

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)
AISLADAS DE ENSILADOS DE PIÑA COMO MICROORGANISMOS
CON POTENCIAL PROBIÓTICO Y DETERMINACIÓN DE SU
APLICABILIDAD COMO CULTIVO BIOPROTECTOR EN LECHE
AGRIA**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencia de Alimentos

JANNETTE WEN FANG WU WU

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres Sheng-Hsiung Wu Chen y Pi-Yueh Wu Lee, por brindarme todo su apoyo en todo momento; a mí hermana Judy, por su guía y a todas aquellas personas que formaron parte de esta experiencia.

Agradecimientos

A mi equipo asesor: Natalia, Jessie y Mauricio, por su guía y apoyo en todo momento, especialmente durante los últimos meses de incertidumbre.

A Vanny, Meli, Laura, Fani, Evelyn y Alejandra por ser grandes compañeras y amigas, y por las tardes de café y las carreras entre cursos y trabajos, los chistes y los consejos.

A Adrián y a Mariajo, por escucharme en mis momentos de frustración y darme palabras de aliento, para seguir adelante.

A Giova y Luis que, como siempre, estuvieron ahí para ayudar cuando más se les necesitó.

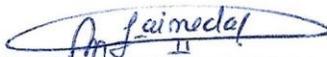
A Alonso por su ayuda en planta.

A Juan Carlos, por las tardes de socialización con café, y por su apoyo “psicológico” en momentos de estrés.

A los compañeros del Laboratorio de Microbiología de Aguas, por su amabilidad y disposición a ayudar en todo momento.

Y por último, gracias a todas aquellas personas que, por mi falta de elocuencia o atención, no mencione anteriormente, pero que fueron parte de este proceso de una u otra forma.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”



M. Sc. María Lourdes Pineda Castro

Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



PhD. Natalia Barboza Vargas

Directora de tesis



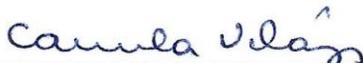
PhD. Mauricio Redondo Solano

Asesor



PhD. Jessie Usaga Barrientos

Asesora



M. Sc. Carmela Velázquez Carrillo

Representante de la Directora de Posgrado en Ciencia de alimentos



Jannette Wen Fang Wu Wu

Sustentante

Tabla de contenidos

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
HOJA DE APROBACIÓN.....	IV
RESUMEN	VII
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	XI
2. OBJETIVO.....	5
2.1. OBJETIVO GENERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	6
3.1.1. Definición de un probiótico	6
3.1.2. Criterios para la definición de un microorganismo probiótico.....	9
3.1.3. Características genéticas y fisiológicas de bacterias lácticas.....	12
3.1.4. Resistencia a antibióticos	15
3.1.5. Grupo <i>Lactobacillus casei</i>	20
3.1.5.1. Propiedades funcionales y antimicrobianas de <i>L. casei</i>	21
3.1.5.1.1. Bacteriocinas y otros compuestos con potencial antimicrobiano	23
3.2. EFECTO BIO-PROTECTOR	24
3.3. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS	25
3.3.1. Leche agria.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Localización del proyecto	27
4.2. Aislamientos bacterianos	27
4.3. IDENTIFICACIÓN DE BAL CON MARCADORES MOLECULARES	27
4.3.1. Extracción de material genético.....	27
4.3.2. Amplificación por PCR.....	28
4.3.3. Análisis de secuencias	28
4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA IN VITRO CONTRA SALMONELLA SP. Y LISTERIA MONOCYTOGENES	29
4.4.1. Evaluación de efecto antagónico determinado en placa.	29
4.4.2. Ensayos de actividad inhibitoria del sobrenadante.....	30
4.4.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE L. CASEI_ 6714 A NIVEL DE CULTIVO CELULAR CONTRA CEPAS ENTERO-INVASIVAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM.....	331
4.4.3.1. Cultivo de líneas celulares.....	31
4.4.3.2. Evaluación de la capacidad de adhesividad de <i>L. casei_ 6714</i>	32
4.4.3.3. Evaluación del efecto antagónico contra patógenos invasivos	32
4.4.3.4. Análisis de resultados.....	33

4.5. EVALUACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>L. CASEI_6714</i>	33
4.6. EFECTO DE <i>L. CASEI_6714</i> SOBRE CRECIMIENTO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> Y LA FERMENTACIÓN EN LECHE AGRIA ARTESANAL.	34
4.6.1. <i>Cultivos iniciadores</i>	34
4.6.2. <i>Preparación de la matriz</i>	35
4.6.3. <i>Evaluación del efecto bioprotector</i>	36
4.6.4. <i>Análisis estadístico</i>	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1. IDENTIFICACIÓN DE BAL CON MARCADORES MOLECULARES	38
.....	41
5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>SALMONELLA</i> SP. Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	42
5.2.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE <i>L. CASEI_6714</i> A NIVEL DE CULTIVO CELULAR CONTRA CEPAS ENTERO-INVASIVAS DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM.	45
5.3. EVALUACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>L. CASEI_6714</i>	47
5.4. EFECTO DE <i>L. CASEI_6714</i> SOBRE CRECIMIENTO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> Y LA FERMENTACIÓN EN LECHE AGRIA ARTESANAL	49
6. CONCLUSIONES	58
8. RECOMENDACIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA CITADA	60
9. ANEXOS	79

Resumen

Los probióticos son suplementos alimentarios, generalmente bacterianos, que benefician la salud del consumidor al ser ingeridos en cantidades específicas. La selección de un organismo como probiótico requieren de estudios *in vitro* e *in vivo* que permiten asegurar su funcionalidad y seguridad. El objetivo de este trabajo fue el aislar e identificar, con marcadores moleculares, BAL presentes en ensilados de subproductos industriales de piña para, posteriormente, evaluar su potencial aplicación como probiótico y aditivo bioprotector en la industria de alimentos.

Para la identificación molecular de los aislamientos, se amplificó previamente el gen ribosomal 16S, además, se utilizó el gen fenilalanina sintetasa (*pheS*). Se aislaron un total de 12 BAL que fueron identificadas como: *L. fermentum* (2), *L. casei* (7), *Weissella ghanensis* (1) y *L. parafarraginis* (2). Se determinó que presentaban una capacidad antagónica *in vitro* significativa ($p < 0.0001$) contra cepas *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*. Además, se observó que una cepa seleccionada (*L. casei*_6714) demostró ser efectiva en la reducción de la invasión de *Salmonella* serovar Typhimurium en células HeLa. La misma cepa fue evaluada como bioprotector contra *L. monocytogenes* en leche agria elaborada artesanalmente en donde se comparó su efecto contra un cultivo iniciador y se observó una acidificación más acelerada y un leve efecto en la reducción de la población del patógeno.

Lista de cuadros

Título	Página
Cuadro I. Cepas de bacterias probióticas más comunes, origen de aislamiento, efecto terapéutico comprobado y productos en los que se pueden utilizar.	8
Cuadro II. Miembros más comunes de las bacterias lácticas.	15
Cuadro III. Antibióticos de uso común clasificados según su mecanismo de acción	17
Cuadro IV. Iniciadores seleccionados para la identificación de las cepas de <i>Lactobacillus</i> sp	28
Cuadro V. Bacterias utilizadas en la selección del método de inoculación del patógeno óptimo.	30
Cuadro VI. Antibióticos que se evaluaron durante la prueba de susceptibilidad de las BAL.	34
Cuadro VII. Designación de tratamientos para las pruebas de efecto bioprotector de las BAL en leche agria.	35
Cuadro VIII. Halos de inhibición observados contra <i>Salmonella</i> sp. y <i>L. monocytogenes</i> en los ensayos de antagonismo contra las bacterias ácido lácticas (BAL).	42
Cuadro IX. Valores de absorbancia a 620 nm obtenidos en la determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante de <i>L. casei</i> _6714 contra <i>Salmonella</i> sp. y <i>L. monocytogenes</i> (promedio \pm desviación estándar, n = 3)	44
Cuadro X. Adhesión de <i>L. casei</i> _6714 a células HeLa por campo microscópico.	45
Cuadro XI. Efecto antagónico de <i>L. casei</i> _ 6714 contra la invasión de <i>Salmonella</i> Typhimurium a células HeLa (promedio \pm desviación estándar)	47
Cuadro XII. Determinación de la resistencia-susceptibilidad a antibióticos seleccionados sobre <i>L. casei</i> _6714 (promedio \pm desviación estándar, n = 3).	48
Cuadro XIII. Valores promedio de la población estabilizada de BAL en las muestras de leche agria a las 24 horas (promedio \pm desviación estándar, n = 2).	52
Cuadro XIV. Pendientes de las curvas de reducción de <i>L. monocytogenes</i> en las muestras de leche agria (n =2).	56

Lista de figuras

Título	Página
<p>Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras de leche agria a ensayar. Los inóculos se adicionaron según la distribución de tratamientos a evaluar (Cuadro VI).</p>	36
<p>Figura 2. Árbol filogenético que se realizó utilizando las secuencias del gen fenil alanil-ARNt sintasa (<i>pheS</i>) (420 nt). En negrita se muestran las secuencias de este trabajo. Se utilizó <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KTCT 3034 como grupo externo.</p>	41
<p>Figura 3. Curva de crecimiento de las BAL para los diferentes tratamientos de leche agria (n = 2). Nota: Los tratamientos corresponden a: cultivo iniciador (control negativo, T1); cultivo iniciador + BAL (T2); BAL + <i>L. monocytogenes</i> (T3); cultivo iniciador + <i>L. monocytogenes</i> (T4) y cultivo iniciador + BAL + <i>L. monocytogenes</i> (T5); A y B corresponden a las repeticiones</p>	51
<p>Figura 4. Comportamiento del pH durante la fermentación de la leche agria Nota: Los tratamientos corresponden a: cultivo iniciador (control negativo, T1); cultivo iniciador + <i>L. casei_6714</i> (T2); <i>L. casei_6714</i> + <i>L. monocytogenes</i> (T3); cultivo iniciador + <i>L. monocytogenes</i> (T4) y cultivo iniciador + <i>L. casei_6714</i> + <i>L. monocytogenes</i> (T5); A y B corresponden a las repeticiones.</p>	54
<p>Figura 5. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en los diferentes tratamientos evaluados durante la elaboración de leche agria (n = 2) donde T3 corresponde al co-cultivo de <i>L. casei_6714</i> y <i>L. monocytogenes</i>; T4 corresponde al co-cultivo del cultivo iniciador y <i>L. monocytogenes</i>; y T5 corresponde al co-cultivo de <i>L. casei_6714</i> + cultivo iniciador + <i>L. monocytogenes</i>; A y B corresponden a las repeticiones.</p>	65
<p>Figura 6. Fotografías de las placas y los halos de inhibición observados en <i>L.monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> sp. para las BAL evaluadas (nota: únicamente con carácter representativo).</p>	80
<p>Figura 7. Fotografías de las células HeLa observadas en el ensayo de adhesividad, donde: (A) Control, (B) es el tratamientos con <i>L. casei_6714</i> y (C) <i>L. fermentum_6702</i>. Nótese la diferencia en la acumulación de bacterias a nivel de la superficie celular.</p>	81

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AND	Ácido desoxirribonucleico.
AICC	Agar infusión cerebro corazón.
AL	Ácido láctico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosin trifosfato.
BAL	Bacteria ácido láctica.
CDC	Centro de Control de Enfermedades, siglas en inglés.
CTS	Caldo tripticasa de soya.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
EFSA	Autoridad Europea de Inocuidad Alimentaria, siglas en inglés.
EMP	Emden- Meyerhof- Parnas.
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle, siglas en inglés.
ETA	Enfermedad de transmisión alimentaria.
EDTA	Etilendiaminotetraacético.
FAO	Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura
Familia ABC	ATP –binding- cassette.
GRAS	Generalmente considerado como seguro, siglas en inglés.
INCIENSA	Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud.
LPS	Lipopolisacárido
MIC	Concentración mínima inhibitoria, siglas en inglés.
MRS	Medio DeMan- Rogosa- Sharpe.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés.
QPS	Presunción Calificada de Inocuidad.
TGI	Tracto gastrointestinal
XLD	Medio Xilosa-Lisina-Deoxicolato.



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Jannette Wen Fang Wu Wu, con cédula de identidad 115010860, en mi condición de autor del TFG titulado Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilados de piña como microorganismos con potencial probiótico y determinación de su aplicabilidad como cultivo bio protector en leche agria.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Jannette Wen Fang Wu Wu

Número de Carné: 806978 Número de cédula: 115010860

Correo Electrónico: jannette.wu@gmail.com

Fecha: 12/01/2021 Número de teléfono: 85537276

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Natalia Barboza Vargas


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de

1. Introducción

La comercialización y consumo de alimentos funcionales presentan un crecimiento importante en el mercado nacional y mundial; en la actualidad, es posible encontrar una gran variedad de productos disponibles en los comercios (Vijaya et al., 2015). Los alimentos funcionales son elaborados a partir de ingredientes naturales que tienen propiedades terapéuticas declaradas y comprobadas con respaldo científico. Uno de los alimentos funcionales más comunes y mejor conocidos son aquellos que contienen probióticos.

Los probióticos son suplementos alimentarios; por lo general, son bacterias, que benefician la salud del consumidor al ser ingeridos en cantidades específicas (Kullisaar et al., 2006; Kumar et al., 2015). Estos suplementos se han asociado a diversos efectos beneficiosos para la salud (de Vrese & Offick, 2010; Isolauri et al., 2002; Leahy et al., 2005) y suelen estar constituidos por diversas cepas microbianas con características específicas comprobadas (Isolauri et al., 2002); además de sus beneficios como ingredientes funcionales, se utilizan de una forma muy amplia en diversos productos fermentados para la obtención de propiedades físicas y sensoriales de mucho interés (Granato et al., 2010).

La categorización de un microorganismo como probiótico requiere de diversos estudios *in vitro* e *in vivo* que proveen indicadores que pueden ser luego extrapolados para estimar su comportamiento en el entorno real (Jensen & Science, 2014; Todorov et al., 2012). La mayoría de los probióticos comerciales y cepas estudiadas son especímenes aislados de productos lácteos fermentados, o bien, aislados del sistema digestivo del ser humano. Por diversas razones, en estudios recientes ha surgido el interés en la identificación de probióticos aislados de “fuentes no convencionales” tales como como material vegetal (Jonganurakkun et al., 2008; Kang et al., 2009) o bebidas fermentadas no lácteas (Ranadheera et al., 2017).

Estudios recientes sobre la microbiota intestinal humana sugieren que cambios en las comunidades bacterianas pueden aumentar la predisposición a diferentes trastornos fisiológicos (Shreiner et al., 2015; Valdes et al., 2018). Los microorganismos probióticos pueden ayudar a restaurar la microbiota intestinal e introducir funciones beneficiosas que resultan en la prevención de algunos fenotipos que se han asociado a enfermedades sistémicas o intestinales (Hemarajata & Versalovic, 2013; Valdes et al., 2018), tales como la reducción

de síntomas de inflamación por medio de la modulación de respuesta inmunológica (Lavasani et al., 2010).

Además, los probióticos pueden producir efectos preventivos y terapéuticos ante diferentes etiologías como la diarrea, por lo que se han convertido en factor de interés tanto a nivel de industria alimentaria como en aplicaciones farmacéuticas para restaurar la microbiota intestinal o compensar otras disfunciones gastrointestinales (Arias et al., 2013; de Vrese & Offick, 2010; Hütt et al., 2006; Nagendra, 2007). En los últimos años, se han utilizado productos y/o alimentos enriquecidos con microorganismos probióticos para el control y prevención de la diarrea después de tratamientos con antibióticos y como reconstituyentes del microbioma intestinal. También se han utilizado para la supresión de la diarrea de viajero y para tratar diarrea infantil (Amara & Shibl, 2015). Estudios preliminares mostraron que bacterias probióticas podrían inhibir la colonización de *Helicobacter pylori*, microorganismo asociado con la producción de gastritis, úlceras y cáncer gástrico en modelos murinos (Aiba et al., 1998; García et al., 2017; Macfarlane & Cummings, 2002; Servin, 2004), así como muchas otras patologías que van desde alergias alimentarias hasta hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares y trastornos autoinmunes como el Síndrome Guillain Barré (Bourrie et al. 2016; Valdes et al. 2018).

Por estos motivos, las bacterias probióticas han llegado a adquirir un papel importante en la lucha y la prevención contra enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Debido a las necesidades actuales del mercado, el identificar nuevos microorganismos con potencial biotecnológico es importante; a pesar de esto, estas cepas deben ser caracterizadas de forma que se evalúen propiedades indispensables tales como su sobrevivencia en condiciones extremas del sistema digestivo (García et al., 2017; Hernández-Alcántara et al., 2018) y/o su sobrevivencia en etapas posteriores del proceso digestivo (García-Ruiz et al., 2014).

A nivel mundial, *Salmonella* sp. es una de las causas más comunes de intoxicación alimentaria. Las personas enfermas pueden presentar síntomas alrededor de 4 a 7 días después de consumir el alimento contaminado y suele ser un cuadro autolimitado, sin embargo, la salmonelosis puede tener consecuencias graves en la población vulnerable (Food Safety Gov, 2017). En el país, los casos asociados a salmonelosis son muy comunes. Datos reportados por INCIENSA (2013), muestran que, de un total de 235 aislamientos de *Salmonella* sp. procedentes de muestras clínicas, un 31,9 % corresponden a *S. enteritidis*,

15,3 % a *S. Typhimurim* y 4,3 % a *S. Typhimurium* var. Copenhagen. Los brotes se presentaron en poblaciones de todas las edades y sexos, con una distribución por todo el país y en su mayoría estuvieron asociados al consumo de alimentos contaminados. Con respecto a *Listeria monocytogenes*, el país no cuenta con información sobre brotes ocasionados por este organismo; empero, datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos, entre los años 2012 -2018 se reportan varios brotes localizados e interestatales de listeriosis asociados con productos lácteos procesados, principalmente quesos, ensaladas preparadas, jamón y productos derivados de cerdo. El género *Listeria* sp. es comúnmente aislado en productos lácteos y vegetales, tiene una amplia distribución en el medio ambiente, por lo que la contaminación con estas bacterias puede darse muy fácilmente (Food Safety Gov, 2018). *Listeria monocytogenes* se desarrolla en plantas de procesamiento y se ha observado que es capaz de sobrevivir y crecer a bajas temperaturas. Su rango de crecimiento es de 10 - 42 °C, con un óptimo de entre 20 – 35 °C (Food Safety Gov, 2018). Las BAL que presentan características promisorias, han mostrado efectos antagonistas con una gran efectividad en el control tanto de *L. monocytogenes* como *Salmonella* sp., por lo que adquieren un interés adicional como probióticos (Sanders et al., 2010).

En la actualidad, muchos de los estudios que se están realizando están enfocados en la búsqueda de cepas probióticas con propiedades específicas, así como tecnologías que permitan optimizar su producción. La selección del microorganismo, el uso de prebiótico y las matrices alimentarias que sirvan de vehículo durante la formulación y desarrollo de alimentos probióticos son esenciales para maximizar la eficacia funcional del probiótico durante la manufactura, almacenamiento y post ingestión (Granato et al., 2010; Gueimonde & Sánchez, 2012; Nagendra, 2007). De hecho, Ranadheera et al. (2010) reportan que existe un efecto sinérgico entre las matrices alimentarias y el microorganismo durante el procesamiento y en el ambiente gastrointestinal.

Además de sus propiedades funcionales, las BAL se reconocen por sus propiedades bio-preservativas, ya que es posible obtener de las mismas la producción de distintos compuestos antimicrobianos tales como el ácido láctico (AL), diacetilo, bacteriocinas y otros metabolitos (Rouse & van Sinderen, 2008). Dadas las exigencias actuales de los consumidores por productos saludables, frescos y naturales que sean libres de aditivos

químicos, el uso de bacterias bioprotectoras como las BAL, para aumentar la calidad y vida útil de los productos, ha adquirido un fuerte interés (Castellano et al., 2008).

