG, de acuerdo a un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 (Tiempo, h: 0, 2 y 4) x 2 (Microorganismo, cepa: *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*) de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

En Donde:

Y_{ijk} = valor de la variable de respuesta observado en el i-ésimo tiempo de exposición a las condiciones gástricas, j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

μ = efecto de la media general

A_i = efecto del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones gástricas

B_j = efecto de la j-ésima cepa de estudio

$(AB)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones gástricas y la j-ésima cepa de estudio.

e_{ijk} = efecto del error experimental del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones gástricas, la j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

La comparación de las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, además, los efectos del factor Tiempo se analizaron por contrastes polinómicos ortogonales, en ambos casos se utilizó el procedimiento General Linear Model en el paquete estadístico Statgraphics 16 (Duarte O., 1986; Cochran y Cox, 1957).

2.6.4 Tolerancia al medio Intestinal aislado

El nivel de tolerancia tanto para *P. acidilactici* ATCC 8042 como *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 presentan al medio intestinal se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Vidhyasagar y Jeevaratnam (2012).

2.6.4.1 Preparación del jugo intestinal simulado

El jugo intestinal se preparó minutos antes de cada prueba, realizando una solución de ácidos biliares ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pancreatina ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en solución salina (0.5% m/v) con pH ajustado a 8, la cual fue esterilizada mediante microfiltración en membranas con poros de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro.

2.6.4.2 Método:

- Desafío al medio intestinal:

Para realizar el desafío al medio intestinal, se emplearon tubos falcon con capacidad de 45 mL, a los cuales se les adicionó 1.5 mL de solución salina 0.5% estéril, 1.0 mL de la suspensión bacteriana (previamente descrita en el punto 2.6.1) y 5 mL de jugo intestinal formulado. Se contó con un grupo control en el que se sustituyó el jugo intestinal formulado por PBS.

La suspensión se agitó en vortex (Thermo Scientific, modelo M16715) por 5 s, posteriormente se incubó en estufa bacteriológica a $38\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias viables por el método de Miles y Misra (1938) a los tiempos: 0, 2.5 y 5 h de incubación.

Fueron realizadas cinco réplicas de la prueba de tolerancia gástrica para cada cepa bacteriana y cada replica contó con tres repeticiones. Los datos obtenidos del conteo de $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada una de las cepas evaluadas fueron transformados al porcentaje de tolerancia al medio intestinal (TMI) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TMI} = (\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ tratamiento} / \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ control}) \times 100$$

2.6.4.3 Análisis estadístico de la tolerancia al medio intestinal:

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los resultados de TMG, de acuerdo a un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 (Tiempo, h: 0, 2.5 y 5) x 2 (Microorganismo, cepa: *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*) de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

En Donde:

Y_{ijk} = valor de la variable de respuesta observado en el i-ésimo tiempo de exposición a las condiciones intestinales, j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

μ = efecto de la media general

A_i = efecto del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales

B_j = efecto de la j-ésima cepa de estudio

$(AB)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales y la j-ésima cepa de estudio.

e_{ijk} = efecto del error experimental del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales, la j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

La comparación de las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, además, los efectos del factor Tiempo se analizaron por contrastes polinómicos ortogonales, en ambos casos se utilizó el procedimiento General Linear Model en el paquete estadístico Statgraphics 16 (Duarte O., 1986; Cochran y Cox, 1957).

2.6.5 Tolerancia al Tracto Gastrointestinal

La estrategia para evaluar la tolerancia al tracto gastrointestinal de las cepas estudiadas en este trabajo está basada en los trabajos de Musikasang, Tani, H-kittikun, & Maneerat (2009).

2.6.5.1 Método:

- **Desafío al tracto gastrointestinal:**

Una vez ajustadas las suspensiones bacterianas (previamente descrita en el punto 2.6.1), fueron sometidas a la prueba de tolerancia gástrica al incubarse durante 4 h a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ en jugo gástrico simulado, una vez concluido el tiempo se realizaron dos lavados en PBS para eliminar cualquier rastro del jugo gástrico y su absorbancia ($A_{600\text{nm}}$) fue ajustada a 1.0.

El desafío al medio intestinal se realizó adicionando en un nuevo falcon 1.5 mL de solución salina 0.5% m/v estéril, 1.0 mL de la suspensión bacteriana desafiada al medio gástrico previamente y 5 mL de jugo intestinal simulado. La suspensión se agitó en vortex (Thermo Scientific, modelo M16715) por 5 s y se incubó en estufa bacteriológica a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 horas.

Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias viables por el método de Miles y Misra (1938) a los tiempos: 0 y 5 h de incubación en medio intestinal. Se contó con un grupo control en el que se sustituyó el jugo intestinal por PBS.

Fueron realizadas cinco réplicas de la prueba de tolerancia gástrica para cada cepa bacteriana y cada réplica contó con tres repeticiones. Los datos obtenidos del conteo de $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada una de las cepas evaluadas fueron transformados al porcentaje de tolerancia al tracto gastrointestinal (TTGI) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TTGI} = (\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ tratamiento} / \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ control}) \times 100$$

2.6.5.2 Análisis estadístico de la tolerancia al tracto gastrointestinal:

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de los resultados de TTGI, de acuerdo a un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 (Tiempo, h: 0 y 5) x 2 (Microorganismo, cepa: *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*) de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

En Donde:

Y_{ijk} = valor de la variable de respuesta observado en el i-ésimo tiempo de exposición a las condiciones intestinales, j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

μ = efecto de la media general

A_i = efecto del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales

B_j = efecto de la j-ésima cepa de estudio

$(AB)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales y la j-ésima cepa de estudio.

e_{ijk} = efecto del error experimental del i-ésimo Tiempo de exposición a las condiciones intestinales, la j-ésima cepa de estudio y k-ésima replica del experimento.

La comparación de las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, además, los efectos del factor Tiempo se analizaron por contrastes polinómicos ortogonales, en ambos casos se utilizó el procedimiento General Linear Model en el paquete estadístico Statgraphics 16 (Duarte O., 1986; Cochran y Cox, 1957).

2.7 Objetivo Particular 5. Determinación de Adherencia a *mucus*

Para evaluar la adhesión a *mucus* intestinal que presentan las especies de *P. acidilactici* ATCC 8042 y de *L. plantarum* ATCC 8014, esta prueba fue basada en la metodología propuesta por Sun, *et al.* (2007).

2.7.1 Materiales:

- *Mucus* porcino (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Buffer carbonato sódico Na₂CO₃ 50 mM·L⁻¹, pH 9.7 (Cuadro 11)
- PBS (la formulación para 1 L se presenta en el Cuadro 9)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- PBST (PBS suplementado con 0.05% v/v de Tween 20)

Cuadro 11. Formulación de Buffer carbonato sódico 50 mM·L⁻¹

Reactivo	Marca	Cantidad
Na ₂ CO ₃	(J.T Baker, México)	1.59 g
NaHCO ₃	(J.T Baker, México)	2.93 g
H ₂ O destilada		c.b.p. 1 L

2.7.2 Método:

- Inmovilización de *mucus*

El *mucus* se resuspendió a concentración de 1000 µg·mL⁻¹ en buffer Na₂CO₃, el cual se inmovilizó en microplacas (Microtiter Microplates, Thermo Electron Corporation, Boston, USA), adicionando 150 µL en cada pocillo e incubando por 12 h a 4°C con agitación lenta. Los pocillos fueron bloqueados con 0.2 mL de PBS suplementado con 1% de Tween 20 T por 1 h y posteriormente lavados con PBST.

- Preparación de los cultivos bacterianos:

Las cepas bacterianas crioconservadas fueron reactivadas como se mencionó en el punto 2.2 (página - 38 -) y se realizó un pase bajo las mismas condiciones de inoculación e incubación, se obtuvo el paquete celular por centrifugación (5000 g por 5 min) y sometido a 2 lavados consecutivos al resuspender en 5 mL de PBS y centrifugar (5000 g por 5 min), con la finalidad

de eliminar los nutrientes del caldo MRS. El paquete celular limpio fue resuspendido en PBST y se ajustó su lectura a 0.5 unidades de absorbancia a 600 nm.

- Adhesión de los cultivos a la capa de *mucus*:

Se emplearon dos placas de 96 pozos, recubiertas con *mucus*, cuya disposición se observa en la Figura 13, de tal forma que se obtuvieron en total 72 pozos sometidos a contacto con cultivo de *P. acidilactici*, 72 pozos sometidos a contacto con cultivo de *L. plantarum* y 48 pozos sin la adición de cultivo “blanco” .

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Blanco	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>P. acidilactici</i>	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blanco	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>L. plantarum</i>	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 13. Diseño de placas en prueba de adherencia

Se añadieron 150 μ L de la suspensión bacteriana en PBST a cada pocillo, la placa fue incubada por 1 h a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con PBST para eliminar las bacterias no adheridas.

Se determinó la Absorbancia a 490nm de los pocillos antes (A_{490nm1}) y después de realizar los lavados (A_{490nm2}), en lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad), empleando como blanco placas con *mucus* sin bacterias adicionadas.

Se calculó el porcentaje de adherencia para cada una de las cepas con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Adherencia} = (A_{490nm2} / A_{490nm1}) * 100$$

Diseño experimental:

La prueba de adherencia a *mucus* intestinal fue realizada de acuerdo a un diseño completamente al azar de un solo factor (Microorganismo) el cual constó con dos niveles (*P. acidilactici* y *L. plantarum*). Para cada una de los microorganismos estudiados, se realizaron 72 repeticiones del experimento (N=72).

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de 0.05 para los resultados obtenidos en la prueba, para verificar la normalidad del conjunto de datos, empleando el programa estadístico Statgraphics.

La presencia de diferencias estadísticas entre la adherencia presentada por ambas cepas se evaluó al realizar la prueba *t* de Student con un nivel de significancia de 0.05 a los datos obtenidos para la variable de respuesta (% de adherencia)

III. RESULTADOS

3.1. Verificación de la identidad de las cepas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Una vez reactivadas las cepas de *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014 en caldo MRS, se realizó la inspección fenotípica verificando morfología y pureza a nivel macro y microscópico, también se efectuó la verificación genotípica de la identidad de las cepas estudiadas en el presente trabajo empleando PCR múltiple ya que esta técnica de biología molecular que permite identificar a nivel de género y de especie.

3.1.1. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

En cuanto a la observación macroscópica del cultivo en agar MRS (Figura 14) demostró que, las colonias fueron de color blanco, redondeadas, con bordes lisos, convexas y de 2 a 3 mm de diámetro.

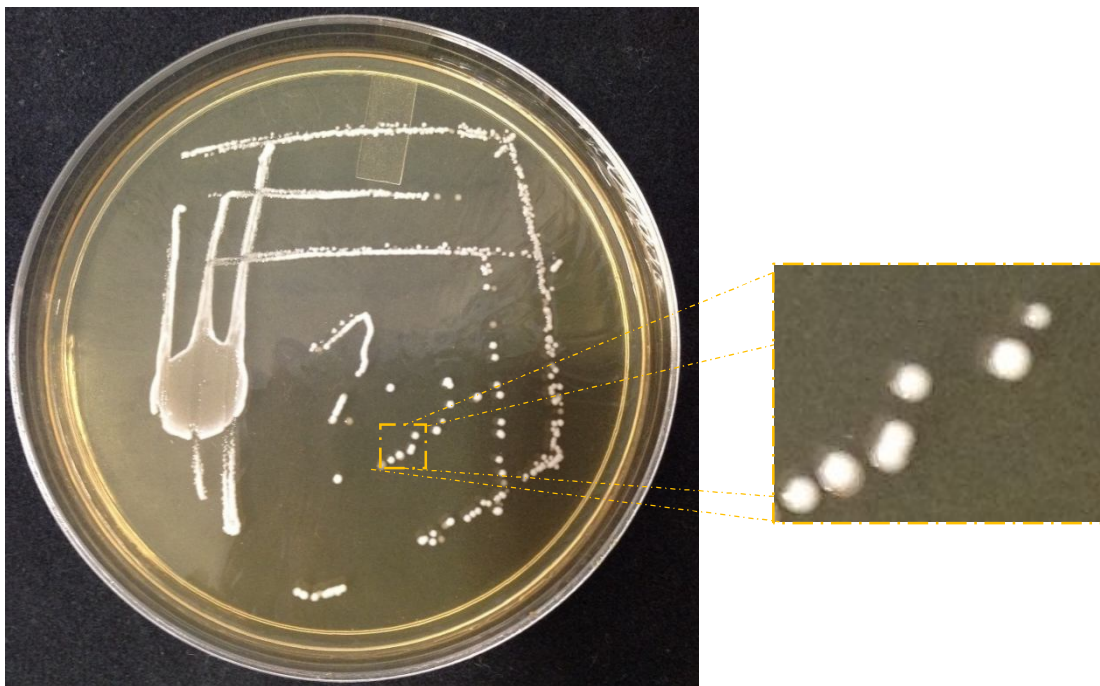


Figura 14. Cultivo de *P. acidilactici* en agar MRS

En la observación bajo microscopio óptico (Figura 15), pudo observarse que la morfología bacteriana correspondió a cocos Gram positivos, dispuestos en racimos o tétradas

características de *Pediococcus* y debido a la homogeneidad presente en el cultivo, se consideró puro.

