

# Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera.

Preliminary study of probiotic potential of lactobacilli isolated from grass milking farm.

Alvarado-Rivas Carmen C. y Díaz-Rivero Cándida G.

Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

Recibido junio 2009 - Aceptado agosto 2009

## RESUMEN

Los probióticos constituyen una interesante alternativa en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, razón por la cual hay un interés creciente por caracterizar microorganismos para uso probiótico. Tomando como referencia el protocolo de la FAO-OMS, se estudiaron, para establecer el potencial probiótico, 10 cepas de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera: 6 *Lactobacillus plantarum* (cepas 1, 4, 20, 37, 50 y 58), 2 *L. paracasei* ssp. *paracasei* (cepas 23 y 90), 1 *L. brevis* (cepa 11) y 1 *L. pentosus* (cepa 67). Se evaluó tanto la resistencia a pH 3 y a 0,3% de bilis en caldo MRS, como la susceptibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina, ciprofloxacina, amikacina, y gentamicina, utilizando el método de difusión en disco modificado. Todas las cepas fueron resistentes a 0,3% de bilis, pero sólo *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23 mostraron alta resistencia a pH 3. Todos los lactobacilos estudiados fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico y eritromicina, y mostraron resistencia a ciprofloxacina, gentamicina y kanamicina. Se concluye que las cepas *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23, presentaron características como potenciales probióticos, las cuales deben seguir investigándose, a pesar de haber mostrado resistencia a antimicrobianos, pues aún debe determinarse si esta resistencia es transmisible.

## PALABRAS CLAVE

Lactobacilli, grass, probiotic potencial.

## ABSTRACT

Probiotics constitute an interesting alternative in the prevention and treatment of some diseases,

reason for which there is an increasing interest to characterize microorganisms for probiotic use. Taking as a reference FAO-OMS, 10 lactobacilli strains isolated from grass milking farm were studied to evaluate its probiotic potential: 6 *Lactobacillus plantarum* (strains 1, 4, 20, 37, 50 y 58), 2 *L. paracasei* ssp. *paracasei* (strains 23 y 90), *L. brevis* (strain 11) and *L. pentosus* (strain 67). Resistance to pH 3 and 0.3% bile in MRS broth were evaluated as well as susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, ciprofloxacin, amikacin and gentamicin using modified disc diffusion method. All the strains were resistant to 0.3% of bile, but only *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 and *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23 showed high resistance to pH 3. All the lactobacilli tested were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid and erythromycin and showed resistance to ciprofloxacin, gentamicin and kanamicin. Considering these finds we conclude that the *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23 showed characteristics with a good potential as probiotics which must continue under studied, although they have resistance to antimicrobials which should be characterized to evaluate if it is transmissible.

## KEY WORDS

Lactobacilli, grass, probiotic potencial.

## INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal de un adulto sano es relativamente estable y contiene diversas poblaciones bacterianas beneficiosas constituidas principalmente por especies de lactobacilos y bifidobacterias, que juegan un rol importante en la salud del huésped [1-4]. El desbalance de la microbiota colónica beneficiosa puede contribuir al desarrollo de diferentes trastornos, como infecciones del tracto gastrointestinal, constipación,

síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria del colon, alergias, enfermedades cardíacas y cáncer de colon. Para prevenir estos riesgos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado explotar el potencial terapéutico y profiláctico de microorganismos beneficiosos o probióticos [5].

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que administrados en cantidades suficientes proveen efectos fisiológicos beneficiosos sobre el huésped [6], en este sentido, se les atribuye: ayuda en la digestión de la lactosa, prevención de infecciones intestinales, acción inmunomoduladora, prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares [7-9], adicionalmente, se está investigando el posible papel de los probióticos en la prevención de las caries dentales [10].

