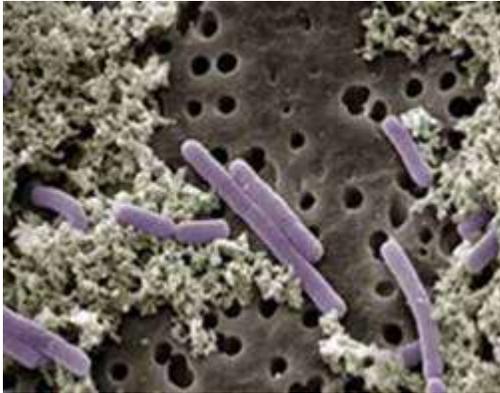


# POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS* AISLADAS DE QUESOS PATAGÓNICOS OVINOS

Marisol Vallejo, Emilio R. Marguet y Valeria E. Etchechoury

Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia, Chubut-Argentina.

E-mail: soltrelew@gmail.com



## Introducción

El tubo digestivo puede ser definido como un ecosistema donde coexisten constituyentes vivos e inertes. El número de microorganismos presentes en el estómago es de  $10^1$ - $10^2$  unidades formadoras de colonias por gramo de contenido (UFC/g), en el intestino delgado es  $10^4$ - $10^8$  UFC/g y en la porción final del tracto gastrointestinal el número asciende a  $10^{12}$  UFC/g (1).

Esta microflora es el resultado de interacciones entre bacterias, huésped y medio externo, y tiene influencia sobre la salud tanto en el individuo sano, como en el enfermo. Su desarrollo se inicia en el momento del nacimiento para continuar después con un proceso lento y gradual que

se completa en varios años.

La microflora del intestino varía según las condiciones anatómicas y/o fisiológicas, en consecuencia observamos que las especies se distribuyen en forma diferencial a lo largo del intestino. Los bacilos Gram-negativos pertenecientes al grupo *Bacteroides fragilis* son predominantes en el colon y comparten el hábitat con coliformes y especies de bacilos y cocos Gram-positivos como bifidobacterias, clostridios, lactobacilos, peptoestreptococos, peptococos, estreptococos y enterococos (2).

Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) se adaptan muy bien a las condiciones gastrointestinales, en especial aquellos organismos considerados como probióticos. Estos se definen como microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o fisiología del hospedero (3). Estos microorganismos poseen características que los hacen pasibles de ser seleccionados como complementos en la dieta humana y animal: capacidad para tolerar los ácidos gástricos; capacidad para tolerar la bilis en el intestino; adherencia a la superficie epitelial y actividad antagonista sobre patógenos (4, 5).

En la actualidad existe plena evidencia de los efectos positivos de los probióticos en la salud humana. Como ejemplo podemos mencionar que los *Lactobacillus* pueden desarrollar efecto inmunomodulador y disminuir la intolerancia a la lactosa (6, 7, 8, 9), mientras que otras propiedades, como la actividad antitumoral y el efecto hipocolesterolémico requieren mayores estudios.

Las BAL que se encuentran en la naturaleza dependen mucho de las condiciones ambientales y en consecuencia convierten a determinadas zonas geográficas en nichos ecológicos que mantienen, en forma relativamente estable, un espectro determinado de microorganismos. Desde hace varios años se han aislado cepas de BAL en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) (Patagonia-Argentina), en busca de propiedades fisiológicas que permitan su utilización desde el punto de vista biotecnológico. Los resultados obtenidos y comparados con los de otras zonas geográficas permiten especular que nos encontramos ante la presencia de una flora que exhibe características distintivas aplicables, en especial en la industria de la alimentación.

Con el objeto de evaluar el potencial probiótico se determinó en el presente trabajo la supervivencia a pH ácido y bilis, actividad antagonista y actividad de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) de 20 cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos provenientes del VIRCh. Sobre la base de los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se seleccionaron 5 cepas que se sometieron a ensayos de adhesión a hidrocarburos (hidrofobicidad de la

superficie celular). Finalmente se realizaron ensayos de autoagregación de las 3 cepas que exhibieron los mayores porcentajes de hidrofobicidad. Los resultados se compararon con 2 cepas comerciales de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (TwCM35 y TwCM36) y 2 cepas de *Lb. casei* (TwCM33 y TwCM49).