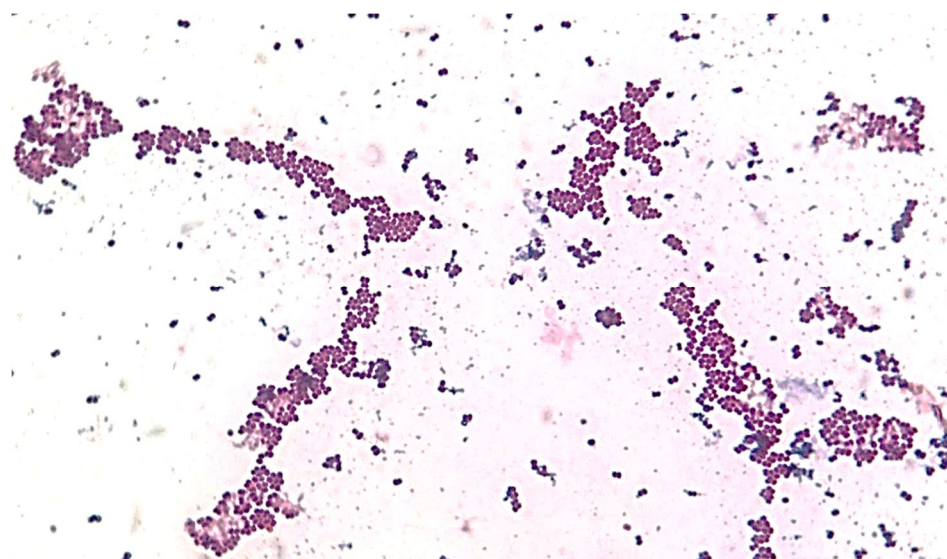


Figura 15. Frotis y tinción de Gram de *Pediococcus acidilactici*

El DNA extraído presentó una concentración de $67.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que su pureza verificada por la relación $A_{260/280}$, fue valorada en 1.8 y resultó adecuado para la amplificación mediante PCR.

El patrón electroforético en agarosa de los productos de PCR obtenidos en la prueba de Identificación de *Pediococcus acidilactici* se presentan en la Figura 16, en donde se observó que los controles (carriles 2 y 4) impuestos en la prueba no mostraron ninguna banda de amplificación, debido a la ausencia de material genético o bien presencia de material genético sin coincidencias para la unión de los *primers* sin embargo, se evidenció que al someter la muestra con ADN de la cepa de *P. acidilactici* a la PCR, se logró la amplificación de dos fragmentos. Uno de ellos con dimensión de ~ 450 pares de bases que correspondió a lo esperado para la amplificación del fragmento de ADN codificante para la subunidad 16S de ARN ribosomal específico del género *Pediococcus*, mientras que el segundo, con una dimensión cercana a ~ 870 pb concuerda con lo esperado para la amplificación de la secuencia de ADN del gen codificante para la enzima D-lactato deshidrogenasa, quien logra la identificación a nivel de especie de *P. acidilactici*.

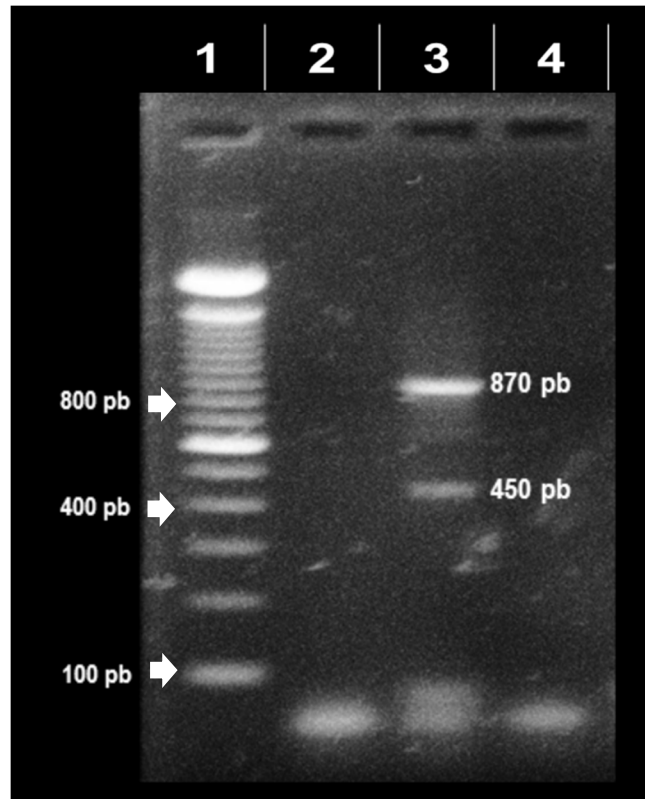


Figura 16. Patrón electroforético de los productos de PCR en la identificación de *Pediococcus acidilactici* carril 1 (100 pb DNA Step Ladder, Promega, WI, USA), carril 2 Control negativo (Sin ADN), carril 3 (ADN de *P. acidilactici*), carril 4 Control positivo (ADN de *L. plantarum*)

3.1.2. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

A la observación macroscópica del cultivo en agar MRS (Figura 17), las colonias del cultivo primario de *L. plantarum* presentaron un color blanco, forma circular, convexas, con bordes lisos y un diámetro promedio de 1.5 mm.

La tinción de Gram y observación bajo microscopio óptico (Figura 18), permitieron observar observó que la morfología bacteriana correspondió a bacilos Gram positivos, dispuestos de forma diplobacilar, con un tamaño promedio de 2 μm , el cultivo presentó homogeneidad de estas características.

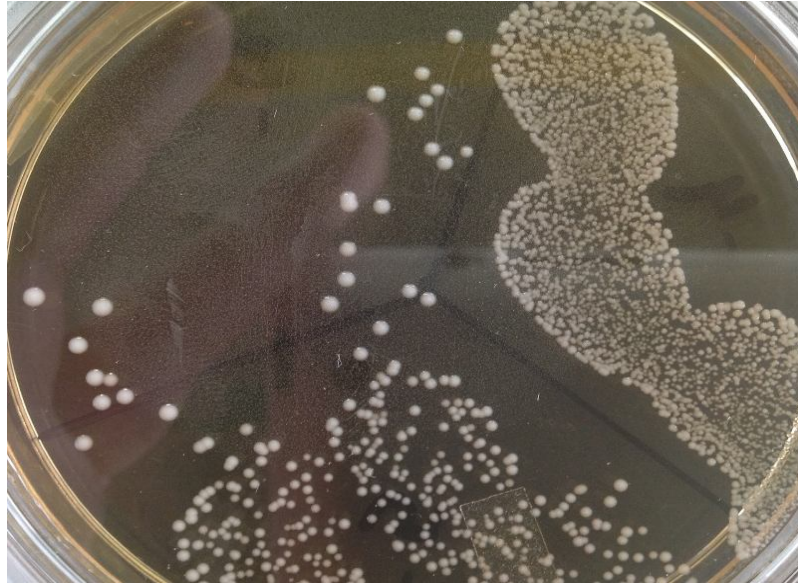


Figura 17. Cultivo de *L. plantarum* en agar MRS

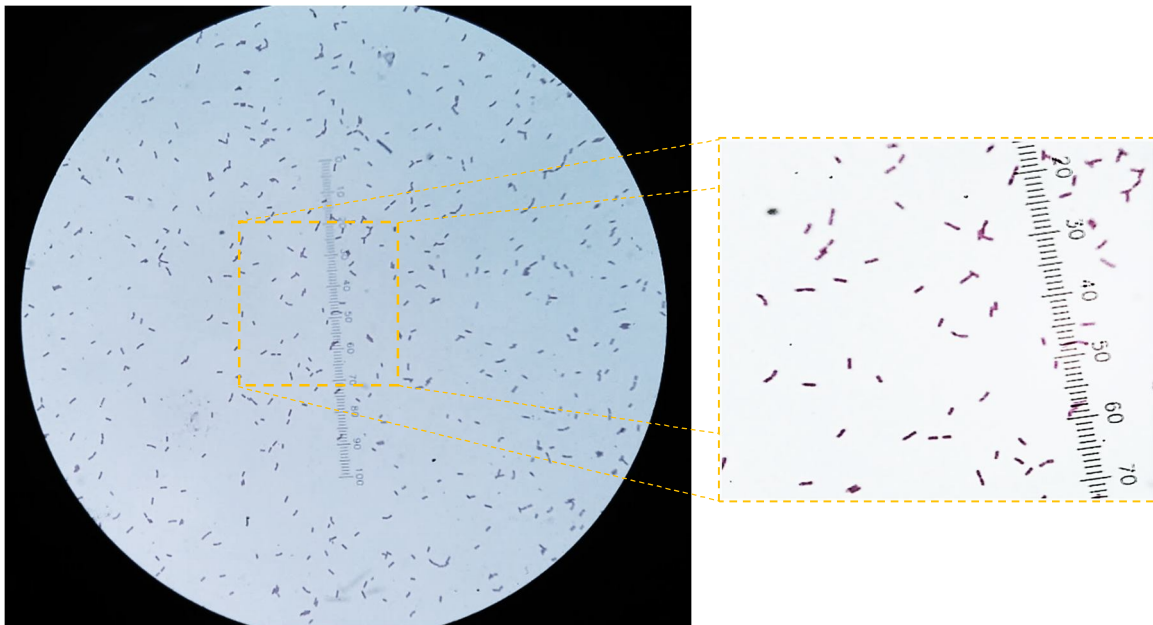


Figura 18. Frotis de *L. plantarum* (tinción de Gram)

El DNA extraído presentó una concentración de $199.9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que su pureza verificada por la relación $A_{260/280}$ fue valorada en 1.72, por lo que presentó las características óptimas para realizar las reacciones de amplificación una vez que fue ajustada la concentración a $60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Al visualizar el gel de agarosa sometido a electroforesis de las reacciones de PCR para la identificación de *L. plantarum* (Figura 19), se observó que al emplear ADN de la cepa de colección usada en el presente trabajo, se logró obtener dos amplificados, el primero de ellos con una dimensión de ~318 pb en identificación de especie y el segundo con dimensión de ~250 pb en la identificación de género. Se observa también que los carriles control de ambas reacciones no se produjo ninguna banda de amplificación.

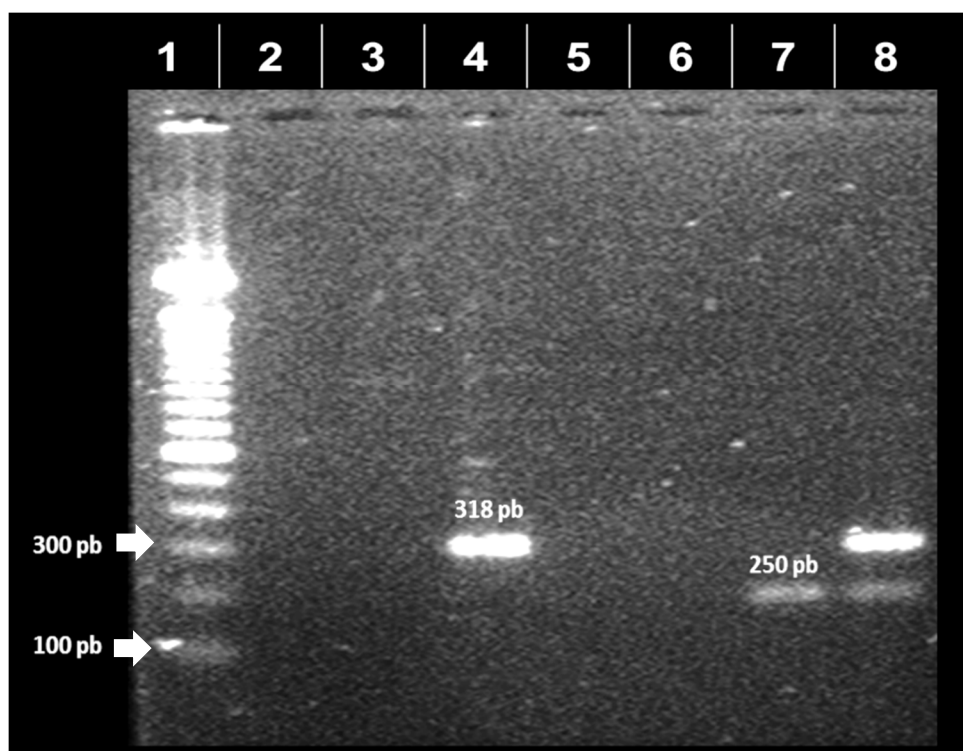


Figura 19. Patrón electroforético de los productos de PCR obtenidos en la identificación de *Lactobacillus plantarum*:

carril 1 (100 pb DNA Step Ladder, Promega, WI, USA), carril 2 Control negativo para identificación de especie (Sin ADN), carril 3 control negativo para identificación de especie (ADN de *P. acidilactici*), carril 4 identificación de especie (ADN *L. plantarum*), carril 5 control negativo para la identificación de género (sin ADN), carril 6 control negativo para identificación de género (ADN *P. acidilactici*), carril 7 identificación de género (ADN de *L. plantarum*), carril 8 reacción PCR múltiple en la que se identifican tanto género como especie (ADN de *L. plantarum*).

3.2. Valoración de la actividad hemolítica

Tras sembrar e incubar las placa de agar sangre, se realizó su lectura (Figura 20 y 21), se observó que las colonias de *P. acidilactici* y *L. plantarum* no produjeron alteración alguna en el medio, a diferencia de lo ocurrido en la sección de las placas en las que fue sembrada la cepa de *Staphylococcus aureus* en las que se evidenció un cambio de coloración formando un halo transparente alrededor de su crecimiento, correspondiente a β -hemólisis.