Bajo las premisas antes expuestas, al estudiar el efecto bioprotector en combinación con las propiedades funcionales propias de BAL con potencial probiótico, que se han aislado de residuos de agroindustria del país, se podría obtener información invaluable para el desarrollo de aplicaciones innovadoras que puedan ser integradas a las tendencias del mercado actual. Con el objetivo de alcanzar el máximo beneficio de este tipo de productos, es de vital importancia que se estudien diversos aspectos como el perfil funcional y fisiológico de estos microorganismos y se evalué su interacción a nivel del producto.

Ante este panorama, esta investigación consistió en expandir el conocimiento existente con respecto a las BAL que fueron aisladas de residuos agroindustriales, específicamente ensilados de piña, con la finalidad de evaluar su potencial probiótico y bioprotector, de forma que se logre sentar una base para estudios futuros.

2. Objetivo

2.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar según su potencial probiótico, BAL aisladas de ensilados de piña y determinar su aplicación como cultivo bioprotector en el procesamiento de leche agria artesanal.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar con marcadores moleculares BAL aisladas de ensilados elaborados a partir de subproducto industrial de piña.
2. Determinar la capacidad antagónica *in vitro* de las BAL aisladas contra *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*.
3. Evaluar la resistencia de la cepa *L. casei* _6714 a diferentes antibióticos de uso común.
4. Describir el efecto bioprotector de la cepa *L. casei* _6714 sobre *L. monocytogenes* en leche agria artesanal.

3. Marco teórico

3.1. Microorganismos probióticos

3.1.1. Definición de un probiótico

La descripción etimológica de la palabra probiótico es “*para la vida*” y en la actualidad se utiliza para describir diversos grupos microbianos que pueden ser utilizados en la dieta de animales y humanos (FAO/WHO, 2006). Este concepto de funcionalidad nace de las observaciones originales del científico y ganador del premio Nobel, Eli Metchnikoff, con respecto al rol que jugaban ciertas bacterias en el funcionamiento del sistema gastrointestinal (Anukam & Reid, 2007). Según Metchnikoff (1907), la dependencia de la microbiota intestinal y su interacción a nivel fisiológico con los alimentos hace posible adoptar medidas de consumo, que permitan modificar su diversidad en el tracto gastrointestinal, con el fin de garantizar la presencia de microorganismos beneficiosos. Años más tarde, el pediatra francés Henry Tissier observó que las muestras fecales de niños con diarrea presentaban un bajo recuento de bacterias de cierto morfotipo, mientras que, en niños saludables, ese mismo morfotipo se observaba en abundancia, por lo que sugirió que la administración de dichos microorganismos podría ayudar en la restauración de la salud intestinal (Mavroudi, 2012; Tissier, 1906). Los estudios realizados por Metchnikoff y Tissier fueron los primeros en establecer el concepto base del término probiótico; mas no fue hasta años después que la palabra se estableció como tal. Después de esto, diversos autores han propuesto distintas definiciones para estos organismos. Fuller (1989), con el objetivo de resaltar la naturaleza microbiana de los agentes, definió la palabra como un suplemento alimenticio vivo que beneficia al hospedero por medio de la mejora del balance intestinal; años más tarde Havenaar y Huis In’t Veld (1992) propusieron que se trataba de una mezcla de uno o más organismos viables, que al ser administrados a un animal o humano, beneficiaban al hospedero al promover las propiedades de la flora indígena. Según Latha, et al. (2015) el concepto actual no dista mucho de estas primeras definiciones y como se mencionó antes, los microorganismos probióticos son ingredientes funcionales que pueden ser agregados a gran diversidad de alimentos, deben ser consumidos en dosis de al menos 6 logaritmos a lo largo del tiempo, y pueden producir efectos fisiológicos deseables en el consumidor (Gueimonde & Sánchez, 2012; Kullisaar et al., 2006; Rezac et al., 2018).

Entre los efectos beneficiosos que se han asociado al consumo de probióticos se destaca el mantenimiento de una microbiota intestinal sana, la modulación y mejora de síntomas asociados con la intolerancia a la lactosa, mejorías en la función renal, bienestar digestivo, prevención y alivio de trastornos digestivos como el colon irritable y la diarrea, reducción de los niveles de colesterol, regulación de la respuesta inmune e inclusive, el tratamiento de enfermedades neuro-psiquiátricas (de Vrese & Offick, 2010; Isolauri et al., 2002; Leahy et al., 2005). Los organismos probióticos pueden ser utilizados en forma individual o en mezclas sinérgicas de dos o más cepas dadas, su aplicación depende del efecto deseado a nivel terapéutico o sensorial del producto (Charalampopoulos & Rastall, 2009).

La gran mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias. Entre las cepas más comunes se encuentran los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* (Isolauri et al., 2002). Además de las características ya mencionadas, estas bacterias se utilizan también como cultivos iniciadores en diversos productos fermentados (Latha et al., 2015). El Cuadro I muestra la información asociada a organismos probióticos y sus orígenes, así como sus aplicaciones más comunes. A pesar del gran número existente de cepas comerciales, la investigación en busca de nuevas cepas se ha convertido en una necesidad con el fin de mejorar los procesos y sus aplicaciones (Gilliland, 2002).

Cuadro I. Cepas de bacterias probióticas más comunes, origen de aislamiento, efecto terapéutico comprobado y productos en los que se pueden utilizar.

Cepa	Origen	Efecto terapéutico	Productos aplicables
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Aislamiento fecal de infantes	Desplazamiento de bacterias patógenas. Alivio de estreñimiento, eczema y colon irritable	Yogurt, encapsulados, leches en polvo
<i>Clostridium butyricum</i> 588	Aislamiento de suelo	Modificación del microbioma. Efectivo para desorden autista autoinmune e infecciones de <i>Helicobacter pylori</i>	Encapsulados Bebidas fortificadas
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lb	Aislamiento intestinal	Alivio de síntomas de diarrea	Vegetales fermentados, encapsulados
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>Shirota</i>	Aislamiento de heces humanas	Previene la colonización de patógenos	Yogurt y otras leches fermentadas
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (DSM9843)	Aislado de colon humano	Reducción de inflamación	Vegetales fermentados, encapsulados
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	Aislamiento fecal	Mejora el microbioma del colon	Encapsulados, leches fermentadas
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-1720	Aislamiento de producto lácteo	Tratamiento de úlceras pépticas	Leches fermentadas
<i>L. helveticus</i> CNCM I-1722	Aislamiento de producto lácteo	Tratamiento de úlceras pépticas	Leches fermentadas
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	Aislamiento de fruta (lychee)	Alivio de síntomas de diarrea, infección de <i>H. pylori</i>	Encapsulados

Adaptado de: McFarland, 2015.

3.1.2. Criterios para la definición de un microorganismo probiótico

La identificación de candidatos para ser considerados microorganismos probióticos viables es un proceso intensivo y complejo en el que se procura verificar varios criterios básicos. Por lo general, estos criterios o propiedades se agrupan en cinco amplias categorías (McFarland, 2015):

- a) *Sobrevivencia en el órgano objetivo.* Las pruebas realizadas en esta categoría van a depender del órgano meta al que debe llegar el organismo. Por lo general, la gran mayoría de los probióticos deben de sobrevivir el tránsito digestivo en la vía boca-colon (Charalampopoulos & Rastall, 2009; Zago et al., 2011). Esto implica que las cepas en estudio deben de ser evaluadas en sistemas simulados del tránsito intestinal para poder determinar su capacidad de tolerancia a enzimas antimicrobianas como las lisozimas y la tolerancia a pH muy bajos como las del ambiente gástrico y la bilis (Pan et al., 2009). Una vez corroborado esto, las cepas promisorias deben ser estudiadas en un modelo *in vivo* en el cual los organismos no solo se enfrenten a estos ambientes físicos, sino que también se afronten a la competencia del microbioma normal de un ser vivo (McFarland, 2015).

- b) *Interacción con el sistema hospedero.* En general, el probiótico ideal debe tener interacciones beneficiosas con el organismo que lo consume; estas interacciones pueden ser con respecto a procesos metabólicos propios del individuo o bien ante factores externos, tales como la dieta o el tratamiento con medicamentos (Benítez-Páez & Sanz, 2017). Idealmente, las cepas probióticas deben ser poco afectadas por medicamentos concomitantes o antibióticos que se consumen de forma simultánea con el probiótico, de forma que se pueda asegurar su sobrevivencia en el tracto intestinal después del tratamiento (Gueimonde et al., 2013; Kumar et al., 2015; McFarland, 2015).

Los antibióticos pueden prevenir el crecimiento o eliminar un microorganismo por diversos mecanismos y, desde su descubrimiento, se mantienen como una de las principales estrategias terapéuticas utilizadas para el tratamiento de diversas etiologías infecciosas en el ser humano y animales

(Imperial & Ibane, 2016; Nami et al., 2015). Para poder definir a un organismo potencialmente probiótico bajo el criterio de resistencia a los antibióticos se deben evaluar las propiedades innatas de los organismos que les permiten tener la resistencia; por ejemplo *Accharomyces boulardii* es una levadura que tiene función como probiótico, debido a su naturaleza, solo se ve afectada por antifúngicos y, por ende, los antibióticos no tienen efecto sobre ella, por lo que posee una resistencia intrínseca (McFarland, 2015). Por lo general, las bacterias que se muestran promisorias como probióticos, deben ser evaluadas en pruebas de susceptibilidad a diversos antibióticos de uso común, que permitan determinar su grado de sensibilidad o resistencia. De manera ideal, los organismos deberían presentar resistencia; sin embargo, la misma deberá ser intrínseca o inherente, y de ninguna forma transferible a otras bacterias por procesos de transferencia horizontal de genes tales como transformación, transducción o conjugación, para evitar la incidencia de resistencia generalizada ante un fármaco (Kumar et al., 2015; Sharma et al., 2014).

- c) *Actividad antipatogénica*. La capacidad de inhibir o interferir en el mecanismo de infección de un organismo patógeno es una característica clave para una bacteria con características probióticas promisorias; a pesar de esto, no todos los probióticos tienen un efecto directo contra el patógeno. El antagonismo de los probióticos es muy diverso, y, en muchos casos, se desconoce a ciencia exacta su mecanismo, aunque se asocia a dos posibles rutas: (a) la regulación del sistema inmunológico (McFarland, 2015) y (b) la producción de antimicrobianos en su metabolismo. Muchos de los efectos antimicrobianos se han asociado a la producción de AL y ácido acético, como producto del metabolismo de carbohidratos. El incremento en la concentración de estas sustancias genera una disminución del pH del medio, ocasiona una inhibición en el crecimiento de diversos microorganismos patógenos y disminuye la probabilidad de deterioro de los alimentos (Klewicki & Klewicka, 2004; Lee & Salminen, 1995). Algunos autores sugieren que una alta actividad antimicrobiana de cepas como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. ante *Salmonella enterica* Typhimurium y

Escheriquia coli O157:H7 se debe principalmente a la presencia de ácidos orgánicos; además, hay evidencia que sugiere una producción de otros metabolitos como las bacteriocinas que favorecen el efecto inhibitorio (Gálvez et al., 2011; Montero Castillo et al., 2015; Pinar & Yalçin, 2015).

Por otra parte, los probióticos modulan la microbiota del comensal aportando variabilidad beneficiosa a la diversidad que la compone y crean mayor competencia por sitios de unión, receptores y nutrientes, desfavoreciendo la proliferación de patógenos (Arias et al., 2013; Fayol-Messaoudi et al., 2005). Este tipo de interacciones pueden ser estudiadas a nivel *in vitro* por medio de ensayos de efecto inhibitorio y de cultivo celular. Los ensayos de efecto inhibitorio, se pueden realizar con medios de cultivo, que permiten determinar el grado de efectividad que presenta cierto microorganismo sobre el crecimiento de un patógeno seleccionado (Shukla & Sharma, 2015; Sousa et al., 2013); mientras que el uso de cultivos celulares permite visualizar la interacción que ocurre entre el microorganismo y las células del tejido que se está estudiando, de manera que se obtiene una mejor idea de lo que sucede, tanto a nivel tisular, como durante un proceso de infección (Tsai et al., 2005; Gopal et al., 2001).

d) *Inocuidad*. Es importante mencionar que todo organismo que desee utilizarse como un potencial probiótico debe ser inocuo y seguro (GRAS, por sus siglas en inglés). La verificación del riesgo de un organismo nuevo puede hacerse por diversos métodos. El más simple es quizás la determinación de su identidad taxonómica, se puede realizar su identificación a nivel de especie y asociarlo de esta manera con cepas de interés (Sanders et al., 2010). Dentro de esta categoría, también se debe considerar el riesgo de transmisión de genes de resistencia (H. Kumar et al., 2015) y su estabilidad genética. La estabilidad genética de una cepa probiótica refleja la susceptibilidad del organismo a experimentar rearrreglos genómicos que se dan por evolución. Los mismos pueden causar variaciones específicas o aleatorias mediante mutación, delección o inserción; se originan por mecanismos como la recombinación homóloga o transferencia horizontal, lo que puede causar que el organismo y/o sus características cambien (Sanders et al., 2010). Existen diversas iniciativas que buscan asegurar la inocuidad de los

probióticos destinados al consumo humano; sin embargo, en la actualidad, a pesar de que existe, por ejemplo, una guía de regulación para aditivos alimentarios de origen microbiano, hasta el momento no existe una guía normalizada para organismos asociados a alimentos. Algunos ejemplos de estas normativas son la Autoridad Europea de Inocuidad Alimentaria (EFSA), que ha planteado guías de referencia que pueden ser utilizadas para su regulación. En la actualidad EFSA utiliza un sistema de Presunción Calificada de Inocuidad (QPS, por sus siglas en inglés) que le permite determinar la inocuidad de suplementos alimentarios de origen microbiano (European Commission, 2003). Del mismo modo organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han desarrollado diversos proyectos que buscan estandarizar los criterios para el aseguramiento de la inocuidad de los organismos utilizados (Sanders et al., 2010).

- e) *Consideraciones de manufactura.* Estos aspectos son importantes para poder definir la aplicabilidad real del organismo. Entre las cosas que se evalúan dentro de esta categoría se consideran la facilidad de producción, estabilidad, vida útil, condiciones de almacenamiento, logística y competitividad (McFarland, 2015). Además se toman en consideración los efectos que puede tener en el alimento o producto en el cual va a ser adicionado y los mecanismos con los que se puede asegurar la viabilidad y efectividad del mismo (Gueimonde & Sánchez, 2012).

3.1.3. *Características genéticas y fisiológicas de bacterias lácticas*

La gran mayoría de los organismos probióticos utilizados en humanos pertenecen al complejo taxonómico de las bacterias ácido lácticas (BAL) y bifidobacterias. Estos dos grupos incluyen a un gran número de especies y cepas que presentan propiedades que, aplicadas en el contexto de alimentos y probióticos, son de gran peso.

Las BAL son un grupo funcional de microorganismos constituidos por especies Gram-positivas, catalasa negativas, productoras predominantemente de AL como producto del metabolismo fermentativo de carbohidratos (Pot et al., 2014; Salvetti et al.,

2012). De acuerdo con el género o especie, la BAL podrá fermentar azúcares para producir únicamente AL (homofermentadoras) o bien una mezcla de AL, etanol y dióxido de carbono (heterofermentativas); en algunos casos, existen miembros que pueden presentar un metabolismo mixto (Jackson & Jackson, 2000). La mayoría de las BAL son especies ubicuas de diversos ambientes y suelen constituir la microbiota normal de plantas, seres humanos y animales. En el caso de los dos últimos, las BAL son capaces de colonizar el tracto digestivo y urogenital; además, pueden ser aisladas de diversos productos alimentarios (Hill et al., 2018). El grupo es taxonómicamente muy variado y ha experimentado muchos cambios a lo largo del tiempo. Orla-Jensen (1919) describió los primeros siete géneros del grupo; a pesar de eso, en la actualidad, el único género sobreviviente corresponde a *Streptococcus* sp. Distintos autores reconocen que el grupo de BAL está conformado por 16 géneros (Cuadro II), de los cuales doce se encuentran vinculados con alimentos (Narvhus & Axelsson, 2003).

El género más abundante de BAL conocidas corresponde al grupo *Lactobacillus* sp., y el mismo se caracteriza por ser un productor importante de AL y sus especies más representativas son de aplicación generalizada en productos alimentarios como cultivos iniciadores o probióticos (Isolauri et al., 2002). Desde un punto de vista taxonómico, *Lactobacillus* sp. incluye alrededor de 200 especies (Hill et al., 2018; Zheng et al., 2015). Como otras BAL, los lactobacilos son organismos Gram positivos, no esporulados en forma de bastón o cocobacilo, que se caracterizan por tener un metabolismo fermentativo, microaerófilico y quimioorganótrofo que requieren de medios enriquecidos para crecer; son catalasa negativos, aunque pueden tener una cierta capacidad pseudocatalasa en algunas cepas. Considerando la composición de su ADN, por lo general presentan un contenido Guanina-Citosina (GC) menor al 54 % y son ubicuas en el medio ambiente (Felis & Dellaglio, 2014). El género *Lactobacillus* pertenece al filo Firmicutes y a la familia Lactobacillaceae; se agrupa dentro de la misma familia que los géneros *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (Zheng et al., 2015) y es filogenéticamente cercano a *Leuconostocaceae*.

Considerando las características metabólicas, los lactobacilos pueden tener diferentes mecanismos de fermentación (Felis & Dellaglio, 2014):

- *Homofermentativa obligada*: los lactobacilos son capaces de fermentar hexosas para la producción exclusiva de ácido láctico siguiendo la ruta Embden- Meyerhof- Parnas (EMP), mientras que las pentosas y el gluconato no puede ser fermentado debido a la deficiencia de fosfocetolasas.
- *Heterofermentativas facultativas*: los lactobacilos son capaces de degradar hexosas a AL por la vía EMP, pero también pueden degradar pentosas y gluconato, dado que poseen aldolasas y fosfocetolasas.
- *Heterofermentativas obligados*: degradan hexosas por la vía del fosfogluconato y producen lactato, etanol o ácido acético y dióxido de carbono; la mayoría de las pentosas se fermentan por esta ruta.

Cuadro II. Miembros más comunes de las bacterias lácticas.

Género	Características	Especies	Fuente	Productos alimentarios
<i>Lactobacillus</i>	Bacilo, Gram positivo, catalasa negativa, no esporulado, hetero y homofermentadora	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i>	Vagina, Tracto gastrointestinal	Yogurt Vino Cervezas
		<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i>	1, Materia vegetal fermentada	Queso Ácido láctico
<i>Leuconostoc</i>	Cocoide, Gram positivo, catalasa negativa, no esporulado, productora de dextrano	<i>L. inhae</i>	Sourdough	Dextranos
		<i>L. kimchii</i>	Col	Ácido láctico
		<i>L. lactis</i>	fermentada Vegetales fermentados	<i>Sauerkraut</i>
<i>Enterococcus</i>	Cocos, Gram positivo, Catalasa negativa No esporulada Capnofílicos	<i>E. faecalis</i>	Ambiente	Enterocina
		<i>E. faecium</i>	Productos cárnicos fermentados	Ácido láctico
<i>Streptococcus</i>	Coco, Gram positivo, Catalasa negativa, No esporulado	<i>S. bovis</i>	Canal vaginal	Lactato
		<i>S. mitis</i>	Tracto gastrointestinal	Productos cárnicos fermentados
		<i>S. oralis</i>	1 (TGI)	
		<i>S. suis</i>	Leche bovina	
<i>Weissella</i>	Cocobacilo, Gram positiva, Catalasa negativa, No esporulado	<i>W. fabaria</i>	Materia vegetal	Vegetales fermentados
		<i>W. confuse</i>		Jugos fermentados
		<i>W. halotolerans</i>		
		<i>W. hellenica</i>		
		<i>W. kimchii</i>		
<i>Lactococcus</i>	Coco, Gram positiva, no esporulado, No móvil	<i>L. lactis</i>	Productos lácteos	Queso Leches fermentadas Ácido láctico

Elaborado a partir de: Fusco et al., 2015; Masood et al., 2011; Narvhus & Axelsson, 2003.

