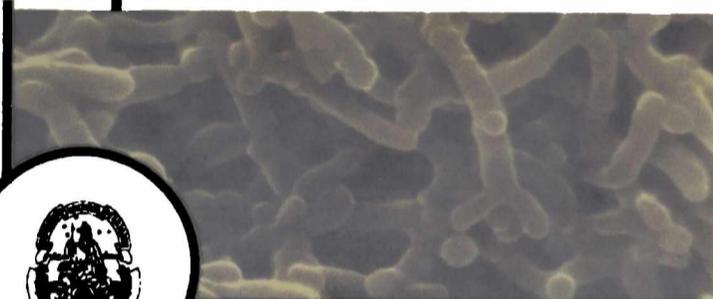
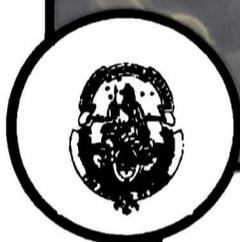


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS**  
DE *Bifidobacterium*: **ESTUDIO,**  
**SELECCIÓN DE CEPAS Y DESARROLLO**

**TESIS DOCTORAL**

**RODRIGO BIBILONI**

**DIRECTORA: Dra GRACIELA DE ANTONI**

**AÑO 2001**

*El presente trabajo, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos, bajo la dirección de la Dra. Graciela L. De Antoni*

*Cada fracaso, deberás tomarlo como principio  
de triunfo, siempre que de él extraigas el  
elemento que te faltó para vencer.*

*Carlos González Pecotche*

**Mi reconocimiento:**

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas otorgadas que permitieron el desarrollo del presente trabajo y por el apoyo económico brindado para estos estudios.

**Mi agradecimiento:**

a la Dra. Graciela De Antoni, por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación, y dirigir este trabajo de Tesis

a la Dra. María Cristina Añón, por haberme permitido realizar este trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)

a la Facultad de Ciencias Exactas, por la formación académica recibida y por el espacio para el aprendizaje de la docencia

al Dr Pablo F. Pérez, por la discusión de resultados y el diseño de experimentos

al Dr Gerardo Vasta, por haberme recibido en el Center of Marine Biotechnology de la Universidad de Maryland (USA), para desarrollar parte de los experimentos y por su aporte en la discusión de resultados

al Dr. Ronald J. Doyle, por las oportunidades ofrecidas y por su constante estímulo

a todos mis compañeros del laboratorio de Micro

a mi familia y amigos, dentro y fuera del CIDCA

... a todos ... porque un investigador no se hace solo

*Al Lolo, a quien le hubiera  
gustado participar de ésto.*

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos y capítulos de libro:

Bibiloni, R.; Sarmiento P. L. and De Antoni, G. L. 1998. An electron microscopy study of the adherence of *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 to human intestinal Caco-2 cells in vitro. *Scanning* **20**: 242-243

Bibiloni, R.; Pérez P. F. and De Antoni, G. L. 1999. Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture *Anaerobe* **5**: 483-485

Bibiloni, R.; Pérez P. F. and De Antoni, G. L. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? *Anaerobe* **5**: 519-524

Pérez, P. F.; Kociubinski G.; Gómez Zavaglia, A.; Bibiloni, R.; Minnaard, J.; Disalvo, E. A. and De Antoni G. L. Bifidobacteria from human origin: isolation, characterization and study of selected properties. (1999) *En: Tuijtelaars A. C. J., Samson R. A., Rombouts F. M. and Notermans S. (eds.) Food Microbiology and Food Safety into the Next Millenium. Chapter 12: Probiotics, págs. 853-857*

Bibiloni, R.; Pérez, P. F. and De Antoni G. L. Effect of *Bifidobacterium* on the interaction between intestinal pathogens and enterocyte-like cells. (1999) *En: Tuijtelaars A. C. J., Samson R. A., Rombouts F. M. and Notermans S. (eds.) Food Microbiology and Food Safety into the Next Millenium. Chapter 12: Probiotics, págs. 827-831*

Bibiloni R., Pérez P. F. and De Antoni, G. L. 2000. An enzymatic-colorimetric assay for the quantification of *Bifidobacterium*. *Journal of Food Protection* **63**: 322-326

Bibiloni R., Gómez Zavaglia, A. and De Antoni, G. L. 2001. Enzyme-based most probable number method for the quantification of *Bifidobacterium* in dairy products. *Journal of Food Protection* (en prensa)

Bibiloni, R., Pérez, P. F.; Garrote, G. L.; Disalvo, E. A. and De Antoni, G. L. Surface characterization and adhesive properties of bifidobacteria. (2001). *En: Doyle, R. J. (ed.) Methods in Enzymology. Vol. 336 Microbial Growth in Biofilms. Part A. Developmental and Molecular Biological Aspects. págs. 411-427.*

## ÍNDICE GENERAL

	<i>pág.</i>
Índice general.....	i
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas.....	x
<b>PREFACIO</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
¿Qué es un probiótico?.....	1
Características de los microorganismos probióticos.....	3
Propiedades tecnológicas e industriales de las bacterias probióticas.....	4
¿Qué hacen los probióticos?.....	7
El ecosistema intestinal.....	11
<i>Bifidobacterium</i> : características metabólicas y estructurales.....	12
Fundamentos de la adhesión bacteriana.....	17
Mecanismos moleculares de la adherencia.....	19
¿Cómo se adhieren los probióticos?.....	21
Metodología y modelos para el estudio de la adhesión bacteriana.....	22
Infecciones del tracto gastrointestinal.....	25
Probióticos vs. Patógenos.....	26
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	29
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b><i>Desarrollo de un método para determinación cuantitativa de Bifidobacterium</i></b>	
INTRODUCCIÓN.....	30
OBJETIVOS.....	34
METODOLOGÍA.....	35
<b>PARTE I. Determinación de aplicabilidad de la medida de actividad de F6FFC para la     cuantificación de <i>Bifidobacterium</i></b>	
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	35
Determinación de actividad de F6FFC.....	37
Determinación del complejo de absorción del complejo férrico.....	38
Relación entre la actividad enzimática y la biomasa bacteriana .....	38

Optimización de la sensibilidad del ensayo enzimático.....	39
<b>Parte II. Aplicación de la metodología desarrollada a la cuantificación de la adherencia de <i>Bifidobacterium</i> a monocapas de células epiteliales en cultivo</b>	
Preparación de las monocapas.....	39
Ensayo de adherencia de <i>Bifidobacterium</i> a Caco-2.....	40
Protocolo seleccionado para determinar la adherencia de bifidobacterias a Caco-2.....	42
Análisis estadístico.....	42
<b>Parte III. Cuantificación de <i>Bifidobacterium</i> en productos comerciales</b>	
Muestras analizadas.....	43
Determinación de <i>Bifidobacterium</i> en productos lácteos y probióticos.....	43
a) Determinación de <i>Bifidobacterium</i> en productos lácteos por medida de la actividad enzimática en forma directa.....	44
b) Determinación de <i>Bifidobacterium</i> en productos lácteos y probióticos utilizando una combinación del NMP con la medida de actividad de F6FFC.....	45
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
<b>PARTE I. Determinación de aplicabilidad de la medida de actividad de F6FFC para la cuantificación de <i>Bifidobacterium</i></b>	
Determinación del máximo de absorción del complejo férrico.....	49
Relación entre la actividad F6FFC y la biomasa bacteriana.....	50
Efecto de los pretratamientos bacterianos sobre la sensibilidad del ensayo.....	52
Efecto de la concentración de F-6-P en la actividad enzimática.....	53
<b>Parte II. Aplicación de la metodología desarrollada a la cuantificación de la adherencia de <i>Bifidobacterium</i> a monocapas de células epiteliales en cultivo</b>	
Estudio de la adherencia de <i>Bifidobacterium</i> a células Caco-2.....	55
 <b>Parte III. Cuantificación de <i>Bifidobacterium</i> en productos comerciales</b>	
a) Determinación cuantitativa de <i>Bifidobacterium</i> en productos lácteos por aplicación directa de la técnica desarrollada.....	58
b) Determinación cuantitativa de <i>Bifidobacterium</i> en productos lácteos y probióticos mediante una combinación del método del Número Más Probable con la determinación de actividad F6FFC (EB-MPN).....	62
Optimización de un medio selectivo para el crecimiento de <i>Bifidobacterium</i> .....	63
Optimización del ensayo basado en el NMP.....	64
 CONCLUSIONES.....	68
 <b>CAPITULO II.</b> <b>Estudio sistemático de las propiedades superficiales de <i>Bifidobacterium</i></b>	
 INTRODUCCIÓN.....	69
 OBJETIVOS.....	71

METODOLOGÍA.....	72
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	72
1) Propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana.....	73
2) Interacciones bacteria-bacteria.....	75
Índice de autoagregación.....	76
Tiempo de autoagregación.....	76
3) Interacciones bacteria-eritrocito.....	77
Modificación de la hemaglutinación.....	78
Inhibición de la hemaglutinación.....	78
4) Adherencia a superficies o partículas inertes o modificadas.....	80
Adherencia a partículas de <i>Sepharose</i> cubiertas con mucinas.....	80
Adherencia al vidrio.....	81
Adherencia al poliestireno.....	81
5) Adherencia a superficies biológicas. Interacción bacteria-células intestinales.....	82
Microscopía óptica.....	83
Microscopía electrónica de barrido.....	84
Ensayo enzimático. Medida de actividad de F6FFC.....	85
6) Caracterización química de la superficie bacteriana.....	85
7) Estudio de proteínas superficiales.....	86
Extracción de proteínas superficiales.....	86
Obtención de proteínas totales solubles.....	87
Obtención de paredes celulares.....	87
Análisis electroforético de proteínas.....	88
Cuantificación de proteínas.....	88
Observación de la superficie bacteriana por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	89
Análisis estadístico.....	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
Cinética de crecimiento en medio líquido.....	92
Índice de autoagregación (IA).....	95
Tiempo de autoagregación (TA).....	97
Hidrofobicidad superficial.....	99
Hemaglutinación (HA).....	107
Adherencia a superficies o partículas inertes o conjugadas.....	113
Adherencia a partículas de <i>Sepharose</i> .....	114
Adherencia a poliestireno.....	115
Adherencia al vidrio.....	117
Adherencia a superficies biológicas.....	118
Adherencia a células Caco-2 en cultivo.....	118
Desarrollo de una técnica para observar la topología de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2.....	125
Resumen de las propiedades superficiales.....	128