El género *Lactobacillus* contiene especies, como *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* y *L. plantarum*, cuyos efectos probióticos han sido estudiados *in vitro* e *in vivo* [8]. Otras especies probióticas estudiadas pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* [11], pero los más conocidos y utilizados son *L. plantarum* 299, *L. rhamnosus* Gorbach Goldin (LGG) y *Bifidobacterium* [6]. Existen cuatro formas básicas de consumo de los probióticos: como un cultivo concentrado agregado a alguna bebida (Ej: jugo de frutas), inoculado dentro de fibras prebióticas, como suplemento dietético en formas farmacéuticas de células liofilizadas (polvo, cápsulas, tabletas) e inoculado dentro de alimentos lácteos [12]. El yogur y las leches fermentadas se consideran vehículos idóneos para bacterias probióticas [13 -15]; quesos y helados han sido utilizados también como alimentos probióticos [16 -18].

Debido al auge del consumo de estos alimentos probióticos, comenzaron a incorporarse rápidamente nuevos productos al mercado sin una normativa previamente aceptada acerca de los requisitos de selección para los probióticos; por esa razón, la FAO en conjunto con la OMS, publicaron en mayo de 2002 una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos [19]; dicha guía incluye los siguientes aspectos: Identificación del género, especie y cepa probiótica, pruebas *in vitro* para la selección de probióticos de uso humano, donde se incluyen ensayos de resistencia a acidez gástrica y sales biliares, adherencia al mucus intestinal y actividad antagonista contra patógenos; seguridad de los probióticos, donde se incluye evaluación de resistencia a antimicrobianos, estudios *in vivo* utilizando animales y humanos; y características del Etiquetado.

Considerando que en el proceso de selección de cepas de interés probiótico, es fundamental comprobar

la capacidad de tolerancia a las condiciones adversas a su paso por el tracto gastrointestinal y su comportamiento ante los agentes empleados en el tratamiento de infecciones [20-21], en esta investigación, se realizó un estudio preliminar *in vitro* a cepas bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus*, aisladas de pastizal de una finca lechera, en relación a su capacidad para sobrevivir en medio ácido y en presencia de bilis, así como, su sensibilidad a algunos antimicrobianos.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas bacterianas

Se estudiaron diez cepas de *Lactobacillus* provenientes de pastizal de una finca lechera: 6 cepas de *Lactobacillus plantarum*, asignadas con los números 1, 4, 20, 37, 50 y 58, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 90, *L. brevis* 11 y *L. pentosus* 67.

### Estandarización del inóculo

Un inóculo de aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  UFC/ml, se consideró adecuado para realizar la evaluación del potencial probiótico de las cepas *in vitro*, por ser la cantidad promedio de bacterias probióticas recomendable que debe consumirse para lograr sus efectos beneficiosos [12, 22]. A partir de crecimiento de las cepas en placas de agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, HIMEDIA) cultivadas en microaerofilia a 37 °C por 12-16 horas, se prepararon suspensiones celulares con turbidez equivalente al tubo N° 2 del nefelómetro de McFarland [23]. La absorbancia de las suspensiones celulares fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro digital (Genesys 20). Los valores oscilaron alrededor de 0,130; por ello, se ajustó la turbidez de todas las suspensiones celulares a este valor de absorbancia. Paralelamente, se realizó el conteo celular utilizando agar MRS e incubando en microaerofilia a 37 °C por 48 horas, permitiendo comprobar en la suspensión el rango  $10^7$ - $10^8$  UFC/ml.

### Resistencia a pH 3

Se utilizó la metodología de Godward y col. [24] modificada por la sustitución del inóculo del microorganismo a estudiar cultivado en caldo NGYC (OXOID) hasta la fase exponencial por el inóculo estandarizado como se explicó anteriormente. El pH del caldo MRS fue ajustado a 3,0 utilizando HCL 1 N e inoculado por duplicado con 1% de suspensión celular de la cepa a estudiar; se incubó en baño de agua a 37 °C por tres horas y se realizó conteo celular [25] a tiempo cero y a las tres horas. Los controles de estos ensayos se realizaron cultivando las cepas bajo las mismas condiciones en caldo MRS

a pH 6,5. El porcentaje de resistencia de las cepas a pH ácido fue calculado por la siguiente ecuación: % R pH:  $[(UFC/ml)_{MRS\ pH\ 3,0} \times 100] / (UFC/ml)_{MRS\ pH\ 6,5}$  [26].