3.1.4. Resistencia a antibióticos

Como se mencionó anteriormente, la resistencia a antibióticos es un tema importante dentro del contexto de los probióticos y es uno de los rubros que se toman en consideración cuando se está definiendo el potencial de un nuevo microorganismo.

Los antibióticos son fármacos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas, y pueden ser de origen sintético o natural (Sharma et al., 2014). Los antibióticos se pueden dividir en cinco grupos según el mecanismo de actividad antimicrobiana que presentan: (1) agentes que inhiben la síntesis de la pared celular, (2) despolarizan la membrana celular, (3) inhiben la síntesis de proteínas (dos mecanismos dependiendo de la subunidad del ribosoma en la que actúan), (4) inhiben la síntesis de ácidos nucleicos e (5) inhiben las rutas metabólicas en las bacterias (Reygaert, 2018). En general, todos los antibióticos utilizados comercialmente para el tratamiento de infecciones caen dentro de alguna de estas categorías como se observa en el Cuadro III.

Cuadro III. Antibióticos de uso común clasificados según su mecanismo de acción

Mecanismo de acción	Antibiótico
Inhibición de la síntesis de pared celular	β -Lactamas
	Carbapenam
	Cefalosporina
	Monobatamas
	Penicilina
Depolarización de la membrana celular	Glicopéptidos
	Lipopéptidos
Inhibición de la síntesis de proteínas	Unión a la subunidad 30S ribosomal
	Aminoglicosidos
	Tetraciclinas
Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos	Unión a subunidad 50S ribosomal
	Cloranfenicol
	Lincosamidas
	Macrolidos
	Oxazolidinona
	Streptograminas
Inhibición de rutas metabólicas	Quinolonas
	Fluoroquinolona
Inhibición de rutas metabólicas	Sulfonamida
	Trimetoprim

Fuente: Martínez, 2014; Sharma *et al.*, 2014.

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias y hongos alteran su fenotipo en respuesta al uso de estos medicamentos y desarrollan la capacidad de evadir o inhibir el

efecto del fármaco diseñado para eliminarlos, por lo que estos no se ven suprimidos y pueden continuar creciendo y desarrollando la infección (CDC, 2019). Esto implica que las infecciones causadas por estos microorganismos se vuelven sumamente difíciles de controlar, y esto se traduce en consecuencias en la salud pública y económicas.

En la actualidad, el uso de antibióticos se ha convertido en la primera línea de defensa contra infecciones; sin embargo, factores como el mayor consumo de medicamentos antimicrobianos, tanto por humanos como por animales, y la prescripción inadecuada (Reygaert, 2018), han causado una aceleración importante en la aparición de la resistencia debido a la presión selectiva que estos agentes ejercen sobre los microorganismos en el ambiente y la alta capacidad de adaptación para su sobrevivencia (Andersson & Hughes, 2010).

Los microorganismos, vistos como un conjunto, no necesariamente presentarán susceptibilidad o resistencia de forma uniforme y generalizada ante un antimicrobiano en específico; el grado de resistencia puede presentar variaciones dentro un mismo grupo o entre grupos relacionados, dependiendo del origen y la naturaleza de esa resistencia.

Las bacterias como grupo o especie no son necesariamente susceptibles o resistentes de manera uniforme a ningún agente antimicrobiano en particular. Los niveles de resistencia pueden variar mucho dentro de los grupos bacterianos relacionados (Coculescu, 2009). La susceptibilidad y la resistencia generalmente se miden en función de la concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés), la cual se define como la concentración mínima de fármaco que inhibirá el crecimiento de la bacteria (Coculescu, 2009; Martinez, 2014). Por otra parte, el concepto de “susceptibilidad” se ubica en un rango promedio del MIC. Si una especie presenta una susceptibilidad dentro del rango de “Resistencia”, se puede asumir que dicha especie presenta una resistencia intrínseca a ese fármaco (Reygaert, 2018), aunque las bacterias también pueden adquirir genes de resistencia de otros organismos relacionados. El nivel de resistencia varía según la especie y los genes adquiridos. A partir de esta premisa, entonces se puede decir que los fenómenos de resistencia pueden clasificarse en dos tipos; las resistencias naturales o intrínsecas y las resistencias adquiridas.

3.1.4.1. *Resistencia intrínseca*

La resistencia intrínseca, también llamada natural, es aquella que siempre se expresa según la especie, o bien, puede ser inducida después de la exposición a un agente (Reygaert,

2018). La resistencia intrínseca se define, entonces, como un rasgo que se comparte de manera universal dentro de una especie bacteriana; dicho rasgo es independiente de la exposición previa al antibiótico y se encuentra codificado dentro de su cromosoma (Martinez, 2014). Algunos ejemplos de mecanismos bacterianos más comunes involucrados en la resistencia intrínseca son, por ejemplo, la permeabilidad reducida de la membrana externa de bacterias Gram negativas, dada por la presencia de lipopolisacárido (LPS), o bien, expresión inducida de bombas de eflujo (Martinez, 2014; Reygaert, 2018)

3.1.4.2. *Resistencia adquirida*

Como su nombre lo sugiere, la resistencia adquirida corresponde a mecanismos de resistencia que los organismos adquieren de otras especies no necesariamente relacionadas por medio de mecanismos de transferencia horizontal de genes, por medio de procesos como transformación, transducción y conjugación (Reygaert, 2018). La adquisición de esos genes puede ser temporal o permanente y la ruta más común por la que se adquieren ese tipo de genes, es por transferencia de plásmidos. Es importante recordar que un plásmido corresponde a una molécula pequeña de ADN en forma circular que tienen la capacidad de autoreplicarse, y, generalmente, contiene un número limitado de genes pequeños asociados a funciones no indispensables y constituyen ventajas competitivas (Bender et al. , 2017; Coculescu, 2009)

3.1.4.3. *Susceptibilidad a los antibióticos de las BAL*

En el caso de las BAL, se ha mostrado un interés importante en su susceptibilidad a los antimicrobianos debido a su amplia distribución en los ambientes, ya que se ha observado la aparición de resistencias asociadas a una exposición ambiental que induce la manifestación de resistencias intrínsecas y extrínsecas que son potencialmente transferibles (Fraqueza, 2015) . Las BAL son organismos altamente adaptables, y muchas especies como *L. lactis*, *Enterococci* sp. y *Lactobacillus* sp., aisladas de productos fermentados han mostrado resistencia a antibióticos como la tetraciclina, eritromicina y vancomicina (Mathur & Singh, 2005). Las BAL son consideradas naturalmente resistentes a ciertos antibióticos, por ejemplo, estudios en aislamiento obtenidos de productos lácteos fermentados encontraron una alta incidencia de *Lactobacillus* sp. resistentes a la vancomicina, eritromicina, gentamicina y ciprofloxacina (Erginkaya et al., 2018). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que

dichos genes de resistencia no son transferibles (Flórez & Mayo, 2017; Álvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira, 2019)

3.1.5. Grupo *Lactobacillus casei*

El grupo *L. casei* comprende sobre todo tres especies muy relacionadas entre sí: *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Estas especies se han estudiado por sus aplicaciones comerciales, industriales y su potencial efecto sobre la salud (Hill et al., 2018; Sutula et al., 2013). A nivel comercial, estas especies se utilizan como cultivos iniciadores en procesos fermentativos de distintos alimentos para lograr sabores, texturas y otras características deseables; por otra parte, se ha determinado que son capaces de producir diversos metabolitos bioactivos que presentan beneficios prometedores al ser consumidos. *L. casei*, al igual que otros miembros de las BAL, es un bacilo de tamaño celular alrededor 0.7-1.1 x 2.0-4.0 μm , Gram-positivo, no esporulado, no móvil, anaerobio facultativo, que carece de citocromos (Holzapfel et al., 2001) y es ubicuo, por lo que puede ser aislado de diversos ambientes que van desde materia orgánica fermentada hasta el tracto intestinal y reproductivo de animales y humanos. Su pH óptimo de crecimiento ronda un valor de 5.5, a pesar de que, como muchas otras BAL, es capaz de tolerar un pH de hasta 2.0; no sintetiza porfirinas y posee un metabolismo estrictamente fermentativo, con ácido láctico como producto mayoritario (Alonso et al. , 2014; Axelsson, 1998; Kandler & Weiss, 1986; Zotta et al., 2014).

L. casei forma parte del grupo de especies heterofermentativas facultativas, el cual produce ácido láctico a partir de hexosas, por medio de la vía Embden-Meyerhoff, y, a partir de pentosas, por la ruta del 6 – fosfogluconato/fosfocetolasa (Axelsson, 1998; Kandler & Weiss, 1986). La temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C; sin embargo, puede haber crecimiento a temperaturas menores de hasta 15 °C, pero no se da crecimiento importante a temperaturas de 45 °C (Alonso et al., 2014). Es una especie considerada como “fastidiosa” debido a que requiere de complementos adicionales, tales como riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y factores de crecimiento, para un desarrollo óptimo (Kandler & Weiss, 1986).

El genoma de *L. casei* está constituido por un cromosoma circular de alrededor 2.9 Mb y un plásmido de 0.029 Mb. El cromosoma principal codifica para al menos 2 751 proteínas (Kang et al., 2017). De acuerdo con Kang et al. (2017), *L. casei* se confunde con frecuencia con otras especies muy relacionadas tales como *L. paracasei* y *L. rhamnosus* debido a la alta

similitud de sus genes. Lo anterior dificulta su identificación y clasificación por métodos genéticos y, por ende, su discriminación (Bottari et al., 2017). Se han planteado métodos de identificación utilizando los genes distintos al 16S, como, por ejemplo, genes que codifican para el factor de elongación Tu (*tuf*), la proteína *recA*, la subunidad alfa de ARN polimerasa (*rpoA*), la prolin imino peptidasa (*pepR*), proteína chaperona *dnaK* y *dnaJ/dnaK*. En su estudio, Bottari *et al.* (2017) compararon los genes anteriormente mencionados, con la identificación obtenida a partir del gen 16Sr, y se determinó que, de 19 cepas de *L. casei*, solo 16 coincidieron en los otros genes distintos del 16S; de la misma forma, de 35 cepas de *L. paracasei*, 31 se corroboraron como miembros de la especie, dos correspondieron a *L. casei*, una fue re-identificada como *L. rhamnosus* y una cepa obtuvo resultados ambiguos; para el caso de *L. rhamnosus*, de las 12 cepas estudiadas, únicamente seis fueron corroboradas, y, de las restantes, una se identificó como *L. casei* y las demás produjeron resultados ambiguos. Lo anterior demuestra que la similitud genética entre las especies es realmente alta.

Otra característica importante de mencionar es su adaptación al medio donde se encuentre. Toh et al. (2013) realizaron una comparación de los genomas de distintas cepas de *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* aisladas de productos lácteos y determinaron que el cromosoma de estas bacterias presentaba genes exclusivos que favorecerían una rápida adaptación al medio. Estas características son de interés para el desarrollo de aplicaciones tecnológicas.

3.1.5.1. Propiedades funcionales y antimicrobianas de *L. casei*

Como se mencionó antes, *L. casei* es un grupo genéticamente muy heterogéneo y con una alta capacidad adaptativa, lo que permite colonizar diversos ambientes naturales o artificiales, creados por el hombre.

Las cepas de *L. casei* han sido ampliamente estudiadas con respecto a sus propiedades como promotoras de beneficios en la salud, por lo que la industria de alimentos ha mostrado un interés importante en evaluar la viabilidad de las cepas en diversos productos debido a sus numerosas propiedades tecnológicas y funcionales (Buriti & Saad, 2007; Buriti et al., 2007; Nagendra, 2007); sin embargo, una de las características que han ganado mayor interés en los últimos años ha sido en torno a sus potenciales usos terapéuticos como alimento funcional o como farmabiótico. El complejo *L. casei* abarca diversas cepas que han demostrado tener potencial probiótico.

La principal aplicación de *L. casei* como alimento funcional se enfoca en su uso como modulador de la composición de la microbiota o bien como agente antagónico ante microorganismos entero-patogénicos, gracias a su capacidad antimicrobiana (Masoumikia & Ganbarov, 2015). El desarrollo de diversos estudios ha permitido la comprensión de los mecanismos de acción que tiene el complejo, así como el espectro de patologías en las cuales muestran un efecto positivo. Por ejemplo, Sutula et al. (2013) evaluaron el efecto del consumo de *L. casei* Shirota en la salud bucal de individuos con dentaduras sanas y se logró determinar que la presencia de la bacteria no afectaba en gran medida la diversidad en la cavidad bucal; sin embargo, estos hallazgos sugerían que el tratamiento era prometedor en casos de infecciones bucales o halitosis. Chain et al. (2017) evaluaron el efecto de la administración de *L. casei* sobre cáncer colo-rectal en un modelo murino, y se determinó que su aplicación tiene un efecto protector significativo debido a sus propiedades inmunomodulatorias que disminuyen la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Del mismo modo, Dietrich *et al.*, (2014) comprobaron que una bebida probiótica comercial presentaba un efecto positivo en la reducción del malestar asociado a la diarrea por antibióticos. Los estudios con respecto a los efectos beneficiosos de *L. casei* como probióticos son muy abundantes, y han permitido su aplicación como aditivo en diversos productos.

En general, los mecanismos de acción antagonista de estos organismos aún no se definen a ciencia exacta, pero, a medida que los estudios en estas áreas progresan, el surgimiento de nuevas aplicaciones, como lo son las terapias contra enfermedades, desarrollo de productos no lácteos, entre otras, viene en crecimiento (Sanders et al., 2016). En la mayoría de los casos, la capacidad antagónica se ha asociado a la competencia dentro de una comunidad microbiana (García-Bayona & Comstock, 2018). Estos mecanismos de competencia son muy diversos y pueden clasificarse por su naturaleza en dos categorías: (a) competición explotativa, en donde los organismos consumen los recursos requeridos por otros organismos en el ambiente y (b) competición por interferencia, la cual consiste en la secreción de compuestos que inhiben el desarrollo de otros microorganismos (Little et al. , 2008). Esta última es la que representa el mayor interés a nivel de aplicaciones biotecnológicas.

La competencia por interferencia puede estar mediada por la producción de diferentes tipos de moléculas como antibióticos de bajo peso molecular, péptidos antimicrobianos que pueden ser sintentizados ribosomal y no ribosomalmente, metabolitos secundarios como el

peróxido de hidrógeno o la modificación de compuestos producidos por el hospedero, señales de interferencia y toxinas (Buffie et al., 2015; García-Bayona & Comstock, 2018; Little et al., 2008)

3.1.5.1.1. *Bacteriocinas y otros compuestos con potencial antimicrobiano*

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos producidos por algunos organismos, entre ellos *L. casei* y por lo general se producen cuando hay otros organismos activos; esto les permite obtener ventajas competitivas en un ambiente dado. Por lo general, las bacteriocinas son péptidos sintetizados por el ribosoma como metabolitos primarios (Zacharof & Lovitt, 2012). Las bacteriocinas son moléculas catiónicas pequeñas compuestas por alrededor de 30-60 aminoácidos que forman hélices anfifílicas y estables a altas temperaturas (100 °C, por 10 min), y tienen una amplia variabilidad de espectro de actividad, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas (Mokoena, 2017; Parada et al., 2007).

El sitio de acción de las bacteriocinas es la membrana citoplasmática bacteriana y, por lo general tienen como blanco las vesículas energizadas de la membrana, con lo que pueden intervenir en la fuerza protón motriz (Parada et al., 2007). Se ha observado que *L. casei* es productora de bacteriocinas. Müller y Radler (1993) lograron aislar y purificar la bacteriocina intracelular caseicina a partir de extractos celulares de *L. casei*.

La caseicina A y la caseicina B son péptidos antimicrobianos generados a través de la fermentación bacteriana del caseinato, y se han reportado como activos contra muchos patógenos Gram-negativos como *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter muytjensii*, *Salmonella* sp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas fluorescens*, y contra Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* (Norberg et al., 2011). También se ha comprobado que el complejo puede producir lactocina una bacteriocina nativa que tiene una actividad antimicrobiana de amplio espectro, un amplio rango de pH y es resistente a altas temperaturas (Yu et al., 2020).

El complejo *L. casei* se ha identificado como productor de biosurfactantes naturales constituidos por una mezcla de lípidos y azúcares similares a glicolípidos. Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas con propiedades emulsificantes. Su actividad posee un cierto grado de capacidad antibacterial, antifúngica, antiviral y anti-adhesiva que demuestra una potencial aplicación en el tratamiento de patógenos en alimentos y podría ser

una herramienta para el control de la formación de biofilms (Sharma & Singh Saharan, 2014). Tanto las bacteriocinas como los surfactantes han presentado actividad antimicrobiana importante contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* y *L. monocytogenes*. Esto ha generado un fuerte interés industrial y biomédico en este tipo de sustancias debido a las implicaciones que podrían tener en el control de biofilms. Además, se podrían utilizar en el procesamiento de alimentos para la prevención del deterioro y evitar la transmisión de enfermedades que pueden implicar un riesgo para el consumidor. Por lo general, la aplicación de biosurfactantes en superficies modifica su hidrofobicidad y previene su adhesión; este principio también representa un punto importante como probiótico, ya que pueden prevenir la colonización intestinal de otros microorganismos (Sharma & Saharan, 2016).

3.2. Efecto bio-protector

Además de sus propiedades funcionales, las BAL se reconocen por sus propiedades como biopreservantes. Este proceso consiste en la extensión de la vida útil y aseguramiento de la inocuidad de un alimento mediante el uso de microbiota controlada y/o compuestos antimicrobianos (Ananou et al., 2007; Rouse & van Sinderen, 2008). *L. casei* presenta un amplio espectro inhibitorio, ya que es capaz de inhibir el crecimiento de otras bacterias de deterioro o patógenas, mohos y levaduras por mecanismos de competencia, producción de bacteriocinas como la caseicina (Li et al., 2013) o por efecto de la exclusión competitiva (Siedler et al., 2019; Rouse & van Sinderen, 2008). Dadas las exigencias actuales de los consumidores por productos saludables, frescos y naturales que sean libres de aditivos químicos, el uso de bacterias bioprotectoras como las BAL, para aumentar la calidad y vida útil de los productos, ha adquirido un fuerte interés. Según Castellano et al. (2008), la aplicación de BAL como cultivo protector permite aumentar la estabilidad e inocuidad de productos cárnicos. En su estudio, se demostró que *L. curvatus* CRL705 posee una inhibición efectiva sobre *L. innocua* y *Brochothrix thermosphacta* en carne molida fresca; además retuvo su efecto inhibitorio durante el almacenamiento a baja temperatura. En el caso de productos lácteos, el uso de BAL como bioprotector también es muy común, especialmente para el control del deterioro fúngico. En su estudio, Leyva-Salas et al. (2018) probaron 32 cepas de BAL y bacterias probióticas, en forma individual y en combinación, para determinar

su efectividad en el control y la inhibición en el crecimiento de *Penicillium commune*, *Mucor racemosus* y *Rhodotorula mucilaginosa* en yogurt, natilla y queso, demostrando que la aplicación de estos microorganismos permitía prolongar la vida útil de estos productos.

3.3. Productos lácteos fermentados

Los productos lácteos fermentados o leches fermentadas son alimentos que se elaboran a partir de leche fresca. Este proceso se da a partir de bacterias lácticas que pueden ser inoculadas adrede o, bien, forman parte de la microbiota normal de la matriz (Walstra et al., 2006). Esta categoría toma en consideración una gran variedad de productos tales como el yogurt, kéfir, suero de mantequilla (“buttermilk”) fermentado, crema y leche agria, kumis, entre otros (Tetrapak, 2017).