## ***Materiales y Métodos***

### Toma de muestras

Se analizaron quesos elaborados con leche ovina de tipo semiduros provenientes de dos plantas queseras ubicadas en la zona del VIRCh. Las muestras de quesos se obtuvieron con sacabocado estéril y se procesaron dentro de las 4 horas.

### Aislamiento

Las muestras se sembraron en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) acidificado a pH 4,6 y 5,4 con ácido clorhídrico 0,2 N. Luego de 24 h de incubación a 35 °C los cultivos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidíxico (40 µg/mL) y cicloheximide (10 µg/mL).

Las cepas se conservaron, hasta el momento de su utilización, a -30°C en viales con leche descremada (10%) y glicerol (10%).

### Identificación fenotípica

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

- Coloración de Gram.
- Prueba de la catalasa.
- Fermentación de azúcares.
- Producción de gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

### Tolerancia a pH

Luego de 16-18 h de incubación a 35°C en caldo MRS las cepas de *Lactobacillus* se centrifugaron a 5000 g durante 15 min y se lavaron 2 veces con buffer PBS 0,2 M, pH 7,2; finalmente se resuspendieron en 5 mL del mismo buffer.

Se realizaron diluciones 1/100 de las cepas en buffer PBS (control) y en buffer acidificado a pH 1; 2; 2,5 y 3 con HCl 0,1 N y se incubaron durante 4 h a 35°C. Luego de este tratamiento las muestras se sembraron en agar MRS y se incubaron durante 48 h a 35° C.

### Tolerancia a sales biliares

Las cepas se incubaron a 35°C durante 24 h en caldo MRS (control) y en caldo suplementado con bilis de buey al 0,3%. El crecimiento poblacional de los cultivos se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm a distintos intervalos de tiempo.

### Actividad antagonica

Para determinar la actividad antagonica de las cepas aisladas se utilizó el método descrito por Lewus y col. (10) con modificaciones. Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS a 35 °C durante 16 h, luego se mezclaron 20 µL del cultivo overnight en 500 mL de agar MRS y se sembraron 50 mL de la mezcla en pocillos practicados en placas con agar MRS. Se incubó durante 12-14 h a 35 °C y posteriormente se adicionó otra capa de 10 mL de agar cerebro-corazón (0,8% agar) conteniendo 50 mL de la cepa indicadora (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC/mL) y se dejó incubar durante 24 h. La actividad antagonica se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos. Los resultados de expresaron como el diámetro medido en milímetros del halo.

### Determinación de $\beta$ -galactosidasa

Las cepas se cultivaron en 2 mL de caldo MRS-lactosa durante 18 h a 35 °C. Luego del período de incubación los cultivos se centrifugaron a 5000 g durante 5 min, se lavaron con buffer PBS 0,2 M, pH 7,0 y se resuspendieron en 2 mL del mismo buffer. La mezcla de reacción contenía 100 mL de suspensión celular, 900 mL de buffer PBS y 200 mL de *o*-nitrofenol  $\beta$ -galactopiranosido (4 mg/mL). Luego de un período de incubación de 10 min a 37°C, la reacción se detuvo con 500 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. La DO se determinó en espectrofotómetro a 420 nm (11). La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1  $\mu$ mol de *o*-nitrofenol  $\beta$ -galactopiranosido por minuto y por mL de cultivo.

### Ensayos de hidrofobicidad

Las pruebas de hidrofobicidad se ensayaron sobre 5 cepas seleccionadas de acuerdo a los resultados exhibidos en las pruebas de tolerancia a pH, bilis, actividad antagonica y actividad b-gal.

Los ensayos de adhesión a solventes orgánicos se determinaron según el método de Pérez y col. (12). Los cultivos se centrifugaron a 5000 g durante 15 min, se lavaron con buffer PBS 0,2 M, pH 7,2 y posteriormente se resuspendieron en 4 mL del mismo buffer. Las suspensiones celulares se pusieron en contacto con 0,8 mL de *p*-xileno y/o hexadecano y se mezclaron mediante vórtex durante 2 min. Luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente la fase acuosa fue cuidadosamente removida y se determinó su DO a 600 nm. El descenso de la absorbancia de la fase acuosa fue tomado como una medida de la hidrofobicidad de la superficie celular, calculándose con la siguiente fórmula:  $H\% = ((A_0 - A)/A_0) \times 100$ , donde  $A_0$  y  $A$  representan las DO antes y después de la extracción con *p*-xileno y/o hexadecano respectivamente.