Estudio de proteínas superficiales.....	130
CONCLUSIONES.....	134
<b>CAPITULO III</b>	
<b>Actividad probiótica de Bifidobacterium: competencia con patógenos intestinales</b>	
INTRODUCCIÓN.....	136
OBJETIVOS.....	139
METODOLOGÍA.....	140
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	140
Determinación de la relación entre DO <sub>600</sub> y UFC/ml para bacterias patógenas.....	141
1) Caracterización de la adherencia y capacidad invasiva de bacterias patógenas en el modelo Caco-2.....	141
Determinación de la concentración bactericida de gentamicina.....	142
Ensayo de adherencia e invasión.....	142
2) Efecto de bifidobacterias sobre asociación de patógenos a células epiteliales en cultivo.....	143
3) Efecto de bifidobacterias sobre la invasión de patógenos a células epiteliales en cultivo.....	144
Microscopía electrónica de barrido.....	146
Ensayos de coagregación bacteriana.....	146
4) Evaluación de daño celular o citotoxicidad.....	147
Reacción del MTT.....	147
Tinción de cristal violeta.....	148
Análisis estadístico.....	148
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	149
1) Caracterización de bacterias patógenas.....	149
Estudio de la adherencia e invasividad de bacterias enteropatógenas.....	152
2) Efecto de bifidobacterias sobre la asociación de patógenos a células epiteliales en cultivo.....	155
Efecto de la incubación de <i>Bif. bifidum</i> 537 sobre la asociación e invasión de <i>S. enterica</i> .....	155
Efecto de la incubación de <i>Bif. bifidum</i> 5310 sobre la asociación e invasión de <i>S. enterica</i> .....	160
Estudio de diferentes factores en el efecto de bifidobacterias sobre patógenos.....	162
a) Efecto del medio de cultivo.....	162
b) Efecto de tratamientos térmicos.....	164
3) Estudio de la exclusión con otras cepas patógenas.....	167
4) Determinación de citotoxicidad o daño celular.....	170
CONCLUSIONES.....	176
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>177</b>

Indice

<b>APÉNDICES</b> .....	179
<b>REFERENCIAS</b> .....	194

## INDICE DE FIGURAS

	<i>pág.</i>
<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	
<b>Figura 1</b> Estrategia para la selección de cepas probióticas .....	6
<b>Figura 2</b> Metabolismo de hidratos de carbono para <i>Bifidobacterium</i> .....	15
<b>Figura 3</b> Sistemas modelo empleados comúnmente en el estudio de la adhesión de microorganismos .....	23
<b>Figura 4</b> Agentes etiológicos más importantes en las infecciones gastrointestinales humanas .....	25
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figura 1</b> Determinación de bifidobacterias en productos lácteos (I) .....	45
<b>Figura 2</b> Determinación de bifidobacterias en productos lácteos (II) .....	46
<b>Figura 3</b> Aspecto visual de la reacción enzimática de la F6FFC .....	49
<b>Figura 4</b> Espectro de absorción del complejo coloreado, producto final de la reacción de F6FFC .....	50
<b>Figura 5</b> Actividad de la F6FFC bacteriana como función de la biomasa para diferentes cepas de bifidobacterias .....	51
<b>Figura 6</b> Aspecto visual de las curvas de calibración de las cepas de bifidobacterias .....	51
<b>Figura 7</b> Efecto de Triton X-100 y sonicación en la determinación de actividad de F6FFC .....	52
<b>Figura 8</b> Actividad de la F6FFC en función de la biomasa utilizando Triton X-100 en la mezcla de reacción .....	53
<b>Figura 9</b> Ensayo de F6FFC como función de la concentración de fructosa-6-fosfato .....	54
<b>Figura 10</b> Adherencia de bifidobacterias de origen humano a células de la línea Caco-2 .....	57
<b>Figura 11</b> Cuantificación de bifidobacterias mediante el ensayo EB-MPN y recuento de viables en medio MRS .....	62
<b>Figura 12</b> Resultados obtenidos con el método EB-MPN en productos lácteos .....	65
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Figura 1</b> Adhesión de <i>Streptococcus cricetus</i> AHT a hexadecano .....	75
<b>Figura 2</b> Aspecto macroscópico de bifidobacterias autoagregantes y no-autoagregantes .....	91
<b>Figura 3</b> Aspecto microscópico de bifidobacterias autoagregantes y no-autoagregantes .....	90
<b>Figura 4</b> Comportamiento cinético de las bifidobacterias crecidas en medio MRS y en TPY .....	92
<b>Figura 5</b> Cosecha máxima de bifidobacterias en diferentes medios .....	94
<b>Figura 6</b> Perfil de sedimentación para la cepa <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310 .....	97-98
<b>Figura 7</b> Representación de la relación entre el IA y TA .....	99
<b>Figura 8</b> Adhesión de <i>Bif. breve</i> CIDCA 532 y <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537 a hexadecano .....	100

<b>Figura 9</b>	Cinética de primer orden para la adhesión de bifidobacterias a hexadecano	101-104
<b>Figura 10</b>	Adherencia de bifidobacterias crecidas en MRS a mucinas comerciales	114
<b>Figura 11</b>	Adherencia de bifidobacterias crecidas en MRS a poliestireno	116
<b>Figura 12</b>	Adherencia de bifidobacterias crecidas en TPY a poliestireno	117
<b>Figura 13</b>	Adherencia de bifidobacterias a Caco-2 por microscopía óptica	119
<b>Figura 14</b>	Adherencia de bifidobacterias a células Caco-2 por medida de actividad de F6FFC	119
<b>Figura 15</b>	Efecto en la adherencia a Caco-2 de diferentes tratamientos sobre las bifidobacterias	121
<b>Figura 16</b>	Microscopía electrónica de barrido de las células Caco-2	125
<b>Figura 17</b>	Microscopía electrónica de barrido de bifidobacterias	126
<b>Figura 18</b>	Microscopía electrónica de barrido de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2	127
<b>Figura 19</b>	SDS-PAGE de proteínas totales de lactobacilos y bifidobacterias. Efecto del LiCl	130
<b>Figura 20</b>	SDS-PAGE de proteínas totales de bifidobacterias. Efecto del GnCl	131
<b>Figura 21</b>	SDS-PAGE de proteínas de paredes celulares de bifidobacterias	132

**CAPÍTULO III**

<b>Figura 1</b>	Adhesión e invasión de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2	152
<b>Figura 2</b>	Asociación (adherencia + invasión) de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2	152
<b>Figura 3</b>	Invasión de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2	153
<b>Figura 4</b>	Asociación de <i>Salmonella enterica</i> a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537	155
<b>Figura 5</b>	Asociación% e Invasión% de <i>S. enterica</i> a monocapas de células Caco-2. Efecto de <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537	156
<b>Figura 6</b>	Asociación de <i>Salmonella enterica</i> a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537	157
<b>Figura 7</b>	Asociación% e Invasión% de <i>S. enterica</i> a monocapas de células Caco-2. Efecto de <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537	158
<b>Figura 8</b>	Ensayos de coagregación con <i>S. enterica</i> y bifidobacterias	159
<b>Figura 9</b>	Asociación de <i>Salmonella enterica</i> a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	160
<b>Figura 10</b>	Asociación% e Invasión% de <i>S. enterica</i> a monocapas de células Caco-2. Efecto de <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	161
<b>Figura 11</b>	Ensayos de coagregación con <i>S. enterica</i> y <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	162
<b>Figura 12</b>	Asociación% de <i>S. enterica</i> a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310 crecida en MRS o TPY	163
<b>Figura 13</b>	Invasión% de <i>S. enterica</i> a células Caco-2 preincubadas	165

	con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310 crecida MRS o TPY	
<b>Figura 14</b>	Asociación de <i>S. enterica</i> a Caco-2 y competencia con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537 tratada térmicamente	.....165
<b>Figura 15</b>	Estudios de coagregación de <i>S. enterica</i> con bifidobacterias frescas y tratadas térmicamente	.....166
<b>Figura 16</b>	Asociación de enteropatógenos a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	.....167
<b>Figura 17</b>	Invasión de enteropatógenos a Caco-2 preincubadas con <i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	.....168
<b>Figura 18</b>	Microscopía electrónica de barrido de Caco-2 incubadas con salmonelas	.....171
<b>Figura 19</b>	Cuantificación de citotoxicidad en células Caco-2 por MTT	.....173
<b>Figura 20</b>	Ensayo de MTT con bacterias patógenas y bifidobacterias	.....173
<b>Figura 21</b>	Ensayo de citotoxicidad revelado con cristal violeta	.....174
<b>Figura 22</b>	Ensayo de citotoxicidad con cantidades crecientes de bifidobacterias con cristal violeta	.....175

## ABREVIATURAS y SIGLAS

ADN.....	ácido desoxirribonucleico
amb.....	ambiente
ALT.....	ácidos lipoteicoicos
ARN .....	ácido ribonucleico
BSA.....	seroalbúmina bovina
BSM.....	mucina de glándula submaxilar bovina
CFA.....	colonization factor antigen
CME.....	componentes de matriz extracelular
CV.....	crystal violeta
DVS.....	divinil sulfona
DO.....	densidad óptica
etc.....	etcétera
F6FFC.....	fructos-6-fosfato fosfocetolasa
<i>g</i> .....	campo gravitatorio
GKN.....	glucosa-K-Na
GnCl.....	cloruro de guanidinio
HA.....	hemaglutinación
hs.....	horas
IA.....	índice de agregación
Ig.....	inmunoglobulina
k.....	constante de remoción
K.....	coeficiente de remoción
MEB.....	microscopía electrónica de barrido
MET .....	microscopía electrónica de transmisión
MTT.....	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
min.....	minutos
nd.....	no determinada
NMP.....	número más probable
PSM.....	mucina de estómago porcino
Rto.....	rendimiento
seg.....	segundos
T.....	temperatura
TA.....	tiempo de agregación
UFC.....	unidades formadoras de colonias
Ui.....	unidades enzimáticas

## PREFACIO

El creciente interés funcional y comercial de los productos probióticos fue la motivación de este trabajo de Tesis que estudiará aspectos microbiológicos, propiedades relacionadas y herramientas para la cuantificación de microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium*, uno de los géneros actualmente utilizados en la formulación de probióticos.

Este trabajo consta de una Introducción que contiene una reseña histórica del concepto de probiótico y los criterios de selección de microorganismos para la formulación de productos. Se describirán aspectos tecnológicos y fisiológicos asociados a esta selección, detallando particularmente los conocimientos y evidencias científicas actuales de dos de ellos: la adherencia a epitelio intestinal y la competencia con microorganismos enteropatógenos.

En el Capítulo I se presentará el desarrollo de un ensayo enzimático para la determinación cuantitativa de bacterias del género *Bifidobacterium*. Se detallarán las condiciones de optimización del ensayo y se demostrará su aplicabilidad en diferentes sistemas, tanto en modelos para estudios de adherencia como en la determinación de bifidobacterias en productos lácteos.

En el Capítulo II se desarrollará un estudio sistemático de las propiedades superficiales de las bifidobacterias a fin de obtener información acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la adherencia de estos microorganismos, considerada como un criterio de selección de bacterias para la formulación de probióticos.

En el Capítulo III se estudiará otro aspecto de selección de bacterias probióticas: la competencia con enteropatógenos. Se analizará el mecanismo de acción de las bifidobacterias sobre bacterias patógenas aisladas de muestras clínicas en un modelo *in vitro*, compuesto por células epiteliales en cultivo.