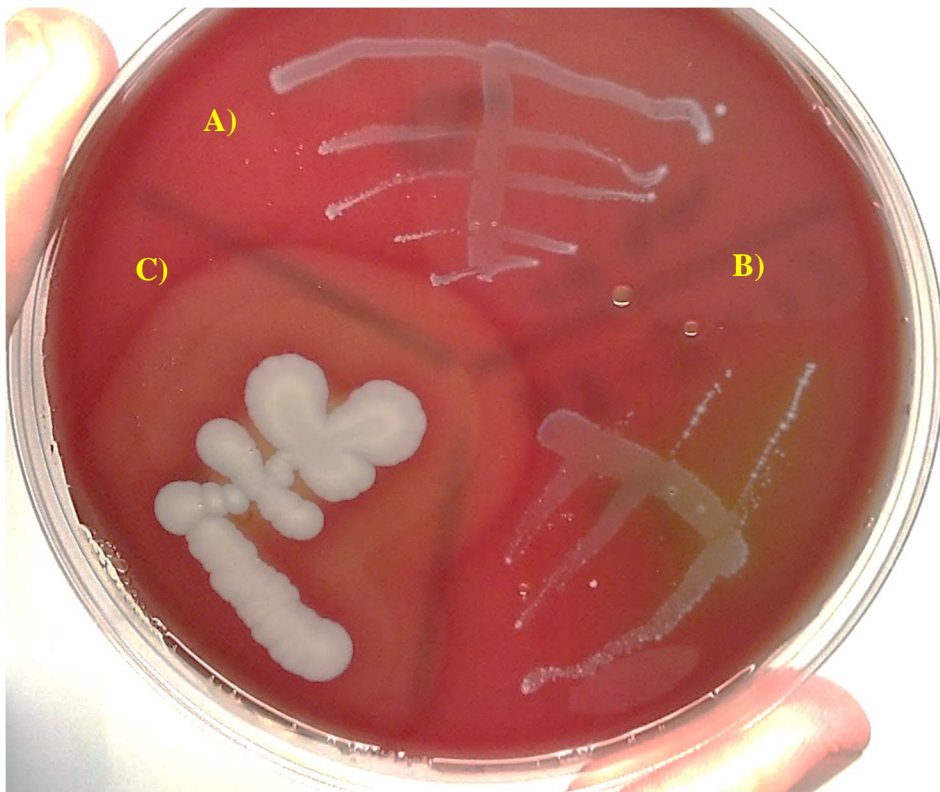


Figura 20. Cultivo de las cepas de estudio en agar sangre
A) *P. acidilactici*, B) *L. plantarum*, C) *S. aureus*

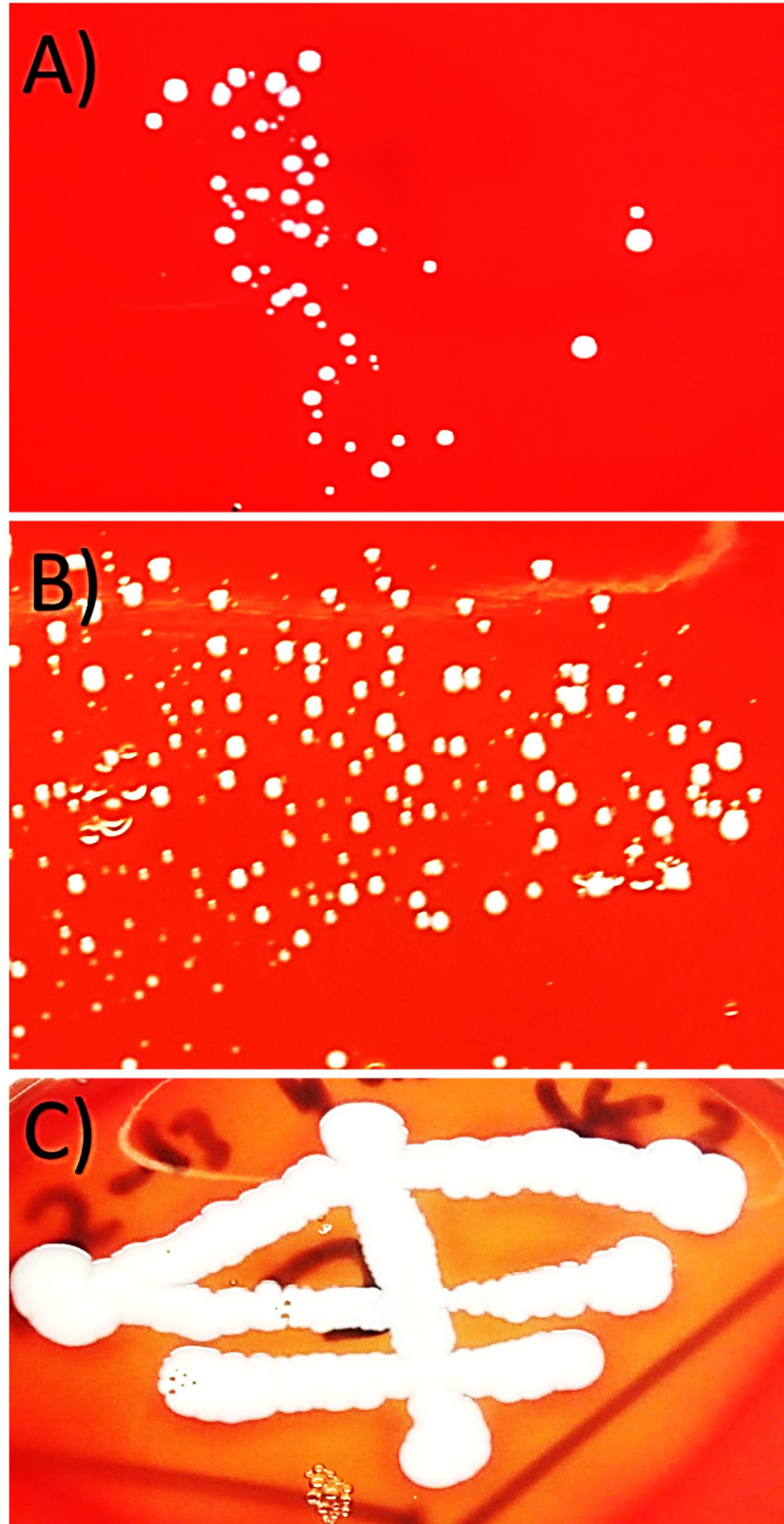


Figura 21. Detalle del crecimiento de colonias en agar sangre
A) *P. acidilactici*, B) *L. plantarum*, C) *S. aureus*

3.3. Valoración de la susceptibilidad a antibióticos

Los resultados de valoración de la susceptibilidad o resistencia a antibióticos que presentaron las cepas estudiadas en este trabajo, fueron realizados mediante pruebas de difusión en agar (Figura 22), han sido comparados con los límites establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) específicamente para los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, sin embargo ante la ausencia de información específica para algunos de los antibióticos utilizados en este trabajo, se realizó su análisis a partir de los estándares indicados para el género *Staphylococcus* por la misma organización.

En base a las referencias bibliográficas se determinó que *P. acidilactici*, fue susceptible a 6 antibióticos, intermedio a 3 y resistente a 7 (Cuadro 12), mientras que *L. plantarum* presentó susceptibilidad a 13 y resistencia a 3 (Cuadro 13).

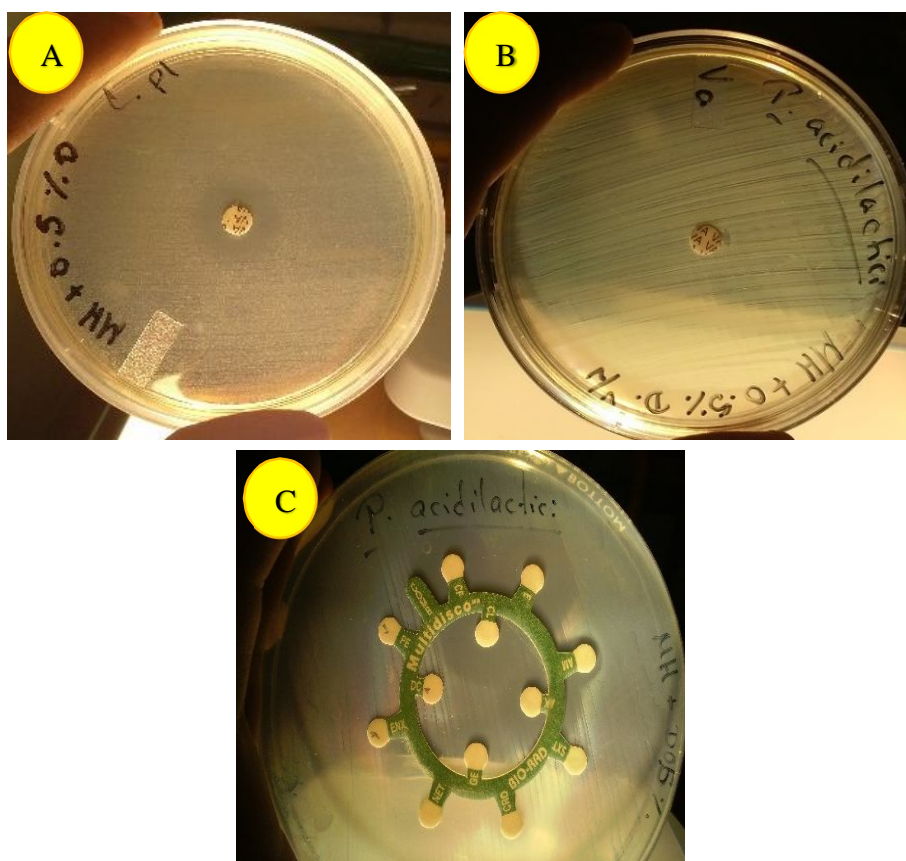


Figura 22. Detalle de zonas de inhibición en prueba de difusión en agar

A: desafío de *L. plantarum* vs Vancomicina (VA); B: corresponde a *P. acidilactici* vs Vancomicina; C: uso de multidiscos

Cuadro 12. Patrón de resistencia o susceptibilidad a antibióticos presentada por *Pediococcus acidilactici*

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	INHIBICIÓN (DIAMETRO) mm	LIMITES INDICADOS POR TABLAS			RESULTADO
			R (\leq)	I	S (\geq)	
Tetraciclina	30 mg	18	14	15-18	19	Intermedio
Vancomicina	30 mg	0	--	--	15	Resistente
Estreptomina	10 mg	11.3	11	12-14	15	Resistente
Kanamicina	30 mg	14.86	13	14-17	18	Intermedio
Amikacina	30 mg	24.6	14	15-16	17	Susceptible
Ampicilina	10 mg	11.86	28	-	29	Resistente
Cefalotina	30 mg	25.2	14	15-17	18	Susceptible
Ceftriaxona	30 mg	15.33	13	14-20	21	Intermedio
Cloranfenicol	30 mg	31.93	12	13-17	18	Susceptible
Dicloxacilina	1 mg	0	10	11-12	13	Resistente
Enoxacina	10 mg	0	14	15-17	18	Resistente
Eritromicina	15 mg	33.8	13	14-22	23	Susceptible
Gentamicina	10 mg	24.7	12	13-14	15	Susceptible
Netilmicina	30 mg	30.8	12	13-14	15	Susceptible
Penicilina	10 U	0	28	-	29	Resistente
Sulfas/Trimetoprim	25 mg	0	10	11-15	16	Resistente

Cuadro 13. Patrón de resistencia o susceptibilidad a antibióticos presentada por *Lactobacillus plantarum*

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	INHIBICIÓN (DIAMETRO) mm	LIMITES INDICADOS POR TABLAS			RESULTADO
			R (\leq)	I	S (\geq)	
Tetraciclina	30 mg	20.4	14	15-18	19	susceptible
Vancomicina	30 mg	13.66	--	--	15	resistente
Estreptomina	10 mg	35	11	12-14	15	susceptible
Kanamicina	30 mg	35.2667	13	14-17	18	susceptible
Amikacina	30 mg	>20	14	15-16	17	susceptible
Ampicilina	10 mg	33.66	28	-	29	susceptible
Cefalotina	30 mg	24.77	14	15-17	18	susceptible
Ceftriaxona	30 mg	42.33	13	14-20	21	susceptible
Cloranfenicol	30 mg	>20	12	13-17	18	susceptible
Dicloxacilina	1 mg	>20	10	11-12	13	susceptible
Enoxacina	10 mg	14	14	15-17	18	resistente
Eritromicina	15 mg	44	13	14-22	23	susceptible
Gentamicina	10 mg	>20	12	13-14	15	susceptible
Netilmicina	30 mg	50.5	12	13-14	15	susceptible
Penicilina	10 U	0	28	-	29	resistente
Sulfas/Trimetoprim	25 mg	41.5	10	11-15	16	susceptible

3.4. Determinación *in vitro* de la tolerancia de las cepas de estudio a los medios gástrico e intestinal

3.4.1. Tolerancia al medio gástrico

El valor promedio de absorbancia al que los cultivos fueron ajustados previo a la prueba de tolerancia gástrica fue de 0.980 para *P. acidilactici* y de 1.002 para *L. plantarum*.