### Capacidad de autoagregación

Sobre la base de los resultados obtenidos en las pruebas de hidrofobicidad se seleccionaron 3 cepas (LbTw3, 5 y 7) con el propósito de evaluar su capacidad de autoagregación. La capacidad de autoagregación se realizó según lo descrito por Kos y col. (13). Las cepas se incubaron durante 18 h a 35°C en 2 mL de caldo MRS. Luego del período de incubación se centrifugaron a 5000 g durante 15 min y las células se lavaron con buffer PBS (0,2M; pH 7,2). La suspensión se sometió a una centrifugación en las condiciones anteriormente descritas y los pellets resultantes se resuspendieron en 2 mL del mismo buffer. Las suspensiones se mezclaron mediante vórtex durante 30 s y la capacidad de autoagregación se evaluó durante 5 h de incubación a temperatura ambiente. Cada hora se extrajeron 0,1 mL de la capa superior y se transfirió a un tubo que contenía 1,9 mL de buffer PBS.

La DO de la mezcla se determinó a 600 nm y el porcentaje de autoagregación se expresó como:  $1 - (A_t/A_0) \times 100$ , donde  $A_t$  representa la DO a tiempo  $t = 1, 2, 3, 4$  y  $5$  h y la  $A_0$  representa la DO a  $t = 0$ .

### **Resultados**

En total, se aislaron 20 cepas de *Lactobacillus* provenientes de quesos ovinos, las que presentaron los rasgos fenotípicos que son utilizados para distinguir a las BAL de otros microorganismos: bacilos Gram-positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos.

La identificación a nivel de grupo se realizó por medio de los patrones de fermentación de azúcares y producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa. Las pruebas citadas permitieron clasificar a la cepa LbTw 17 como perteneciente al Grupo A (homofermentadores obligados), 14 cepas (LbTw3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 18) fueron incluidas en el Grupo B (heterofermentadores facultativos) y las cepas LbTw1, 2, 9, 19 y 20 incluidas en el Grupo C (heterofermentadores obligados).

### **Tolerancia a pH**

Solo la cepa LbTw20 no exhibió desarrollo luego de 4 h de incubación a todos los pH ensayados. Las cepas LbTw 9 y 10 sobrevivieron a pH  $\geq 2,5$ ; 7 cepas (LbTw4, 6, 11, 12, 13, 14 y 18) sobrevivieron a pH  $\geq 2$  y el resto mantuvo su viabilidad en todos los tratamientos. Las cepas comerciales resultaron menos resistentes si las comparamos con las autóctonas. Las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TwCM 35 y 36 mantuvieron su viabilidad a pH  $\geq 2,5$ , mientras que *Lb. casei* TwCM33 y 49 solo a pH  $\geq 3$ .

## Tolerancia a sales biliares

En todas las cepas autóctonas estudiadas las curvas de crecimiento en presencia de 0,3% de bilis resultaron comparables con las obtenidas en los medios de cultivo sin el inhibidor. La resistencia a sales biliares de las cepas comerciales resultó variable, los resultados obtenidos para las cepas comerciales *Lb. casei* TwCM35 y *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* TwCM49 demostraron un aumento en la fase lag, una fase logarítmica comparable y una población final equivalente.

## Actividad antagónica

A continuación se muestran los resultados obtenidos de actividad antagónica de las cepas autóctonas y comerciales contra bacterias indicadoras (ver Tablas 1 y 2).

**Tabla 1. Actividad Antimicrobiana de *Lactobacillus* contra microorganismos Gram-negativos**

Cepa	Actividad inhibitoria							
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> Tw2 <sup>1</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7 <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7 <sup>3</sup>	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	<i>Shigella</i> <i>flexneri</i>	<i>Salmonella</i> sp.
LbTw 1	+	++	++	++	++	++	+	++
LbTw 2	++	++	++	+	+++	+++	+	++
LbTw 3	++	++	+++	++	+++	+++	++	++
LbTw 4	++	+	++	+	++	++	++	++
LbTw 5	+++	+++	++	++	+	+	++	++
LbTw 6	++	+++	++	++	++	++	++	-
LbTw 7	-	++	+	-	+++	-	++	++
LbTw 8	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
LbTw 9	++	++	++	++	+++	++	+++	++
LbTw 10	++	++	++	++	+++	++	+++	++
LbTw 11	++	+++	+++	++	+++	++	+++	-
LbTw 12	++	++	++	++	++	++	+++	-
LbTw 13	++	++	++	++	+	+	++	+
LbTw 14	++	-	++	+	+	++	++	-
LbTw 15	++	+++	+++	++	++	+	++	++
LbTw 16	+	+	++	++	++	+	+	+
LbTw 17	++	++	++	++	+	+	++	+
LbTw 18	++	++	++	++	++	++	++	-
LbTw 19	++	++	++	++	-	+	+	-
LbTw 20	-	-	-	-	+	++	++	-
TwCM 33	++	++	++	++	-	+	++	-
TwCM 35	+	++	++	++	+	++	++	+
TwCM 36	+	++	++	+	++	+	++	+
TwCM 49	++	++	++	++	+	++	++	-