#### Resistencia a 0,3 % de bilis bovina

Se utilizó la metodología de Godward y col. [24] modificada por la sustitución del inóculo del microorganismo a estudiar cultivado en caldo NGYC (OXOID) hasta la fase exponencial por el inóculo estandarizado como se explicó anteriormente. Las cepas fueron cultivadas al 1% y por duplicado en caldo MRS con 0,3% de bilis de buey deshidratada (DIFCO), y en las condiciones de incubación del ensayo anterior. Se realizó conteo celular [25] a tiempo cero y a las tres horas. Los controles consistieron en cultivos de las cepas bajo las mismas condiciones en caldo MRS a pH 6,5. El porcentaje de resistencia de las cepas a bilis bovina fue calculado por la siguiente ecuación: % R bilis:  $[(UFC/ml)_{MRS + 0,3\ \% \text{ de bilis}} \times 100] / (UFC/ml)_{MRS\ pH\ 6,5}$  [26].

#### Susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Se utilizó el método de difusión en disco modificado, substituyendo el agar Müeller Hinton por agar MRS [27-28]. Los antimicrobianos probados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (2:1; 30 µg, OXOID); eritromicina (15 µg, BBL); ciprofloxacina (5 µg, OXOID); amikacina (30 µg, HIMEDIA) y gentamicina (10 µg, BBL). Como no existen valores estándares para la interpretación de la susceptibilidad de lactobacilos cuando se utiliza el método de difusión en disco, la susceptibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico; eritromicina; y ciprofloxacina se interpretó utilizando los estándares de diámetros de inhibición de *Enterococcus* spp. [29] por su relación filogenética con los lactobacilos. Para interpretar los resultados de sensibilidad a amikacina y gentamicina se utilizaron medidas de halos de inhibición sugeridas por la casa comercial HIMEDIA.

## RESULTADOS

#### Resistencia a pH 3 y a 0,3% de bilis bovina

La resistencia a pH 3 de los lactobacilos estudiados fue variable. El porcentaje máximo de sobrevivencia fue mostrado por la cepa *L. plantarum* 20 (93,41%) (Tabla 1) y la menos resistente a este pH fue *L. plantarum* 58, con un porcentaje de sobrevivencia de 0,35%. El comportamiento de los microorganismos ante 0,3% de bilis fue más uniforme; mostrando porcentajes muy altos de sobrevivencia, a excepción de *L. plantarum* 1 y *L. plantarum* 4 (Tabla 1).

**TABLA 1**

Tolerancia o crecimiento de los lactobacilos a pH 3 y 0,3 % de bilis

Cepa	Sobrevivencia (%) a pH 3	Sobrevivencia (%) 0,3 de bilis
<i>L. plantarum</i> 1	64,29	35,0
<i>L. plantarum</i> 4	83,33	40,0
<i>L. plantarum</i> 20	93,41	100 <sup>a</sup>
<i>L. plantarum</i> 37	36,37	100 <sup>a</sup>
<i>L. plantarum</i> 50	91,0	100 <sup>a</sup>
<i>L. plantarum</i> 58	0,35	100 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 23	91,67	100 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 90	44,0	100 <sup>a</sup>
<i>L. pentosus</i> 67	8,7	100 <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> 11	3,57	100 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: crecimiento bacteriano en las condiciones ensayadas

#### Sensibilidad a agentes antimicrobianos

Las cepas mostraron resistencia a amikacina, gentamicina y ciprofloxacina, mientras que, todas mostraron sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico y eritromicina (Tabla 2). En el ensayo de susceptibilidad a ciprofloxacina de la cepa *L. plantarum* se observaron colonias intrahalo.