La leche que ha sido espontáneamente fermentada por la microbiota normal presente, se consume como alimento en diversas partes del mundo, como parte de una tradición o comportamiento cultural y consiste en uno de los métodos más antiguos de preservación de lácteos basado en la acidificación natural (Roginski, 2004). Por lo general, la presencia de BAL en estas matrices promueve la producción de compuestos que favorecen la inhibición de microorganismos no deseados; sin embargo, puede darse el desarrollo de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp., *E. coli* y *Staphylococcus aureus* que podrían contaminar el producto durante el procesamiento y almacenamiento (Cissé et al., 2019; Andrade et al., 2015) lo cual implica una amenaza importante a nivel de salud pública.

Según datos de la Cámara Nacional de Productores de Leche (CNPL), para el 2018 se reporta que las exportaciones de productos lácteos generaron alrededor de \$ 472 millones de dólares. En el caso de Costa Rica, la producción de lácteos representa el 31 % de la producción láctea en la región. Se estima que la participación del país seguirá creciendo en mercado conforme aumente su competitividad por medio del mejoramiento de sus costos, aumento de sus medidas sanitarias y diversificación de la producción (Elmundocr, 2018).

3.3.1. Leche agria

La leche agria es un producto fermentado producido a partir de la fermentación espontánea de la leche cruda gracias a la acción metabólica de los microorganismos presentes

de forma nativa en la matriz, o bien, por la adición de cultivos iniciadores en leches que han recibido algún proceso de higienización (Kumar et al., 2015; Mora, 2018).

La leche agria es de consumo común en Costa Rica. Con la excepción de algunos ejemplos muy específicos elaborados comercialmente, la gran mayoría de la leche agria es elaborada de forma artesanal por pequeñas empresas lecheras y, en muchos de los casos, bajo condiciones que no son las óptimas (Espinoza-Mora, 2018). La prevalencia de patógenos alimentarios en la leche y productos lácteos derivados se ve influenciada por diversos factores que van desde las condiciones de recolección de la leche hasta las prácticas de manufactura (Abel et al., 2016; Oliver et al., 2005).

Debido al aumento en el interés y el consumo de este tipo de alimentos, es importante que, además de promover las prácticas adecuadas en el procesamiento, se estudien nuevas alternativas que sean económicas y permitan optimizar su elaboración.

4. Materiales y métodos

4.1. Localización del proyecto

La identificación molecular de las BAL aisladas de ensilados de piña se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM); las pruebas de antagonismo y de adhesión a cultivos celulares se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET). Los análisis físicoquímicos y preparación de leche agria se realizaron en las instalaciones de la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Finalmente, la determinación de la susceptibilidad a antibióticos y el estudio del efecto bioprotector de *L. casei* en contra de la población de *L. monocytogenes* en leche agria se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología. Todos en la Universidad de Costa Rica.

4.2. Aislamientos bacterianos

Se trabajó con 12 cepas de BAL aisladas por colaboradores del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) a partir de ensilados elaborados con subproductos del procesamiento industrial de la piña (cáscaras y coronas), provenientes de la empresa Florida Products S.A.

4.3. Identificación de BAL con marcadores moleculares

4.3.1. Extracción de material genético

Las cepas de BAL aisladas de los ensilados, se crecieron en medio DeMan- Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid, Reino Unido) líquido por 24 ± 2 h a $35,0 \pm 0,5$ °C. La extracción de los ácidos nucleicos totales (ANt) se realizó siguiendo el protocolo de extracción de ADN de plásmido Miniprep por método convencional con fenol (Birnboim & Doly, 1979) para el cual se tomó 1 mL del cultivo bacteriano y se centrifugó a 13 000 rpm por 2 min en una microcentrífuga. El botón obtenido se resuspendió en 100 µL de solución I (25mM Tris-HCL pH 8.0; 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 50 mM D-Glucosa) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min; posteriormente se adicionó 200 µL de Solución II (0,2N de hidróxido de sodio (NaOH) y 1% de dodecilsulfato sódico (SDS)); se mezcló por inversión

y se incubó por 5 min a 4 °C. Finalmente, se adicionaron 150 µL de solución III (3M acetato de potasio y 2 M de ácido acético pH: 4,8) y se le aplicó un incubación final de 5 min a 4 °C. Finalizado este periodo, se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min y se transfirieron 450 µL del sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 450 µL de fenol/cloroformo (1:1 V/V). La mezcla se agitó y se centrifugó. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionó 800 µL de isopropanol; se mezcló por inversión. Finalmente, se centrifugó por 10 min a 12 000 rpm y se descartó el sobrenadante. El botón obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas.

4.3.2. Amplificación por PCR

Se amplificó el gen de la subunidad alfa de la fenilalanina ARNt ligasa (*pheS*), en una reacción que contiene un volumen final de 25 µl de un master mix iProof High-Fidelity DNA Polymerase (BioRad, Estados Unidos), 0.2 µM de cada iniciador (cuadro IV) y 50 ng de ADN. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 3 ciclos de 95 °C por 2 min, 15 s; 46 °C a 1 min y 72 °C por 15 s; seguido de, 30 ciclos de 95 °C por 35 s, 46 °C por 1 min 15 s y 72 °C por 15 s. Finalmente, una elongación a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1 % utilizando azul de carga y gel-red (Biotium, Estados Unidos) como tintura de los ácidos nucleicos, y un marcador de 100 pb, a 100 V por al menos 30 min. Las muestras se enviaron a la empresa Macrogen Inc. (Corea) para su secuenciación.

Cuadro IV. Iniciadores seleccionados para la identificación de las cepas de *Lactobacillus* sp.

Primer	Secuencia 5'-3'
<i>pheS</i> 21F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
<i>pheS</i> 22R	CCWARVCCRAARGCAAARCC
<i>pheS</i> 23R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC

4.3.3. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el programa Standen (Bonfield et al. 1995) y se alinearon utilizando el programa MUSCLE (Tamura et al., 2013). Utilizando la

aplicación BlastN, se realizó una comparación con secuencias de referencia disponibles en bases de datos del GenBank. Las secuencias depuradas fueron depositadas en el GenBank (www.ncbi.com) y se les asignó un código.

Para el análisis filogenético, se utilizaron un total de 31 secuencias de BAL (12 aislamientos del estudio y 19 secuencias de referencias obtenidas del GenBank). Los fragmentos analizados consisten en 420 nt para el gen *pheS*. Se construyó un árbol filogenético utilizando inferencia, sawwun modelo de 10 millones de generaciones y ocho cadenas, con un muestreo de 2000 generaciones (Huelsenbeck et al. , 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

4.4. Determinación de la capacidad antagónica *in vitro* contra *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*

4.4.1. Evaluación de efecto antagónico determinado en placa.

Se realizó la evaluación de efecto antagónico de las BAL contra cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp. Para lo anterior, se utilizó el método de sobrecapas con ciertas modificaciones (Booth et al., 1977; Hütt et al., 2006; Soleimani et al, 2010). Las BAL se rayaron sobre agar MRS (Oxoid, Reino Unido) en forma de una línea recta gruesa de aproximadamente 7 cm de largo, dejando una distancia de 0.5 cm del borde del plato; las placas se incubaron en condiciones de capnofilia a $35,0 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 h. Una vez finalizado este periodo, se procedió a aplicar una sobrecapa de 5 mL de agar infusión cerebro corazón (AICC) (Oxoid, Reino Unido). El patógeno se inoculó sobre el AICC sólido y se realizó el hisopado utilizando un coctel de cinco cepas de cada bacteria patógena; El mismo se preparó a partir de un cultivo que se creció por 18 h para cada bacteria (Cuadro V). Se trabajó con dos cocteles, uno para *Salmonella* sp. y uno de *L. monocytogenes*. Las placas se incubaron por 24 ± 2 h y el efecto antagónico se determinó, por la medición, en milímetros, de las zonas claras donde no hubo crecimiento del patógeno. El poder antagónico se determinó siguiendo el criterio de que todos aquellos halos con un diámetro superior a los 6 mm eran considerados como un efecto inhibitorio importante (Hütt et al., 2006; Pan et al., 2009).

Cuadro V. Bacterias utilizadas en la selección del método de inoculación del patógeno óptimo.

Cepa	Número de identificación*	Origen
<i>Listeria monocytogenes</i>	11.1	Aislamiento de embutidos
	5.3	Aislamiento de embutidos
	13.6	Aislamiento de embutidos
	14.1	Aislamiento de embutidos
	19116	ATCC
<i>Salmonella</i> sp.	750	
<i>Salmonella</i>	DA36	
<i>Salmonella</i> Typhi	612	Aislamientos clínicos
<i>Salmonella</i> Typhimurium	93	
<i>Salmonella</i>	3SB	

*Según el Centro de investigación en Enfermedades Tropicales (CIET)

4.4.2. Ensayos de actividad inhibitoria del sobrenadante.

La determinación de la capacidad antagonica del sobrenadante sobre los patógenos, se realizó con un método modificado del protocolo presentado por Lourenço y Pinto (2011). La cepa que mostró resultados más promisorios en la prueba anterior de antagonismo (*L. casei_6714*) se creció en caldo MRS (Oxoid, Reino Unido) a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 h. El caldo con el crecimiento se centrifugó a 1500 rpm por 15 min, el sobrenadante se decantó y filtró utilizando un filtro de 0.2 µm. Para eliminar la interferencia por ácido láctico (AL), el sobrenadante fue neutralizado con NaOH 0,1M (Thermofisher Scientific, Estados Unidos) y se utilizó de inmediato.

Los patógenos se crecieron en agar tripticasa soya (ATS) durante la noche, y se prepararon estándares de McFarland 0.5 utilizando una colonia resuspendida en agua

peptonada estéril (APE). Estas suspensiones fueron empleadas para la preparación del coctel de trabajo para cada patógeno. El microplato de 96-pocillos se llenó con 50 μ L de caldo tripticasa soya estéril (CTS) (Oxoid), 50 μ L de la solución del patógeno y volúmenes variables (50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 y 15 μ L), del sobrenadante neutralizado. Se incluyeron controles positivos y negativos. El control positivo se preparó utilizando 50 μ L de CTS estéril, 50 μ L del patógeno y 50 μ L caldo MRS estéril. Los controles negativos no contenían el patógeno y se ajustaron usando APE. Los microplatos se incubaron en condiciones aerobias a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 h en alta humedad. Finalizada esta incubación, se procedió a medir la absorbancia a 620 nm en un lector de microplatos (Biotek Instruments, Estados Unidos) y los resultados se ajustaron utilizando el control negativo. Los ensayos se efectuaron por triplicado.

Para analizar el efecto inhibitorio del sobrenadante, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías considerando un $\alpha= 0.05$; seguido por una comparación múltiple de medias de Tukey usando el programa JMP versión 11 (SAS Institute, Estados Unidos)

4.4.3. Evaluación de la capacidad antagónica de *L. casei* _6714 a nivel de cultivo celular contra cepas entero-invasivas de *Salmonella* Typhimurium.

4.4.3.1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares fueron provistas por el CIET. Las monocapas de células HeLA se crecieron en caldo esencial mínimo de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés; Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 20 μ moles de glutamina, 50 unidades de penicilina G y 50 μ g/mL de estreptomina; se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % O₂. Para la preparación de los platos, se añadió tripsina a las células para separar el tejido de las paredes de la botella; las células separadas se emplearon para preparar monocapas en placas de 12 pocillos estériles, sembradas con 10⁶ células e incubadas por 48 h.

4.4.3.2. *Evaluación de la capacidad de adhesividad de L. casei_6714*

El ensayo para la evaluación de la capacidad de adherencia de *L. casei* en las células HeLA se realizó utilizando el método descrito por Gopal et al. (2001) y Tsai et al. (2005). Se inoculó *L. casei_6714* a una concentración de aproximadamente 10^7 UFC/mL en caldo EMEM sobre una monocapa de células HeLA previamente cultivada en un portaobjetos de vidrio incubado dentro de una microplaca de 12 pocillos. La microplaca se incubó en atmosfera de 95% CO₂ por 2 h a 35 ± 0.5 ° C. Finalizada la incubación, las células se lavaron dos veces con buffer de fosfatos (PBS) (Sigma-Aldrich); se fijaron con paraformaldehído al 10% durante 10 min y se lavaron dos veces con PBS (Sigma-Aldrich). Finalizado los lavados, se tiñeron los portaobjetos con cristal violeta durante 5 min. Los portaobjetos teñidos se lavaron con PBS para eliminar el exceso de colorante y se observaron al microscopio. La adhesión de las BAL se evaluó contabilizando el número promedio de células bacterianas unidas a la monocapa de células HeLa dentro de 5 campos microscópicos seleccionados al azar. Los recuentos de *L. casei* se determinaron para un promedio de 26 células epiteliales. Se incluyó, además, un control con *L. fermentum_6702* (cepa de baja capacidad de adhesión) para fines de comparación.

4.4.3.3. *Evaluación del efecto antagónico contra patógenos invasivos*

Los ensayos se realizaron basados en el protocolo de Giannella et al. (1973) con algunas modificaciones. Para el ensayo de protección, en el cual se simula el efecto del consumo del probiótico durante una infección en el individuo, se creció la cepa de *Salmonella* serovar Thyphimurium en CTS a $35 \pm 0,5$ ° C durante 24 ± 2 h. El cultivo se diluyó en EMEM (Thermo Fisher Scientific) libre de antibióticos para obtener una concentración de aproximadamente 10^7 UFC/ml. Del mismo modo, *L. casei_6714* se creció en MRS en las mismas condiciones indicadas en las secciones anteriores y se diluyó del mismo modo descrito para *Salmonella*.

Se añadió un volumen de 1 ml de cada suspensión de bacteria a las monocapas celulares crecidas en una microplaca de 12 pocillos; seguido, se procedió a centrifugar a 1600 rpm durante 5 min y luego se incubó en las mismas condiciones descritas para el mantenimiento y preparación de las células. Las microplacas se incubaron durante 0, 3 y 24 h. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y luego se mantuvieron durante 1 h en medio EMEM (Thermo Fisher Scientific) con 100 µg/mL de gentamicina. Una vez finalizada

la exposición al antibiótico, cada pocillo se lavó con PBS (Sigma-Aldrich) dos veces y luego se procedió a lisar las células con agua ultrapura durante 10 min. El lisado obtenido, se diluyó serialmente en APE para hacer un cultivo bacteriano en ATS y agar Xilosa-Lisina-Deoxicolato (XLD) (Oxoid). Las placas se incubaron a $35 \pm 0,5$ ° C durante toda la noche. Los recuentos bacterianos se utilizaron para calcular la tasa de invasividad. Se incluyó un control positivo de *Salmonella* sp sin tratamiento y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para realizar el ensayo de prevención, el cual simula de forma *in vitro* lo que ocurriría en un individuo que consume de forma mantenida dosis del probiótico antes de una infección, se siguió el mismo protocolo descrito para el ensayo de tratamiento con la diferencia de que cada monocapa celular se expuso previamente a *L. casei*_6714 durante 3h y 24 h antes de la infección con *Salmonella*.

4.4.3.4. Análisis de resultados

El recuento de bacterias adheridas a la superficie de la célula y el recuento de *Salmonella* Typhimurium después de la lisis celular se analizaron con un ANDEVA ($\alpha= 0.05$) y se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias HSD-Tukey. Todos los análisis se realizaron por medio del programa estadístico JMP 11.

4.5. Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de *L. casei*_6714

La susceptibilidad a los antibióticos se evaluó mediante el método de difusión con agar utilizando discos de antibiótico (Hudzicki, 2013). El cultivo de *L. casei*_6714 se realizó en caldo MRS (Oxoid) incubado a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 2 h. La suspensión de la cepa se frotó en agar Müller-Hinton (Oxoid) usando un hisopo de algodón estéril; posteriormente se colocaron discos con concentraciones de antibióticos estandarizados según lo indicado por los protocolos establecidos para este tipo de pruebas (Cuadro VI) en la superficie del agar. Las placas se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 2 en condiciones de capnofilia. Los ensayos experimentales se realizaron por triplicado. Después de la incubación, se midió el diámetro de las zonas de inhibición y se comparó con los estándares establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Sharma et al., 2016; Wolupeek et al., 2017)

Cuadro VI. Antibióticos que se evaluaron durante la prueba de susceptibilidad de las BAL.

Antibiótico	Concentración
Ciprofloxacina	5 µg
Vancomicina	30 µg
Penicilina	10 UI
Amoxicilina con ácido clavulánico	30 µg
Eritromicina	15 µg
Amikacina	30 µg
Estreptomina	10 µg
Tetraciclina	30 µg
Cloranfenicol	30 µg

4.6. Efecto de *L. casei*_6714 sobre crecimiento de *L. monocytogenes* y la fermentación en leche agria artesanal.

4.6.1. Cultivos iniciadores

Se trabajaron dos cultivos de bacterias lácticas. El primero consistió en un control utilizando la cepa comercial R-704 (Chr Hansen Inc, Dinamarca) que se adicionó a la leche según las recomendaciones del proveedor. El segundo control consistió en el inóculo de la cepa *L. casei*_6714, el cual se preparó creciendo la bacteria durante 24 horas en agar MRS, bajo condiciones de capnofilia a $35 \pm 0,5$ ° C. A partir de dicha placa, se picó una colonia para preparar un estándar de McFarland 0.5 en APE. Esta solución se utilizó para inocular las leches a evaluar.

L. monocytogenes se adicionó en forma de un cóctel de cinco cepas (Cuadro V) elaborado a partir de pre-cultivos de la bacteria en CTS, incubados a $35 \pm 0,5$ ° C por 18 h. Para la preparación de este se emplearon volúmenes iguales de cada cepa. Los inóculos de cultivo iniciador (CI), BAL y *L. monocytogenes* se adicionaron según el esquema de tratamientos descrito en el Cuadro VII.

Cuadro VII. Designación de tratamientos para las pruebas de efecto bioprotector de las BAL en leche agria.

Tratamiento	Composición	Categoría
T1	Cultivo iniciador R704 (Hansen, Dinamarca)	Control negativo
T2	Cultivo iniciador R704 (Hansen, Dinamarca) + BAL seleccionada	Control positivo
T3	BAL + <i>L. monocytogenes</i>	Experimento
T4	Cultivo iniciador R704 + <i>L. monocytogenes</i>	Experimento
T5	Cultivo iniciador + BAL + <i>L. monocytogenes</i> .	Experimento

4.6.2. Preparación de la matriz

La leche agria se preparó utilizando leche cruda y siguiendo el proceso que se muestra en la Figura 1. Previo a este paso, la materia prima fue caracterizada utilizando el EKOMILK® para determinar su densidad, contenido de proteínas, grasa, sólidos no grasos y agua.

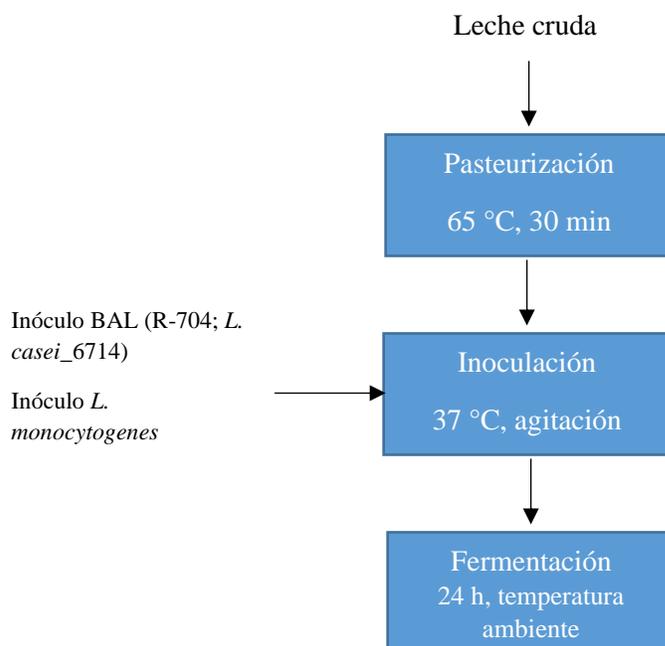


Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras de leche agria a ensayar. Los inóculos se adicionaron según la distribución de tratamientos a evaluar (Cuadro VI).