<sup>1,2</sup> cepa de origen ovino; <sup>3</sup> cepa de origen bovino.

+, <10 mm de inhibición; ++, entre 10 y 20 mm de inhibición; +++, ≥ 20 mm de inhibición; -, sin inhibición.

**Tabla 2. Actividad Antimicrobiana de *Lactobacillus* contra microorganismos Gram-positivos**

Cepa	Actividad inhibitoria						
	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B.</i>	<i>B.</i>
	<i>innocua</i>	ATCC 7644	<i>aureus</i> Tw2 <sup>1</sup>	ATCC 25923	<i>megaterium</i>	<i>cereus</i>	<i>subtilis</i>
LbTw 1	++	+	+	-	++	++	-
LbTw 2	++	++	+	++	++	++	-
LbTw 3	++	++	++	++	+++	++	+
LbTw 4	++	++	++	++	+++	+++	+
LbTw 5	++	++	++	++	+++	+++	+
LbTw 6	++	++	++	++	+++	+++	+
LbTw 7	++	++	++	++	+++	+++	+
LbTw 8	++	++	++	++	+++	+++	+
LbTw 9	++	++	++	++	++	++	-
LbTw 10	-	-	++	++	++	+++	-
LbTw 11	++	++	++	++	++	-	-
LbTw 12	++	++	++	++	+	++	++
LbTw 13	++	++	++	++	+	++	+
LbTw 14	++	++	++	++	++	++	+
LbTw 15	++	++	++	++	+	++	++
LbTw 16	++	+	+	-	++	++	-
LbTw 17	++	+	++	++	+++	+++	-
LbTw 18	++	+	++	++	++	+++	++
LbTw 19	-	-	+	-	+++	+++	-
LbTw 20	++	++	+	++	++	++	-
TwCM 33	-	-	-	-	+++	+	-
TwCM 35	++	++	+	++	++	++	-
TwCM 36	-	++	+++	++	+++	++	-
TwCM 49	++	++	+	++	++	+++	++

<sup>1</sup> cepa de origen ovino

+, <10 mm de inhibición; ++, entre 10 y 20 mm de inhibición; +++, ≥ 20 mm de inhibición; -, sin inhibición

#### Determinación de b-gal

Las cepas LbTw1, 2, 14, 16, 17 y 20 no presentaron actividad de b-gal, las restantes cepas desarrollaron actividades comprendidas entre 0,04 y 0,19 UE, mientras que las cepas comerciales exhibieron actividades de 0,07 y 0,16 UE (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Actividad Enzimática de b-gal**

Cepas	U.E. <sup>1</sup>
LbTw 3	0,15
LbTw 4	0,08

LbTw 5	0,12
LbTw 6	0,14
LbTw 7	0,14
LbTw 8	0,19
LbTw 9	0,11
LbTw 10	0,09
LbTw 11	0,19
LbTw 12	0,14
LbTw 13	0,07
LbTw 15	0,13
LbTw 18	0,11
LbTw 19	0,04
TwCM 33	0,16
TwCM 35	0,07
TwCM 36	0,08
TwCM 49	0,07

<sup>1</sup> U.E., unidad enzimática. Los resultados corresponden al promedio de 3 determinaciones.

#### Ensayos de hidrofobicidad

Sobre la base de los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia a pH 1,0; resistencia a bilis, actividad antagónica y actividad de  $\beta$ -gal se seleccionaron las cepas LbTw3, 5, 7, 8 y 15 para someterlas a pruebas complementarias.