**TABLA 2**

Susceptibilidad de los lactobacilos a diferentes agentes antimicrobianos

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

Amox/Ac. Clav.: Amoxicilina/ácido clavulánico; Eritr.: eritromicina; Ciprofloxac.: ciprofloxacina; Amik.: amikacina; R: Resistente; S: Sensible

## DISCUSIÓN

La acidez producida por el estómago con pH de 2-3 constituye una de las principales barreras para muchos microorganismos que transitan el tracto gastrointestinal [30]. Muchas especies de lactobacilos pueden hacer frente a esta barrera porque son microorganismos acidúricos; con pH

óptimo de crecimiento en el rango 5,5-6,2; capaces de crecer a pH inferior a 5 [31]; esto lo logran gracias a mecanismos celulares que les permiten mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad, tales como bombas de extracción de protones [32], sin embargo, la eficiencia de estos mecanismos puede variar en los miembros de una misma especie. Todas las cepas de lactobacilos estudiadas fueron capaces de sobrevivir 3 horas expuestas a medio ácido, destacando con mayor capacidad *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23 (Tabla 1). Estos resultados contrastan con los obtenidos en un estudio realizado en la ciudad de Mérida con 22 cepas de *Lactobacillus* spp. de origen humano, donde se evaluó la resistencia a pH 3; encontrándose porcentajes importantes de inhibición en todas las cepas estudiadas [33]; sin embargo, coinciden con los obtenidos por varios autores que han encontrado resistencia a pH 3 en cepas de *L. casei* y *L. plantarum* caracterizadas para uso probiótico. [24, 34-36].

Otra barrera del tracto intestinal que deben superar las bacterias probióticas es la presencia de sales biliares en concentraciones aproximadas a 0,3% en el intestino delgado [37], estos compuestos son muy inhibitorios para muchos microorganismos porque alteran la permeabilidad de las bacterias sensibles provocando lisis celular, sin embargo, en las cepas resistentes puede facilitar el transporte de sustratos y favorecer el ingreso de nutrientes [38].

Todas las cepas mostraron resistencia a 0,3% de bilis, pero cabe destacar, que 8 de los 10 lactobacilos estudiados, no solamente mostraron resistencia muy alta a 0,3% de bilis, sino que también, fueron capaces de reproducirse en estas condiciones (Tabla 1). En la investigación mencionada anteriormente, donde se evaluó la resistencia de 22 lactobacilos de origen humano a pH 3, también se evaluó la resistencia a 0,3% de bilis; encontrándose que todas las cepas presentaron porcentajes altos de inhibición (50-60 %) [33]. El efecto adverso de esta concentración de bilis también fue observado en 16 de 38 cepas de *Lactobacillus* aisladas de un consorcio bacteriano probiótico [39]. Los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los de otras investigaciones, donde encontraron resistencia de cepas de *L. casei* y *L. plantarum* a diferentes concentraciones de bilis incluyendo la utilizada en este trabajo de investigación [37-38, 40-42]. Resulta muy interesante que todas las cepas aisladas de pasto, muestren resistencia a la concentración de bilis ensayada; una posible explicación podría ser que provienen del tracto gastrointestinal de las vacas que pacen en el pastizal donde se tomaron las muestras; en todo caso, esto constituye un aspecto a favor de la

selección de las mismas como bacterias para potencial uso probiótico.

Aunque las cepas *L. plantarum* 37 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 90 mostraron una sensibilidad importante al pH ensayado (Tabla 1), tienen a su favor la resistencia a bilis; por ello, no debe descartarse su potencial uso como probióticos en productos lácteos como queso, que ofrece protección a los microorganismos contra las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal por su pH cercano al neutro y consistencia sólida y grasa [43]. Los estudios de la viabilidad de bacterias probióticas en quesos se han realizado generalmente en quesos madurados como Cheddar, Cottage y Gouda; pero también se han realizado y encontrado resultados satisfactorios en queso fresco argentino [18]. El consumo de queso en nuestro país es muy popular, razón por la cual, deben aportarse bases científicas que permitan el desarrollo de quesos con probióticos, utilizando bacterias lácticas probióticas autóctonas como las aisladas en este trabajo de investigación.