En el análisis de varianza factorial 3x2 (Tiempo x Tratamiento) de los resultados del conteo de UFC·ml⁻¹ de *P. acidilactici* en la prueba de tolerancia al medio gástrico, se encontró interacción ($p < 0.5$) entre los factores (Cuadro 14). El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio gástrico, disminuyó el conteo de UFC·ml⁻¹ (efecto lineal, $p < 0.05$). Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los grupos de *P. acidilactici* Control y Gástrico. En la Figura 23 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 14. Recuento de *P. acidilactici* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia gástrica

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	4.43E+07 ^a	1.17E+06	5.23E+05	5
	Gástrico	4.35E+07 ^a	1.40E+06	6.26E+05	5
2.00	Control	4.38E+07 ^a	9.26E+05	4.14E+05	5
	Gástrico	3.68E+07 ^b	9.95E+05	4.45E+05	5
4.00	Control	4.35E+07 ^a	9.76E+05	4.36E+05	5
	Gástrico	3.27E+07 ^c	1.82E+06	8.14E+05	5

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

EEM: error estándar de la media; SMGS: sometidos a medio gástrico simulado

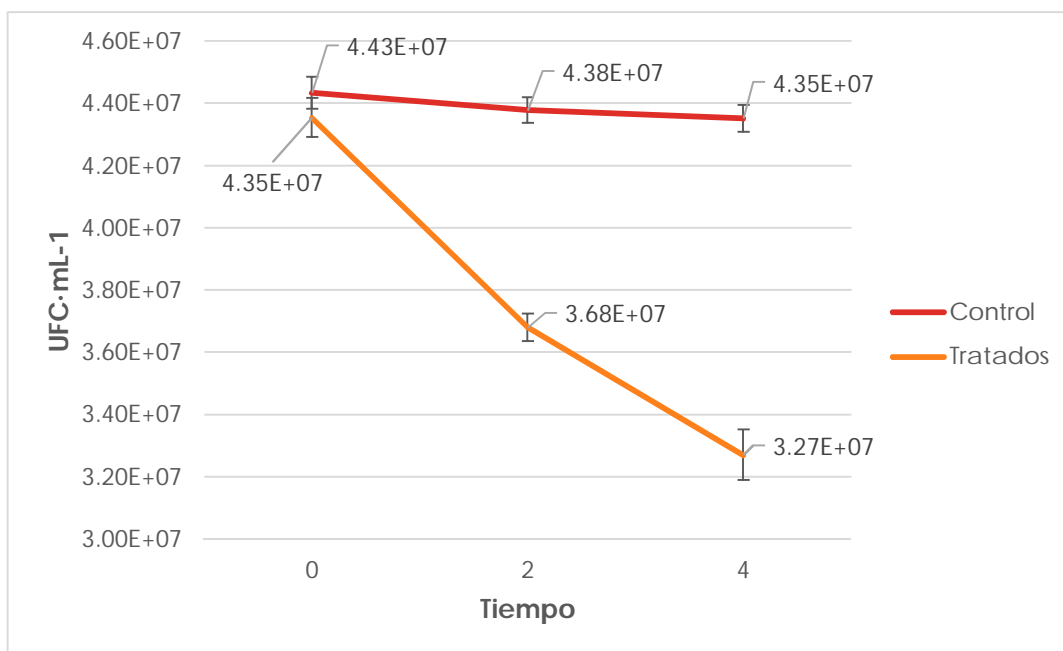


Figura 23. Comportamiento de *P. acidilactici* (UFC·mL-1) en medio gástrico simulado

En el análisis de varianza factorial 3x2 (Tiempo x Tratamiento) de los resultados del conteo de UFC·mL⁻¹ de *L. plantarum* en la prueba de tolerancia al medio gástrico, se encontró interacción ($p < 0.5$) entre los factores (Cuadro 15). El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio gástrico, disminuyó el conteo de UFC·mL⁻¹ (efecto lineal, $p < 0.05$). Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre el grupo Control y Gástrico. En la Figura 24 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 15. Recuento de *L. plantarum* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia gástrica

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	4.77E+07 ^a	1.30E+06	5.82E+05	5
	Gástrico	4.66E+07 ^{ab}	8.04E+05	3.60E+05	5
2.00	Control	4.43E+07 ^{ab}	1.26E+06	5.65E+05	5
	Gástrico	4.11E+07 ^{ab}	5.08E+06	2.27E+05	5
4.00	Control	4.23E+07 ^{bc}	2.52E+06	1.13E+05	5
	Gástrico	3.49E+07 ^c	5.47E+06	2.44E+05	5

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística

EEM: error estándar de la media

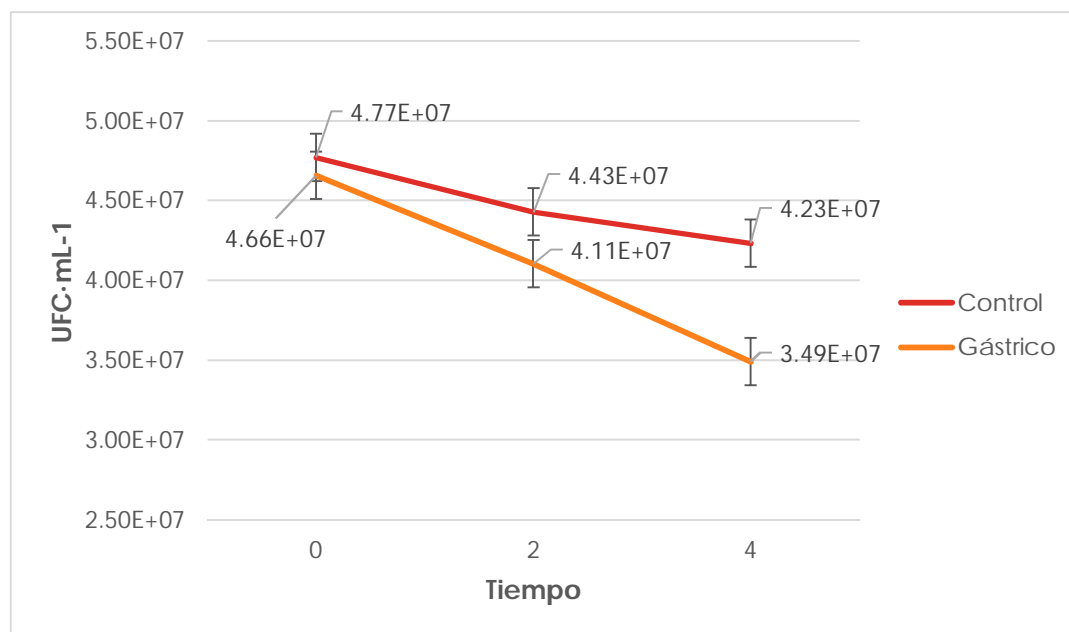


Figura 24. Comportamiento de *L. plantarum* (UFC·mL-1) en medio gástrico simulado

Como se observa en el Cuadro 16, en el análisis de varianza de la tolerancia al medio gástrico no se encontró interacción ($p > 0.5$) de los factores tiempo y microorganismo. El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición, disminuyó la TMG (Efecto lineal, $p < 0.05$), la prueba de comparaciones múltiples del factor tiempo se muestra en el Cuadro 17. No se encontró diferencia ($p > 0.05$) entre los niveles del factor microorganismo (*P. acidilactici* y *L. plantarum*). En la Figura 25 se muestra la interacción de los factores sobre la TMG.

Cuadro 16. Tolerancia al medio gástrico (%) de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

Microorganismo	Tiempo			EEM
	0	2	4	
<i>P. acidilactici</i>	98.198 (2.03)	84.062 (3.36)	75.188 (3.81)	1.549
<i>L. Plantarum</i>	97.67 (2.45)	92.664 (10.29)	82.17 (8.60)	1.549

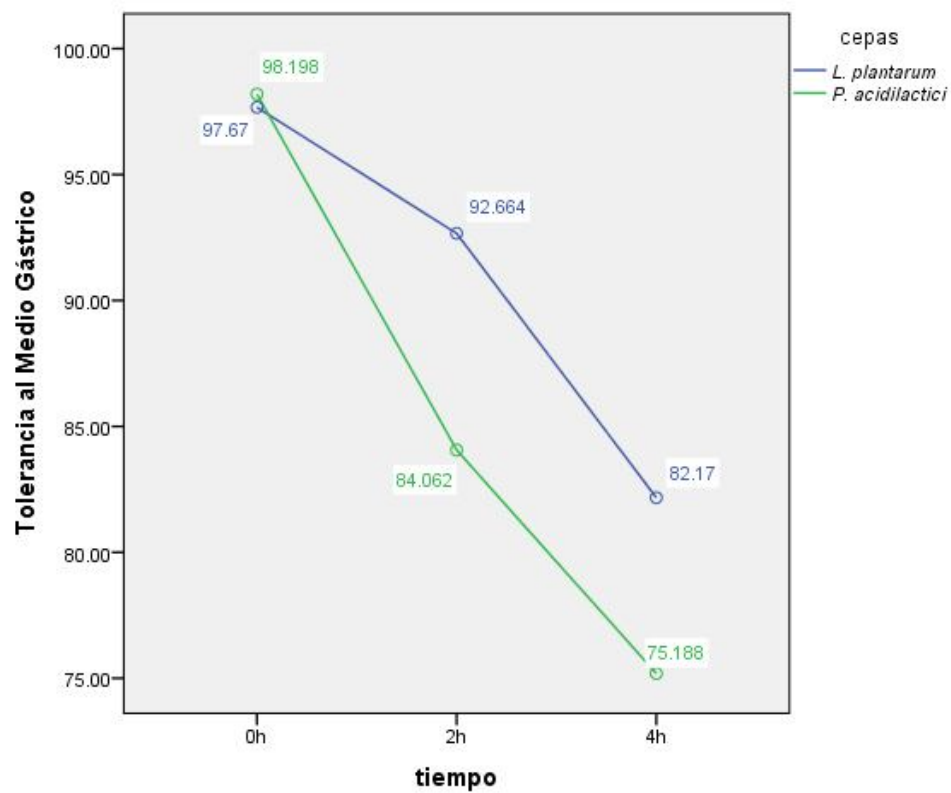
No se encontraron diferencias estadísticas en la interacción de los factores ($p > 0.05$)

EEM: error estándar de la media

Cuadro 17. Prueba de múltiple rangos para TMG por tiempo (Tukey)

	Tiempo			EEM
	0	2	4	
Media	97.934 ^a	88.636 ^b	80.679 ^c	2.08851

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia estadística

**Figura 25.** TMG de *L. plantarum* y *P. acidilactici*

3.4.2. Tolerancia al medio Intestinal

El valor promedio de absorbancia al que los cultivos fueron ajustados previo a la prueba de tolerancia intestinal fue de 1.000 y 1.001 para *P. acidilactici* y *L. plantarum* respectivamente.

En el análisis de varianza de los resultados del conteo de UFC·ml⁻¹ de *P. acidilactici* en la prueba de TMI, se encontró interacción (p=0.0059) entre los factores Tiempo y Tratamiento (Cuadro 18). El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio intestinal simulado, disminuyó (efecto lineal, p<0.05) el conteo de UFC·ml⁻¹. Se encontró diferencia (p<0.05) entre los grupos de *P. acidilactici* Control e Intestinal. En la Figura 26 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 18. Recuento de *P. acidilactici* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	4.61E+07 ^a	4.79E+05	2.14E+05	5
	Intestinal	4.22E+07 ^a	7.16E+06	3.20E+05	5
2.00	Control	4.59E+07 ^a	3.78E+05	1.69E+05	5
	Intestinal	2.76E+07 ^b	5.41E+05	2.42E+05	5
4.00	Control	4.46E+07 ^a	1.94E+06	8.69E+05	5
	Intestinal	2.41E+07 ^b	1.59E+06	7.13E+05	5

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
EEM: error estándar de la media

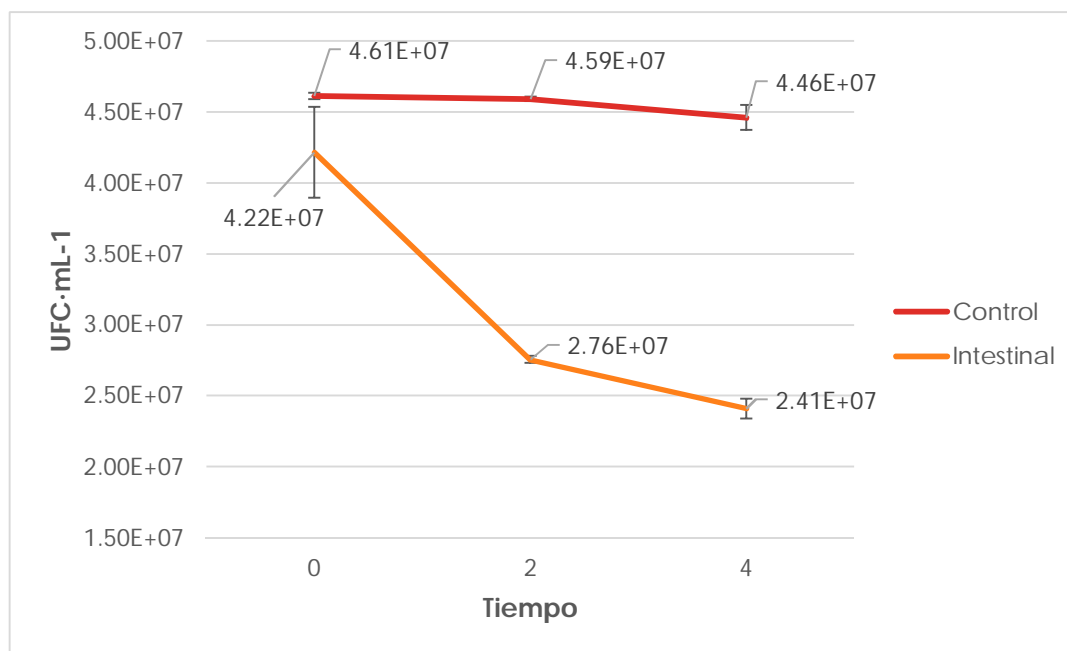


Figura 26. Comportamiento de *P. acidilactici* (UFC·mL⁻¹) en medio gástrico simulado

En el análisis de varianza de los resultados del conteo de UFC·ml⁻¹ de *L. plantarum* en la prueba de TMI, se encontró interacción ($p < 0.05$) entre los factores Tiempo y Tratamiento (Cuadro 19). El análisis de los factores principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio intestinal simulado, disminuyó (efecto lineal, $p < 0.05$) el conteo de UFC·ml⁻¹. Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los grupos Control e Intestinal. En la Figura 27 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 19. Recuento de *L. plantarum* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	4.58E+07 ^a	3.12E+06	1.39E+06	5
	Intestinal	4.46E+07 ^a	3.59E+06	1.61E+06	5
2.00	Control	4.44E+07 ^a	1.03E+06	4.60E+05	5
	Intestinal	4.19E+07 ^a	6.13E+06	2.74E+06	5
4.00	Control	4.38E+07 ^a	1.35E+06	6.04E+05	5
	Intestinal	2.89E+07 ^b	2.59E+06	1.16E+06	5

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
EEM: error estándar de la media

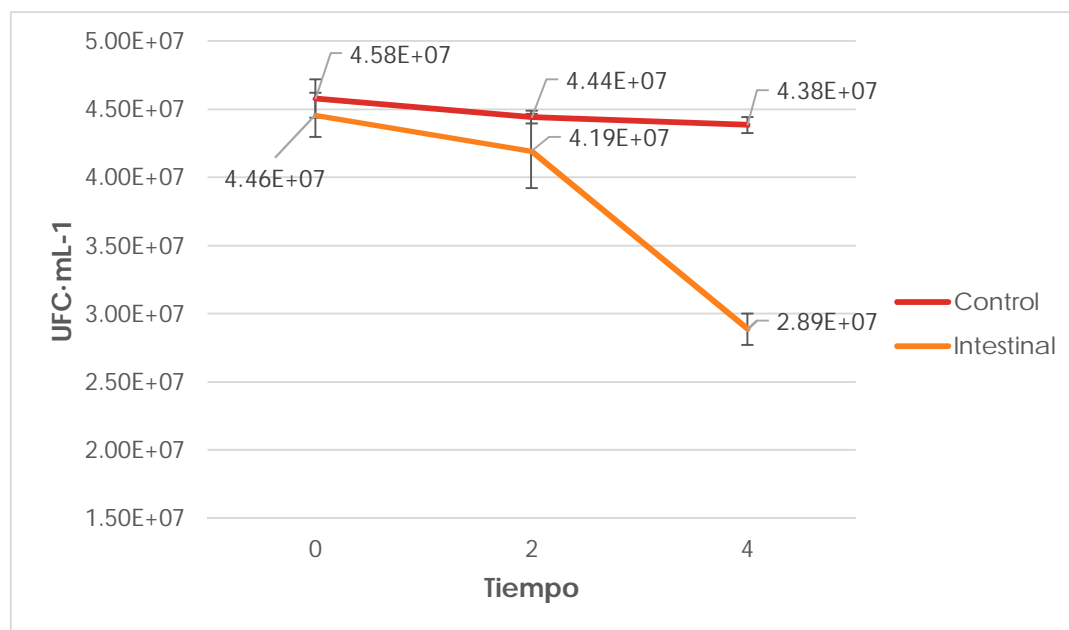


Figura 27. Comportamiento de *L. plantarum* (UFC·mL⁻¹) en medio gástrico simulado

Como se observa en el Cuadro 20, en el análisis de varianza de la tolerancia al medio intestinal se encontró interacción ($p=0.0059$) de los factores tiempo y microorganismo. El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición, disminuyó la TMI (Efecto lineal, $p<0.05$). Se encontró diferencia ($p<0.05$) entre los niveles del factor microorganismo (*P. acidilactici* y *L. plantarum*). En la Figura 28 se muestra la interacción de los factores sobre la TMG.