4.6.3. Evaluación del efecto bioprotector.

El ensayo propuesto se basó en el estudio de Espinoza-Mora (2018). Se inocularon 400 mL de leche pasteurizada según los tratamientos indicados en el Cuadro VI con una carga de 10^8 UFC/mL de *L. casei_6714*, cultivo iniciador o una mezcla de los dos anteriores y de 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes*. Las muestras inoculadas se almacenaron a temperatura ambiente por un período de 24 h y se realizaron muestreos a las 0, 3, 6, 8 y 24 h, en donde se midió el pH, recuento de BAL por el método de esparcimiento en agar MRS (Splittstoesser et al., 2001) y recuento de *L. monocytogenes* por el método de vaciado utilizando agar Oxford (FDA, 2016; Splittstoesser et al., 2001; Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Este ensayo se realizó por duplicado considerando lotes independientes de leche agria y réplicas biológicas (inóculos independientes). Nótese que por motivos de fuerza mayor no se realizaron las tres repeticiones recomendables para dar mayor sensibilidad al ensayo; es importante considerar para futuras pruebas, realizar los ensayos con al menos tres repeticiones.

4.6.4. Análisis estadístico

Todos los análisis se efectuaron usando el programa JMP 13 (SAS Institute, Estados Unidos).

4.6.4.1. Curva de crecimiento de BAL en las leches inoculadas.

Los resultados del crecimiento exponencial de BAL en las cinco muestras de leche agria a través del tiempo se analizaron utilizando un modelo logístico de tres parámetros con el objetivo de estimar un modelo que se ajustara óptimamente al comportamiento de los datos. Para esto se utilizó la ecuación 1 para determinar los valores de los factores: tasa de crecimiento (a), punto de inflexión (b) y asíntota de crecimiento (c) (Micha & Corradini, 2011; Pla et al., 2015).

$$\log(\text{población}) = \frac{c}{1 + e^{-a(\text{tiempo}-b)}} \quad (1)$$

Se determinó el promedio y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés) de cada parámetro por tratamiento y se analizaron con un ANDEVA ($\alpha= 0.05$) para determinar si existían valores con diferencias significativas entre los parámetros a y c. Posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias Tukey para determinar cuáles muestras mostraban diferencias significativas.

4.6.4.2. *Curva de crecimiento de acidificación de la leche inoculada.*

Los resultados de los valores de pH de las cinco muestras de leche agria a través del tiempo se analizaron utilizando un modelo exponencial de tres parámetros con el objetivo de estimar un modelo que se ajustara a la disminución del pH de la matriz hasta alcanzar un valor límite de 4.5. Para esto, se utilizó la Ecuación 2 con lo que se determinaron los valores de los factores: asíntota (a), escalar (b) y tasa de crecimiento (c) (Micha & Corradini, 2011; Tjørve & Tjørve, 2017)

$$pH = a + b * \exp(c * tiempo) \quad (2)$$

Se determinó el promedio y la SD de cada parámetro por tratamiento y se analizó con un ANDEVA ($\alpha= 0.05$) para determinar la existencia de valores con diferencias significativas entre los parámetros a, b y c. Posteriormente, se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey para determinar cuáles muestras mostraban diferencias significativas.

4.6.4.3. *Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en las leches inoculadas.*

Los resultados del decrecimiento poblacional de *L. monocytogenes* en las cinco muestras de leche agria a través del tiempo se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal en donde se determinó la recta de mejor ajuste (Ecuación 3). A partir de estas rectas, se realizó un ANDEVA ($\alpha= 0.05$), donde se compararon los valores obtenidos para las pendientes y se determinó si existían diferencias significativas. Para evaluar cuáles medias eran significativamente distintas, se procedió a realizar una comparación múltiple de medias de Tukey.

$$\log(población) = a + b * tiempo \quad (3)$$

5. Resultados y discusión

5.1. Identificación de BAL con marcadores moleculares

Se identificaron doce morfotipos bacterianos a partir de los aislamientos obtenidos de los ensilados de piña. La mayoría de las BAL identificadas corresponden al género *Lactobacillus* sp. con un total de once cepas, y *Weissella* sp. con una cepa. Al realizar la comparación de las secuencias con los datos obtenidos en el GenBank, se identificaron un total de cuatro especies distintas, tal y como se muestra en la Figura 2.

Las cepas de *Lactobacillus* sp. fueron representantes del género más común, según los resultados obtenidos, y esto era de esperarse, ya que, de acuerdo con la literatura, son el grupo con mayor abundancia de especies dentro del grupo BAL (Narvhus & Axelsson, 2003); se encuentran presentes en una gran diversidad de matrices, sobre todo en vegetales como plantas y flores (Góngora et al., 2012), y productos vegetales frescos y fermentados (Sáez et al., 2018; Yi et al., 2013), entre los que se incluyen los desechos orgánicos (Arshad et al., 2018; Góngora et al., 2012) tales como la piña (Mardalena & Erina, 2016). Dentro de este grupo, se identificaron en total tres especies: *L. casei* (7), *L. fermentum* (2) y *L. parafarraginis* (2).

W. ghanensis fue también identificada en este trabajo. El género *Weissella* sp., era conocido como *Leuconostoc* sp.; sin embargo, fue reclasificado por Collins et al. (1993). El género *Weissella* sp abarca hasta el momento un total de 22 especies que pueden ser identificadas en una gran variedad de hábitats que incluyen alimentos fermentados (De Bruyne et al., 2010; Li et al., 2020); sin embargo, algunos autores también han asociado a algunos de sus miembros al deterioro de alimentos (Fusco et al., 2015; Sáez et al., 2018). *W. ghanensis* se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa negativa, no esporulada con un forma cocoidal o bacilar, perteneciente a la familia *Leuconostocaceae* (Collins et al., 1993). Es un organismo anaerobio facultativo, quimioorganoheterotrofo con un metabolismo estrictamente fermentativo ya que carece de citocromos, por lo que deben metabolizar la glucosa por medio de una ruta heterofermentativa. Para lo anterior, utilizan las vías hexosa-monofosfato y la fosfoacetolasa; esto implica que sus productos finales están constituidos por una mezcla de AL, CO₂ y etanol o acetato (Collins et al., 1993; Fusco et al., 2015).

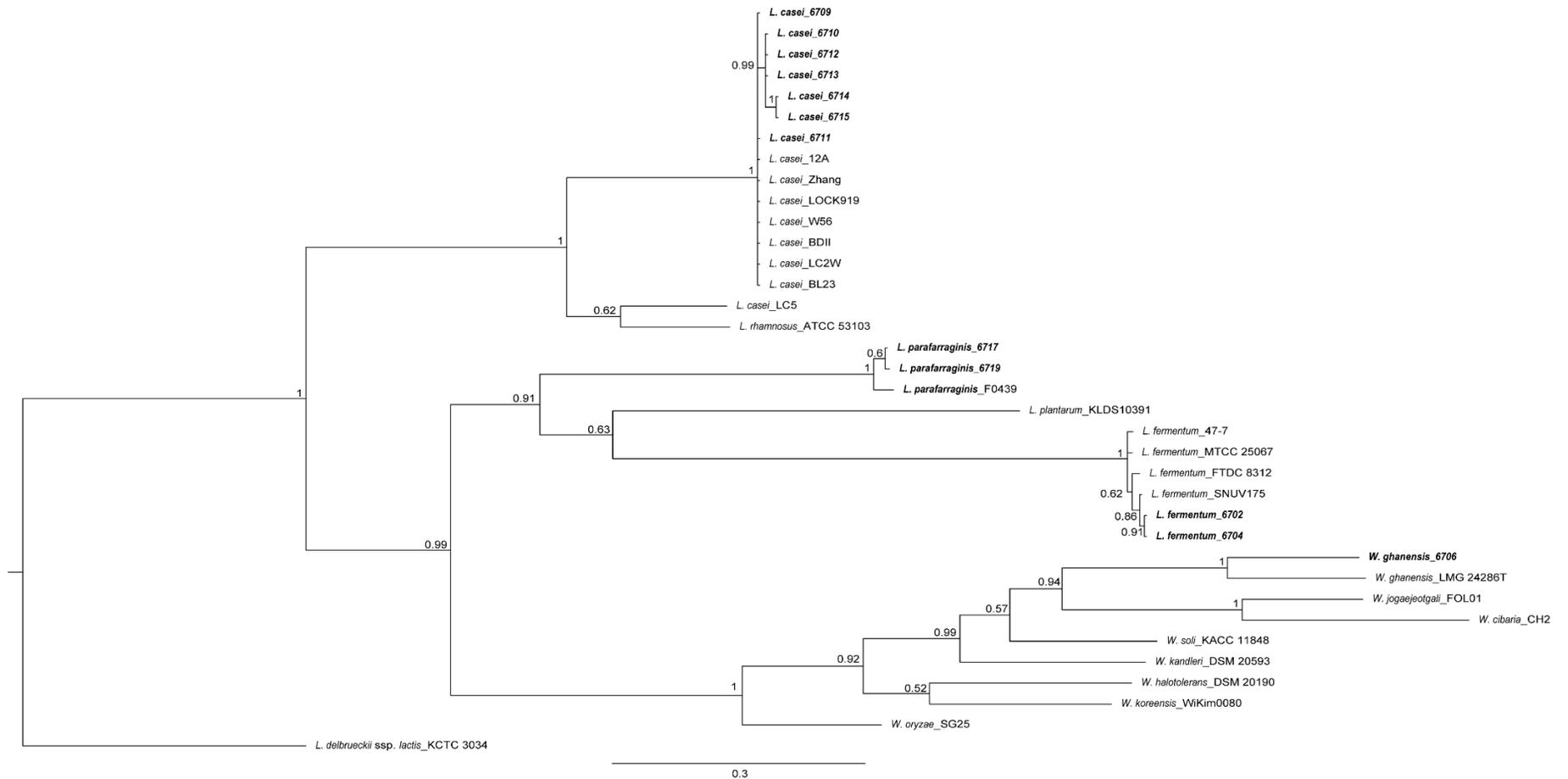


Figura 2. Árbol filogenético que se realizó utilizando las secuencias del gen fenil alanil-ARNt sintasa (*pheS*) (420 nt). En negrita se muestran las secuencias de este trabajo. Se utilizó *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KTCT 3034 como grupo externo.

5.2. Determinación de la capacidad antagónica *in vitro* contra *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*

Cuando se realizaron las pruebas de antagonismo contra *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*, se encontró que, en general, todas las cepas mostraron una actividad importante frente al crecimiento de los dos patógenos, especialmente contra *Salmonella* sp (Cuadro VIII). Este efecto antagónico se vio físicamente como la aparición de un halo o área de no crecimiento por parte del patógeno (Anexo 1, Figura 6). Cabe destacar que los dos patógenos utilizados representaban a una especie Gram negativa y otra Gram positiva, respectivamente. Esto es importante debido a las diferencias de estructura y composición de las células, que pueden activar distintas rutas metabólicas para generar patogenicidad. Las bacterias Gram negativas presentan una membrana celular de tres capas compuestas de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS), tienen una permeabilidad regulada, mientras que las bacterias Gram positivas presentan una capa gruesa de peptidoglicano. La presencia de la capa de peptidoglicano confiere a la bacteria una barrera de exposición ante los agentes antimicrobianos, y por lo general, van a hacer de estos organismo un poco más resistentes (Reygaert, 2018). En este estudio, se determinó que la cepa *L. casei*_6714 fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria contra *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*.

Cuadro VIII. Halos de inhibición observados contra *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* en los ensayos de antagonismo contra las bacterias ácido lácticas (BAL).

Cepa	Halo de inhibición (mm)	
	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
<i>L. casei_6709</i>	++	+
<i>L. casei_6710</i>	++	++
<i>L. casei_6711</i>	++	+
<i>L. casei_6712</i>	+++	++
<i>L. casei_6713</i>	++	++
<i>L. casei_6714</i>	+++	+++
<i>L. casei_6715</i>	+	+
<i>L. fermentum_6702</i>	++	+
<i>L. fermentum_6704</i>	+	+
<i>L. parafarraginis_6717</i>	++	++
<i>L. parafarraginis_6719</i>	++	+
<i>W. ghanensis_6706</i>	+++	++

+: Zona de inhibición 0-3 mm de diámetro (débil)

++: Zona de inhibición 3 - 6 mm de diámetro (buena)

+++ : Zona de inhibición mayor a 6 mm de diámetro (fuerte)

El ensayo de actividad antimicrobiana del sobrenadante para *L. casei_6714* (Cuadro IX) muestra resultados inhibitorios significativos ante *Salmonella* sp. cuando se utilizó un volumen de 20 μ L, mientras que para *L. monocytogenes*, se requirió de un volumen mayor (50 μ L) para obtener un efecto inhibitorio equivalente. Esto se podría explicar por distintos factores.

Cuadro IX. Valores de absorbancia a 620 nm obtenidos en la determinación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante de *L. casei* _6714 contra *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* (promedio \pm desviación estándar, n = 3)

Volumen del sobrenadante (μ L)	Absorbancia a 620 nm	
	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
50	0.062 \pm 0.007 ^{CD}	0.043 \pm 0.05 ^{BC}
45	0.09 \pm 0.04 ^{CD}	0.13 \pm 0.02 ^A
40	0.055 \pm 0.008 ^D	0.128 \pm 0.004 ^A
35	0.08 \pm 0.03 ^{CD}	0.14 \pm 0.01 ^A
30	0.15 \pm 0.06 ^{BCD}	0.11 \pm 0.05 ^{AB}
25	0.16 \pm 0.03 ^{BCD}	0.113 \pm 0.004 ^{AB}
20	0.19 \pm 0.03 ^{BC}	0.129 \pm 0.003 ^A
15	0.24 \pm 0.01 ^{AB}	0.13 \pm 0.01 ^A
Control positivo	0.34 \pm 0.08 ^A	0.151 \pm 0.007 ^A

En una misma columna, entre valores que no comparten la misma letra existe diferencias significativas ($p < 0.005$).

Las BAL son productoras de diversos metabolitos que pueden tener un efecto antimicrobiano importante. Los antimicrobianos producidos por las BAL varían en cuanto a naturaleza y peso molecular lo cual puede afectar la magnitud de impacto que tienen sobre los organismos patógenos (Çon & Gökalp, 2000; Pinar & Yalçin, 2015). Al trabajar con un sobrenadante previamente neutralizado, se está eliminando el efecto ocasionado por la presencia de iones hidronio en la matriz, por lo que se podría suponer que existe la presencia de otras sustancias metabólicas presentes, tales como las bacteriocinas.

Las diferencias entre los resultados obtenidos al comparar el efecto por sobrecapa *vrs* del sobrenadante neutralizado y la inhibición contra *L. monocytogenes*, podrían explicarse debido a que este patógeno no presenta una buena tolerancia a la acidez, por lo que su crecimiento se ve limitado a pH menores de 4.5 (Koutsoumanis et al., 2003). Además, el efecto del sobrenadante fue mucho más significativo sobre *Salmonella* sp. Este fenómeno

puede ser explicado por la naturaleza estructural de los patógenos como se mencionó con anterioridad.

5.2.1. Evaluación de la capacidad antagónica de *L. casei* _6714 a nivel de cultivo celular contra cepas entero-invasivas de *Salmonella* Typhimurium.

El ensayo de evaluación de la adhesividad de la cepa se realizó para verificar la capacidad de la BAL seleccionada de asentarse en el epitelio intestinal, lo cual es un factor relevante durante el proceso de colonización intestinal (Janković et al., 2012). Los resultados del conteo celular de *L. casei*_6714 que se adhiere a la superficie de las células HeLa (Cuadro X) mostraron que la cepa presentó una alta capacidad de adherencia (200%) en comparación con un organismo de referencia (Cuadro X). Este efecto se visualizó como un mayor número de células bacterianas depositadas sobre la superficie celular (anexo 2, figura 7) en donde se vieron diferencias significativas entre el *L. casei*_6714 y *L. fermentum*_6702 ($p = 0.0032$).

Cuadro X. Adhesión de *L. casei* _6714 a células HeLA por campo microscópico.

Cepa	Adherencia de BAL a células
<i>L. casei</i> _6714	403 ± 18
<i>L. fermentum</i> _6702	164 ± 16

Del mismo modo, cuando se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar la prevención de la invasión celular por parte de *Salmonella* Typhimurium (Cuadro XI), se encontró que *L. casei*_6714 logró una reducción de la bacteria patógena de aproximadamente un 11% cuando se encontraba en presencia simultánea con el patógeno (tratamiento de la infección), mientras que los resultados del ensayo de protección, en donde se aplicó un pre-tratamiento con la BAL y seguidamente se realizó la infección con *Salmonella* Typhimurium muestran una reducción del 10 al 20 % del patógeno, dependiendo de la extensión de la exposición previa a la BAL, lo cual sugiere que a mayor tiempo de exposición, mejor su efecto sobre la reducción de la invasión en las células. Esto coincide con las características esperadas de un organismo probiótico (Nagpal et al., 2012). De acuerdo con Collado et al. (2008), la

colonización y adhesión de la BAL permite la formación de una capa o *film* sobre la superficie epitelial que sirve como una barrera física que previene la invasión. En el caso de *Salmonella* Typhimurium la infección y eventual invasión se da después de que la bacteria entra en contacto con los endocitos y promueve su fagocitosis. La bacteria patógena utiliza un conjunto de proteínas efectoras que se inyectan en el citoplasma de la célula huésped a través de un aparato de secreción tipo III y esto permite una reorganización del citoesqueleto de actina del huésped que culmina con la absorción de las bacterias adheridas (Ly & Casanova, 2007). Al generar una barrera física entre la célula y el patógeno, el porcentaje de invasividad se va a ver reducido. Los resultados obtenidos coinciden con los resultados observados *in vitro* en los estudios de Tsai et al. (2005) donde se evaluó el efecto de varias BAL en la invasividad de *Salmonella* sp. en varias líneas celulares; por otra parte, otros estudios sugieren que la BAL podría prevenir la invasión de otros patógenos; por ejemplo, Gopal et al., (2001) evaluaron la adhesividad *in vitro* de cepas de *L. rhamnosus* con *Escherichia coli* enterotoxigénica y determinaron que la invasividad y las asociaciones celulares de esa cepa toxigénica se veían reducidos considerablemente.

Basado en los resultados observados en el estudio, *L. casei*_ 6714 muestra un potencial importante como probiótico. En estudios anteriores se ha determinado que esta especie presenta propiedades beneficiosas importantes. Por ejemplo, Chain et al. (2017) estudió el efecto de una cepa de *L. casei* en la prevención de colitis asociada al cáncer colon rectal. Además se la ha asociado a la reducción de índices glicémicos (Khalili et al., 2019) y como un tratamiento probiótico en enfermedades urogenitales (Reid & Bruce, 2002), lo que sugiere que las aplicaciones probióticas para esta cepa son diversas; sin embargo, aún es necesario realizar otros estudios que permitan confirmar esto. Los ensayos realizados en este estudio son de carácter *in vitro*, por lo que solo ofrecen una idea del potencial, aunque el comportamiento de este organismo podría ocurrir de forma distinta al encontrarse en condiciones reales, es decir, en una situación con mayores factores de variabilidad.

Cuadro XI. Efecto antagónico de *L. casei_6714* contra la invasión de *Salmonella* Typhimurium a células HeLa (promedio \pm desviación estándar)

Ensayo	Log CFU /mL <i>Salmonella</i>	Adhesión celular a HeLa (%)
Tratamiento	5,3 \pm 0,1 ^B	65 \pm 1 ^B
Protección (3 h) *	5,4 \pm 0,2 ^B	66 \pm 2 ^B
Protección (24 h) *	4,6 \pm 0,1 ^C	56 \pm 1 ^C
Control	6,2 \pm 0,1 ^A	76 \pm 2 ^A

En una misma columna, entre valores que no comparten la misma letra existe diferencia significativa ($p < 0.005$).