Finalmente se realizará una Discusión General acerca de las evidencias científicas aportadas en este trabajo de Tesis y las inquietudes para futuras investigaciones sobre probióticos.



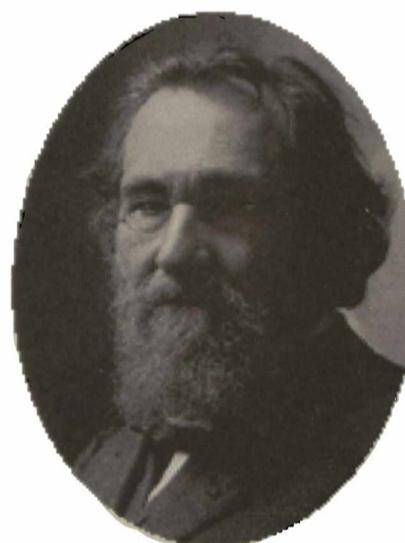
# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### *¿Qué es un probiótico?*

**H**an pasado casi cien años desde la introducción de las teorías sobre la prolongación de la esperanza de vida mediante la modulación del ecosistema intestinal. Aunque existen registros que señalan que el consumo humano de *leches fermentadas* data de hace 2000 años, sólo desde los estudios de Tissier<sup>428</sup> y Metchnikoff<sup>276</sup> en el Instituto Pasteur de París, se han establecido las bases científicas en cuanto a los estudios sobre probióticos, interpretándose más claramente las propiedades nutricionales y fisiológicas de algunas cepas probióticas. Más aún, es posible ahora afirmar que ciertas cepas son probióticas ya que se cuenta con ejemplos documentados de su habilidad para mantener y promover efectos saludables en el hospedador<sup>244</sup>.

Así como la investigación clínica en este aspecto ha progresado, también se ha observado cierto desarrollo relacionado al mejoramiento de



*Elie Metchnikoff (1845-1916)*

la estabilidad de probióticos en productos lácteos. Mientras que el mercado japonés es probablemente el más adelantado, un progreso significativo se ha obtenido en América, Europa, Australasia y en los países en vías de desarrollo en la última década. Con dicha estabilidad optimizada y sus efectos probióticos confirmados, estamos en condiciones de considerar a las bacterias probióticas como ingredientes funcionales de

alimentos y bebidas. El término *probiótico* dejó de ser extraño para los consumidores. Un ejemplo muy convincente lo ofrece la Internet. Tipeando palabras como "probióticos" o "acidophilus" en PubMed o en algún buscador (Yahoo, Excite), en pocos segundos aparece una abundante cantidad de información sobre los últimos años de todas partes del mundo. Según la revista Newsweek y Time la medicina moderna estaría saliendo de la "Era de los Antibióticos" para ingresar a la "Era de los Probióticos", concentrándose en la bioterapéutica<sup>238</sup>.

*Probiótico* es un cultivo monomicrobiano o polimicrobiano que administrado a hombres o animales produce un efecto beneficioso mejorando las propiedades de la flora indígena. La palabra *probiótico* deriva del griego que significa *para la vida* y ha tenido varios significados a lo largo de los últimos años. Primero se utilizó para describir *sustancias secretadas por un microorganismo que estimulaban el crecimiento de otro*, como un antónimo de antibiótico<sup>248</sup>. Esta acepción no perduró, y más tarde se utilizó para describir *extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento microbiano*<sup>410</sup>. Hacia mediados de la década del 70, ya se le dio una connotación más amplia: *organismos o sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal*<sup>321</sup>. En un intento de mejorar esta definición, Fuller<sup>137</sup> redefinió el concepto como *suplemento alimentario microbiano vivo que afecta benéficamente al hospedador mejorando el balance microbiano intestinal*, puntualizando aquí la importancia de la viabilidad del probiótico. Sin embargo, se han obtenido evidencias de inhibición de la adherencia de Gram (-) a células uroepiteliales por extractos celulares aislados de lactobacilos del tracto urinario<sup>57</sup>. Más recientemente se ha demostrado que componentes

de bajo peso molecular de la pared celular, liberados durante la lisis de *Lb. fermentum*, inhiben la adherencia de *E. coli* K88 al mucus porcino<sup>319</sup>.

Romond y col.<sup>352</sup>, inoculando ratones convencionales con sobrenadantes de sueros fermentados con cepas de bifidobacterias, encontraron que existen factores abióticos producidos durante la fermentación (diferentes de los ácidos acético y láctico) que inhibieren esporas de clostridios y *Bacteroides fragilis*. En consecuencia, la administración de bacterias vivas parece no ser necesaria para influir en el ecosistema intestinal.

Recientemente Naidu y col.<sup>298</sup> completaron el concepto de probiótico redefiniéndolo como *adyuvante dietario microbiano que afecta benéficamente la fisiología del hospedador mediante la modulación de la inmunidad sistémica y de mucosas y mejorando el balance nutricional y microbiano del tracto gastrointestinal*. Sin embargo, considerando que se ha determinado experimentalmente que un probiótico también puede ejercer su acción en el tracto urogenital, oral y respiratorio según el tipo de microorganismo y modo de administración, esta última definición sigue siendo incompleta. Por esta razón, se propuso el término de *sustancia probióticamente activa* para indicar *complejos celulares de bacterias probióticas que poseen la capacidad de interactuar con la mucosa del hospedador y que puede modular benéficamente el sistema inmune independientemente de su viabilidad*<sup>298</sup>.

Durante los últimos años han empezado a cobrar importancia las sustancias *prebióticas*. Se trata de *ingredientes alimentarios no digeribles*

que afectan positivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando consecuentemente la salud del hospedador<sup>150</sup>. Para que un ingrediente alimentario pueda ser clasificado como prebiótico debe (1) no ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal; (2) ser sustrato selectivo para una o para un limitado número de bacterias benéficas comensales del colon, cuyo crecimiento y actividad metabólica serán

estimulados; (3) en consecuencia, alterar la microflora colónica hacia una composición más beneficiosa; y (4) inducir efectos sistémicos o en el lumen intestinal que sean beneficiosos para el hospedador. Los candidatos son hidratos de carbono no digeribles (oligo- y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas, y ciertos lípidos, que debido a su estructura química no pueden ser absorbidos en la parte superior del intestino o hidrolizados por enzimas digestivas humanas.

### **Características de los microorganismos probióticos**

Los requerimientos básicos para la selección de un probiótico para tracto gastrointestinal humano comprenden tanto propiedades fisiológicas como tecnológicas y entre ellas están:

ser de origen humano, es importante que las cepas probióticas sean de origen humano debido a que los efectos producidos pueden ser específicos para la especie hospedadora;

poseer resistencia a la acidez estomacal y a la bilis duodenal, para de esta manera alcanzar en forma viable un sitio de fijación en el intestino;

presentar habilidad para colonizar el tracto intestinal humano, al menos temporariamente, requiriendo probablemente algunos mecanismos de adherencia. Las cepas adherentes se ven favorecidas para establecerse en el intestino y tener por ende, mayor capacidad probiótica;

mostrar efecto anticarcinogénico, ya sea por secuestro de sustancias carcinogénicas o por inhibición de flora productora;

mostrar antagonismo frente a microorganismos patógenos por producción de sustancias antimicrobianas, por exclusión competitiva por sitios de adhesión en el intestino o por competencia por nutrientes;

deben ser seguras para la ingestión humana poseyendo el status de GRAS (*generally recognized as safe*) y testeadas clínicamente en cuanto a sus efectos sobre la salud;

presentar capacidad para ser preparado como producto viable en escala industrial;

permanecer viable por períodos largos durante el almacenamiento del producto.

En este sentido, la selección de cepas para probióticos debe basarse en las propiedades ya

mencionadas y que las mismas se expresen en el hospedador receptor. Sin embargo, este último evoluciona por necesidad desarrollando mecanismos de defensa para evitar el establecimiento de bacterias exógenas (acidez gástrica, enzimas digestivas, ácidos biliares). Los intentos de incrementar el número de bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal por su ingestión usualmente resulta en un leve pero no persistente aumento en el contenido de bacterias lácticas<sup>39,332</sup>. Además, grandes cantidades de bacterias lácticas no logran mejorar la malabsorción de lactosa en individuos intolerantes a la lactosa aunque hayan alcanzado el colon<sup>196</sup>.

Una de las formas más importantes en las que un probiótico para tracto gastrointestinal puede ejercer un efecto benéfico sobre el hospedador es modificando los procesos metabólicos que ocurren en el intestino. Tales efectos pueden lograrse en

teoría por una variedad de mecanismos:

- suprimiendo reacciones que resultan en la generación de metabolitos tóxicos o carcinogénicos;
- estimulando reacciones enzimáticas involucradas en la detoxificación de sustancias potencialmente patógenas ingeridas directamente o generadas en forma endógena;
- estimulando enzimas relacionadas con la digestión de nutrientes complejos;
- proveyendo enzimas bacterianas cuando por defectos genéticos las correspondientes en el hospedador están ausentes; o
- sintetizando vitaminas u otros nutrientes esenciales suministrados deficientemente en la dieta.

### ***Propiedades tecnológicas e industriales de las bacterias probióticas***

A nivel industrial la obtención de concentrados bacterianos para la producción de probióticos implica contar con cepas apropiadas para ejercer su acción probiótica (instalarse en el organismo y producir su acción benéfica para la salud), y tecnologías para su producción a gran escala y conservación.

El primer punto es de fundamental importancia ya que no cualquier cepa será capaz de establecerse en el tracto gastrointestinal. Para que

ello ocurra, la cepa deberá poseer determinadas características estructurales y metabólicas ya comentadas. La selección de cepas del mismo habitat natural que se desea colonizar garantizaría el poder de adaptación que se busca<sup>405</sup>.