Otro de los requisitos que deben cumplir las especies bacterianas probióticas es la ausencia de resistencia a antimicrobianos, porque debe evitarse el riesgo de que estas cepas puedan transferir genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas o potencialmente patógenas presentes en el tracto gastrointestinal del huésped [19, 44], de allí, que en la caracterización y selección de especies con potencialidades probióticas se incluya la evaluación del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos [45].

Las cepas estudiadas mostraron sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico y eritromicina y resistencia a ciprofloxacina, amikacina y gentamicina (Tabla 2). Se ha reportado la sensibilidad de *Lactobacillus* spp. a penicilina y otros  $\beta$ -lactámicos [44, 46, 47], así como también, a eritromicina en cepas de *L. plantarum* y *L. brevis* aisladas de alcaparra [48].

La resistencia de *Lactobacillus* spp. a gentamicina y otros aminoglucósidos está bien documentada [28, 43, 49-51], en este sentido, se han reportado cepas de *L. plantarum* resistentes [49, 52, 53]. Pulido y col. [48] también reportaron la resistencia a ciprofloxacina de 49 cepas de *L. plantarum* y 9 cepas de *L. brevis* aisladas de alcaparras fermentadas. Un fenómeno interesante que se observó al ensayar la susceptibilidad a ciprofloxacina de la cepa de *L. plantarum* 58, fue el desarrollo de colonias en los halos de inhibición; en aislados clínicos estos resultados se interpretan como resistencia heterogénea; esto quiere decir que la cepa porta los genes de resistencia al antibiótico pero no todas las bacterias de la población pueden expresarlos; en estos casos debe reportarse la cepa como resistente [54].

La resistencia de las bacterias a antimicrobianos puede ser natural con poca posibilidad de transmisión, o adquirida, considerada muy transmisible [50]. La resistencia de las bacterias lácticas es considerada intrínseca y no transmisible [44]; por ejemplo, la resistencia natural de *Lactobacillus* a glicopéptidos está muy bien documentada [46, 48, 52].

Aunque algunas especies de lactobacilos como *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. reuteri* pueden portar plásmidos R que codifican resistencia a antibióticos, tales como tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol y lincomicina, hay poca referencia en la literatura de la transferencia conjugativa en este género, incluso, de plásmidos nativos [44, 50].

Desde el punto de vista de los requisitos relativos a seguridad que deben tener las bacterias de uso probiótico, es deseable que no porten genes de resistencia a antimicrobianos, por ello, este estudio preliminar de la sensibilidad de las cepas a antimicrobianos debe completarse, incluyendo otros antimicrobianos, y realizando estudios a nivel molecular para determinar que esa resistencia no sea transmisible.

## CONCLUSION

1. *L. plantarum* 20, 50, 4, 1 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 23 mostraron cualidades como potenciales bacterias probióticas por su resistencia a pH 3 y a 0,3% de bilis.

2. Aunque las cepas *L. plantarum* 37 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* 90 mostraron una sensibilidad importante al pH ensayado, pudieran utilizarse como probióticos adjuntos en quesos.

3. Los lactobacilos mostraron resistencia a ciprofloxacina, gentamicina y kanamicina, no obstante, no debe descartarse su potencial uso como probióticos hasta determinar si esa resistencia es transmisible.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico ( CDCHT) de la Universidad de los Andes por el financiamiento otorgado bajo el código FA-385-06-03-EM y al FONACIT, por el financiamiento otorgado para el fortalecimiento del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo el código F-2000001633.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers O, Leer R, et al. Complete

genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. PNAS On Line. 2003; 100 (2). [Consultada el 04 de mayo de 2009] En Internet. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/100/4/1990>

[2]. Lièvin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser J, et al. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut. 2000; 47 (5): 646-652.

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

[4]. Jacobsen C, Resenfeldt N, Hayford A, Moller P, Michaelsen K, Paerregard A, et al. Screening of probiotic activity of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five select strains in humans. Appl Environ Microbiol. 1999; 65 (11): 4949-4956.