Del total de cepas autóctonas seleccionadas, LbTw3, 5, 7 exhibieron valores de hidrofobicidad elevados y comparables con cada solvente empleado, mientras que las cepas LbTw8 y 15 mostraron escasa afinidad (ver Tabla 4).

Los valores determinados para las cepas comerciales resultaron variables con cada solvente. Cuando se realizó la prueba con *p*-xileno las 4 cepas mostraron valores menores a los determinados en las cepas LbTw3, 5, 7, mientras que cuando se llevó a cabo la prueba con hexadecano solo con las cepas *Lb. casei* TwCM33 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TwCM36 se lograron valores comparables.

**Tabla 4. Adhesión de *Lactobacillus* autóctonos y comerciales a solventes orgánicos**

CEPAS	% Hidrofobicidad	
	<i>p</i> -xileno	Hexadecano
LbTw 3	81	86
LbTw 5	82	85
LbTw 7	78	89
LbTw 8	1	7
LbTw 15	0	3
TwCM 33	36	83

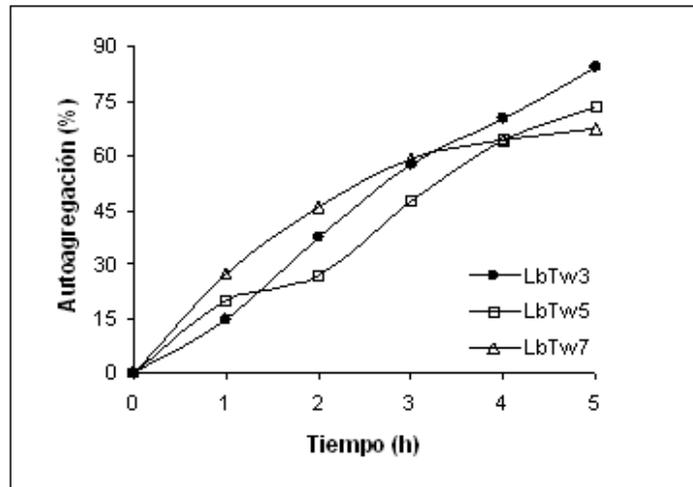
TwCM 35	42	59
TwCM 36	37	80
TwCM 49	24	13

Los valores corresponden al promedio de 2 ensayos.

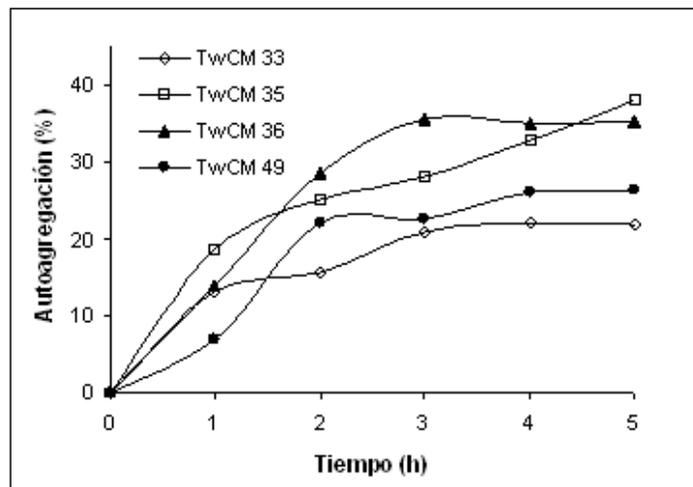
### Capacidad de autoagregación

Los valores de sedimentación de las cepas LbTw3, 5 y 7 seleccionadas, medidos durante un período de incubación de 5 h demostraron fenotipos de fuerte autoagregación, con valores superiores a 65 % (ver Figura 1). La capacidad de autoagregación observada está relacionada con los componentes de la superficie celular, propiedad que no se vio afectada luego del lavado y resuspensión de las células en buffer PBS. Los ensayos realizados en las cepas comerciales, comparadas con las autóctonas, demostraron una capacidad inferior, con valores comprendidos entre 22-38 % (ver Figura 2).

**Figura 1. Ensayo de autoagregación en cepas de *Lactobacillus* autóctonos seleccionados. Los valores corresponden al promedio de 4 ensayos.**



**Figura 2. Ensayo de autoagregación en cepas de *Lactobacillus* comerciales. Los valores corresponden al promedio de 4 ensayos.**



### Discusión

La microbiota del tracto gastrointestinal está regulada por diversos factores, como la disponibilidad de alimento, interacción entre microorganismos, enzimas gástricas y pancreáticas, pH, movimientos peristálticos y sales biliares. La capacidad de tolerancia a pH y sales biliares es un criterio de selección y un prerequisite indispensable para que los microorganismos puedan desarrollar sus efectos benéficos en el intestino (14, 15).