Cuadro 20. Tolerancia al medio intestinal (%) de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

Tiempo (h)	Microorganismo	Media	D.E	EE	N
0.00	<i>P. acidilactici</i>	91.522 ^a	15.975	7.144	5
	<i>L. plantarum</i>	97.428 ^a	5.632	2.518	5
2.00	<i>P. acidilactici</i>	60.048 ^b	1.329	0.594	5
	<i>L. plantarum</i>	94.28 ^a	12.687	5.673	5
4.00	<i>P. acidilactici</i>	54.212 ^b	6.147	2.749	5
	<i>L. plantarum</i>	65.84 ^b	6.118	2.736	5

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
EEM: error estándar de la media

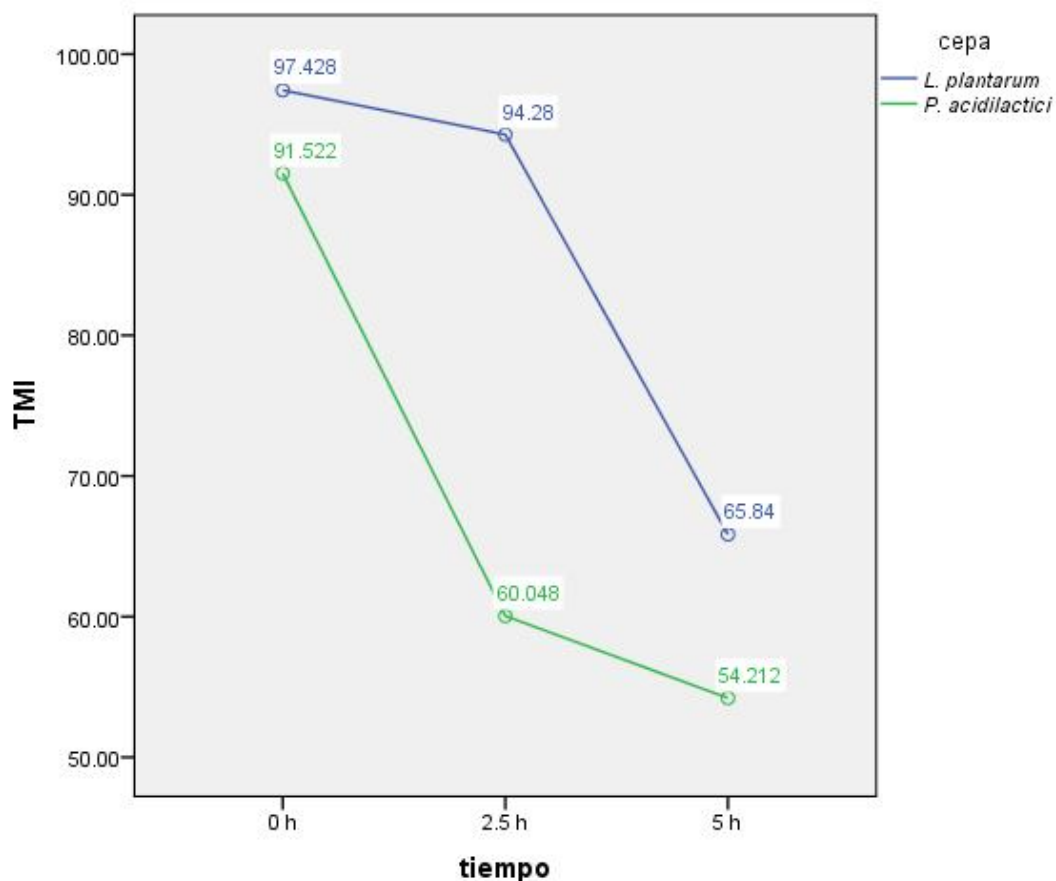


Figura 28. TMI (%) de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

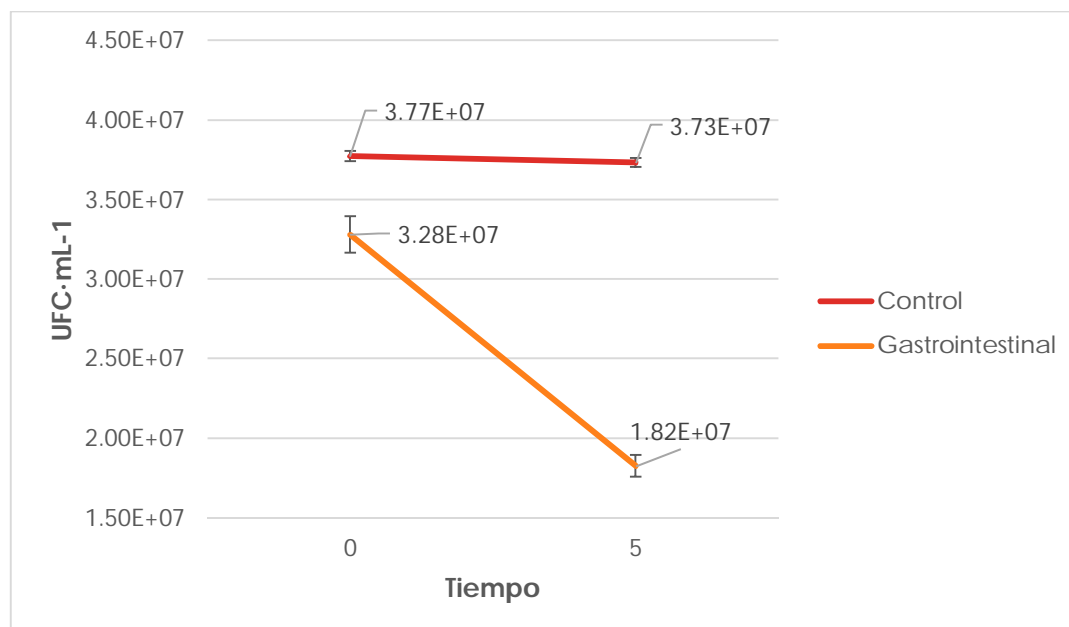
3.4.3. Tolerancia al tránsito gastrointestinal

En el análisis de varianza de los resultados del conteo de $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ de *P. acidilactici* en la prueba de TTGI, se encontró interacción ($p < 0.05$) entre los factores Tiempo y Tratamiento (Cuadro 21). El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio intestinal simulado, disminuyó el conteo de $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ (efecto lineal, $p < 0.05$). Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los grupos Control y Gastrointestinal. En la Figura 29 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 21. Recuento de *P. acidilactici* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	3.77E+07 ^a	7.60E+05	3.40E+05	5
	GI	3.28E+07 ^b	2.54E+06	1.14E+06	5
5.00	Control	3.73E+07 ^a	6.21E+06	2.78E+05	5
	GI	1.82E+07 ^c	1.52E+06	6.82E+05	5

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
EEM: error estándar de la media; GI: gastrointestinal

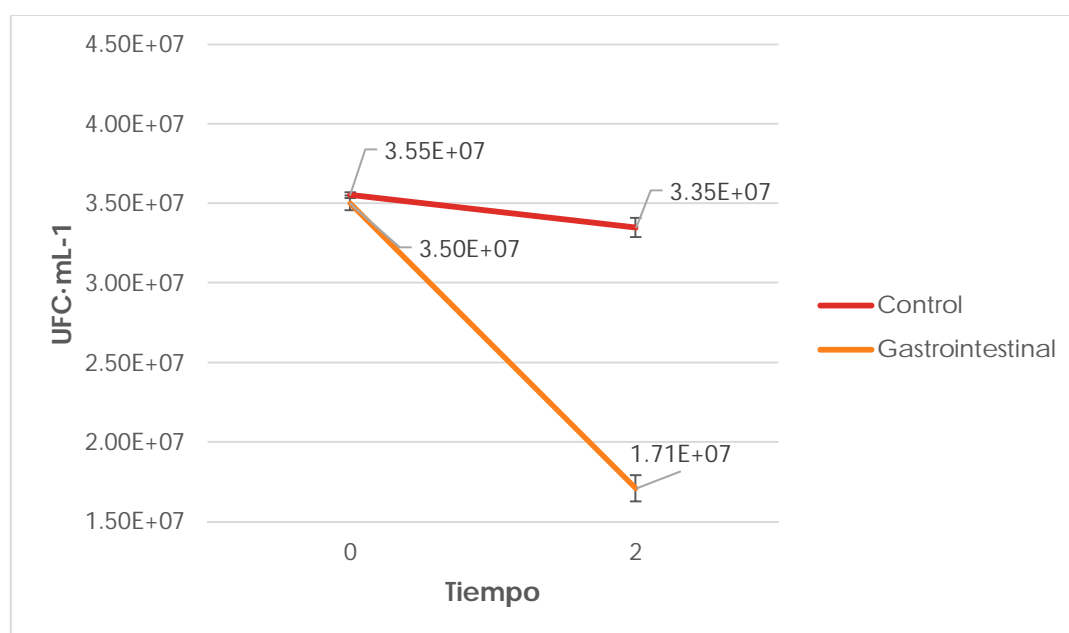
**Figura 29.** Comportamiento de *P. acidilactici* (UFC·mL⁻¹) en la prueba de tolerancia gastrointestinal

En el análisis de varianza de los resultados del conteo de UFC·mL⁻¹ de *L. plantarum* en la prueba de TTGI, se encontró interacción ($p < 0.05$) entre los factores Tiempo y Tratamiento (Cuadro 22). El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición al medio intestinal simulado, disminuyó el conteo de UFC·mL⁻¹ (efecto lineal, $p < 0.05$). Se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre los grupos Control y Gastrointestinal. En la Figura 30 se muestra la interacción de los factores.

Cuadro 22. Recuento de *L. plantarum* (UFC·mL⁻¹) en prueba de tolerancia intestinal

Tiempo (h)	Grupo	Media	D.E	EE	N
0.00	Control	3.55E+07 ^a	3.96E+05	1.77E+05	5
	GI	3.50E+07 ^a	1.05E+06	4.72E+06	5
5.00	Control	3.35E+07 ^a	1.35E+06	6.05E+05	5
	GI	1.71E+07 ^b	1.86E+06	8.31E+05	5

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
 EEM: error estándar de la media; GI: gastrointestinal

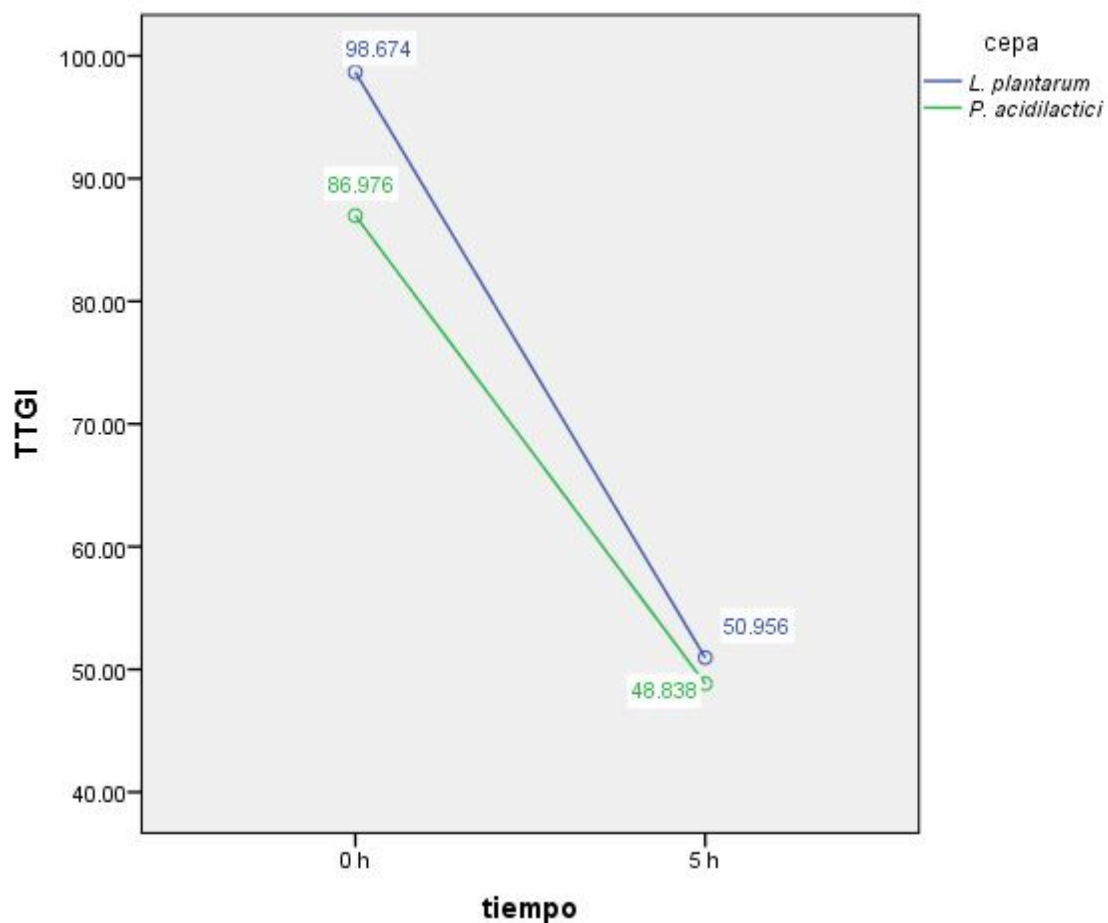
**Figura 30.** Comportamiento de *L. plantarum* (UFC·mL⁻¹) en la prueba de tolerancia gastrointestinal

Como se observa en el Cuadro 23, en el análisis de varianza de la tolerancia al medio intestinal se encontró interacción ($p=0.0491$) de los factores tiempo y microorganismo. El análisis de los efectos principales indicó que al incrementarse el tiempo de exposición, disminuyó la TMI (Efecto lineal, $p<0.05$). Se encontró diferencia ($p<0.05$) entre los niveles del factor microorganismo (*P. acidilactici* y *L. plantarum*). En la Figura 31 se muestra la interacción de los factores sobre la TTGI.