Por otra parte, dichas cepas deberán tener la propiedad de resistir los procesos tecnológicos requeridos para su producción masiva. Una de las primeras etapas en la producción de probióticos es el cultivo a gran escala, lavado y secado de

microorganismos. La mayoría de las bacterias lácticas pueden ser cultivadas en fermentadores a gran escala y son relativamente resistentes a la centrifugación. En general, las bacterias lácticas pueden resistir el congelamiento y la conservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o temperaturas menores<sup>177</sup>, pero son menos resistentes a la liofilización y en especial al secado en *spray*. La viabilidad de las bacterias lácticas disminuye dramáticamente durante el pelleteo, por lo tanto la preservación o implementación de medidas de protección deben ser garantizadas durante la producción. También es posible que surjan contaminaciones con microorganismos indeseados. Finalmente es necesario que estos productos contengan un nivel suficiente de bacterias viables ( $10^9$ - $10^{10}$  microorganismos viables/100 g de producto) para lograr aquellas concentraciones que resulten fisiológicamente activas *in vivo* ( $10^6$ - $10^7$  microorganismos viables/g contenido intestinal). En síntesis, las propiedades tecnológicas que se buscan en una cepa probiótica son:

la resistencia a las condiciones de crecimiento y concentración en gran escala;

la resistencia a la liofilización y el secado (para el caso que corresponda);

mantenimiento de buen perfil de aroma, *flavor* y propiedades organolépticas;

mantenimiento de estabilidad y propiedades de colonización durante el período de conservación;

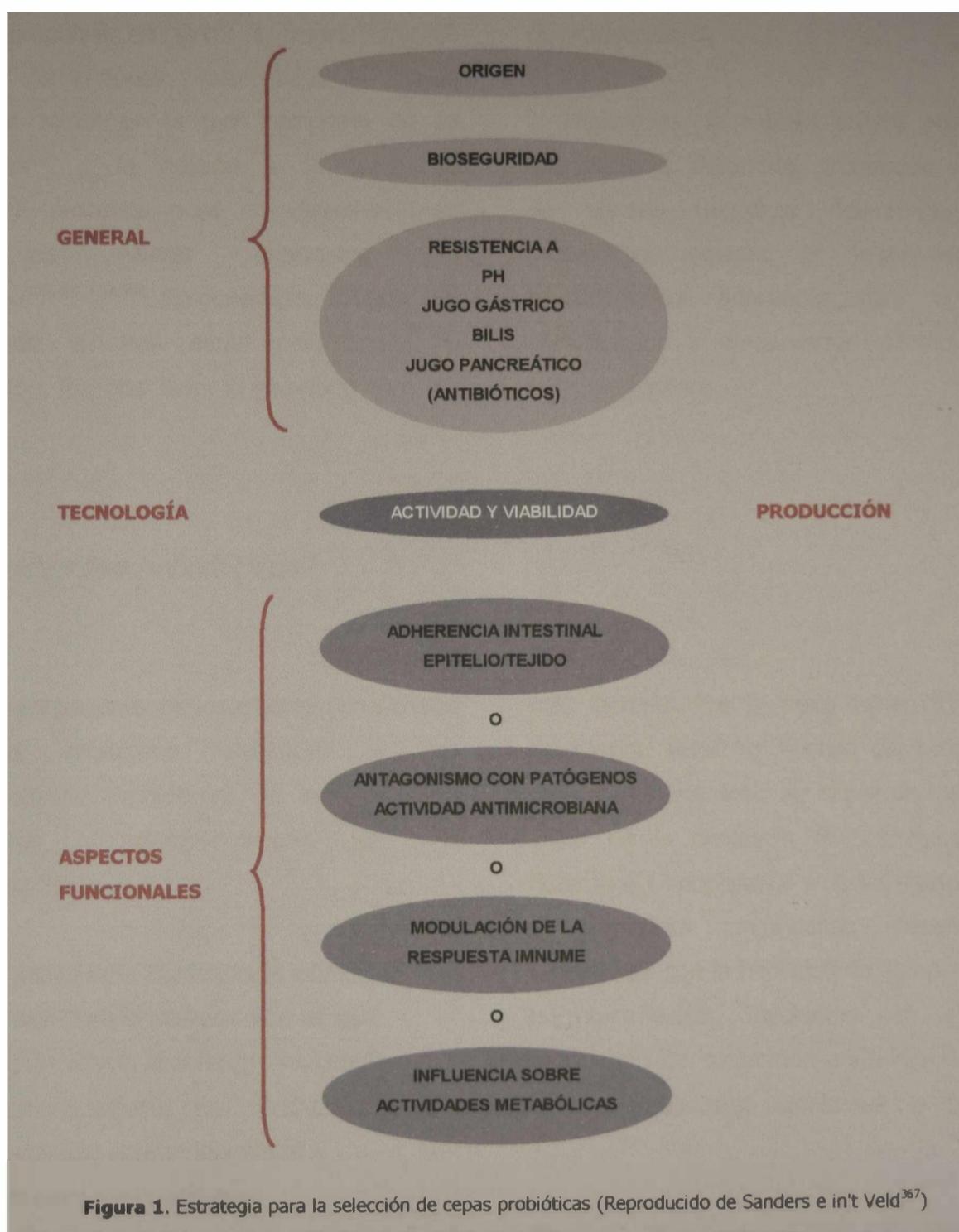
Cada una de estas características implica una tarea de relevamiento de un gran número de cepas aisladas de habitats naturales, en este caso el intestino humano, y un estudio bioquímico y fisicoquímico de los componentes que determinan ese comportamiento.

En general, no se puede asumir que las actividades observadas en una cepa probiótica vayan a ser las mismas que para otra cepa, aún para el mismo género y especie. Esto no es difícil de imaginar considerando el gran espectro de resultados observados en ensayos *in vitro*. Esta propiedad cepa-dependiente del carácter probiótico justifica los esfuerzos para identificar la mejor cepa o la combinación de cepas para objetivos específicos. Un esquema que permite decidir sobre la selección de cepas probióticas en base a bioseguridad, métodos de producción y procesamiento y métodos de administración, podría ser el esquema representado en la Figura 1.

Entre las bacterias acidolácticas más comúnmente utilizadas como probióticos se pueden mencionar las cepas de los géneros *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subesp. *delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*), *Bifidobacterium* (*Bif. adolescentis*, *Bif. animalis*, *Bif. bifidum*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *Bif. thermophilum*) y *Streptococcus* (*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*). También se han utilizado con éxito bacterias pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* y *Bacillus*. En probióticos animales se han utilizado levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pintolopesii*) y hongos (*Aspergillus niger*).

Las formas de presentación de un probiótico son en general, en forma liofilizada, en pastillas, cápsulas o como producto fermentado;

administrado por ingestión directa o mezclado en los alimentos y el agua. En especial, un gran número de productos alimenticios han sido



empleados o están en proceso de desarrollo con el objeto de servir como vías de comercialización de microorganismos probióticos para consumo humano y de animales. Estos incluyen leches

fermentadas<sup>282,418</sup>, yogures<sup>350</sup>, yogures helados<sup>190,291,143</sup>, quesos<sup>97,30</sup>, helados<sup>181,290</sup>, leches fermentadas a base de soja<sup>91,263</sup>, yogures a base de soja<sup>295</sup> y alimentos balanceados<sup>187,292,180,414,456</sup>.

Las leches fermentadas conteniendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son un grupo de bioproductos muy delicados. En particular, las bifidobacterias generalmente muestran un crecimiento pobre en leche e invariablemente requieren condiciones anaeróbicas<sup>338</sup>, bajos potenciales redox en la fase temprana de su crecimiento<sup>225</sup> y la adición a la leche de hidrolizados proteicos ricos en vitaminas para lograr los niveles adecuados de crecimiento<sup>450,335,116,289</sup>. En general, se los adiciona al producto en una etapa posterior a la fermentación. Por otro lado, la viabilidad de estos

dos géneros disminuye marcadamente con el almacenamiento refrigerado a bajo pH<sup>153,26,190,392</sup> y de ahí la necesidad de seleccionar adecuadamente las cepas y monitorear cuidadosamente las etapas de producción.

Finalmente, la calidad en los programas de investigación, desarrollo, producción y validación de efectos benéficos de estos productos probióticos requiere la implementación de procedimientos adecuados para la detección, identificación y enumeración diferencial de los microorganismos.

### ***¿Qué hacen los probióticos?***

Las investigaciones de los efectos beneficiosos sobre el organismo atribuidos a los microorganismos probióticos, en especial para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han encaminado hacia:

- el control de la homeostasis intestinal;
- la mejora en la utilización de lactosa;
- modulación de la defensa inmunitaria;
- el control sobre el nivel de colesterol;
- la actividad anticarcinogénica; y
- la inhibición de patógenos

Estos mecanismos de protección están ligados a la posibilidad de interactuar con el epitelio intestinal a través de estructuras de la superficie bacteriana que se discutirán más adelante. Sin embargo, la colonización por una cepa probiótica en una ecología microbiana preexistente requiere

más factores que la mera adherencia. Una vez establecida sobre la mucosa del hospedador, la cepa bacteriana debe ser capaz de reproducirse a pesar de la presencia de los mecanismos de defensa del hospedador y de las interacciones con la microflora circundante. Aquellos microorganismos con la habilidad de competir con otros microorganismos mediante por ejemplo, la producción de sustancias antimicrobianas, tienen más posibilidades de colonizar dicho ecosistema.

***Control de la homeostasis intestinal.*** La ingestión regular de leche o yogur con microorganismos probióticos es utilizada para combatir la constipación, facilitar el tránsito intestinal y combatir los problemas causados por los antibióticos sobre la flora intestinal ayudando a reestablecer su equilibrio<sup>364,152</sup>. *Bif. breve* es capaz

de colonizar efectivamente el intestino y está asociado a un aumento de peso en neonatos prematuros, probablemente como resultado de la estabilización de la flora intestinal<sup>223</sup>. Acidificando el medio intestinal este microorganismo inhibe el metabolismo oxidativa de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Clostridium*<sup>68,362</sup>. Se ha demostrado que las bacterias lácticas además de modular la microflora colónica pueden controlar la actividad de enzimas bacterianas<sup>152,9,157</sup>. Estudios con modelos animales sugieren que la administración oral de probióticos puede limitar la colonización e infección de *E. coli*<sup>32</sup>, *Candida albicans*<sup>88,335,372</sup> y *Shigella sonnei*<sup>296</sup>. Los niños con alto contenido de *Bifidobacterium* resisten a infecciones entéricas<sup>362</sup>. La administración de *Bifidobacterium* puede corregir la disfunción intestinal y mantener el balance normal de la flora intestinal<sup>89</sup>.

**Inmunomodulación.** La adición de yogur a cultivos de linfocitos provoca la síntesis de interferón  $\gamma$ ; la ingestión de bacterias de yogur liofilizadas durante 28 días aumenta la concentración proteica del suero, la frecuencia de linfocitos B y de células NK (natural killer), así como la de IgG (inmunoglobulina G) e interferón  $\gamma$ . La administración oral de bacterias lácticas incrementa la actividad fagocítica<sup>325</sup> y la producción de citoquinas<sup>85</sup> no sólo en animales sino también en humanos<sup>251,379</sup>. Numerosas publicaciones sugieren que las bacterias probióticas pueden causar efectos inmunomodulatorios generando resistencia a patógenos, comúnmente a través de la estimulación de la producción de anticuerpos. Se ha publicado que las bacterias probióticas protegen ratones contra

infecciones de patógenos gastrointestinales como *Shigella sonnei*<sup>296</sup>, *Salmonella typhimurium*, y *Escherichia coli*<sup>326,325</sup> y esta resistencia ha sido asociada a un incremento de la producción de IgA (inmunoglobulina A). *Lb. casei* y *Bif. animalis* indujeron la producción de IgA en ratones eutímicos<sup>452</sup>. Niños alimentados con leches fermentadas conteniendo *Lactobacillus* GG mostraron incremento de IgA específica contra rotavirus<sup>216,465,467</sup>. También se encontró estimulación de respuesta celular en las placas de Peyer<sup>415</sup> por *Bif. longum* administrado en forma oral, y protección contra antígenos dietarios que puedan haber escapado la digestión intestinal como la  $\beta$ -lactoglobulina, una proteína de suero generalmente ingerida en productos lácteos<sup>416</sup>. Esto último presenta a las bifidobacterias como potenciales agentes inmunomodulatorios contra la sensibilización a antígenos proteicos alimentarios. Con respecto a actividad adjuvante<sup>232,387</sup>, se publicó que el efecto del consumo de yogur en la producción de interferón  $\gamma$  fue mucho mayor con cultivos vivos que con yogures tratados térmicamente<sup>171</sup>. En otros estudios se mostró que sólo la administración de bacterias vivas y no muertas, inducían la expresión de interleuquina 12 en macrófagos, necesaria para la inducción de células T productoras de interferón  $\gamma$ <sup>408</sup>. Pero Takahashi y col.<sup>416</sup> mostraron que bifidobacterias muertas administradas en forma oral fueron capaces de incrementar la respuesta inmune de mucosas. Extractos de paredes celulares de *Bif. infantis* incrementaron hipersensibilidad tipo retardada en ratones en un modelo experimental<sup>387</sup>. Se publicó que las bifidobacterias poseen otras funciones inmunológicas e.g. actividad mitogénica, promoción del crecimiento de macrófagos<sup>381</sup>, y efectos antitumorales<sup>232,386</sup>. Si

bien la mayoría de los efectos inmunopotenciadores se focalizan a la fracción de la pared celular -peptidoglicanos y polisacáridos<sup>232,161</sup>, se encontró que *Bif. adolescentis* M101-4 tiene actividad mitogénica *in vitro*<sup>193</sup> cuando las células se lisan, sugiriendo la existencia de un componente citoplasmático como candidato inmunopotenciador (polisacárido).