En este trabajo se estudiaron las propiedades probióticas de 20 cepas de *Lactobacillus* salvajes aisladas de quesos ovinos. Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que las cepas estudiadas, exceptuando las cepas LbTw9, 10 y 20, mantienen su viabilidad a valores de pH  $\leq 2$ , demostrando mayor capacidad para tolerar bajos valores de pH que las cepas comerciales. Los valores hallados resultaron comparables con los de investigaciones descritas por otros autores (16, 17). En consecuencia, estas características hacen posible que sobrevivan durante su paso por el estómago, llegando al intestino en cantidades adecuadas para ejercer actividades benéficas.

La tolerancia a sales biliares es una importante característica de las BAL utilizadas como adjuntos dietarios, que les permite sobrevivir y duplicarse en el intestino delgado. En todos los casos de las 20 cepas salvajes estudiadas no se alteró la tasa de duplicación y la población final en presencia del inhibidor. La bilis actúa sobre la membrana plasmática alterando su permeabilidad y provocando, en el caso de cepas sensibles la lisis celular. Sin embargo en el caso de cepas resistentes como las estudiadas, puede facilitar el transporte de sustratos y favorecer el ingreso de nutrientes (18).

Las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, diacetilo, peróxido de hidrógeno y ácido láctico constituyen metabolitos producidos por los microorganismos probióticos que exhiben efecto antimicrobiano (19). Las cepas de *Lactobacillus* salvajes presentaron actividad antagónica contra microorganismos patógenos y/o contaminantes de alimentos comparables con las cepas comerciales. Se pueden destacar las cepas LbTw1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 15, 16 y 17 que resultaron activas contra todos los microorganismos Gram-negativos estudiados, mientras que la cepa LbTw20 presentó el menor espectro de inhibición. Solo las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TwCM 35 y 36 presentaron actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos evaluados.

Los resultados obtenidos contra microorganismos Gram-positivos fueron similares, las cepas LbTw3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15 y 18 exhibieron actividad antagónica contra la totalidad de cepas estudiadas. Con respecto a las cepas comerciales solo *Lb. casei* TwCM49 presentó actividad inhibitoria contra todos los microorganismos estudiados, mientras que *Lb. casei* TwCM33 solo inhibió las cepas de *Bacillus megaterium* y *B. cereus*. Este fenómeno resulta de interés desde el punto de vista sanitario debido a que los lactobacilos aislados se encuentran en gran número en la etapa final de la maduración de quesos constituyendo un mecanismo natural para controlar la posible contaminación de los alimentos con microorganismos potencialmente peligrosos (20).

La intolerancia a la lactosa es un problema que padece entre el 70 y el 100% de la población mundial en distinto grado. La frecuencia de la pérdida de la capacidad para degradar la lactosa en la edad adulta varía según las poblaciones y las latitudes; es menos frecuente en el Norte y Centro de Europa, pero muy extendida en África y Oriente (21). Este problema se debe a la ingestión de productos que contienen lactosa, principalmente leche no fermentada, y los bajos niveles de b-gal intestinal.

De las 20 cepas estudiadas, 6 no presentaron actividad de b-gal, sin embargo 3 de estas, las cepas LbTw14, 17 y 20 fermentaron la lactosa (dato no mostrado). Este fenómeno indica que el sustrato utilizado para determinar la actividad enzimática (*o*-nitrofenol  $\beta$ -galactopiranosido) no logra atravesar la membrana debido a que en algunas cepas de lactobacilos el transporte se realiza por el sistema fosfotransferasa de azúcares. En estos casos la lactosa se acumula en el citosol como lactosa-6-fosfato, sustrato específico de la fosfo-b-galactosidasa (22).

Exceptuando la cepa LbTw19, las restantes desarrollaron actividades de b-gal comparables con las cepas comerciales. En consecuencia, los resultados obtenidos nos permiten considerar el potencial uso de los lactobacilos estudiados para fermentar o formar parte de la flora acompañante de productos lácteos destinados a personas con intolerancia a la lactosa.