*Post-inoculación con *Salmonella*.

5.3.Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de *L. casei_6714*

Como se mencionó antes, la susceptibilidad a los antibióticos es una característica importante cuando se trata del tema de microorganismos con potenciales aplicaciones biotecnológicas y biomédicas (Reygaert, 2018). En este estudio, se evaluó el efecto de varios antibióticos de uso común sobre *L. casei_6714* (Cuadro XII). En general, se observó una resistencia importante ante la mayoría de los antibióticos que se ensayaron, con la excepción de la eritromicina y la amoxicilina con ácido clavulánico que presentaron una sensibilidad intermedia. La eritromicina es un macrólido antibacterial con un espectro similar al de las penicilinas, por lo general se utiliza en pacientes que presentan alergias a este compuesto (Fromage, 2013); por otra parte, la amoxicilina, un medicamento del grupo de las β – lactamas, combinada con ácido clavulánico, un inhibidor de la β – lactamasa, es un antibiótico efectivo ante organismos que previamente han presentado resistencia a la amoxicilina convencional (Fromage, 2013; Reygaert, 2018). Estudios indican que el género *Lactobacillus* sp. presentan resistencia a la eritromicina y al cloranfenicol (Sharma et al., 2014; Zago et al., 2011), tal y como se observó con *L. casei_6714* que presentó resistencia al cloranfenicol, mas no a la eritrocimicina lo cual coincide con lo observado por Sharma et al. (2016). En general, se observó resistencia ante inhibidores de la pared celular lo cual se ha visto como una resistencia común del grupo (Flórez et al., 2005; Klare et al., 2007); sin

embargo, con la presencia de un inhibidor de la β – lactamasa como el ácido clavulánico, se logró disminuir dicha resistencia.

Cuadro XII. Determinación de la resistencia-susceptibilidad a antibióticos seleccionados sobre *L. casei*_6714 por medición de su zona de inhibición (halo) (promedio \pm desviación estándar, n = 3)

Antibiótico	Halo (mm)	Interpretación
Ciprofloxacina	5.3 (\pm 0,6)	Resistente
Vancomicina	0.0 (\pm 0)	Resistente
Penicilina	11.0 (\pm 1.0)	Resistente
Amoxicilina con ácido		
clavulánico	15.0 (\pm 0,5)	Intermedio
Eritromicina	15.2 (\pm 0,3)	Intermedio
Amikacina	6.0 (\pm 0)	Resistente
Estreptomicina	3.7 (\pm 0,6)	Resistente
Tetraciclina	8.8 (\pm 1)	Resistente
Cloranfenicol	10.3 (\pm 0,6)	Resistente

*L. casei*_6714 mostró una resistencia importante contra la vancomicina. Este resultado es crítico debido a que este antibiótico corresponde al tratamiento de último recurso ante patógenos resistentes a múltiples drogas, por lo que la presencia de una resistencia potencialmente transmisible puede representar un riesgo para la salud pública (Reygaert, 2018; Sharma et al., 2016). Sin embargo, varios autores han relacionado la resistencia a los glicopéptidos como la vancomicina como una propiedad intrínseca del grupo debido a su capacidad de sustituir el residuo de d- alanina o d –serina terminal del pentapéptido muramil que previene la unión de la vancomicina a la célula (Sharma et al., 2016).

En el caso de los probióticos, la presencia de la resistencia es un factor favorable, ya que esto permite el proceso de colonización y sobrevivencia en el tracto gastrointestinal (GI) durante o post exposición a un tratamiento con antibióticos (Bacha et al., 2010; Sharma et al., 2014). Sin embargo, es importante verificar que la resistencia sea intrínseca o bien se encuentre en el cromosoma de la bacteria y no dentro de elementos transferibles como los plásmidos, para evitar una segregación de genes de resistencia o elementos móviles como los transposones, debido a que, de lo contrario, estos genes de resistencia podría ser transferidos a otras bacterias promoviendo el crecimiento de resistencia adquirida a antimicrobianos. Para esto se recomendaría verificar que es estos genes efectivamente se encuentran en el cromosoma, o bien corroborar la existencia de plásmidos en los microorganismo que se está evaluando (CDC 2019; Coculescu, 2009). Las propiedades observadas para *L. casei_6714* como probióticos son promisorias; sin embargo, aún se deben realizar otros estudios tales como la determinación de posible transferencia de genes de resistencia a antibióticos por medio de la identificación de dichos genes en elementos móviles (Raghavan, 2019; Wolupeck et al., 2017).

5.4.Efecto de *L. casei_6714* sobre crecimiento de *L. monocytogenes* y la fermentación en leche agria artesanal

La evolución de la población de BAL en los distintos tratamientos de leche agria evaluados se observa en la Figura 3. Como era de esperarse, la población tanto del cultivo iniciador como de *L. casei_6714* mostraron un crecimiento exponencial importante. Esto es de esperarse dado que la matriz en la que se encontraban es rica en nutrientes y azúcares, sobre todo lactosa, que son de los sustratos de preferencia para este grupo de organismos (Rezac et al., 2018; Yerlikaya, 2014).

El análisis estadístico efectuado al parámetro de tasa de crecimiento no determinó diferencias significativas entre los cinco tratamientos estudiados ($p = 0.2811$). Esta es una medida de la intensidad con la que un organismo crece, y por ende, demuestra su vigor fisiológico (Micha & Corradini, 2011); en otras palabras, este parámetro da una idea de cómo se comportan ambos organismos en diferentes escenarios como lo es la presencia de un organismo secundario en co-cultivo. Al no observarse diferencias significativas entre los

valores de tasa de crecimiento, es posible afirmar que el desarrollo y el crecimiento del cultivo iniciador y de *L. casei_6714* no se vieron afectados por la presencia del otro. Algunos estudios han reportado que algunas combinaciones de BAL de morfología tipo coco y tipo bacilo presentaban incompatibilidad, por ende se da una inhibición del crecimiento; del mismo modo, esta interacción puede más bien promover el crecimiento o ser neutral (Vinderola et al., 2002). De acuerdo con lo observado, es factible pensar que la interacción entre el cultivo iniciador y *L. casei_6714* es de carácter neutral. Sin embargo, es importante destacar que este experimento se realizó únicamente con dos repeticiones, por lo que la potencia de prueba se reduce y esto disminuye la sensibilidad con la que se pueden detectar las diferencias significativas (Guo et al., 2013).

Se debe destacar que los tratamientos BAL+ *L. monocytogenes* (T3), cultivo iniciador R704 + *L. monocytogenes* (T4) y cultivo iniciador + BAL + *L. monocytogenes* (T5), los cuales son los que se encuentran inoculados con *L. monocytogenes*, mostraron una tasa de crecimiento más baja en comparación con los dos controles (positivo y negativo) sin el patógeno ($p < 0.05$). Esto sugiere que la presencia de la *L. monocytogenes* ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento de las BAL y el cultivo iniciador, causando que el crecimiento celular en ambos casos sea más lento; esto es más evidente con la BAL. Los detalles de dicho efecto se deberán estudiar más a fondo para poder ser comprendidos.

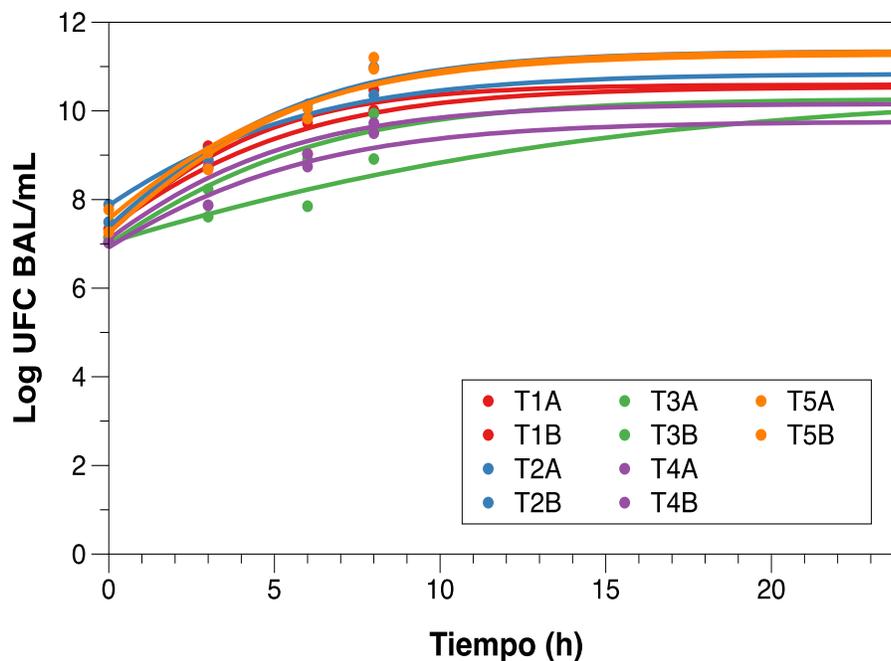


Figura 3. Curva de crecimiento de las BAL para los diferentes tratamientos de leche agria (n = 2). Nota: Los tratamientos corresponden a: cultivo iniciador (control negativo, T1); cultivo iniciador + BAL (T2); BAL + *L. monocytogenes* (T3); cultivo iniciador + *L. monocytogenes* (T4) y cultivo iniciador + BAL + *L. monocytogenes* (T5); A y B corresponden a las repeticiones.

Cuando se analiza el crecimiento asintótico de las BAL en los diferentes tratamientos (Figura 3) se puede estimar la fase estacionaria de la curva de crecimiento de los organismos en estudio y se puede determinar un punto en el cual el crecimiento de la población ha llegado a su máximo (Micha & Corradini, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos del ANDEVA, se encontraron diferencias significativas ($p = 0,0075$) entre los valores de la población de BAL y BAL + cultivo iniciador estabilizada (Cuadro XIII). Los tratamientos 2 y 5 muestran los recuentos más altos de BAL, lo cual tiene coherencia dado a que en ambos casos se estaba trabajando con una mezcla del cultivo iniciador y *L. casei_6714*. El tratamiento 4 fue el que mostró el conteo más bajo, sin embargo, sus valores no se diferencian de los tratamientos 1 y 3. Para estos tratamientos se esperaba una contabilización de células mucho menor al de los tratamientos que contenían una combinación del organismo iniciador y *L. casei_6714*.

Cuadro XIII. Valores promedio de la población estabilizada de BAL en las muestras de leche agria a las 24 horas (promedio \pm desviación estándar, n = 2)

Tratamiento	Log UFC/ mL
Cultivo iniciador R704 (Hansen, Dinamarca) (T1)	10.57 \pm 0.04 ^A
Cultivo iniciador R704 (Hansen, Dinamarca) + <i>L. casei</i> _6714seleccionada (T2)	11.1 \pm 0.4 ^B
<i>L. casei</i> _ 6714 + <i>L. monocytogenes</i> (T3)	10.4 \pm 0.1 ^{AC}
Cultivo iniciador R704 + <i>L. monocytogenes</i> (T4)	10.0 \pm 0.3 ^{DC}
Cultivo iniciador + <i>L. casei</i> _6714 + <i>L. monocytogenes</i> (T5)	11.31 \pm 0.05 ^{EB}

*Valores que no comparten letras en común son significativamente ($p < 0.05$) distintos según la prueba Tukey.

En cuanto a la evolución del pH de la leche durante la fermentación (Figura 4), se observó un comportamiento similar entre los tratamientos con la excepción del T3, que presentó una disminución del pH mucho más desacelerada. El pH de la leche sujeta al tratamiento T3 a las 24 h es superior al pH límite establecido para asegurar la inocuidad del producto ($\text{pH} \leq 4.5$). Este resultado es importante de señalar dado que, a pH superiores al límite, el crecimiento de organismos patógenos se ve significativamente potenciado, por lo que la recurrencia de una infección o intoxicación asociada a esta matriz puede convertirse en riesgo grave para la salud pública (Gould, 2009). En cuanto a los demás tratamientos, hay una disminución del pH de la leche, y fue posible llegar al valor límite de pH: 4.5 en menos de 24 h. Éste corresponde al pH mínimo necesario para asegurar la inocuidad del producto ya que a un pH de al menos 4.5 se inhibe el crecimiento de la mayoría de los organismos de deterioro y patógenos, entre ellos *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*, además de que se favorece el desarrollo de las BAL (Ahmed et al., 2014; Cissé et al., 2019). Como era de esperar, los tratamientos que presentaban una combinación de los dos microorganismos (BAL y cultivo iniciador) mostraron una disminución mayor de pH de la leche, lo cual puede

ser explicado por la sumatoria en la producción de AL por las dos especies que se inocularon en la matriz. El cultivo iniciador, estaba compuesto por cepas de *Lactococcus lactis*. Este organismo se ha utilizado por siglos para la fermentación de productos tales como lácteos y vegetales ya que se caracteriza por ser un organismo estrictamente homofermentativo (Song et al., 2017). Por otra parte, *L. casei* es un grupo que se describe como heterofermentadores facultativos, es decir, que pueden fermentar hexosas a ácido láctico en su totalidad o, bajo ciertas condiciones, pueden generar una mezcla de sustancias como el AL, acético, etanol y ácido fórmico (De Angelis & Gobbetti, 2016). De acuerdo con el estudio de Zheng et al., (2015), la presencia de genes que permiten categorizar a una especie como un fermentador facultativo depende de la cepa en específico. Esto podría explicar el comportamiento del organismo en la muestra T3. La poca disminución del pH de la leche con este tratamiento podría explicarse debido a que el microorganismo siguiera una ruta metabólica heterofermentativa en lugar de la homofermentativa, por lo que se favoreció la producción de otros compuestos, que no alteraron el valor de pH de forma significativa. Como se mencionó anteriormente, *L. casei* es un género homofermentativo facultativo, por lo que en condiciones dadas puede preferir una ruta en específico. Lo recomendable en este caso sería analizar químicamente las leches obtenidas para confirmar o descartarla presencia de otros compuestos distintos de AL, y, de ser el caso de que se observara una ruta heterofermentativa, acondicionar previamente la leche para favorecer la ruta homofermentativa. La producción de productos heterofermentativos generalmente es indeseable en derivados lácteos; sin embargo, podrían resultar de interés en otro tipo de productos (Mesquita et al., 2017; Reid et al., 2003). En los otros tratamientos en donde se combinaron *L. casei_6714* y el cultivo iniciador, se logró alcanzar el pH límite en menos de 24 h; esto pudo haber ocurrido debido a la presencia de un efecto sinérgico entre los organismos, de forma que el cultivo iniciador pudo haber producido metabolitos secundarios que sirvieran de sustrato para *L. casei_6714*, favoreciendo su crecimiento, en comparación al observado cuando se encontraba solo, o bien, el pH disminuyó por la producción de ácido propia del cultivo iniciador (Vinderola et al., 2002).

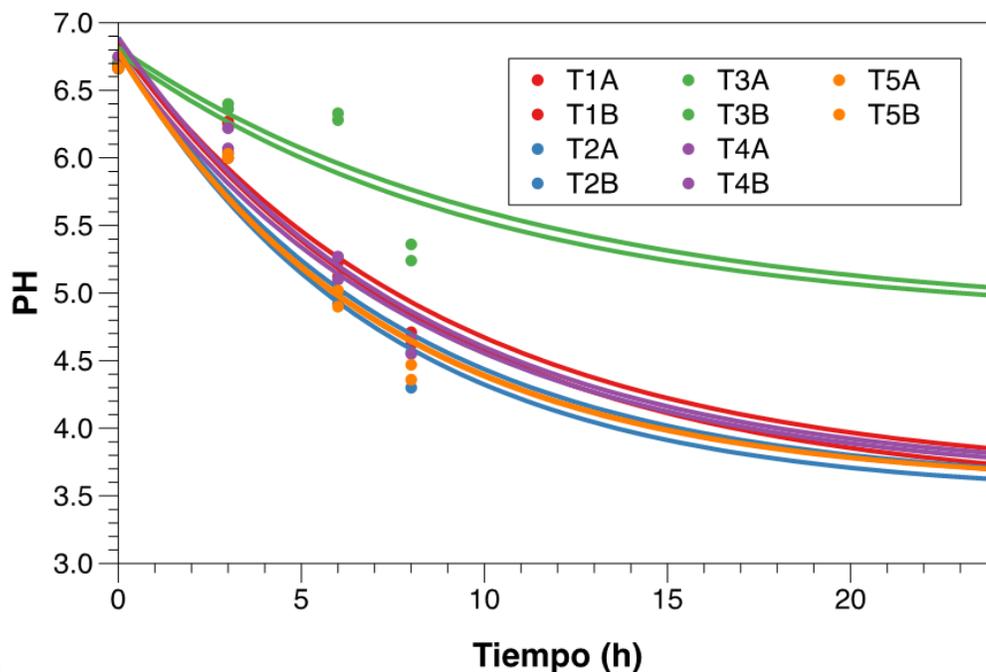


Figura 4. Comportamiento del pH durante la fermentación de la leche agria Nota: Los tratamientos corresponden a: cultivo iniciador (control negativo, T1); cultivo iniciador + *L. casei_6714* (T2); *L. casei_6714* + *L. monocytogenes* (T3); cultivo iniciador + *L. monocytogenes* (T4) y cultivo iniciador + *L. casei_6714* + *L. monocytogens* (T5); A y B corresponden a las repeticiones.

Con respecto a los parámetros evaluados en el modelo estadístico exponencial (Cuadro XIV), se detectaron diferencias significativas ($p < 0.005$) para todos los tratamientos evaluados. Esto sugiere que existen diferencias en las tasas de acidificación; sin embargo, es importante recalcar que los resultados del pH final de la leche pueden ser explicados por la variabilidad en el experimento y, debido al número reducido de repeticiones, no es posible estudiar este factor con mayor detalle, por lo que se recomienda que se realice el experimento con un mayor número de repeticiones en un futuro de forma que sea posible comparar los resultados obtenidos

Los recuentos de *L. monocytogenes* (Figura 5), muestran una disminución en la población del patógeno a lo largo del periodo de estudio, sobre todo cuando está en presencia de ambos lactobacilos (tratamientos 4 y 5), mientras que en presencia de *L. casei_6714*, su

disminución es menor (tratamiento 3). Esto es un resultado inesperado, debido a que estudios previos han sugerido que *L. casei* presenta un efecto inhibitorio importante contra *L. monocytogenes* (Gutiérrez-Cortés et al., 2017; Pálmai & Kiskó, 2003; Xie et al., 2011). Los experimentos realizados *in vitro* sugieren un efecto antagónico de consideración; sin embargo, el mismo no se observó en la matriz láctea, lo que pudo deberse a que esta cepa en específico (*L. casei*_ 6714) fue aislada de una matriz vegetal muy característica, por lo que puede presentar adaptaciones genéticas que la hacen menos eficiente en una matriz láctea. De acuerdo con Yu et al. (2020) y Levy et al. (2018), las bacterias asociadas a matrices vegetales suelen presentar menos elementos móviles y codifican para dominios proteicos similares a las de las plantas que colonizan, y usualmente las BAL suelen ser más eficientes metabolizando azúcares como glucosa, fructuosa y sacarosa, que son más frecuentes en las matrices vegetales que azúcares más complejos como la lactosa en la leche. Esto podría venir a explicar también el por qué la *L. casei*_ 6714 tuvo un mejor rendimiento cuando crecía en co-cultivo con el cultivo iniciador.