Cuadro 23. TTGI (%) de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

Tiempo (h)	Microorganismo	Media	D.E	EE	N
0.00	<i>P. acidilactici</i>	86.976 ^b	7.556	3.38	5
	<i>L. plantarum</i>	98.674 ^a	3.897	1.74	5
2.00	<i>P. acidilactici</i>	48.839 ^c	3.382	1.51	5
	<i>L. plantarum</i>	50.957 ^c	4.184	1.87	5

^{a,b,c} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística
EEM: error estándar de la media

**Figura 31.** TTGI de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

La tolerancia al Tránsito Gastrointestinal de ambas cepas se muestra en la Figura 31. El análisis estadístico realizado por una prueba-t al tiempo final de la prueba (5h), determinó que no existen diferencias estadísticas entre ambas cepas ($p=0.404376$) con una confiabilidad del 95%, es decir que no existen diferencias en viabilidad entre *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 en esta prueba.

3.5. Determinación de la adherencia a *mucus*

El Cuadro 24 muestra el análisis estadístico descriptivo del comportamiento de las dos cepas de estudio, obtenido a partir de las lecturas de Absorbancia a 490_{nm} realizadas en el equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader.

Cuadro 24. Adherencia a mucus (Absorbancia a 490 nm) de *P. acidilactici* y *L. plantarum*

	<i>P. acidilactici</i>		<i>L. plantarum</i>	
	prelavado (A _{490nm1})	postlavado (A _{490nm2})	prelavado (A _{490nm1})	postlavado (A _{490nm2})
n=	72	72	72	72
MEDIA	0.185486111	0.114277778	0.187597222	0.110916667
MEDIANA	0.186291667	0.11175	0.187791667	0.10875
DESVIACION ESTANDAR	0.005153747	0.02337335	0.005030305	0.020672273
VARIANZA	0.000026561	0.000546313	0.000025304	0.000427343
RANGO	0.025	0.085	0.028	0.104
MÍNIMO	0.174291667	0.06775	0.173291667	0.05975
1ER CUARTIL	0.182041667	0.1	0.186291667	0.09725
MEDIANA	0.186291667	0.11125	0.187944444	0.10725
3ER CUARTIL	0.187291667	0.12975	0.189791667	0.12075
MÁXIMO	0.199291667	0.15275	0.201291667	0.16375

La prueba de Shapiro-Wilk determinó que los datos obtenidos en la prueba de adherencia a *mucus*, para las cepas *P. acidilactici* y *L. plantarum*, se ajustan a la distribución normal, con un 95% de confianza.

La comparación de las medias de los datos obtenidos para las dos diferentes cepas empleadas en este trabajo se realizó mediante la prueba T de Student con ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion, contrastando la hipótesis nula H_0 de que las medias son iguales ($X_1=X_2$) vs la hipótesis alterna H_a de que las medias son diferentes ($X_1 \neq X_2$), con un nivel de significancia de 0.05. Se obtuvo un valor $p=0.516211$, es decir que con los datos obtenidos no puede asegurarse que existan diferencias entre las medias de ambos grupos.

Se encontró que el porcentaje de adherencia a *mucus* que presentaron las cepas de estudio fue de 61.67% para *P. acidilactici* y 59.06% para *L. plantarum*.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el potencial probiótico de dos cepas de BAL, la primera de ellas *Pediococcus acidilactici* (ATCC 8042) fue seleccionada debido a su capacidad antibacteriana estudiada previamente, sin embargo su capacidad como probiótico ha sido escasamente investigada. La segunda cepa de estudio correspondió a *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), una de las más investigadas en el mundo por su potencial probiótico (Pisano *et al.*, 2011). La inclusión de esta cepa en este trabajo permitió corroborar algunas de sus propiedades como cepa probiótica, además de utilizarla como cepa control a lo largo del estudio con respecto a *P. acidilactici* cuya capacidad probiótica no ha sido reconocida aún.

La comisión mixta FAO/OMS (2002) publicó una guía para la evaluación de microorganismos que deseen emplearse como probióticos, dentro de esta guía se establece la evaluación de los siguientes aspectos: Identificación de la cepa probiótica a nivel de género y especie, pruebas *in vitro* que determinen la resistencia al tránsito gastrointestinal, adherencia al epitelio intestinal, actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y aspectos de seguridad de las cepas probióticas que incluyen la evaluación de resistencia a antibióticos.

De acuerdo a las recomendaciones mencionadas anteriormente, se realizaron estudios *in vitro* de diversas características probióticas con el fin de determinar si *P. acidilactici* manifiesta un potencial probiótico de forma similar a *L. plantarum*, de esta forma establecer si es una cepa con las características necesarias para ser incluida en productos alimenticios destinados para los animales domésticos monogástricos.

4.1. Verificación de la identidad de las cepas de estudio

La correcta identificación de cepas con potencial probiótico es el primer requisito establecido por la guía para evaluación de probióticos. Es necesario que los microorganismos sean identificados y corroborar que son inocuas y de grado alimentario (GRAS), además los efectos benéficos no pueden ser atribuidos de forma generalizada a un género ni especie.

Los métodos clásicos de identificación se basan en el estudio de características fenotípicas, sin embargo, esta información representa una pequeña parte de la información genética ya que su expresión puede estar influenciada por las condiciones ambientales. Debido a estas razones, fue necesario profundizar en la identificación de las cepas, a nivel de caracterización

genotípica, con el fin de asociar un determinado efecto a una cepa específica y poder realizar su seguimiento en otros estudios.

La identificación genotípica empleada en este trabajo, se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias codificantes de los genes 16S y 23S de ARNr, debido a que contienen secuencias conservadas, variables e hipervariables que facilitan la distinción entre géneros.

4.1.1. *Pediococcus acidilactici*

Las características fenotípicas observadas en el cultivo primario de esta cepa, fue congruente con lo establecido por Moreira Dos S., (1993) y por Axelsson (1998) para el género *Pediococcus*, además, la verificación de pureza del mismo permitió realizar la identificación genotípica.

Para verificar la identidad de esta cepa se emplearon dos técnicas, la identificación del género *Pediococcus* fue basada en la amplificación del gen 16S rARN empleando *primers* específicos, logrando la distinción con otros miembros del grupo de las BAL, mientras que para la identificación de especie se recurrió a la amplificación del gen *ldh* involucrado en la síntesis de la enzima lactato deshidrogenasa que logra la distinción entre las especies *acidilactici* y *pentosaceus*.

Al someter el DNA de la cepa de estudio a las reacciones de amplificación empleando los *primers* específicos mencionados antes, fue posible la obtención de dos amplicones en la electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de amplificación (Figura 16), el primero de ellos con longitud de alrededor de 870 pb y el segundo de alrededor de 450 pb, lo cual corresponde a lo esperado en la identificación de género y especie respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con lo establecido por Mora *et al.*, (1997) y Llorente (1998, 2008).

4.1.2. *Lactobacillus plantarum*

De forma similar a lo ocurrido con la cepa de *P. acidilactici*, las características fenotípicas observadas en el cultivo primario de esta cepa, fue congruente con lo establecido por Wood y Holzapfel (1995) y por Salminen *et al.*, (2005) para el género *Lactobacillus*, y debido a la pureza del mismo fue posible realizar la identificación genotípica.

La identificación de género se fundamentó en la amplificación del espacio intergénico 16S-23S específico para *Lactobacillus*, el análisis electroforético de los productos de PCR (Figura 19) mostró que el uso de los controles a la prueba no provocó amplificación alguna, en contraste el uso de DNA extraído de la cepa problema mostró un amplicon con longitud aproximada de 250 pb, idéntico a lo reportado por Dubernet *et al.*, (2002), lo cual indica que los *primers* empleados en esta prueba son específicos para el género *Lactobacillus* ya que no existió amplificación alguna al usar DNA de otra cepa (*Pediococcus acidilactici*) y que el amplicon obtenido demostró que la cepa empleada en esta prueba coincide con el género *Lactobacillus*.

De forma similar la comprobación de identidad para la especie se desarrolló al emplear *primers* específicos diseñados para la distinción entre *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum*, basados en la longitud de amplificación de la secuencia del gen *recA* que es considerado marcador filogenético.

Durante la prueba se demostró que los *primers* empleados son específicos para identificar la secuencia del gen *recA* en el género *Lactobacillus*, debido a la ausencia de amplificación en los controles impuestos, sin embargo al emplear el DNA de la cepa identificada como perteneciente a este género se obtuvo un amplicon de longitud aproximada a 318 pares de bases, este resultado concuerda con lo establecido por Torriani *et al.*, (2001) para la especie *plantarum*.

Con los resultados de las pruebas de identificación de género y especie, fue posible corroborar que en el presente trabajo fue empleada la cepa de *Lactobacillus plantarum*. Esta verificación de identidad fue de gran importancia ya que la cepa de *Lactobacillus plantarum* que es considerada en varios estudios como un probiótico, sirvió como referencia para contrastar las características de *Pediococcus acidilactici* como potencial probiótico.

4.2. Valoración de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica es considerada un factor de virulencia frecuente en microorganismos patógenos, ya que demuestra la presencia de antígenos somáticos y flagelares capaces de destruir los eritrocitos como mecanismo para conseguir disponibilidad de hierro y otros nutrimentos.

En la prueba de hemólisis desarrollada en este trabajo, se utilizó como control positivo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la cual demostró ser capaz de causar β -hemólisis, coincidiendo con lo reportado por Wiseman (1975) y Ali-Vehmas *et al.*, (2001).

Las cepas de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum* estudiadas en este trabajo no presentaron actividad hemolítica, estos resultados son congruentes con lo observado por Anas *et al.*, (2008) para *Lactobacillus plantarum* y Cota *et al.*, (2013) quien reportó la ausencia de capacidad hemolítica en cepas del género *Pediococcus*.

4.3. Susceptibilidad a antibióticos

La selección de nuevas cepas como probióticos requiere de analizar la susceptibilidad a antibióticos, este criterio es necesario para asegurar su uso y aplicaciones como adyuvante en tratamientos de infecciones gastrointestinales.

Sin embargo, la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos genéticamente transferibles es una característica indeseable en las bacterias y más aún en aquellas que se pretenden incorporar en la cadena alimenticia, es decir, en la producción de carne, leche o huevo, ya que una vez en el intestino, éstas pueden transmitir los mecanismos de resistencia a otros microorganismos, algunos de ellos patógenos (Teuber, Meile, & Schwartz, 1999).

Por tales razones, el estudio de la resistencia de las cepas de estudio frente a diversos antibióticos es una prueba fundamental para su uso como probióticos. En este estudio los antibióticos empleados incluyeron inhibidores de la pared celular (Penicilina, Ampicilina, Cefalotina, Ceftriaxona, Dicloxacilina y Vancomicina), inhibidores de la síntesis de proteínas (Tetraciclina, Gentamicina, Estreptomicina, Kanamicina, Amikacina, Netilmicina, Cloranfenicol y Eritromicina), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (Enoxacina) e inhibidores del metabolismo de folatos (Sulfametoxazol/Trimetoprim).

El perfil de resistencia o susceptibilidad a antibióticos reportado en este trabajo, corresponde con lo reportado por Swenson, Facklam, y Thornsberry (1990) y por Tankovic, Leclercq, y Duval (1993), coincidiendo en la resistencia a vancomicina y penicilina y la susceptibilidad a eritromicina, gentamicina y cloranfenicol de ambas especies. De forma similar, los tres trabajos concuerdan en la resistencia de *Pediococcus* a Estreptomicina, Ampicilina, Sulfas/Trimetoprim y en la susceptibilidad a las Cefalosporinas (Cefalotina y Ceftriaxona),

mientras que los resultados son similares para lo reportado en este trabajo para Tetraciclina, vancomicina, penicilina, Estreptomicina, Kanamicina, Cefalotina, cloranfenicol, Eritromicina y gentamicina para *Lactobacillus plantarum*.

En términos generales, la actividad antibacteriana ejercida sobre *P. acidilactici* por mecanismo de acción fue de la siguiente forma: *inhibidores de la síntesis proteica (ISP)* > *inhibidores de la síntesis de pared celular (IPC)* > *inhibidores de las síntesis de ácidos nucleicos (IAN)* e *inhibidores del metabolismo de los folatos (IMF)*.