### **Control sobre el nivel de colesterol sérico.**

algunas bacterias probióticas inhiben la conversión de acetato en colesterol y otras a través de una acción indirecta, mediante el aumento del nivel de ácidos biliares, favorecen el metabolismo del colesterol. Las bacterias lácticas producen hidroximetilglutarato, que inhibe hidroximetilglutaril-CoA reductasas involucradas en la síntesis de colesterol. Ninguna evidencia directa ha sido presentada hasta el momento que involucre a las bifidobacterias en la reducción del nivel del colesterol; sin embargo, Mann y Spoerry<sup>259</sup> sugirieron que el consumo de leches fermentadas con estas bacterias disminuye el nivel de colesterol sérico. Por el contrario, Payens y col.<sup>322</sup> no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol sérico en individuos alimentados con yogur. Evidentemente, este es un campo controvertido en el que faltan ensayos *in vivo*.

**Efecto sobre la carcinogénesis o actividad antitumoral.** Se ha reportado la reducción de ciertos tipos de cáncer e inhibición del crecimiento de ciertos tumores y células tumorales<sup>138,444,342</sup>. El yogur tendría un efecto inhibitor sobre la proliferación de células cancerosas en cultivo; la disminución del pH intestinal inhibe el crecimiento

de bacterias putrefascentes, lo cual reduce la cantidad de compuestos N-nitrosos, productos fenólicos de la tirosina y triptofano, metabolitos esteroides biliares y otros potenciales carcinógenos del colon; la actividad antitumoral de las bifidobacterias parece estar asociada a componentes de la pared celular<sup>405</sup>. Se observó que las bacterias lácticas previenen daño y mutaciones en el ADN *in vitro*<sup>333</sup> e inhibición en el crecimiento de células tumorales en cultivo<sup>343,344</sup>. La ingesta de *Bif. longum* en ratas generó una importante disminución en la incidencia de tumores de colon e hígado inducidos por 2-amino-3-metilimidazo[4,5f]quinolina<sup>342</sup> y la ingesta de *Lactobacillus* GG y *Lactobacillus acidophilus* disminuyó la incidencia de lesiones preneoplásticas y tumores de colon en ratas tratadas con 1,2-dimetilhidrazina<sup>156,159</sup>. Estos efectos se asociaron a una reducción en la actividad fecal de  $\beta$ -glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa<sup>157</sup>. A pesar de que los estudios en humanos son escasos, se observó que el consumo de lactobacilos por voluntarios reduce la mutagenicidad en la orina y heces asociadas a la ingesta de carcinógenos en carne cocida<sup>179,246</sup>.

**Mejoramiento de la tolerancia a la lactosa.** El consumo de productos lácteos conteniendo bacterias lácticas puede ser beneficioso para pacientes intolerantes a la lactosa<sup>384,211</sup>. Esta enfermedad es debida a la deficiencia enzimática de lactasa, enzima que se encuentra a nivel del ribete en cepillo del intestino delgado, y que hidroliza la lactosa hasta glucosa y galactosa, monosacáridos que son absorbidos a nivel del intestino delgado. Cuando se produce un déficit de lactasa, la lactosa ingerida para sin hidrolizar hasta

el colon donde se fragmenta por la lactasa y la  $\beta$ -galactosidasa bacterianas; a este nivel los monosacáridos no son absorbidos, sino fermentados a ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato) y lactato<sup>194</sup>. En pacientes con colitis activa, síndrome de intestino corto o inflamación intestinal, el lactato puede aumentar hasta 20 veces su valor normal<sup>195,48</sup>. Se ha sugerido que una alta concentración de lactato y la lactosa no absorbida que no ha sido hidrolizada por las bacterias, inducen la secreción de agua y sodio al lumen intestinal incrementando el volumen del quimo, causando daño en la mucosa colónica<sup>7,412</sup> y en consecuencia contribuyendo a la diarrea<sup>191,195</sup>. Pero como los ácidos grasos de cadena corta son rápidamente absorbidos por la mucosa colónica, estimulando la absorción de agua y sodio, la fermentación de la lactosa no absorbida a ácidos grasos de cadena corta reduce la carga osmótica y mitiga la diarrea. En consecuencia, los tratamientos deberían estar enfocados a reducir la formación de lactato colónico e incrementar la producción de ácidos grasos de cadena corta. El estudio realizado por Jiang y Savaiano<sup>212</sup> sugiere que las bifidobacterias tendrían un potencial en el manejo de la colitis, al menos desplazando el metabolismo bacteriano hacia la formación de ácidos grasos de cadena corta. En resumen, la microflora colónica podría contribuir a la absorción de lactosa en intolerantes a la lactosa utilizando la lactosa no absorbida. La fermentación de lactosa por la flora colónica *in vitro* es dependiente del pH, debido al efecto de este en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de las bacterias. La suplementación de bifidobacterias mejoraría la fermentación de lactosa hasta cierto límite a pH neutro<sup>212</sup>.

**Antagonismo con microorganismos patógenos.** El consumo de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*) puede disminuir la recurrencia de candidiasis vaginal<sup>189</sup>. Algunos lactobacilos pueden inhibir o desplazar patógenos adheridos a células uroepiteliales y catéteres<sup>271,348,277</sup> aunque el mecanismo no ha sido completamente determinado. *Bifidobacterium* ha sido también útil en la inhibición del crecimiento de *Candida* en pacientes con leucemia<sup>432</sup> y en la prevención de infecciones respiratorias y urinarias causadas por este hongo<sup>433</sup>. Ejemplos relacionados al microambiente intestinal se describirán más adelante (págs. 24 y 25)

Muchos de los efectos protectores descritos se deben a un aumento del número de bacterias lácticas en el colon. Tales incrementos pueden ser logrados por el consumo de prebióticos, definido anteriormente, que alcanzan el colon sin ser digeridos y actúan como sustratos específicos para lactobacilos y bifidobacterias<sup>356,358,361,178,185,204</sup>. Se ha demostrado que la lactulosa, un disacárido sintético no digerible, disminuye el grado de carcinogénesis en ratas<sup>357</sup>. La inulina es un componente de muchas plantas comestibles como la achicoria, la cebolla y el ajo. Es una mezcla de oligosacáridos a base de fructosa y glucosa que alcanzan el colon sin ser digeridos y estimulan preferencialmente el crecimiento de bifidobacterias en el intestino<sup>150</sup>. Rowland y col.<sup>359</sup> encontraron que la administración conjunta de inulina con *Bif. longum* reduce la incidencia de criptas aberrantes inducidas por un mutágeno en colon de ratas en un 80%.

## ***El ecosistema intestinal***

Gran número de microorganismos colonizan el tracto gastrointestinal humano, algunos con consecuencias beneficiosas y otros perniciosas. La microflora *indígena* se compone de los microorganismos que habitan las superficies y cavidades abiertas directa o indirectamente al medio ambiente. Por lo tanto, los microorganismos *indígenas* habitan normalmente la piel, la cavidad oral, el tracto respiratorio superior, el tracto gastrointestinal, el urinario y la vagina. El término *microflora indígena* es difícil de definir aunque se ha puntualizado<sup>105</sup> que la composición de la flora intestinal indígena de una especie animal determinada, está dada por una combinación de *flora autóctona* presente durante la evolución animal, la *flora normal* referida a los microorganismos tan ubicuos en una dada comunidad animal que se han establecido en prácticamente todos sus miembros, y los *verdaderos patógenos*, que se adquieren accidentalmente y son capaces de persistir en los tejidos. Actualmente los términos *flora intestinal indígena* y *flora intestinal normal* se usan indistintamente para describir la colección de microorganismos que normalmente habitan el tracto gastrointestinal<sup>18</sup>.

La flora indígena gastrointestinal no aparece espontáneamente en neonatos, sino que ciertos microorganismos colonizan hábitats particulares en diferentes momentos luego del nacimiento en una suerte de *sucesión* bacteriana. El feto *in utero* es normalmente estéril y al nacer comienza a contaminarse con una colección heterogénea de microorganismos presentes en el canal de parto y

en el entorno inmediato. Con el correr de los días, muchos de estos microorganismos son eliminados y subsecuentemente ocurren cambios cuantitativos y cualitativos en la flora gastrointestinal.

Las bacterias acidolácticas y los coliformes comienzan siendo los predominantes en neonatos sanos. Los niveles de *Bifidobacterium* oscilan entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  por gramo de heces, constituyendo el 90% de la flora de los recién nacidos alimentados con leche materna, mientras que los lactobacilos, enterococos y coliformes constituyen el 1%; pero luego, la microflora cambia drásticamente y predominan otros anaerobios estrictos.

Se estima que existen más de 400 especies bacterianas en el tracto gastrointestinal del hombre. La flora microbiana no se haya distribuida al azar en el tracto gastrointestinal adulto sino más bien se encuentran niveles bacterianos característicos en regiones particulares del tracto. Mientras en el estómago hay menos de  $10^3$  bacterias/ml, el intestino posee alrededor de  $10^{14}$  microorganismos, que es 10 veces más que el número total de células del cuerpo humano<sup>283</sup>.

La cavidad oral contiene alrededor de 200 especies. La saliva contiene bacterias transitorias ( $10^9$  bacterias/ml) provenientes de la superficie oral, como la lengua y la cavidad bucal. La placa dental y las criptas gingivales sin embargo, proveen un entorno anaeróbico con bajos potenciales de oxidación-reducción, que permiten el establecimiento de una microflora anaeróbica

diversa. La placa dental contiene una densa población de  $10^{11}$  bacterias/g.