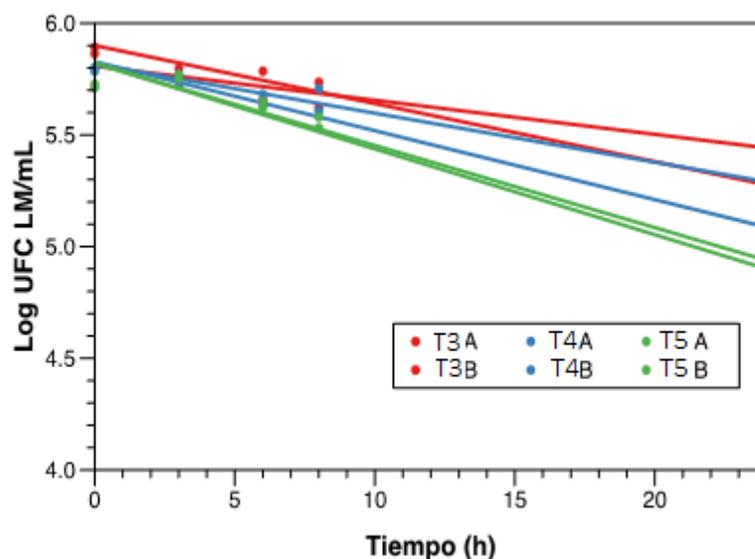


Figura 5. Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en los diferentes tratamientos evaluados durante la elaboración de leche agria (n = 2) donde T3 corresponde al co-cultivo de *L. casei*_6714 y *L. monocytogenes*; T4 corresponde al co-cultivo del cultivo iniciador y *L. monocytogenes*; y T5 corresponde al co-cultivo de *L. casei*_ 6714 + cultivo iniciador + *L. monocytogenes*; A y B corresponden a las repeticiones.

El análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas ($p < 0.005$) en las pendientes de reducción de la población de *L. monocytogenes* tras someterse a cada tratamiento (Cuadro XIV). En todos los casos, se observaron reducciones de la población de la *L. monocytogenes* significativas ($p < 0.005$); sin embargo, las reducciones fueron de apenas 1-log respecto a la población inicial. De acuerdo con la FAO/OMS (2016), la mínima reducción observable en la carga microbiana de un producto para ser considerado una inactivación efectiva es de 2-log, ya que esto implica que cerca del 99% de los microorganismos han sido removidos o inactivados por la intervención, independientemente de la carga inicial.

Cuadro XIV. Pendientes de las curvas de reducción de *L. monocytogenes* en las muestras de leche agria (n =2).

Tratamiento	Pendiente	Probabilidad
<i>L. casei</i> _ 6714 + <i>L. monocytogenes</i> (T3)	-0.0206 ^A	0.1341
Cultivo iniciador R704 + <i>L. monocytogenes</i> (T4)	-0.0264 ^{AB}	0.00033
Cultivo iniciador + <i>L. casei</i> _6714 + <i>L. monocytogenes</i> (T5)	-0.0375 ^C	0.0061

*Valores que no comparten letras en común son significativamente ($p < 0.05$) distintos según la prueba Tukey.

En este caso no se observa una disminución relevante de la población de *L. monocytogenes*, y existe una cierta incertidumbre con respecto a las diferencias observadas debido al número reducido de repeticiones utilizados. Es recomendable que este estudio se realice con un mayor número de repeticiones para poder solventar estos problemas.

Los miembros del género *Lactobacillus*, incluyendo a *L. casei*, han mostrado propiedades importantes como mecanismo de prevención de crecimiento de *Listeria* sp. en alimentos (Fernandes et al., 2013; Zhao et al., 2020); pero, los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas no fueron los esperados, ya que se no se observó un efecto importante en la reducción de la población de *L. monocytogenes* en las leches fermentadas; sin embargo, esto no implica que las BAL no tengan una aplicación como bioprotector. Estudios han mostrado que los miembros del grupo *L. casei* son prometedores como agentes de biocontrol contra agentes de carácter fúngico (Leyva-Salas et al., 2018; Li et al., 2013; Siedler et al.,

2019) e, incluso, se han sugerido para aumentar la vida útil de productos de origen cárnico (Castellano et al., 2008; Työppönen et al., 2003) y en el posible control de deterioro de productos de cervecería (Rouse & van Sinderen, 2008). Es recomendable realizar estudios con otros agentes de deterioro y, además, verificar que *L. casei* no genere algún tipo de incompatibilidad con otros organismos utilizados en el procesamiento de estos productos, ya que Li et al. (2013) observaron que la adición de *L. casei* interfería con el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*.

Aún existen muchas interrogantes con respecto a la funcionalidad de *L. casei* _6714 como un organismo bioprotector; sin embargo, se trata de un organismo prometedor, por lo que se recomienda continuar con más estudios en el futuro.

6. Conclusiones

- Se determinó que las cepas aisladas del proceso de ensilaje de piña se agrupan mayoritariamente en el género *Lactobacillus* sp. y *Weissella* sp.
- Todas las cepas estudiadas presentaron un efecto antagónico importante contra cócteles de *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp.; sin embargo, el efecto antagónico evaluado *in vitro* fue mayor contra las bacterias Gram negativas como *Salmonella*, lo que implica que las BAL estudiadas tienen un potencial probiótico de interés.
- Las pruebas del efecto inhibitorio del sobrenadante neutralizado permitieron verificar la existencia de metabolitos con potencial antimicrobiano, los cuales fueron más efectivos contra patógenos Gram negativos.
- La presencia de *L. casei* _6714 disminuye significativamente la invasión *in vitro* de *Salmonella* Typhimurium en las células HeLa debido a su alta capacidad de adhesión a la superficie celular. Este efecto se ve mucho más marcado cuando se aplican la BAL como un tratamiento preventivo.
- La cepa *L. casei* _6714 presentó resistencia significativa a varios antibióticos de uso común.
- *L. casei* _6714 no mostró ningún tipo de incompatibilidad con respecto al cultivo iniciador, por lo que se podrían utilizar como organismos sinérgicos; sin embargo, se recomienda realizar más pruebas para corroborar esta conclusión.
- La cepa *L. casei* _6714 no logró la acidificación hasta el punto de corte ($\text{pH} \leq 4.5$) en un periodo de 24 horas, ni tampoco mostró un efecto inhibitorio importante sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* en la matriz de estudio, por lo que no es un organismo apto en el control del patógeno en este tipo de productos; sin embargo, podría tener un impacto mayor en otros organismos que causan deterioro, por lo que se recomienda realizar estudios enfocados en esa línea.
- En general, se determinó que *L. casei* _6714 es un organismo potencialmente probiótico, de acuerdo con sus resultados *in vitro*; pesar de eso, se requieren estudios adicionales que simulen de forma más precisa la dinámica real para poder corroborar este hallazgo.

7. Recomendaciones

- Se recomienda realizar el estudio de efecto bioprotector en leche agria con un mayor número de repeticiones para aumentar la potencia de prueba y mejorar la sensibilidad del estudio.
- Es importante efectuar otros estudios que permitan la identificación y cuantificación de las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL de forma que puedan ser utilizadas en aplicaciones futuras.
- Se recomienda evaluar el efecto antagónico de *L. casei_6714* utilizando otras líneas celulares como la CaCO2 y escalar el ensayo a modelos *in vivo* que permitan simular la dinámica a nivel gastrointestinal de forma más cercana a lo que ocurre a nivel de un organismo vivo.
- Es importante verificar que las resistencias a los antibióticos que se observaron en el estudio no se encuentren codificada en genes accesorios que puedan ser transferidos a otras bacterias, por lo que es recomendable que se hagan otras pruebas, tales como determinación de presencia de plásmidos o la secuenciación del genoma de las BAL.
- Se recomienda realizar estudios sobre el efecto de *L. casei_6714* en otros organismos como *Salmonella* sp. u organismos de deterioro, para observar su comportamiento.

8. Bibliografía citada

- Abel, T., Donatien, K., Aly, S., Adama, S., Nadia, F., Diarra, C. S., Joseph, D., & Hagreacoute, S. (2016). Evaluation of microbiological quality of raw milk, sour milk and artisanal yoghurt from Ouagadougou, Burkina Faso. *African Journal of Microbiology Research*, *10*(16), 535–541. <https://doi.org/10.5897/ajmr2015.7949>
- Ahmed, L. I., Morgan, S. D., Hafez, R. S., & Abdel-All, A. A. A. (2014). Hygienic Quality of Some Fermented Milk Products. *International Journal of Dairy Science*, *9*(3), 63–73. <https://doi.org/10.3923/ijds.2014.63.73>
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. A., Takagi, A., & Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal of Gastroenterology*, *93*(11), 2097–2101.
- Alonso, S., Herrero, M., Rendueles, M., & Díaz, M. (2014). Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. *Process Biochemistry*, *49*(5), 732–739.
- Álvarez-Cisneros, Y., & Ponce-Alquicira, E. (2019). Antibiotic resistance in lactic Acid Bacteria. In *Antimicrobial Resistance - A Global Threat*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80624>
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *23*(2), 107–114.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp. 475–486). Formatex. <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages475-486.pdf>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Andrade, E. H. P., Silva, N. M. A., Resende, M. F. S., Souza, M. R., Fonseca, L. M., Cerqueira, M. M. O. P., Penna, C. F. A. M., & Leite, M. O. (2015). Microbiological and physical-

- chemical characteristics of fermented milk beverages. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 67(6), 1735–1742.
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating Current Reserach and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, May, 466–474.
- Arias, B., Reyes, M., Navarro, L., Solis, B., Márquez, M., Sánchez, G., Snell, R., & Zuñiga, R. (2013). Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157 : H7 resistant to antibiotics. *E-Gnosis*, 11, 1–16.
- Arshad, F., Mehmood, R., Hussain, S., Annus Khan, M., & Khan, M. S. (2018). Lactobacilli as Probiotics and their Isolation from Different Sources. *British Journal of Research*, 05(03), 43. <https://doi.org/10.21767/2394-3718.100043>
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen & A. Von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (2nd ed., pp. 1–72). Marcel Dekker.
- Bacha, K., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from Wakalim, a traditional Ethiopian fermented beef sausage. *Journal of Food Safety*, 30(1), 213–223. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00201.x>
- Bender, K., Buckley, D., Sattley, M., & Stahl, D. (2017). *Brock Bioloфы of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- Benítez-Páez, A., & Sanz, Y. (2017). From Bacterial Genomics to Human Health. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, 159–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00008-X>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Blair, J., Webber, N., Baylay, A., Ogbolu, D., & Piddock, L. (2015). Molecular mechanism of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*2, 13(1), 42–51.
- Bonfield, J. K., Smith, K. f, & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23(24), 4992–4999.
- Booth, S. J., Johnson, J. L., & Wilkins, T. D. (1977). Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(4), 718–724.

- Bottari, B., Felis, G. E., Salvetti, E., Castioni, A., Campedelli, I., Torriani, S., Bernini, V., & Gatti, M. (2017). Effective identification of *Lactobacillus casei* group species: genome-based selection of the gene *mutL* as the target of a novel multiplex PCR assay. *Microbiology*, *163*(7), 950–960. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000497>
- Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY, p. 647). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Buffie, C. G., Bucci, V., Stein, R. R., McKenney, P. T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., Littmann, E., van den Brink, M. R. M., Jenq, R. R., Taur, Y., Sander, C., Cross, J. R., Toussaint, N. C., Xavier, J. B., & Pamer, E. G. (2015). Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, *517*(7533), 205–208. <https://doi.org/10.1038/nature13828>
- Buriti, F. C. A., & Saad, S. M. I. (2007). Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *57*(4), 373–380. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524322>
- Buriti, F. C., Cardarelli, H. R., & Saad, S. M. I. (2007). Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *Journal of Food Protection*, *70*(1), 228–235.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, *79*(3), 483–499. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.009>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *About Antibiotic Resistance / Antibiotic/Antimicrobial Resistance / CDC*. Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Centro para el control y Prevencio de Enfermedades (CDC). (n.d.). *Actualizaciones de la investigación del brote, por fecha | Outbreak of Listeria Infections Linked to Pork Products | November 2018 | Listeria | CDC*. 2018. Retrieved March 26, 2019, from <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/porkproducts-11-18/updates-esp.html>
- Chain, F., Jacouton, E., Bermúdez-Humarán, L. G., Sokol, H., & Langella, P. (2017). Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Frontiers*

in *Immunology*, 8, 1553.

- Charalampopoulos, D., & Rastall, R. (2009). *Prebiotics and Probiotics Science* (D. Charalampopoulos & R. Rastall (eds.)). Springer.
- Cissé, H., Muandze-Nzambe, J. U., Somda, N. S., Sawadogo, A., Drabo, S. M., Tapsoba, F., Zongo, C., Traore, Y., & Savadogo, A. (2019). Assessment of safety and quality of fermented milk of camels, cows, and goats sold and consumed in five localities of Burkina Faso. *Veterinary World*, 12(2), 295–304. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.295-304>
- Coculescu, B.-I. (2009). Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicine and Life*, 2(2), 114–123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20108530>
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Collins, M., Samelis, J., Metaxopoulos, J., & Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 595–603.
- Çon, A. H., & Gökalp, H. Y. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*, 55(1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00129-1)
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00851-9>
- De Bruyne, K., Camu, N., Vandamme, P., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2010). *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 1999–2005.
- de Vrese, M., & Offick, B. (2010). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. In R. Watson & V. Preedy (Eds.), *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (Vol. 137, Issue 3 Suppl 2, pp. 205–227). Academic Press.
- Dietrich, C. G., Kottmann, T., & Alavi, M. (2014). Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. *World*

- Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15837. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15837>
- Elmundocr. (2018, October 8). *Quesos y leches concentran el 88% de las exportaciones de lácteos en Centroamérica*. Elmundocr. <https://www.elmundo.cr/economia-y-negocios/quesos-y-leches-concentran-el-88-de-las-exportaciones-de-lacteos-en-centroamerica/>
- Erginkaya, Z., Turhan, E. U., & Tatlı, D. (2018). Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(1), 53–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29805464>
- Espinoza-Mora, M. (2018). *Evaluación de las practicas actuales de formulación, procesamiento, manejo y del efecto de la acidificación sobre la reducción de patógenos y el aseguramiento de la inocuidad de leche agria artesanal producida en Costa Rica*. Universidad de Costa Rica.
- European Commission. (2003). *On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed / food and feed / food production*. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out178_en.pdf
- FAO/OMS. (2016). *Statistical aspects of microbiological criteria related to foods: a risk managers guide*. www.fao.org/food/food-safety-quality
- FAO/WHO. (2006). *Probiotics in Food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation* (pp. 413–426). World Health Organization /Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M.-H., Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2005). pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008–6013.
- FDA. (2016). Laboratory Methods - BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Laboratory Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.12.009>
- Felis, G., & Dellaglio, F. (2014). *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. October 2007.
- Fernandes, M. S., Cruz, A. G., Dias Arroyo, D. M., Faria, J. de A. F., Cristianini, M., & Sant'Ana, A. S. (2013). On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and

- product's functionality. *Food Control*, 34(2), 331–335.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.040>
- Flórez, A., & Mayo, B. (2017). Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02608>
- Flórez, A., Delgado, S., & Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1139/w04-114>
- Food Safety Gov. (2017). *Salmonella*. U.S. Department of Health and Human Services.
<https://espanol.foodsafety.gov/intoxicación/causas/bacteriasvirus/salmonella/3d2g/índice.html>
- Food Safety Gov. (2018). *Listeria*. U.S. Department of Health and Human Services.
<https://espanol.foodsafety.gov/intoxicación/causas/bacteriasvirus/listeria/vb2/índice.html>
- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>
- Fromage, G. (2013). Structure and medical uses of antibiotics: erythromycin and co-amoxiclav. *Journal of Aesthetic Nursing*, 2(4), 184–188.
<https://doi.org/10.12968/joan.2013.2.4.184>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2666378>
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., & Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue MAR, p. 155). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2011). Biological control of pathogens and post-processing spoilage microorganisms in fresh and processed fruit and vegetables. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*, 403–432.

<https://doi.org/10.1533/9780857090522.3.403>

- García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2018). Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. In *Science* (Vol. 361, Issue 6408). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aat2456>
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, *44*(2014 SRC-BaiduScholar FG-0), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015>
- García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., Henríquez, K., Karlyshev, A., Villena, J., & González, C. (2017). Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, *25*, 75–83.
- Giannella, R. A., Washington, O., Gemski, P., & Formal, S. B. (1973). Invasion of HeLa Cells by *Salmonella typhimurium*: A Model for Study of Invasiveness of *Salmonella*. *Journal of Infectious Diseases*, *128*(1), 69–75. <https://doi.org/10.1093/infdis/128.1.69>
- Gilliland, S. E. (2002). *Technological and Commercial Application of Lactic acid bacteria: Health and Nutritional benefits in dairy products.* (pp. 1–15). <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Gilli.pdf>
- Góngora, H. G., Ledesma, P., Valvo, V. R. L., Ruiz, A. E., & Breccia, J. D. (2012). Screening of lactic acid bacteria for fermentation of minced wastes of Argentinean hake (*Merluccius hubbsi*). *Food and Bioproducts Processing*, *90*(4), 767–772.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, *67*(3), 207–216. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00440-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00440-8)
- Gould, G. (2009). Preservation principles and new technologies. In C. Blackburn & P. McClure (Eds.), *Foodborne Pathogens* (Vol. 21, pp. 547–580). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845696337.2.547>
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products.

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302.
- Gueimonde, M., & Sánchez, B. (2012). Enhancing probiotic stability in industrial processes. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 23(0), 2–5.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUL), 202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Guo, Y., Logan, H. L., Glueck, D. H., & Muller, K. E. (2013). Selecting a sample size for studies with repeated measures. *BMC Medical Research Methodology*, 13(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-13-100>
- Gutiérrez-Cortés, C., Suárez, H., Buitrago, G., & Díaz-Moreno, C. (2017). Isolation and evaluation of the antagonist activity of lactic acid bacteria in raw cow milk. *Agronomía Colombiana*, 35(3), 357–364. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.63911>
- Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1992). Probiotics: A General View. In *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* (pp. 151–170). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_6
- Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39–51. <https://doi.org/459294>
- Hernández-Alcántara, A. M., Wachter, C., Llamas, M. G., López, P., & Pérez-Chabela, M. L. (2018). Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 249–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.063>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & U, S. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
- Hudzicki, J. (2013). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. In *American Society for Microbiology* (pp. 1–25).
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic

- trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hütt, P., Shchepetova, J., Lõivukene, K., Kullisaar, T., & Mikelsaar, M. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1324–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02857.x>
- Imperial, I. C. V. J., & Ibane, J. A. (2016). Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1983. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01983>
- INCIENSA. (2014). *Informe de vigilancia basada en laboratorio: Salmonella, Costa Rica, 2013*. <http://www.inciensa.sa.cr>
- Isolauri, E., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Jackson, R. S., & Jackson, R. S. (2000). Fermentation. *Wine Science*, 281–354. <https://doi.org/10.1016/B978-012379062-0/50008-1>
- Janković, T., Frece, J., Abram, M., & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 19–24. <https://journal.institut-isi.si/aggregation-ability-of-potential-probiotic-lactobacillus-plantarum-strains/>
- Jensen, H., & Science, F. (2014). *In vitro characterization of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria : interactions with human cells*.
- Jonganurakkun, B., Wang, Q., Xu, S. H., Tada, Y., Minamida, K., Yasokawa, D., Sugi, M., Hara, H., & Asano, K. (2008). *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1), 69–73.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In P. Sneath, S. Mair, M. Sharpe, & J. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9th ed., pp. 1063–1065).
- Kang, H., Oh, Y. J., Ahn, K. S., Eom, H. J., Han, N. S., Kim, Y. B., & Sohn, N. W. (2009). *Leuconostoc citreum* HJ-P4 (KACC 91035) regulates immunoglobulin E in an ovalbumin-induced allergy model and induces interleukin-12 through nuclear factor-kappa B and p38/c-Jun N-terminal kinases signaling in macrophages. *Microbiology and Immunology*, 53(6), 331–339.