Las características físico-químicas de la pared celular bacteriana, tanto como la naturaleza de la superficie a la que se adhiere, influyen sobre los fenómenos de autoagregación y adhesión. Los ensayos de adhesión a *p*-xileno y hexadecano, ambos solventes no polares, realizados en las cepas seleccionadas demostraron que 3 de ellas (LbTw3, 5, 7) presentaban porcentajes de adhesión superiores al 78%. Estos resultados, mayores a los obtenidos en las cepas comerciales y a los presentados en trabajos previos (23, 24) indicarían un fuerte carácter hidrofóbico de la superficie celular, factor que contribuye a la interacción de las BAL con las células del tracto gastrointestinal.

El ensayo de autoagregación se llevó a cabo omitiendo las cepas LbTw8 y 15 debido a los bajos resultados obtenidos en la prueba de hidrofobicidad (adhesión a solventes orgánicos). La adhesión de los microorganismos al epitelio intestinal se debe a la interacción de fuerzas atractivas y repulsivas entre las superficies participantes (25, 26). La capacidad de autoagregación de las cepas probióticas parece ser un requisito necesario para lograr la adhesión a las células epiteliales del intestino, ocupando lugares específicos para evitar la potencial colonización por microorganismos patógenos (27, 28, 29). Los porcentajes de autoagregación de las cepas LbTw3, 5 y 7 sugieren una relación directa con el carácter hidrofóbico de la superficie celular.

### **Conclusión**

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que las cepas autóctonas LbTw3, 5 y 7 poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probióticos: resistencia a pH ácido y sales biliares, amplio espectro de actividad antimicrobiana, buena actividad de b-gal y propiedades hidrofóbicas relacionadas con su capacidad de adhesión al epitelio intestinal.

Los microorganismos no necesitan cumplir con todos los criterios de selección ensayados, en consecuencia las restantes cepas podrían ser sometidas a posteriores pruebas con el objeto de estudiar propiedades adicionales no contempladas en este estudio.

### **Resumen**

En el presente trabajo se evaluó el potencial probiótico de 20 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de quesos ovinos provenientes del Valle Inferior del Río Chubut, (Patagonia-Argentina). Se analizó la tolerancia a pH ácido y sales biliares, actividad antimicrobiana y actividad de b-galactosidasa (b-gal), los resultados se compararon con cepas comerciales. Además, se estudió la adhesión a hidrocarburos y la capacidad de autoagregación en cepas seleccionadas. En 10 cepas se observó supervivencia luego de 4 h de incubación a pH 1,0; 7 cepas sobrevivieron a pH 2,0; 2 cepas a pH 2,5; mientras que 1 cepa no toleró ninguno de los tratamientos. En todas las cepas estudiadas no se alteró la tasa de duplicación en presencia de 0,3 % de sales biliares. Doce cepas desarrollaron actividad inhibitoria contra todos los microorganismos Gram-positivos y negativos estudiados. No se detectó actividad de b-gal en 6 cepas, mientras que las restantes desarrollaron actividades comparables a las obtenidas en las cepas comerciales. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas previamente descritas se seleccionaron 5 cepas para estudiar su adhesión a hidrocarburos. Las cepas de *Lactobacillus* LbTw3, LbTw5 y LbTw7 exhibieron valores superiores al 78% y se sometieron a pruebas

de autoagregación. Los resultados obtenidos sugieren una fuerte relación entre la capacidad de autoagregación y la hidrofobicidad de la superficie celular. Sobre la base de los resultados obtenidos por las cepas LbTw3, LbTw5 y LbTw7 concluimos que presentan características para ser consideradas como cepas potencialmente probióticas. Debido a que los microorganismos no necesitan cumplir con todos los criterios de selección, las restantes cepas pueden ser sometidas a posteriores pruebas con el objeto de estudiar propiedades adicionales.