[5]. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr. 2001; 73 (2): 386S-92S.

[6]. Pérez-Luyo A. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? Rev Estomatol Herediana. 2008; 18 (1): 65-68

[7]. Isolauri E. Future aspects of probiotics in helath: Probiotics-immunomodulatory potential against allergic disease. J Food Sci. 2004; 69 (5):135-137.

[8]. Zamudio K, Zavaleta A. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. Ciencia e Investigación. 2003; 6 (1): 30-35.

[9]. Amores R, Calvo A, Maestre J, Martínez-Hernández D. Probióticos. Rev Esp Quimioterap. 2004; 17 (2): 131-139

[10]. Meurman J. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry?. Eur J. Oral Sci. 2005; 113 (3): 188-196.

[11]. Brizuela M, Serrano P, Pérez Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. Braz Arch Biol Technol. 2001; 44 (1): 95-99.

[12]. Caglar E, Kargul B, Tanboga, I. Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. Oral Dis. 2005; 11 (3): 131-137.

[13]. Talwalkar A, Kailaspathy K. A review of oxygen toxicity in probiotics yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Comprehensive Rev Food Sci Food Safety. 2004; 3 (3): 117-123.

[14]. González-Martínez B, Gómez-Treviño M, Jiménez-Salas Z. Bacteriocinas de Probióticos. RESPYN. 2003; 4 (2). [En Internet]. Disponible

en: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

[15]. De Vuyst L. Technological aspects related to the application of functional starters cultures. *Food Technol Biotechnol.* 2000; 38 (2):105-112.

[16]. Haynes I, Playne M. Survival of probiotics cultures in low-fat ice-cream. *Aust J Dairy Tech.* 2002; 57 (1):10-14.

[17]. Ross R, Fitzgerald G, Collins K, Staton C. Cheese delivering biocultures.-probiotic cheese. *Aust J Dairy Tech.* 2002; 57 (2): 71-91.

[18]. Vinderola C, Prosello W Ghiberto D, Reinheimer J. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J Dairy Sci.* 2000; 83 (9): 1905-1911.

[19]. Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediatr Esp.* 2003; 61 (9): 476-482.

[20] González-Rivas F, González-Martínez B. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *RESPYN.* 2006; 7 (1). [En Internet]. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/1/ensayos/criterios.htm>

[21]. Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait.* 2005; 85: 193-204.

[22]. Calderón O, Padilla C, Chaves C, Villalobos L, Arias M. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *ALAN*, 2007; 57 (1): 51-56.

[23]. APHA (American Public Health Association). Compendium of methods for the microbiological examination of food. Third Edition. Vanderzant, C, and Splittstoesser, D (Eds.). Washington (EEUU): APHA; 1994. p 1992.

[24]. Godward B, Sultana K, Kaillasapathy K, Peiris P, Arumugaswamy R, Reynolds N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwis.* 2000; 5 (8): 441-445.

[25]. Maturin L, Peeler J. Aerobic plate count in *Bacteriological analytical manual*, 8<sup>th</sup> ed., revision A. Madison: AOAC International, 1998. p 3.01-3.10.

[26]. Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Prot.* 1999; 62 (8): 905-912.

[27]. Ocaña V, Silva C, Nader-Macías M.

Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; ID 18182: 1-6

[28]. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins, J. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998; 61: 1636-1643.

[29]. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing, ninth informational Supplement. M100S-19. 2009; 29 (3). p 61-62.

[30]. Prescott L. Harley J, Klein D. Normal microbiota and nonspecific host resistance in *Microbiology*. 5ta Edition. Madrid (España): Mc Graw-Hill-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.; 2002. p 702.

[31]. Kandler O, Weiss N. Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, P.H. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds.). Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1986. p 1208-1235.

[32]. Piard J, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 1991; 71: 525-541.

[33]. Mejia J, Chacón Z, Otoniel J, Guerrero B, López, G. Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *R C.* 2007; 17 (2):178-185.