- Kang, J., Chung, W.-H., Lim, T.-J., Whon, T. W., Lim, S., & Nam, Y.-D. (2017). Complete Genome Sequence of *Lactobacillus casei* LC5, a Potential Probiotics for Atopic Dermatitis. *Frontiers in Immunology*, 8, 413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00413>
- Khalili, L., Alipour, B., Asghari Jafar-Abadi, M., Faraji, I., Hassanalilou, T., Mesgari Abbasi, M., Vaghef-Mehrabany, E., & Alizadeh Sani, M. (2019). The effects of *Lactobacillus casei* on glycemic response, serum Sirtuin1 and Fetuin-A levels in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: a randomized controlled trial. *Iranian Biomedical Journal*, 23(1), 68–77. <https://doi.org/10.29252/.23.1.68>
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., & Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- Klewicki, R., & Klewicka, E. (2004). Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology Letters*, 26(4), 317–320.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7514–7516. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7514-7516.2003>
- Kullisaar, T., Mikelsaar, M., Shchepetova, J., Lo, K., & Hu, P. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2006), 1324–1332.
- Kumar, A., Sanjeev, K., Puniya, M., & Malik, R. (2015). *Fermented milk and Dairy products: an overview*. CRC Press.
- Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., Rowland, I., Heimbach, J., Bañares, S., Young, T., Nomoto, K., & Lalonde, M. (2015). Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.021>
- Latha, D. P., Reddy, S. M., Youn, K. S., & Ravindra, P. (2015). Starter culture technology:

- Fermented foods. In *Advances in Bioprocess Technology* (pp. 435–454). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17915-5_21
- Lavasani, S., Dzhambazov, B., Nouri, M., Fåk, F., Buske, S., Molin, G., Thorlacius, H., Alenfall, J., Jeppsson, B., & Weström, B. (2010). A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS ONE*, 5(2), e9009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009009>
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1303–1315.
- Lee, Y.-K., & Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 241–245.
- Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviefhaus, M., Clingenpeel, S., Herrera Paredes, S., Miao, J., Wang, K., Devescovi, G., Stillman, K., Monteiro, F., Rangel Alvarez, B., Lundberg, D. S., Lu, T. Y., Lebeis, S., Jin, Z., McDonald, M., Klein, A. P., Feltcher, M. E., Rio, T. G., ... Dangl, J. L. (2018). Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature Genetics*, 50(1), 138–150. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0012-9>
- Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., Lê, S., Mounier, J., Valence, F., & Coton, E. (2018). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., & Lv, J. (2013). Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control*, 34(2), 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.023>
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Li, Y. Q., Tian, W. L., & Gu, C. T. (2020). *Weissella sagaensis* sp. Nov., isolated from traditional Chinese yogurt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2485–2492. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004062>
- Little, A. E. F., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2008). Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annual*

- Review of Microbiology*, 62(1), 375–401.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Lourenço, F. R., & Pinto, T. de J. A. (2011). Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 573–584.
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300015>
- Ly, K. T., & Casanova, J. E. (2007). Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2103–2111. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00992.x>
- Macfarlane, G. T., & Cummings, J. H. (2002). Probiotics, infection and immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 15(5), 501–506.
- Mardalena, S. S., & Erina, S. (2016). Molecular characteristics and identification of lactic acid bacteria of pineapple waste as probiotics candidates for ruminants. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(6), 519–523. <https://doi.org/10.3923/pjn.2016.519.523>
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., & Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91–98.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.536522>
- Masoumikia, R., & Ganbarov, K. (2015). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against human enteropathogenic bacteria in homemade tvorog curd cheese from Azerbaijan. *BioImpacts*, 5(3), 113–115.
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281–295.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mavroudi, A. (2012). Probiotics in pediatrics – properties, mechanisms of action, and indications. In *Probiotics*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50043>
- McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl 2), S85–S90.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ054>
- Mesquita, A. R. C. de, Silveira, L. P. da M., Cruz Filho, I. J. Da, Lima, V. F. de, Silveira Filho, V. D. M., Araujo, A. A., Silva, T. L. da, Araújo, K. de F., & Macedo, L. da S. (2017). Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. *Journal of Environmental*

- Analysis and Progress*, 2(2), 115. <https://doi.org/10.24221/jeap.2.2.2017.1202.115-124>
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In *The prolongation of life: Optimistic studies* (pp. 161–183). W.Heinenmann.
- Micha, P., & Corradini, M. G. (2011). Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917–945. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.570463>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Montero Castillo, P. M., Durán Lengua, M., & Díaz Caballero, A. (2015). Antagonistic action of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* in cheese from Mompox - Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 68(2), 7721–7727.
- Müller, E., & Radler, F. (1993). Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiologica*, 38(6), 441–446. <https://doi.org/10.1007/BF02814392>
- Nagendra, P. S. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262–1277.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x>
- Nami, Y., Haghshenas, B., Abdullah, N., Barzegari, A., Radiah, D., Rosli, R., & Yari Khosroushahi, A. (2015). Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. *Journal of Medical Microbiology*, 64(2), 137–146. https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/64/2/137_jmm078923.pdf?expires=1553627209&id=id&accname=guest&checksum=EB1032EFD9F9A3FFA2547BF66B8BE221
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 3465–3472). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Norberg, S., O'Connor, P. M., Stanton, C., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2011). Altering the composition of caseicins A and B as a means of determining the contribution of specific residues to antimicrobial activity. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 77(7), 2496–2501. <https://doi.org/10.1128/AEM.02450-10>
- Oliver, S., Jayarao, B., & Almeida, R. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Path. Dis*, 2, 115–129.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*. E. Munksgaard.
- Pálmai, M., & Kiskó, G. (2003). Studies on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus casei* in mixed cultures. *Acta Alimentaria*, 32(1), 103–111. <https://doi.org/10.1556/AAlim.32.2003.1.12>
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., & Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20(6), 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- Parada, J. ., Caron, C., Madeiros, A., & Soccol, C. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*2, 50, 521–542.
- Pinar, Ş., & Yalçın, G. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Agriculture & Food*, 3(9), 451–457. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pla, M., Oltra, S., Esteban, M., Andreu, S., & Palop, A. (2015). Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *BioMed Research International*, 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/365025>
- Pot, B., Felis, G. E., Bruyne, K. De, Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. In *Lactic Acid Bacteria* (Vol. 9781444333, pp. 249–353). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch19>
- Raghavan, K. T. (2019). Antibiotic susceptibility profile of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from humans. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 17(4). <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.17.003033>
- Ranadheera, C., Vidanarachchi, J., Rocha, R., Cruz, A., & Ajlouni, S. (2017). Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67.
- Ranadheera, R., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7.
- Reid, G., & Bruce, A. W. (2002). Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic

- applications. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(s1), S77–S80. <https://doi.org/10.1086/318841>
- Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., & Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37(2), 105–118.
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Roginski, H. (2004). Fermented milks. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 2369–2375). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00456-9>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rouse, S., & van Sinderen, D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1724–1733.
- Sáez, G. D., Flomenbaum, L., & Zárate, G. (2018). Lactic acid bacteria from argentinean fermented foods: isolation and characterization for their potential use as starters for fermentation of vegetables. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 398–410. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspenger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., & Vaughan, E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. In *Gut Microbes* (Vol. 1, Issue 3, pp. 1–22). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Sanders, M. E., Shane, A., & Merenstein, D. (2016). Advancing probiotic research in humans in the United States: challenges and strategies. *Gut Microbes*, 7(2), 97–100.

- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405–440.
- Sharma, D., & Saharan, B. S. (2016). Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Reports*, 11, 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2016.05.001>
- Sharma, D., & Singh Saharan, B. (2014). Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/698713>
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>
- Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38–51. <https://doi.org/10.1111/jfs.12211>
- Shreiner, A., Kao, J., & Young, V. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinions in Gastroenterology*, 31(1), 69–75.
- Shukla, P., & Sharma, J. (2015). A Study showing antagonistic effect of *Lactobacilli casei* and *Lactobacilli sporogenesis* against some common pathogens *in vitro*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(6), 36–40.
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>
- Soleimani, N. A., Kermanshahi, R. K., Yakhchali, B., & Sattari, T. N. (2010). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, 4(20), 2169–2173.
- Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 16, Issue 1, p. 55). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>
- Sousa, M. Â. B., Farias, L. de M., de Oliveira, P. L., Silvana Moreira, J., Apolônio, A. C. M., Silvano Oliveira, J., Matos Santoro, M., Mendes, E. N., & Magalhães, P. P. (2013). Antagonistic activity expressed by *Shigella sonnei*: identification of a putative new

- bacteriocin. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(6), 724–729.
- Splittstoesser, D., Pouch, F., Ito, K., Vandezant, C., & Peterkin, P. I. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. In *American Public Health Association* (4th ed., Vol. 4, Issue 1939).
- Sutula, J., Ann Coulthwaite, L., Thomas, L. V., & Verran, J. (2013). The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 24.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tetrapak. (2017). *Fermented milk products*. Dairy Processing Handbook. <http://dairyprocessinghandbook.com/chapter/fermented-milk-products>
- Tissier, H. (1906). Treatment of intestinal infections using bacterial flora of the intestine. *Crit Rev Soc Bio*, 60, 359–361.
- Tjørve, K. M. C., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>
- Todorov, S. D., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2012). Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 973–984.
- Toh, H., Oshima, K., Nakano, A., Takahata, M., Murakami, M., Takaki, T., Nishiyama, H., Igimi, S., Hattori, M., & Morita, H. (2013). Genomic Adaptation of the *Lactobacillus casei* Group. *PLoS ONE*, 8(10), e75073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075073>
- Tsai, C. C., Hsieh, H. Y., Chiu, H. H., Lai, Y. Y., Liu, J. H., Yu, B., & Tsen, H. Y. (2005). Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.014>
- Työppönen, S., Petäjä, E., & Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 233–244.
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Bmj*, k2179.

- Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. (1992). Chapter colony count methods. In *In Compendium of microbiological examination of foods by and nd American Health Association* (Vol. 4).
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112–6124.
- Vinderola, C. G., Mocchiutti, P., & Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. In *J. Dairy Sci* (Vol. 85). American Dairy Science Association. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74129-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74129-5)
- Walstra, P., M Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology* (Second edi, pp. 551–573). Taylor & Francis. <https://biot409.files.wordpress.com/2014/02/16-dairy-science-and-technology.pdf>
- Wolupeck, H. L., Morete, C. A., DallaSanta, O. R., Luciano, F. B., Madeira, H. M. F., & Macedo, R. E. F. de. (2017). Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages. *Ciência Rural*, 47(8), 8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160966>
- Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., & Zhang, L. (2011). Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, 22(7), 1027–1031.
- Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(2), 221–229. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0050>
- Yi, E. J., Yang, J. E., Lee, J. M., Park, Y. J., Park, S. Y., Shin, H. S., Kook, M. C., & Yi, T. H. (2013). *Lactobacillus yonginensis* sp. nov., a lactic acid bacterium with ginsenoside converting activity isolated from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART9), 3274–3279.
- Yu, A. O., Leveau, J. H. J., & Marco, M. L. (2020). Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. In *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 12, Issue 1, pp. 16–29). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/1758->

2229.12794

- Yu, W., Ma, J., Chen, X., Tan, Y., Chen, P., Zhu, X., & Liu, L. (2020). Expression and purification of recombinant *Lactobacillus casei* bacteriocin and analysis of its antibacterial activity. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 301–308. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1749134>
- Zacharof, M., & Lovitt, R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56.
- Zago, M., Fornasari, M., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>.
- Zhao, H., Zhang, F., Chai, J., & Wang, J. (2020). *Lactobacillus acidophilus* reduces *Listeria monocytogenes* infection by inhibiting mitogen-activated protein kinase genes in growing rabbits. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49, 2020. <https://doi.org/10.37496/rbz4920200054>
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., & Gänzle, M. (2015). A Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7233–7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>
- Zotta, T., Ricciardi, A., Ianniello, R. G., Parente, E., Reale, A., Rossi, F., Iacumin, L., Comi, G., & Coppola, R. (2014). Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099189>

ANEXO 1: Halos de inhibición para la prueba de antagonismo por sobrecapa.

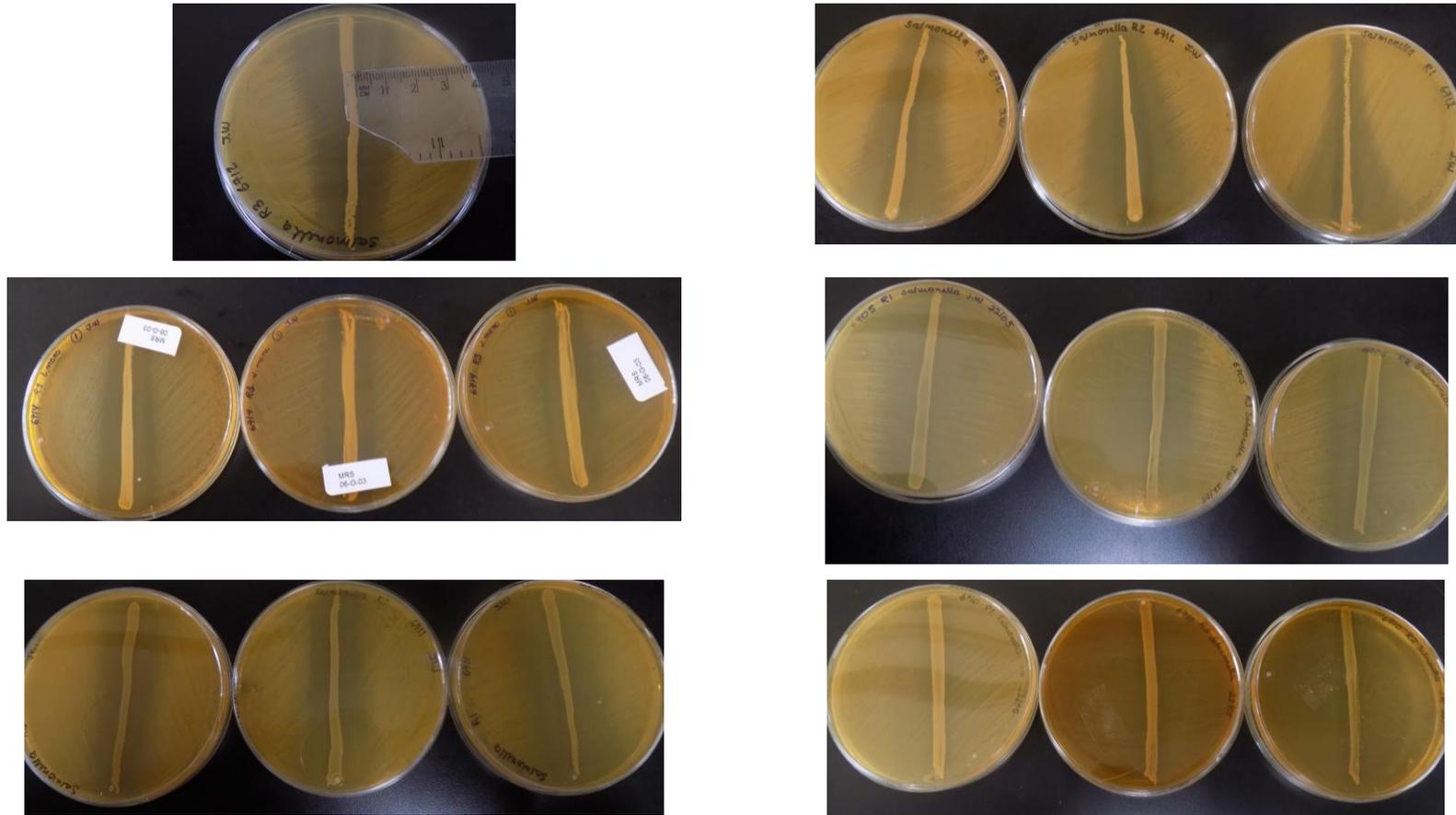


Figura 6. Fotografías de las placas y los halos de inhibición observados en *L.monocytogenes* y *Salmonella* sp. para las BAL evaluadas (nota: únicamente con carácter representativo).

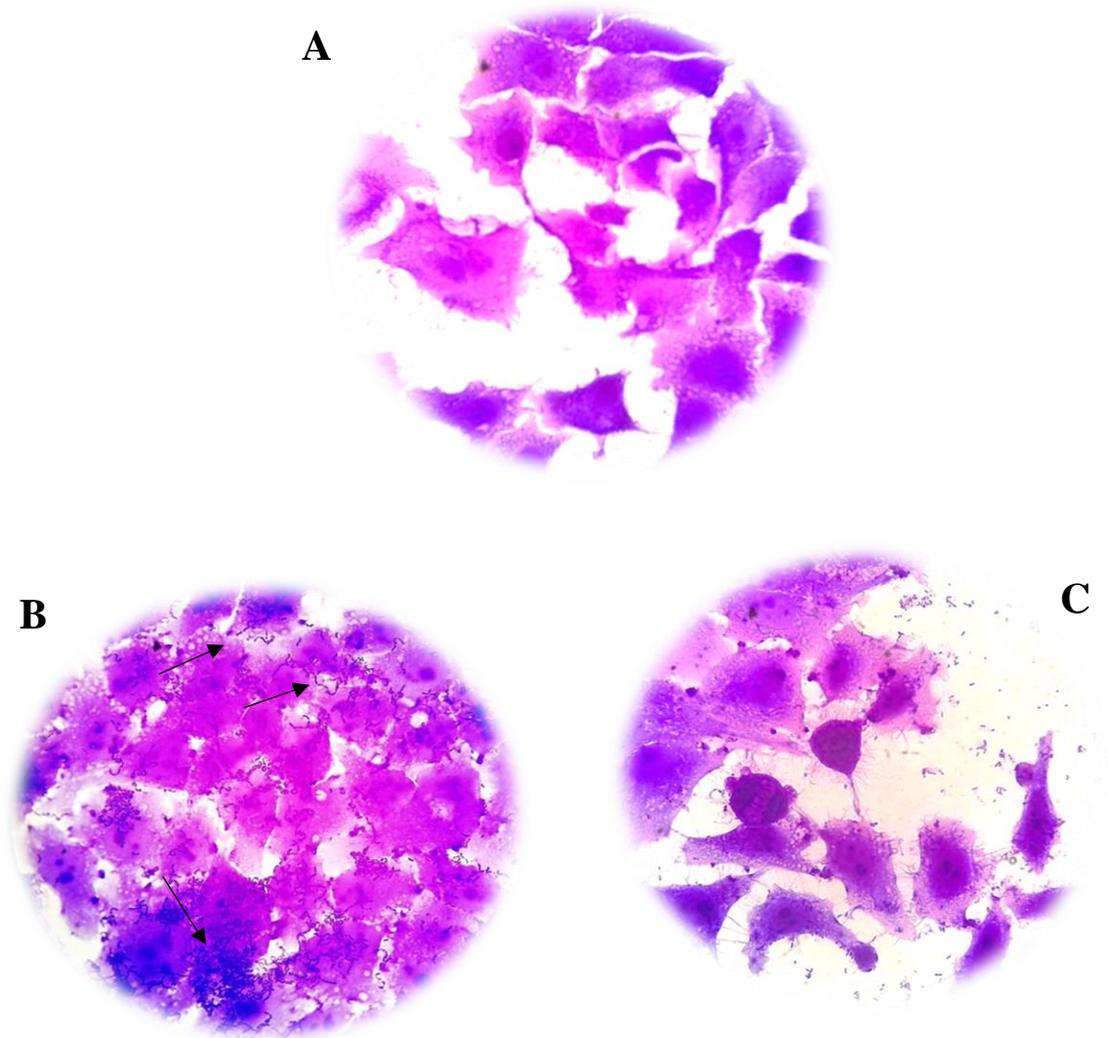
ANEXO 2: Fotografías de células adheridas sobre la superficie de las células HeLa

Figura 7. Fotografías de las células HeLa observadas en el ensayo de adhesividad, donde: (A) Control, (B) es el tratamientos con *L. casei_6714* y (C) *L. fermentum_6702*. Nótese la diferencia en la acumulación de bacterias a nivel de la superficie celular.