El comportamiento registrado para *L. plantarum* en esta prueba, demostró que esta cepa presenta un muy buen patrón de susceptibilidad siendo catalogada como susceptible a la mayoría de los antibióticos y mecanismos de acción, esta característica es deseada en los microorganismos a ser empleados como probióticos en la alimentación animal, por tal razón es lógico que la gran mayoría de estudios científicos se basen en este género como probiótico clásico, evitando la transmisión de resistencia a bacterias potencialmente patógenas.

4.4. Tolerancia al tracto gastrointestinal

La capacidad de las bacterias para sobrevivir y establecerse en intestino depende de las condiciones fisicoquímicas del tracto gastrointestinal, por ello la capacidad de resistencia a las condiciones presentes en el compartimento gástrico e intestinal es de vital importancia para que logren ejercer sus efectos benéficos al hospedador, estas capacidades son requisito esencial para catalogar una bacteria como potencial probiótico.

Debido a lo expuesto anteriormente, hemos realizado una serie de ensayos *in vitro* con la finalidad de simular las condiciones del tracto gastrointestinal y el tránsito a través de él, para evaluar la capacidad de sobrevivencia de *P. acidilactici* ATCC 8042 y compararlas con las presentadas por *L. plantarum* ATCC 8014.

El ambiente gástrico actúa como barrera fisiológica al paso de microorganismos, la presencia de un pH ácido y pepsina disminuyen el porcentaje de células bacterianas viables que lograrán alcanzar el intestino. Por medio de los ensayos de tolerancia a las condiciones gástricas, se corroboró esta capacidad restrictiva, tanto la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 como *L. plantarum* ATCC 8014 mostraron una marcada disminución en la cantidad de UFC·mL⁻¹ al ser expuestas al medio gástrico simulado, existiendo diferencias estadísticas

con respecto a sus controles en los que se empleó PBS, además se logró identificar que al aumentar el tiempo de exposición al medio gástrico fue menor la viabilidad de las células de ambas cepas bacterianas. Se determinó además, que no existen diferencias en viabilidad entre las dos cepas estudiadas al ser expuestas al medio gástrico en un lapso de 5 horas.

Los resultados obtenidos han coincidido con diversos estudios, entre ellos Jacobsen y colaboradores (1999) indicaron que diversos miembros del género *Lactobacillus* tienen la capacidad de sobrevivir en medios con pH entre 1.5 y 4, de forma similar, Abdelouahab y colaboradores (2009) desafiaron cepas de *L. plantarum* las cuales mostraron supervivencia a pH 2. En cuanto al género *Pediococcus*, Raqhavendra, Rao, y Halami (2010) observaron que la cepa de *P. pentosaceus* CFR R123 mostró un 62% de supervivencia al ser desafiada a pH de 2.5, este dato si bien reafirma que el género *Pediococcus* es tolerante en medios ácidos, denota que existen diferencias entre los miembros de este grupo.

El medio gástrico no es la única barrera para los microorganismos que se intenta lleguen viables a intestino, el pH alcalino y la presencia de ácidos biliares son una segunda barrera fisiológica para los probióticos. En general se observó que *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014 tienen la capacidad de sobrevivir al ser expuestas a las condiciones intestinales, sin embargo, provocan una disminución en el número de UFC·mL⁻¹ de acuerdo al tiempo de exposición. Este efecto no se observó cuando las cepas fueron expuestas el mismo tiempo pero en PBS.

Se determinó que *P. acidilactici* ATCC presentó una supervivencia del 54.21% mientras que para *L. plantarum* fue 65.84%, estos niveles de tolerancia fueron menores en comparación a lo presentado al medio gástrico (75.18% y 82.17% respectivamente).

Debe notarse que existieron diferencias estadísticas en la tolerancia al medio intestinal entre las cepas estudiadas, este fenómeno puede explicarse debido a la presencia de adaptaciones para reducir el daño a membranas celulares ejercido por los ácidos biliares, estos mecanismos evolutivos de defensa han sido observados en géneros habitualmente presentes en intestino, tal es el caso de algunos *Lactobacillus*.

Aunque se observaron diferencias en tolerancia al medio intestinal y se determinó que es menor en la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042, fue posible observar supervivencia de

ambas cepas al permanecer bajo estas condiciones adversas durante 5 horas, tiempo suficiente para lograr alcanzar las porciones distales del intestino y ejercer allí sus beneficios.

Al desafiar las cepas al tránsito gastrointestinal, en el que las cepas estudiadas fueron sometidas al medio gástrico, recuperadas y posteriormente desafiadas al medio intestinal, se detectó que existieron diferencias en la sobrevivencia de ambas. Fue evidente que existieron diferencias en sobrevivencia entre aquellas que fueron previamente sometidas al medio gástrico (tolerancia al tránsito gastrointestinal) y aquellas que no lo fueron (tolerancia intestinal). Este efecto denota que no es suficiente el análisis de la tolerancia a los medios gástrico e intestinal de forma aislada, y que es necesario realizar el test de tolerancia al tránsito gastrointestinal con el fin de conocer de forma más cercana a la realidad lo que ocurre *in vivo*, esta idea concuerda con lo propuesto por Musikasang y colaboradores (2009).

4.5. Adherencia a *mucus*

La adherencia a *mucus* es una de las propiedades que debe poseer un microorganismo con potencial probiótico, se considera un factor necesario y de gran importancia, debido a que esta característica les permite instaurarse en el intestino y posteriormente ejercer sus efectos benéficos, tales como evitar la adherencia e instauración de bacterias patógenas en la mucosa intestinal, así como estimular el sistema inmunológico. Sin embargo, esta capacidad es altamente específica, ya que se han observado diferencias inclusive entre cepas de una misma especie (Iñiguez y Acedo., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *P. acidilactici* ATCC 8042 y *L. plantarum* ATCC 8014 tienen la misma capacidad de adherirse al *mucus*, esta evaluación permite suponer que *P. acidilactici* ATCC 8042 cuenta con mecanismos que le permiten la adherencia a componentes del *mucus* y que estos son igualmente efectivos que los presentados por la cepa de *L. plantarum* ATCC 8014. Uno de estos mecanismos puede ser la presencia uniones fosfatidilcolina-manosa específicos tal cual ha sido reportado en diversas cepas de *L. plantarum* por Adlerberth y colaboradores (1996), de forma similar, Pretzer y colaboradores en 2005, indicaron que la presencia de estos mecanismos moleculares de adherencia, le permiten a las bacterias probióticas adherirse a la mucosa intestinal y prevenir la invasión de bacterias patógenas entre otros efectos benéficos.

Los porcentajes de adherencia presentados por la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 (61.67%) son congruentes con lo reportado por Damayanti, Mira y Dinoto (2012) para el género *Pediococcus*, quienes en su estudio de adherencia en *mucus* de pollo y *mucus* porcino, obtuvieron porcentajes de adherencia de 55% y 50.85% respectivamente, además, estos dos trabajos coinciden en que la capacidad de adherencia a *mucus* es mayor en el género *Pediococcus* en comparación con *Lactobacillus*.

Los porcentajes de adherencia a *mucus* reportados en este trabajo indican que ambas cepas poseen una capacidad de adherencia fuerte (mayor a 40%) de acuerdo a la clasificación propuesta por Salminen y colaboradores (1996).

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- 1) Las bacterias ácido lácticas empleadas en este trabajo se identificaron genotípicamente a nivel de género y especie como *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*, confirmando de esta forma la identidad de las cepas de colección ATCC 8042 y ATCC 8014 respectivamente.
- 2) Se determinó que las cepas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 son cepas que carecen de actividad hemolítica, esta característica de seguridad supone que no es una cepa con potencial patógeno.
- 3) Por medio de la técnica de difusión en agar, se logró establecer el patrón de resistencia o susceptibilidad que presentan las cepas *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 frente a antibióticos de interés veterinario. La cepa de *Pediococcus acidilactici* presentó mayor número de resistencias a antibióticos y mecanismos de acción (sobre pared celular, síntesis proteica, síntesis de ácidos nucleicos o inhibidores del metabolismo de folatos).
- 4) Al someter las cepas de estudio al medio gástrico se determinó que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 tienen la capacidad de permanecer durante 4 horas bajo estas condiciones y presentar similar sobrevivencia.
- 5) El estudio *in vitro* de tolerancia al medio intestinal ejerció mayor restricción en la sobrevivencia de las cepas de estudio en comparación con el medio gástrico, además se determinó que *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 tuvo mayor tolerancia a estas condiciones en comparación a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.
- 6) Se observó que el desafío *in vitro* a condiciones gástricas previo al intestinal provocó una menor tolerancia de las cepas de estudio a los componentes del jugo intestinal, se determinó que existen diferencias estadísticas en tolerancia entre las cepas de estudio,

L. plantarum ATCC 8014 mostró una mayor tolerancia a estas condiciones en comparación a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

- 7) Se determinó que la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 empleada en este trabajo, posee la misma capacidad de adherirse a *mucus* porcino que la presentada por *L. plantarum* ATCC 8014, esta característica le conferirá la posibilidad de colonizar el intestino y ejercer sus efectos benéficos.

RECOMENDACIONES

El autor de este trabajo se permite recomendar ampliar los estudios que conlleven a establecer los beneficios que ofrece la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como microorganismo probiótico, entre ellos son de gran importancia el determinar si posee genes asociados con su resistencia a antibióticos y verificar si es posible su transmisión a bacterias patógenas.

Es necesario evaluar la tolerancia al tránsito gastrointestinal una vez que esta cepa fue sometida a procesos tecnológicos como es el caso de la microencapsulación o la liofilización, así mismo determinar la estabilidad de su viabilidad a través de diferentes tiempos de almacenamiento.

Sería interesante evaluar los cambios en tolerancia al tracto gastrointestinal ofreciéndole al microorganismo un medio rico en nutrientes que eviten subestimar su comportamiento bajo estas condiciones.

El presente trabajo sienta bases sobre la capacidad de adherencia a *mucus* de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, sin embargo es necesario evaluar y determinar cuáles son los mecanismos que esta cepa posee para lograrlo.

Es reconocido el efecto antagónico que presenta esta cepa en particular frente a diversos patógenos, será de gran relevancia identificar si esta característica es alterada una vez que la cepa sea sometida a las barreras adversas que impone el tránsito gastrointestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- Abdelouahab, M., Kaid-Harohe, M., Lamri, K., Rezki, M., & Kacem, M. (2009). Selection of *Lactobacillus plantarum* strains for their uses as starter cultures in Algerian olive fermentations. *Grasas y aceites*, 60(1), 82-88.
- Adlerberth , I., Ahrne, S., Johansson , M., Molin , G., Hanson , L., & Wold, A. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl Environmental Microbiology*(62), 2244-2251.
- Aguilera G., C., Barberam J., M., Díaz L., E., Duarte P., A., Gálvez P., J., & Gil H., A. (2008). *Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación*. Madrid: Dirección General de Salud Publica y Administración.
- Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Pyörälä, S., & Atroshi, F. (2001). Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiological Research*, 155(4), 339-344.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*(45), 91-95.
- Anas , M., Jamal, E. H., & Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goats Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 3(2), 39-49.
- Anderson, D. G., & McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*(46), 549-552.
- Arribas A., M. (2009). *Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune*. Facultad de Farmacia. Granada: Universidad de Granada.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Clasification and physiology. In W. Von, & S. Salminen, *Lactic acid bacteria*. N. Y., E.U.A: Marcel Dekker.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. (2006). Bile Salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiology.*, 72(3), 1729-1738.

- Bixquert J., M. (2009). Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. *Rev Esp Enferm Dig*, 101(8), 553-564.
- Bordoni, A., Amaretti, A., Leonardi, A., Boschetti, E., Danesi, F., Matteuzzi, D., . . . Rossi, M. (2013). Cholesterol-lowering probiotics: in vitro selection and in vivo testing of bifidobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 8273-8281.
- Brandtzaeg, P., & Pabst, R. (2004). Let's go mucosal: communication on slippery ground. *TRENDS in Immunology*, 25(11), 570-577.
- Caballero F., C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion on colonic epithelial cells. *Am Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol*(292), 315-322.
- Castro, L. A., & De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308-314.
- Charalampopoulos , D., & Rastall R., A. (2009). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. New York, United States of America: Springer.
- Chen, Y., & Weiner, H. (1996). Dose dependant activation and deletion of antigen T cells following oral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 778, 111-121.
- Chong E., S. (2013). A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24.
- Claesson, M., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. (2007). The genus *Lactobacillus*- a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 22-28.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). *Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne (USA): NCCLS.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

-
- Cochran, G., & Cox, M. (1957). *Experimental designs* (2a Edición ed.). USA: Wiley Publications in statistics.
- Collado A., M. (2004). *Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Cota, G. L., Luna G., A., González O., H. A., Flores M., M., Fierro C., J. A., Escamilla M., R., & Peraza G., V. (2013). Effect of *Pediococcus sp.*, *Pediococcus pentosaceus*, inulin and fulvic acid, added to the diet, on growth of *Oreochromis niloticus*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(48), 5489-5495.
- Couch, J. (1978). Poultry researchers outline benefits of bacteria, fungistatic compounds, other feed additives. *Feedstuffs*, 50(6).
- Courvalin, P. (2006). Antibiotic resistance; the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38(2), 261-265.
- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34, 145-153.
- Cunningham, J. (2003). *Fisiología veterinaria* (3a ed.). Madrid, España: Elsevier.
- Damayanti, E., Mira, L., & Dinoto, A. (2012). 16s RNA Identification of *Pediococcus spp.* from Broiler and Studies of Adherence Ability on Immobilized Mucus. *Indonesian Journal of Bacteriology*, 17(2), 96-106.
- de Valdez, G., & de Taranto, M. (2001). Probiotic properties of *Lactobacilli*: Cholesterol reduction and bile salt hydrolase activity. (J. F. Spencer, Ed.) *Food Microbiology Protocols*, 14, 172-182.
- de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics- compensation for lactase insufficiency. *American Journal Clinical Nutrition*, 2(73), 421s-429s.
- Dolz, M. C. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 28(3), 20-37.