El estómago y los dos tercios superiores del intestino delgado (duodeno y yeyuno) contienen un pequeño número de microorganismos ( $10^3$ - $10^4$  bacterias/ml de jugo gástrico o intestinal). Esto se puede deber al bajo pH del contenido estomacal y el relativamente lento flujo peristáltico del estómago al duodeno. Las principales especies presentes son los lactobacilos y estreptococos ácido-tolerantes que sobreviven al pasaje estomacal. Recientemente se ha descubierto que el *Helicobacter pylori*, un bacilo espiralado y altamente móvil, está presente en el estómago de más de un tercio de la población adulta mundial. En algunos individuos puede causar gastritis, úlcera gástrica o duodenal y puede ser un factor importante en el desarrollo de cáncer gástrico<sup>31</sup>.

La parte distal del intestino delgado se considera una zona de tránsito entre la relativamente escasa microflora del duodeno y el tremendo número de bacterias del intestino grueso<sup>421</sup>. Comparada con la zona proximal del intestino delgado, la parte distal con menor peristalsis y potencial redox, mantiene una más alta y diversa población bacteriana ( $10^8$  bacterias/ml de contenido intestinal).

El intestino grueso es el principal sitio de colonización microbiana en humanos y animales, probablemente debido a la baja motilidad intestinal y los extremadamente bajos potenciales redox<sup>421</sup>. Consecuentemente, el intestino grueso almacena una gran cantidad de bacterias ( $10^{10}$ - $10^{11}$  bacterias/g de contenido intestinal), conteniendo en forma estimativa unas 200 a 300 especies. Es importante enfatizar que el 99.9% de la microflora gastrointestinal la componen anaerobios estrictos. También se debe puntualizar que acompañando esta distribución vertical desde la cavidad oral al colon, existe una distribución horizontal de especies desde el lumen intestinal a la mucosa epitelial.

Factores ambientales, interacciones fisiológicas y la dieta gobiernan esta distribución de la microflora en las diferentes regiones del intestino. De estos factores, la dieta es el principal factor que regula la frecuencia y la concentración de una especie o grupo particular de microorganismos que colonizan el tracto. También se sabe que la dieta influye sobre las actividades metabólicas de los microorganismos intestinales. Por otro lado, la flora normal del intestino se perturba cuando proliferan bacterias patógenas, como en el caso de diarreas o por acción de tratamientos con antibióticos y radiaciones.

### ***Bifidobacterium: características metabólicas y estructurales***

Las bacterias del género *Bifidobacterium* fueron descritas inicialmente por Tissier a principios del siglo pasado bajo el nombre de *Bacillus bifidus*<sup>429</sup>.

Desde ese momento, su clasificación ha evolucionado continuamente y actualmente se conocen alrededor de treinta especies<sup>10,273</sup>, 12 de

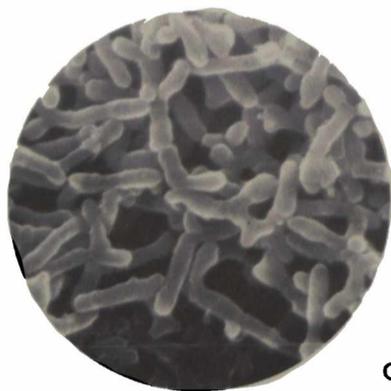
las cuales son de origen humano<sup>25,58</sup> (Tabla 1). Las últimas dos especies descubiertas (*Bif. inopinatum*

*sp. nov.* y *Bif. denticolens sp nov.* fueron aisladas de placa dental humana<sup>81</sup>.

**Tabla 1.** Especies pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

Origen humano	Otro origen	
<i>Bif. adolescentis</i>	<i>Bif. animalis</i>	<i>Bif. merycicum</i>
<i>Bif. angulatum</i>	<i>Bif. asteroides</i>	<i>Bif. minimum</i>
<i>Bif. bifidum</i>	<i>Bif. boum</i>	<i>Bif. pseudolongum</i>
<i>Bif. breve</i>	<i>Bif. choerinum</i>	<i>Bif. pullorum</i>
<i>Bif. catenulatum</i>	<i>Bif. coryneforme</i>	<i>Bif. ruminantium</i>
<i>Bif. denticolens</i>	<i>Bif. cuniculi</i>	<i>Bif. saeculare</i>
<i>Bif. dentium</i>	<i>Bif. gallicum</i>	<i>Bif. subtile</i>
<i>Bif. globosum</i>	<i>Bif. gallinarum</i>	<i>Bif. suis</i>
<i>Bif. infantis</i>	<i>Bif. indicum</i>	<i>Bif. thermophilum</i>
<i>Bif. inopinatum</i>	<i>Bif. magnum</i>	
<i>Bif. longum</i>		
<i>Bif. pseudocatenulatum</i>		

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son microorganismos Gram (+), inmóviles y no esporulados, habitantes naturales del intestino de animales y del hombre. El nombre *Bifidobacterium* proviene de las formas en Y o en V que pueden presentar bajo ciertas condiciones de cultivo. Además para *Bifidobacterium bifidum*, cantidades insuficientes de factores de crecimiento inducen la formación de bacilos en forma bífida.



Se los puede encontrar como bacilos cortos, regulares, angostos de extremos aguzados, también como bacilos cocoides regulares, o muchas veces

como células largas suavemente curvadas, con protuberancias o con una gran variedad de bifurcaciones, con extremidades espatuladas. Pueden encontrarse aislados o agrupados en cadenas formando diferentes figuras<sup>376</sup>. De hecho, es un microorganismo muy pleomórfico. En medio sólido, sus colonias son convexas, de bordes enteros, de color cremoso a blanco, brillantes y de consistencia muy suave<sup>376</sup>.

A pesar de ser consideradas anaerobias, las bifidobacterias varían considerablemente en su tolerancia al O<sub>2</sub>. Algunas son anaerobias obligadas, mientras que otras toleran el O<sub>2</sub> en presencia de CO<sub>2</sub>. Las cepas menos sensibles parecen tener una leve actividad catalásica que destruye el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado, tóxico para las células, aunque en general son catalasa (-).

La temperatura óptima de crecimiento es entre 37 °C y 43 °C, pudiendo desarrollar también en condiciones extremas de temperatura de 25 a 28 °C y de 43 a 45 °C. El pH óptimo para su desarrollo es de 6.5 a 7. El contenido de G + C en su ADN varía entre 55 y 67 moles%.

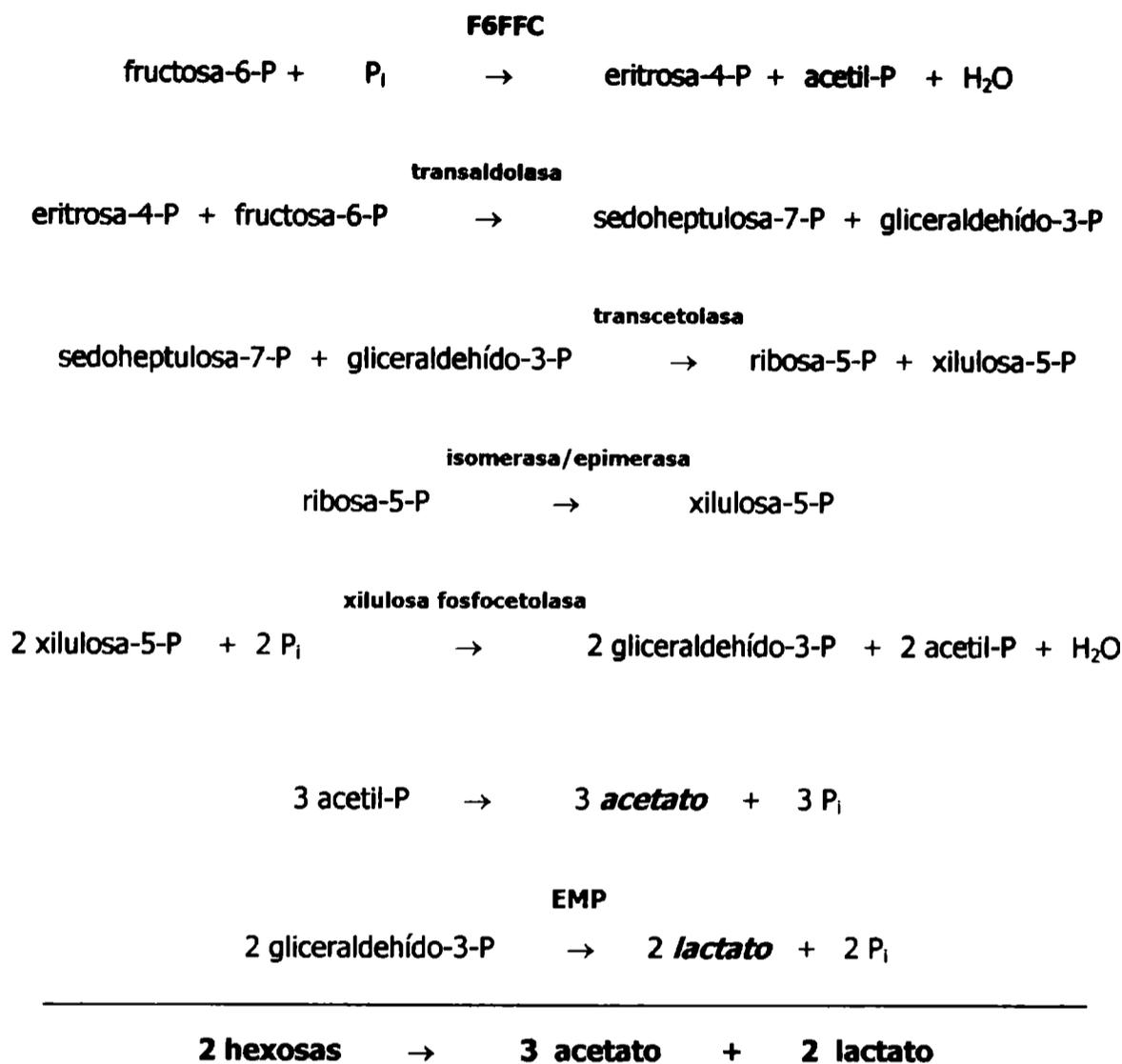
Las bifidobacterias requieren para su crecimiento carbonato o bicarbonato (o CO<sub>2</sub> gaseoso). Como fuentes esenciales de nitrógeno son importantes la cisteína o cistina. También pueden crecer en presencia de sales de amonio como única fuente de nitrógeno. En especial, *Bif. bifidum* requiere la presencia de sales de Fe, Mg y en menor grado Mn. Se han utilizado varios medios para su desarrollo, entre los cuales se puede mencionar el medio no selectivo Tryptone-Phytone-Yeast extract (TPY), el cual permite el crecimiento de todas las especies de *Bifidobacterium* así como de otras bacterias lácticas<sup>376,289</sup>.