[34]. Suskovic B, Brkic S, Maric V. *Lactobacillus acipophilus* M92 as potential probiotic strains. *Milchwis.* 1997; 52 (8): 430-435.

[35]. Cebezi A, Gürakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.* 2003 ; 20 : 511-518.

[36]. García I, Fragoso-Sousa L, Alvarez G, Fernández-Riusech M. Evaluation de cepas lácticas para su aplicación como probióticos. *Alimentaria.* 2001; ISSN 0300-5755 (322) : 59-62.

[37]. Maurad K, Meriem K. Probiotics characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas y Aceites.* 2008; 59 (3) : 218-224.

[38]. Vallejo M, Marguet E, Etchechoury V. Potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patagónicos. *RESPYN.* 2008; 9 (4). [En Internet]. Disponible en: [http://www.respyn.uanl.mx/ix/4/articulos/probioticos\\_quesos.htm](http://www.respyn.uanl.mx/ix/4/articulos/probioticos_quesos.htm)

[39]. Chateau N, Deschamps A, Hadj-Sassi A. Heterogeneity of bile salts resistance of a probiotic consortium. *Lett Appl Microbiol.* 1994; 18 (1): 42-44.

[40]. Rodriguez-Palacios A, Staempfli H, Duffield T, Weese J. Isolation of bovine intestinal

*Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157:H7. J Appl Microbiol. 2009; 106 (2):393-401.

[41]. Harutoshi T, Kazushi H, Taku M. High bile- and low pH- resistance lactic acid bacteria isolated from traditional fermented dairy products in Inner Mongolia, China. Milk Science. 2007; 55 (3):129-134.

[42]. Oh S, Kim S, Worobo R. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J Dairy Sci. 2000; 83 (12): 2747-2752.

[43]. Ross R, Fitzgerald G, Collins K, Staton C. Cheese delivering biocultures.-probiotic cheese. Aust J Dairy Tech. 2002; 57 (2): 71-78.

[44]. Zhou J, Pillidge C, Gopal P, Gill H. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Int J Food Microbiol. 2005; 98 (2): 211-217.

[45]. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. Lett Appl Microbiol. 1998; 26 (5): 333-337.

[46]. Danielsen M, Wild A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol. 2005; 82 (1): 1-11.

[47]. Alvarado C, Chacón Z, Otoniel J, Guerrero B, López G. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas de un Queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su Uso Como Cultivo Iniciador. R C. 2007; 17 (3):301-308.

[48]. Pulido R, Omar N, Lucas R, Abriouel H, Camero M, Gálvez A. Resistance to antimicrobial agents in lactobacilli isolated from caper fermentation. Antoine Leeuwenhoek. 2005; 88 (3-4): 277-281.

[49]. Xu H, Tian W, Jia L, Cheng B, Wei H, Wais L, *et al.* Antibiotic susceptibility of potential probiotic lactobacilli, the disc diffusion method in LAPTg agars was performed. BMI. 2008; 2: 838-842.

[50]. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. Int J Food Microbiol. 2005; 105 (3): 281-291.

[51]. Kozlova E, Pivovarenko T, Milinovskaia I, Aminov R, Kovalenko N, Voronin A. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. Antibiot Khimioter. 1992; 37 (6): 12-15.

[52]. Zarazaga M, Sáenz Y, Portillo A, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Del Campo R, *et al.* In Vitro Activities of Ketolide HMR3647, Macrolides, and Other Antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* Isolates. Antimicrob Agents Chemoter. 1999; 43 (12): 3039-3041.

[53]. Vamanu E, Vamanu, A, Ovidiu P, Câmpeanu G. Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for the preservation of fodders. Afr J Biotechnol. 2005; 4 (5): 404-408.

[54]. Cavalieri S, Harbeck R, Mc Carter y, Ortez J, Rankin I, Saitter R, *et al.* Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 2005. Editora coordinadora: Marie Coyle. [Consultada el 04 de mayo de 2009] En Internet. Disponible en: [http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs\\_sucep\\_antimicro.pdf](http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_sucep_antimicro.pdf)