-
- Duarte O., A. (1986). *Notas para estadística y diseño experimental*. México: Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Dubernet , S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of *lactobacilli* at genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 271-275.
- Dunne , C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., . . . Collins, J. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*(73), 386-392.
- Dunne, C., Murphy, L., Fynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran , S., Feeney, M., . . . Collins, J. (1999). Probiotics: from myth to reality: demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trails. *Antonie van Leeuwenhoek*(76), 279-292.
- Dvorkin , M., & Cardinali, D. (2003). *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica* (13 ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- EFSA. (2012). Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA journal*, 10(6), 2740-2750.
- Ezema C. (2012). *Probiotic effects of Sacharomyces cerevisiae on Laying Chicken fed palm kernel cake-based diets*. University of Nigeria, Department of Animal Health and Production. Nsukka: Faculty of Veterinary Medicine.
- Ezema, C. (2007). *The performance of broilers fed palm kernel cake-based diet supplemented with bioactive yeast*. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Health and Production. Nsukka: University of Nigeria.
- Fang, H., Rlina , T., & Heikki, A. (2000). Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology Med Microbiology*(29), 47-52.
- FAO/OMS. (2002). *Probióticos en los alimentos, Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. FAO/OMS.

- Figuroa, V., Chi M., E., Cervantes R., M., & Domínguez V., I. (2006). Functional foods for weanling pigs. *Veterinaria México*, 37, 117-136.
- Freter, R. (Septiembre de 1956). Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. *Journal of Experimental Medicine*, 104(3), 411-418.
- Gaggía, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 515-528.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3, 710-720.
- Gänzle, M. G., Hertel, C., van der Vossen, J. M., & Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing *Lactobacilli* on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International journal of food Microbiology*, 48, 21-35.
- García, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L., Rosa, C., Nicoli, J., Elias, I., . . . Halaihel, N. (2012). Identification and *in vitro* screening of avian yeast for use as probiotic. *Veterinary Science*(93), 798-802.
- Granados, P. (2009). *Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de Pediococcus acidilactici ATCC 8042*. Facultad de Ciencias. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guarner, F., Khan, A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., . . . Le Mair, T. (2008). *Probiotics and Prebiotics*. World Gastroenterology Organisation Practice Guideline.
- Gutiérrez P., J. (2012). *Inmunología veterinaria*. México: Manual Moderno.
- Gutiérrez P., J. A. (2010). *Inmunología veterinaria*. México: Manual Moderno.
- Hansen, C. F., Riss, A. L., Bresson, S., Hojbjerg, O., & Jensen, B. B. (2007). Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*, 108, 206-209.

- Harharnjit S., G., Kay J., R., Martin L, C., & Pramod K., G. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *American Society for Clinical Nutrition*, 74(6), 833-839.
- Hart A., L., Kamm M., A., Stagg A., J., & Knight S., C. (2009). Mechanisms of Activation of Probiotics: Recent Advances. *Journal Inflamm Bowel Disease*, 15(2), 300-310.
- Hernández , S., Fernández-Collado, C., & Baptista, L. (2006). *Metodología de la Investigación*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Hernández, O. (2005). *Espectro antimicrobiano de Pediococcus acidilactici ATCC 8042*. México, D. F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hougee, S., Vriesema A., J., & Wijering S., C. (2009). Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International Arch Allergy Immunology*, 2(151), 107-117.
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Journal of Food Microbiology*, 91, 253-260.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*(46), 205-229.
- Huckle, B., Hewitt, C., Jüsten , P., Yan, Y., & Zhang, Z. (2008). Determination of the viability and release profile of compression coated probiotic cells using fluorescent staining and flow cytometry. *Minerva Biotec.*(18), 11-16.
- Hummel, A., Hertel, C., Holzapfel, W., & Charles, M. (2007). Antibiotic resistances of starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730-739.
- ICMF. (1981). *International Commision on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos. técnicas de análisis microbiológico*. (Vol. 1). Zaragoza: Acribia.

-
- Iñiguez P., C., & Acedo F., E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*, 7(2).
- Isolauri, E., Joensuu, J., & Suomalainen, H. (2000). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*(13), 310-312.
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt-Nielsen, V., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., . . . Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Johansson, M. E., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., . . . Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 3635-3641.
- Jonsson, H., Ström, E., & Ross, S. (2001). Addition of mucin to the growth medium triggers mucus binding activity in different strains of *Lactobacillus reuteri* in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 19-22.
- Kocevar Nared, J., Kristl, J., & Smid-Korvar, J. (1997). Comparative rheological investigation of crude gastric *mucin* and natural gastric *mucus*. *Biomaterials*, 18, 677-681.
- Kociubinski, G., Pérez, P., & De Antoni, G. (1999). Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62, 905-912.
- Krieg, R., Vahjen, W., Award, W., Sysel, M., Kroefer, S., Zocher, E., . . . Zentek, J. (2009). Performance, digestive disorders and the intestinal microbiota in weaning rabbits are affected by herbal feed additive. *World Rabbit Science*(17), 87-95.
- Krueger, W., Bradley, J., & Patterson, R. (1977). The interaction of gentian violet and *lactobacillus* organisms in the diet of Leghorn hens. *Poult. Science*(56).

- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & de Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 171-184.
- Lee, Y., & Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*. New Jersey: Wiley & Sons.
- Ljungh, A., & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues Intestinal Microbiology*(7), 73-90.
- Llorente, B. (2008). *Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042*. Facultad de Ciencias. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- López-Brea, M., & Domingo, D. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Rev.Esp.Quimioterapia*, 20(2), 170-181.
- Madsen, K. L. (2012). Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, 5, 55-59.
- Malago, J., Koninkx, J., & Marinsek-Logar, R. (2011). *Probiotic Bacteria and Enteric Infections*. London: Springer.
- Martínez A., J., Muñoz C., A., Urrialde A., R., Fontecha, J., Murcia T., M., Gómez C., C., & Villarino M., A. (2003). *Nuevos alimentos para nuevas necesidades*. Madrid, España: Nueva Imprenta.
- Martínez B., I. K., González M., B. E., Campos G., E., Barba de la Rosa, A. P., & Jiménez S., Z. (2008). Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. *Salud Pública y Nutrición*, 9(4).
- Martínez, T. (2011). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042*. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., & Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery*, 18, 586-590.
- Messaoudi, S., Madi, A., Prévost, H., Feuilleley, M., Manai, M., Dousset, X., & Connil, N. (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potencial of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe*, 10(004), 1-6.
- Metchnikoff, E. (1906). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. En *The prolongation of life: Optimistic Studies* (págs. 161-183). London, United Kingdom: Mitchell, c. Willim Heinemann Press.
- Michail, S. (2009). The role of Probiotics in allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 5(5), 1-7.
- Min-Tze, L. (2011). *Probiotics, biology, genetics and health aspects*. Penang: Springer.
- Monteagudo, M. (2010). *Selección in vitro de microorganismos con potencial probiótico*. Facultad de Veterinaria . León: Universidad de León.
- Mora , D. (2003). Autolytic activity and pediocin - induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strain. *Journal of Applied Microbiology*(94), 561-570.
- Mora P., N., & García G., A. (2007). *Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones químicas. PAchuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Mora, D., Grazia F., M., Parini, C., & Luigi M., P. (1997). Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and IdhD gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS microbiology Letters*, 151, 231-236.
- Moreau, M., & Corthier, G. (1996). The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res. Immunol.*(147), 46-59.

-
- Moreira Dos S., W. L. (1993). *Aislamiento y caracterización de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Moreno de L., A., del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Santos R., C., van de Guchte, M., Azevedo, V., . . . Guy L., J. (2011). Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. *ISRN Gastroenterology*, 2011.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal Microbiological Biotechnology*(25), 1337-1345.
- Nissen , L., Chingwaru, W., & Sgorbati, B. (2009). Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus spp.* strains: a functional study in the small intestinal cell model. *Int J Food Microbiology*, 135(15), 288-294.
- Ogueke, C., Owuamanam, C., Ihediohanma, N., & Iwouno, J. (2010). Probiotics and Prebiotics:Unfolding Prospects for Better Human Health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9), 833-843.
- Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health beneficial effects of Probiotics: its mode of action. *Animal Science*, 80, 361-371.
- Ohland, C. L., & MacNaughton , W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal Physiol Gastrointest Liver*(298), 807-819.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F., & Ataoglu, H. (2012). Evaluación of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*(2), 162-174.
- Otte, J. M., & Podolsky , D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by Gram positive and Gram negative microorganisms. *American Journal Physiol Gastrointestinal Liver Physiology*(286), 613-625.
- Ouwehand A., C. (2007). Antiallergic effects of probiotics. *Joutnal of Nutririon*, 137(3), 794S-797S.

-
- Parvez, S., Malik K., A., Kang, S., & Kim H., Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Patel, S., & Goyal, A. (2013). Evolving roles of probiotics in cancer prophylaxis and therapy. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*(5), 59-67.
- Pavlovic, N., Stankov, K., & Mikov, M. (2012). Probiotics - Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. *Appl Biochem Biotechnol*(168), 1880-1895.
- Pfeiler, E., Azcarate-Peril, M., & Klaenhammer, T. (2007). Characterization of a novel bile inducible operon encoding a two component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal bacteriology*(189), 4624-4634.
- Pisano, M. B., Patrignami, F., Cosentino, S., Guerzoni, M. E., Franz, C. M., & Holzapfel, W. H. (2011). Diversity and functional properties of *Lactobacillus plantarum*-group strains isolated from Italian chesse products. *Dairy Science & Technology*(91), 65-76.
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiserma, A., Bron, P., Lambert, J., . . . van der Meer, R. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*(187), 6128-6136.
- Prioult, G., Fliss, I., & Pecquet, S. (2003). Effect of Probiotic Bacteria on Induction and Maintenance of Oral Tolerance to beta Lactoglobulin in Gnotobiotic Mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), 787-792.
- Qin H., Zhang Z., & Hang X. (2009). *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli* induced tight junction protein changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology Journal*, 9(63).
- Raghavendra, P., Rao, T. S., & Halami, P. M. (2010). Evaluation of beneficial attributes for phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123. *Beneficial Microbes*(3), 259-264.

- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M., & McCormick, J. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 658-672.
- Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52, 988-997.
- Rettger, L., Levy, W., Weinstein, L., & Weiss, J. (1935). *Lactobacillus acidophilus and its therapeutic application*. New Haven: Yale University Press.
- Rivera, Q. (2005). *Evaluación del efecto de bioconservación en salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlan Izcalli, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez, G. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona: Departament de Genètica i Microbiologia.
- Rodríguez M., M. L. (1994). *Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Ross, S., & Jonsson, H. (2002). A high molecular mass cell surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148, 433-442.
- Ross, S., Karner, F., Axelsson, L., & Jonsson, H. (2000). *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with *in vitro* mucus binding activity isolated from pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 251-258.
- Ryu E., H., & Chang H., C. (2013). In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Annals of Microbiology*.

- Saito, T. (2004). Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Science Journal*, 75, 1-13.
- Salminen, S., Laine, M., von Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T., & Matlila-Sandholm, T. (1996). Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Bioscience and Microflora*(15), 61-67.
- Salminen, S., von Wright, A., & Ouwehand, A. (2005). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional Aspects*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., & Gasbarri, R. (2010). Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 98-108.
- Saxelin, M. (1997). Lactobacillus GG: a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International*, 13(2), 293-313.
- Shah, N. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*(7), 1262-1277.
- Shimada, M. (2003). *Nutrición animal*. México: Trillas.
- Sretenovic, L., Petrovic, M., Aleksic, S., Pantelic, V., Katic, V., Bogdanovic, V., & Beskorovajni, R. (2008). Influence of yeast, probiotics and enzymes in rations on dairy cows performances during transition. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 24, 33-43.
- Swenson, J., Facklam, R., & Thornsberry, C. (1990). Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(4), 543-549.
- Tankovic, J., Leclercq, R., & Duval, J. (1993). Antimicrobial Susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of Macrolide Resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 37(4), 789-792.

- Tejeda, S. M., Lee, J., & Ustunol, Z. (1999). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *Journal of Dairy Science*(82), 649-660.
- Teuber, M., Meile, L., & Schwartz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*(76), 115-137.
- Tissier, H. (1906). Traitement des infections intestinales parla méthode de la flore bacterienne de l'intestin. *C.R Soc. Biol.*, 60, 359-361.
- Torriani, S., Felis, G., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3450-3454.
- Tuomola, E., & Salminen, S. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*(41), 45-51.
- Vaishnava, S., Behrendt, C., Ismail, A., Eckermann, L., & Hooper, L. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(52), 20858-20863.
- Velasco , P. (2010). *Caracterización y espectro antibacteriano de la peptidoglucano Hidrolasa de Pediococcus acidilactici ATCC 8042*. Facultad de Ciencias. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vicente, J., Higgins, S., Bielke, L., Tellez, G., Dooghue, D., Donohue, A., & Hargis, B. (2007). Effect of Probiotic Culture Candidates on *Salmonella* prevalence in Commercial Turkey Houses. *Poultry Science Association*(16), 471-476.
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2012). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*. *Journal of functional Foods*, in press.

- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., & Pavlik, I. (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Veterinari Medicina*, 55(5), 199-224.
- Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics- compensation for lactase insufficiency. *American J. Clinical Nutrition*, 73(2), 421-429.
- Wilcock, P. (2011). Piglets performing better with yeast during lactation. *Pig Progress*, 27(3), 22-23.
- Wiseman, G. M. (1975). The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 317-344.
- Wood, B. J., & Holzapfel, W. H. (1995). *The genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer.
- Yörük, M., Gül, M., Hayirli, A., & Macit, M. (2004). The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science*(83), 84-88.
- Zhang W., Azevedo M., S., Wen K., Gonzalez, A., Saif, L., Li G., . . . Yuan L. (2008). Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine*, 26(30), 3665-3661.
- Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*(98), 2011-2017.