La clasificación de *Bifidobacterium* como bacteria láctica ha causado controversia en los últimos años. Si bien filogenéticamente *Bifidobacterium* no se halla íntimamente emparentado con *Lactobacillus*, es muy frecuente considerarlo entre las bacterias lácticas ya que producen ácido láctico a partir de hexosas y son empleados en las formulaciones de productos lácteos.

La estructura mureínica de la pared celular de las bifidobacterias es un parámetro importante utilizado a menudo para diferenciar claramente

entre especies relacionadas, como por ejemplo *Bif. boum* de *Bif. termophilum* o *Bif. minimum* de *Bif. subtile*. Algunas especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* fueron estudiadas por Exterkate y col.<sup>116</sup> quienes hallaron que diferencias en fosfolípidos de poliglicerol y aminoacil fosfatidil-glicerol puede ayudar a diferenciar entre ambos géneros.

El metabolismo de hidratos de carbono en *Bifidobacterium* difiere del que presentan tanto bacterias lácticas homofermentativas como las heterofermentativas. Las especies de origen humano de *Bifidobacterium* carecen de las enzimas aldolasa [EC 4.1.2.13] y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [EC 1.1.1.49], por lo tanto no pueden metabolizar los carbohidratos ni por vía glicolítica ni por la vía de las hexosas monofosfato. Las bacterias homofermentativas utilizan la glicólisis para convertir la glucosa en ácido láctico, mientras que las heterofermentativas usan la vía de las hexosas monofosfato, lo que las lleva a obtener ácido acético y etanol. En lugar de esto, las bifidobacterias poseen una enzima característica, la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (F6FFC) [EC 4.1.2.22] descubierta por Shramm y col.<sup>410</sup>. Esta enzima cataliza la reacción de clivaje de la fructosa-6-fosfato en acetil-1-fosfato y eritrosa-4-fosfato. El primero origina ácido acético, mientras que la segunda, bajo la acción de las enzimas transaldolasa [EC 2.2.1.2], transcetolasa [EC 2.2.1.1], isomerasa [EC 5.3.1.5], epimerasa [EC 5.1.3.1] y xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa [EC 4.1.2.9], da gliceraldehído-3-fosfato, el cual a su vez origina ácido láctico. Las reacciones involucradas se esquematizan a continuación:



**Figura 2.** Metabolismo de hidratos de carbono para los microorganismos del género *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias no producen ácido butírico ni ácido propiónico, y el CO<sub>2</sub> se genera solamente durante la degradación de gluconato. En teoría, las bifidobacterias producen ácido acético y ácido láctico en una relación molar 3:2; sin embargo, en la práctica se producen algunas desviaciones debido a la fosforólisis del ácido pirúvico para dar ácido fórmico y acetil-1-fosfato. Esto, combinado con la reducción del acetil-1-fosfato a etanol,

puede resultar en la formación de ácido acético, ácido fórmico y etanol.

Este género es único en cuanto a que todo el ácido láctico que produce es en la forma L(+), el cual es muy fácilmente metabolizado por los niños, mientras que la forma D(+) producida por otras bacterias lácticas puede causar acidosis metabólica durante el primer año de vida. El ácido láctico y el

ácido acético controlan el pH del intestino grueso, lo cual restringe el crecimiento de varios potenciales patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para poder lograr esta inhibición, es necesario que los microorganismos probióticos estén metabólicamente activos en el tracto gastrointestinal.

La producción de estos ácidos por las bifidobacterias depende de la metabolización de carbohidratos que no hayan sido utilizados por el sistema digestivo humano ni por otros microorganismos hasta alcanzar el colon, y que en este caso particular estos prebióticos reciben el nombre de *factores bifidogénicos*. Se trata en general de aminoazúcares, y han sido identificados hasta el momento varios de ellos, por ejemplo  $\beta$ -etil-N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-galactosamina, ácido N-acetilneuramínico y N-acetilmanosamina, entre otros. Sin embargo, estos aminoazúcares son demasiado costosos para suplementar alimentos y medios de cultivo. Por lo tanto, se ha tendido a reemplazarlos por hidratos de carbono complejos como la rafinosa e inulina y en dietas humanas, por fructooligosacáridos y lactulosa.

Los fructooligosacáridos se encuentran naturalmente en una variedad de cultivo de alcachofas tuberosas de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), proveyendo la fuente más abundante de estos polifruktanos. Estos polifruktanos tienen un grado de polimerización entre 2 y 35; las moléculas de D-fructosa están unidas por un enlace  $\alpha(1\rightarrow2)$ , como en la sacarosa; grados de polimerización mayores a 30 corresponden a inulina. Las bifidobacterias son capaces de metabolizar mejor los fructooligosacáridos de

cadena corta, por lo cual los fructanos de cadena larga deben ser hidrolizados.

*Bifidobacterium* produce vitaminas, principalmente del grupo B<sup>307,247</sup> y también enzimas digestivas como la caseína fosfatasa [EC 4.2.1.8] y lisozima [EC 3.2.1.17]<sup>280,220</sup>

Las bacterias del género *Bifidobacterium* constituyen una parte importante de la microbiota indígena del hombre y animales<sup>284</sup>. Se distribuyen en varios nichos ecológicos del tracto gastrointestinal y genitourinario variando en su proporción de acuerdo a la edad, la dieta y el estrés. También se los halla como flora comensal de la cavidad oral<sup>434</sup>. Las bifidobacterias constituyen una alta proporción de la microbiota indígena infantil desde el momento del nacimiento. Su proliferación es estimulada por componentes glicoproteicos de la  $\kappa$ -caseína del calostro humano y en menor medida de la leche materna, de su baja inmunogenicidad y contenido proteico. También se observó un efecto estimulador de azúcares N-acetilados presentes en la leche materna<sup>305</sup> y oligosacáridos transgalactosilados en leches formuladas<sup>421</sup>. Al crecer, las proporciones de bifidobacterias disminuye hasta constituir el tercer género más común del ecosistema gastrointestinal humano luego de *Bacteroides* y *Eubacterium*<sup>120,287,284</sup>. Además, el perfil de especies dentro de *Bifidobacterium* cambia con la edad: *Bif. infantis* y *Bif. breve* se reemplazan por *Bif. adolescentis* mientras que *Bif. longum* persiste a lo largo de toda la vida<sup>285</sup>. Este cambio en el perfil podría estar influenciado por el consumo de factores bifidogénicos<sup>289</sup>. En adultos humanos, *Bifidobacterium* se encuentra en un porcentaje menor que en niños (6-36% de la flora total).

Aunque ciertas especies de bifidobacterias han sido relacionadas con infecciones genito-urinarias<sup>369,169,261,96,36</sup> y bacteriemia<sup>40,44</sup>. *Bif. dentium* es la única especie considerada patógena

para el hombre. Se la considera agente etiológico de la caries<sup>146,390</sup>. Recientemente, se han descrito dos casos de meningitis leve causada por *Bif. breve*<sup>175</sup>.

### ***Fundamentos de la adhesión bacteriana***

Para comenzar a ejercer su acción probiótica en el intestino, es importante que los microorganismos sean capaces en cierta medida de mantenerse adheridos al epitelio al menos temporalmente, sobre todo en zonas de activa peristalsis o motilidad de las vellosidades.<sup>374</sup>

Ciertos aspectos fundamentales sobre la adhesión bacteriana se conocen desde hace algunos años<sup>14,19,113,242,262,380</sup> y varias evidencias ya han sido puntualizadas. Primero, la supervivencia de microorganismos en algunos entornos depende de la habilidad para adherirse a superficies o sustratos. Segundo, el proceso de adhesión involucra una interacción entre moléculas complementarias presentes en la superficie del microorganismo y en el sustrato. Tercero, la expresión de macromoléculas microbianas involucradas en la adhesión se encuentra bajo ciertos mecanismos de control.

Se entiende por *adhesión* o *adherencia* a la unión entre una bacteria y un sustrato de modo que para lograr su separación haya que entregar cierta cantidad de energía. En términos generales, las bacterias se adhieren sólo a sustratos complementarios, mediante interacciones iónicas o

Coulómbicas, por medio de puentes de hidrógeno<sup>330</sup>, por uniones hidrofóbicas<sup>110</sup> o por medio de complejos de coordinación que involucran iones metálicos multivalentes. Hasta el momento, no se conocen otras fuerzas capaces de participar en la adhesión bacteriana. Frecuentemente, se dice que la adhesión es altamente estereoespecífica, es decir que una bacteria se une a un sustrato sólo si el sustrato posee cierto tipo de receptor, como por ejemplo un hidrato de carbono y su lectina. En contraste se dice que la adhesión no es estereoespecífica cuando una bacteria hidrofóbica se une a un sustrato también hidrofóbico<sup>47</sup>. Sin embargo, esta designación como inespecífica para la adhesión que no depende de interacciones estereoespecíficas pero sí del efecto hidrofóbico o de interacciones iónicas, es probablemente una sobresimplificación. De hecho, es posible que evolutivamente se hayan seleccionado determinadas cepas bacterianas de fenotipo adherente con superficies hidrofóbicas o con superficies que contienen dominios hidrofóbicos. La complementariedad entre una bacteria y un sustrato particular no es suficiente para iniciar la colonización de ese sustrato debido a que es también importante la presencia de ciertos factores como requerimientos nutricionales

y resistencia a efectos deletéreos de naturaleza física o química. El proceso de adhesión está probablemente compuesto por una serie de etapas o factores que incluyen presentación, orientación, y accesibilidad de los receptores y las adhesinas en las superficies del sustrato y de las bacterias respectivamente. Más aún, el proceso de adhesión podría requerir la participación de constituyentes superficiales determinados que interaccionarían en forma secuencial para lograr dicha interacción.

Se entiende por *adhesina* a una molécula superficial capaz de unirse a un receptor presente en un sustrato. La mayoría de las especies bacterianas expresan más de un tipo de adhesinas y cada una de ellas posee un *sitio activo* comprometido en una interacción estereoespecífica con el receptor. Una de las estrategias bacterianas más frecuente para lograr adherirse es ubicar sus adhesinas en la superficie. Los apéndices superficiales y las estructuras que poseen adhesinas incluyen fimbrias, fibrillas, cápsulas y otros polímeros secretados, membranas externas y flagelos, que les confieren la capacidad de interaccionar con los receptores a distancia, formar complejos y finalmente ubicarse sobre el sustrato.