*Palabras Clave: propiedades probióticas, Lactobacillus salvajes, quesos ovinos, Patagonia.*

### **Abstract**

In the present work the probiotic potencial of 20 strains of *Lactobacillus* spp. isolated from ovine milk cheese from Valle Inferior del Río Chubut, (Patagonia-Argentina) was evaluated. The strains were examined in relation to acidic and bile salts tolerance, antimicrobial activities and b-galactosidase (b-Gal) activity, and were compared with commercial strains. Microbial adhesion to hydrocarbons and autoaggregation ability on selected strains were also studied. Survival following 4 h of incubation at pH 1.0 was observed for 10 strains, 7 strains survived to pH 2.0, 2 strains to pH 2.5, whereas 1 strain could not survive any of the treatments. In all studied strains the duplication rate in the presence of 0.3 % bile salts was not affected. Twelve strains displayed antimicrobial activities against all Gram-positive and Gram-negative bacteria studied. b-Gal activity was not detected in 6 strains, whereas the remaining strains displayed values comparable with those obtained in commercial ones. From the results obtained in previously described tests, 5 strains were selected to evaluate the adherence to hydrocarbons. Strains *Lactobacillus*LbTw3, LbTw5 and LbTw7 showed values higher than 78 % and were subjected to autoaggregation test. The results of the test suggest a strong relationship between autoaggregation and cell surface hydrophobicity. On the basis of the results obtained, we concluded that strains LbTw3, LbTw5 and LbTw7 exhibit characteristics to be regard as potentially probiotic strains. Since microorganisms do not need to fulfil all selected criteria, the remaining strains could be subjected to further tests in order to study additional properties.

*Keywords: probiotic properties, wild Lactobacillus, ovine cheese, Patagonia.*

### **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto PICTR 2002 N° 00063 financiado por la Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina).

### **Referencias**

1. Hoier, E. 1992. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Austr.* 44 (suppl.9):418-420.
2. Fooks, L., R. Fuller and G. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9:53-61.
3. Schrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotic-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl):361S-364S.
4. Mattila- Sandholm, T., P. Myllärinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fondeén and M. Saarela. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12:173-182.
5. Sgouras D., P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martinez-González, E. Eriotou, S. Michopoulos,
6. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou and A. Mentis. 2004. In vitro and In vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:518-526.
7. Medici M, C.G. Vinderola and G. Perdigón. 2004. Gut mucosal immunostimulation by probiotic fresh cheese. *Int. Dairy J.* 14:611-618.
7. Perdigón G, C. Maldonado-Galdeano, J. Valdez and M. Medici. 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (suppl.4):21-26.

8. Shermak M.A., J.M. Saavedra, T.L. Jackson, S.S. Huang, T.M. Bayless and J.M. Perman. 1995. Effect of yogurt on symptoms and hydrogen production in lactose-malabsorbing children. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(Suppl.):1003S-1006S.
9. Sanders M.E. 1993. Summary of the conclusions from a consensus panel of experts on health attributes on lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.* 76:1819-1828.
10. Lewus, C.B., A. Kaiser and T.J. Montville. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1683-1688.
11. Mustapha, A., T. Jiang and D.A. Savaiano. 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 80:1537-1545.
12. Pérez, P.F., Y. Minnaard, E.A. Disalvo and G.L. De Antoni. 1998. Surface properties of Bifidobacterial strain of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:21-26.
13. Kos, B., J. Suskovic, S. Vukovic, M. Simpraga, J. Frece and S. Matosic. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94:981-987.
14. Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):386S-392S.
15. Ouwehand, A.C., P.V. Kirjavainen, C. Shortt and S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9:43-52.
16. Jacobsen, C.N., V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford, P.J. Moller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandström, M. Tvede and M. Jacobsen. 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 strain in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4949-4956.
17. El-Naggar, M.Y.M. 2004. Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology.* 3(suppl.2):173-180.
18. Mustapha, A., *et al, Op. cit.*
19. Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria in: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. (S. Salminen and von Wright, eds.), Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 139-160.
20. Kieronczyk, A., S. Skeie, T. Langsrud and M. Yvon. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter Lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:734-739.
21. de Vrese, M., A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Laue and J. Schrezenmeir. 2001. Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):421S-429S.
22. Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Sc. J.* 75:1-13.
23. Gusils, C., M. Bujazha and S. González. 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia.* 27(suppl. 8):409-413.
24. Kos, B., *et al, Op. cit.*

25. Greene, J.D. and T.R. Klaenhammer. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4487–4494.
26. Pérez, P.F., *et al*, *Op. cit.*
27. Reid, G., J.A. Mc Groarty, R. Angotti and R.L. Cook. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian J. Microbiol.* 41:334-351.
28. Boris, S., J.E. Suárez and C. Barbés. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* 83:413-420.
29. Del Re, B., B. Sgorbati, M. Miglioli and D. Palenzona. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strain of *Bifidobacterium longun*. *Letters Appl. Microbiol.* 31:438-442.