En principio, las bacterias y la mayoría de los sustratos biológicos no se pueden adherir debido a que ambos se encuentran negativamente cargados y generan una repulsión entre sí. Dicha repulsión es el resultado de la doble capa eléctrica existente en cualquier sustrato inmerso en una suspensión electrolítica<sup>95</sup>. La capa electrostática que rodea la bacteria se compone de macromoléculas cargadas

negativamente y contraiones cargados positivamente. Se establece así un potencial eléctrico a través de la doble capa. En el caso de bacterias, el potencial eléctrico es función de su movilidad electroforética y su carga neta superficial, expresados como el potencial zeta de la bacteria. La naturaleza de los electrolitos que rodean a la bacteria también afecta el potencial eléctrico de la doble capa superficial. La extensión de la doble capa eléctrica es generalmente del orden de los 2-5 nm en buffers fisiológicos, de manera que las bacterias son repelidas de los sustratos a distancias menores de 8-12 nm. Una vez que se hayan superado las fuerzas repulsivas, entran en juego las adhesinas interaccionando con los receptores para lograr la adhesión. La interacción bacteria-sustrato puede involucrar la unión simultánea de un gran número de moléculas de adhesina con una gran cantidad de receptores complementarios que formarían muchas uniones individuales logrando así una adhesión más resistente y virtualmente irreversible.

La interacción adhesina-receptor depende del arreglo espacial y de la accesibilidad de las adhesinas y sus receptores en los sustratos. Otros componentes superficiales pueden interferir en la accesibilidad de las adhesinas y por lo tanto una adhesión exitosa dependería de la expresión y regulación de tales moléculas interferentes. Un ejemplo típico es la formación de una cápsula de polisacárido en la superficie de la bacteria. En contraposición, la presencia de moléculas superficiales no adherentes ayudan a estabilizar la interacción adhesina-receptor.

## **Mecanismos moleculares de la adherencia**

El dogma central de la adhesión bacteriana establece que las adhesinas funcionen desde la superficie bacteriana. En la mayoría de los casos, las adhesinas son ensambladas en la superficie, pero en unos pocos, las adhesinas son inicialmente secretadas en una forma soluble y luego se asocian a la superficie bacteriana<sup>435</sup>. En cualquiera de los casos las adhesinas deben anclarse a la superficie bacteriana antes de participar del proceso de adhesión.

Existen cuatro *compartimientos* celulares principales que actúan de soporte para las adhesinas superficiales. Tres de ellos, la membrana citoplasmática, la pared de peptidoglicano y la capa S, se encuentran tanto en los microorganismos Gram (+) como en los Gram (-); mientras que la membrana externa solo se encuentra en Gram (-). La estrategia de la bacteria es exponer las adhesinas sobre alguna de estas estructuras que de esta manera hacen de puente entre la bacteria y el sustrato. Muchas especies poseen apéndices filamentosos que se prolongan desde la membrana y actúan como adhesinas.

Ya que existe una gran variedad de estructuras superficiales en aquellas bacterias capaces de adherirse, esto implica un gran espectro de mecanismos de adherencia.

**Fimbrias o pili bacterianos.** Las fimbrias o fibrillas se encuentran tanto en bacterias Gram (+) como en Gram (-). En las primeras, se hallan ancladas en la membrana citoplasmática, mientras

que en las segundas están ancladas en la parte externa de la membrana externa. Duguid y col.<sup>109</sup> observaron la presencia de apéndices filamentosos en *Escherichia coli* y acuñaron el término *fimbria* del latín *fiber*, que significa hilo. En 1959, Brinton sugirió el nombre de *pili* (del latín que describe estructuras en forma de pelo) para apéndices superficiales no flagelares en *E. coli*. Actualmente se usan los dos términos en forma indistinta. El término *fimbria* parece tener más aceptación mientras que el término *pili* se usa para describir filamentos conjugativos en la mayoría de las Gram (-). Las fibrillas son también prolongaciones superficiales de la bacteria, pero poseen algunas características morfológicas que las distinguen de las fimbrias<sup>173</sup>.

Muchas proteínas producidas por los estreptococos o estafilococos se fijan en la membrana citoplasmática mediante uniones hidrofóbicas y extienden a través de la pared de peptidoglicano hacia la superficie externa su región amino terminal<sup>126</sup>. Estas proteínas pueden funcionar como adhesinas o pueden formar complejos con otras moléculas que funcionen como adhesinas. Mediante microscopía electrónica se ha podido determinar que la exposición de adhesinas se realiza bajo la forma de fimbrias, fibrillas o proyecciones de morfología no definida, aunque no todas estas estructuras funcionan como adhesinas.

Se ha definido gran número de especies con fimbrias adhesivas<sup>173</sup>. Las fimbrias de bacterias

Gram (+) son finas estructuras de 1-3 nm de diámetro y de longitud variable entre 100 y 400 nm. Se componen de moléculas de proteína organizadas en forma helicoidal para formar un cilindro. En la punta de la fimbria se ubican proteínas que les confieren las propiedades adherentes, que la mayoría de las veces se trata de lectinas. En muchos aspectos, las fimbrias se asemejan a los flagelos; sin embargo, las fimbrias no rotan y no poseen cuerpo basal<sup>304</sup>.

**Proteínas superficiales (capa S).** Una de las estructuras especializadas que se encuentran en la mayoría de las *Eubacteria* y *Archaeobacteria* y que podría estar involucrada en la adhesión celular y en el reconocimiento de superficies es lo que se denomina capa S (capa superficial). Ha sido descrita en muchas bacterias Gram negativas como *Campylobacter fetus*<sup>133</sup> y en muchas Gram positivas como *Bacillus brevis*<sup>404</sup>, *Clostridium symbiosum*<sup>275</sup>, *Eubacterium* sp.<sup>403</sup> y lactobacilos<sup>264,221,381</sup>. Se trata de arreglos regulares de subunidades presentes como componente más externo de las cubiertas celulares. Las capas S pueden ser consideradas como las membranas biológicas más simples desarrolladas durante la evolución. Generalmente están compuestas de pocas especies moleculares simples de naturaleza proteica, glicoproteica, dotadas de la capacidad de disponerse por un proceso entrópico en arreglos bidimensionales, en presencia o ausencia de superficies adherentes.

Aunque en los últimos diez años se ha acumulado bastante información en lo que respecta a estructura química y morfogénesis, muy poco se sabe de su función específica. Al estar ubicada en la superficie celular, la capa S estaría

involucrada directamente en las interacciones entre la bacteria y su entorno.

Se pueden distinguir tres categorías de pared bacteriana que contienen capa S. *Archaeobacteria* tienen una cubierta de doble capa que consiste en la membrana plasmática asociada a la capa S de subunidades glicoproteicas. En los Gram (+), sería la rígida pared de peptidoglicano que es considerablemente más ancha que en los Gram (-) los cuales contienen una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, lípidos, proteínas y lipoproteínas. Cuando tienen capa S, esta representa la estructura macromolecular más externa asociada a la pared o a la membrana externa.

Por aplicación de la técnica de criofractura ha sido posible confirmar que la capa S cubre completamente la superficie celular. Mediante análisis cristalográficos se pudo determinar la estructura tridimensional de los arreglos periódicos: son de estructura hexagonal, cúbica u oblicua.

La extracción directa de la capa S de la pared celular se ha logrado mediante el uso de altas concentraciones de urea, cloruro de guanidinio (GnCl), LiCl, formamida, dodecil sulfato de Na (SDS) y ocasionalmente por acción de agentes quelantes. Estos ensayos de extracción demostraron que las subunidades de capa S en Gram (+) y Gram (-) se unen no covalentemente entre ellas y a la pared que las soporta, y que la integridad estructural de la capa S se atribuye a una combinación de uniones débiles (uniones hidrofóbicas, uniones iónicas que involucran cationes divalentes o interacciones con grupos polares y puentes de hidrógeno). Químicamente la

capa S se compone de especies polipeptídicas simples, homogéneas y de alto peso molecular (40-200 kDa) con algún componente de carbohidrato.

Su función deriva de que cubre completamente la superficie celular. Es evidente que tienen

potencial función como barreras contra agentes o factores externos (acción de predadores bacterianos, bacteriófagos), como medio de mantenimiento de la forma celular o como un promotor para la adhesión celular, fenómeno visible como autoaglutinación o reconocimiento de superficies epiteliales<sup>404</sup>.

### ***¿Cómo se adhieren los microorganismos probióticos?***

A pesar de recientes experimentos *in vitro* con bacterias probióticas sobre células intestinales humanas en cultivo utilizadas como modelo<sup>22,59,67,114</sup>, los factores superficiales de estas bacterias todavía deben ser caracterizados.

Diferentes mecanismos han sido propuestos y parece que la adhesión de lactobacilos y bifidobacterias no dependen de un único y ubicuo mecanismo. Algunos mecanismos que involucran proteínas o componentes proteicos como mediadores de la adhesión han sido sugeridos para algunas cepas de *Lactobacillus*, incluyendo *Lb. jonsonii* La1<sup>21</sup>, *Lb. acidophilus* BG2F04<sup>67</sup> y LB12<sup>59</sup>, *Lb. fermentum* 104<sup>184</sup> y *Lb. crispatus* JCM 5810<sup>430</sup>. Suegara y col.<sup>411</sup> también sugirieron que son proteínas las involucradas en la adhesión de tales bacterias a estómago de rata *in vitro*, avalado también por resultados de Conway y col.<sup>69</sup> En la adhesión de la cepa *Lb. fermentum* 104-S a epitelio de estómago porcino están involucradas tanto proteínas como hidratos de carbono<sup>182,183</sup>. Sin embargo, Sherman y Savage<sup>394</sup> postularon que cepas de *Lactobacillus* se unen a células del epitelio de estómago de ratón a través de

macromoléculas que median la adhesión epitelial en otras bacterias Gram (+). Esto se logra mediante complejos macromoleculares compuestos por ácidos lipoteicoicos (ALT) y proteínas<sup>63,207</sup>. Wadström y col.<sup>451</sup> exploraron el rol de la hidrofobicidad superficial en la adherencia de lactobacilos: un tratamiento con proteasas disminuye la hidrofobicidad superficial y la adherencia. De todas maneras, la adherencia de estos microorganismos puede ser un proceso de más de una etapa desde las atracciones electrostáticas hasta la formación de fibrillas y microcápsulas compuestas de polisacáridos ácidos, como fue observado por Fuller y Brooker<sup>140</sup>.

La importancia de ALT como mediadores de la adhesión de *Lb. spp* o de otras bacterias a células epiteliales también ha sido demostrada<sup>16,57,309,315,423,424,394</sup>. En algunos casos se cree que existe un polisacárido externo que media la adherencia<sup>12,46,373</sup>. La adhesión de *Lactobacillus spp.* a células epiteliales también depende de la fisiología de la bacteria y parámetros fisicoquímicos que pueden ser modificados por las condiciones de

cultivo<sup>71,270,323</sup>. También puede ser que el pH sea un factor a tener en cuenta<sup>167,184,166</sup>.

Un trabajo publicado por Lin y Savage<sup>249</sup> relaciona el fenotipo adherente de lactobacilos a elementos genéticos extracromosómicos sobre la base de que sólo diez de las veinte cepas estudiadas contenían plásmidos de aprox. 90 MDa y que estas cepas fueron adherentes a epitelio queratinizado de estómago murino<sup>250</sup>. En algunos casos existe especificidad en la adherencia<sup>12,422</sup>. Lactobacilos aislados de aves fueron capaces de adherirse a células epiteliales intestinales de pollo *in vitro* y no así las cepas provenientes de mamíferos<sup>135</sup>.

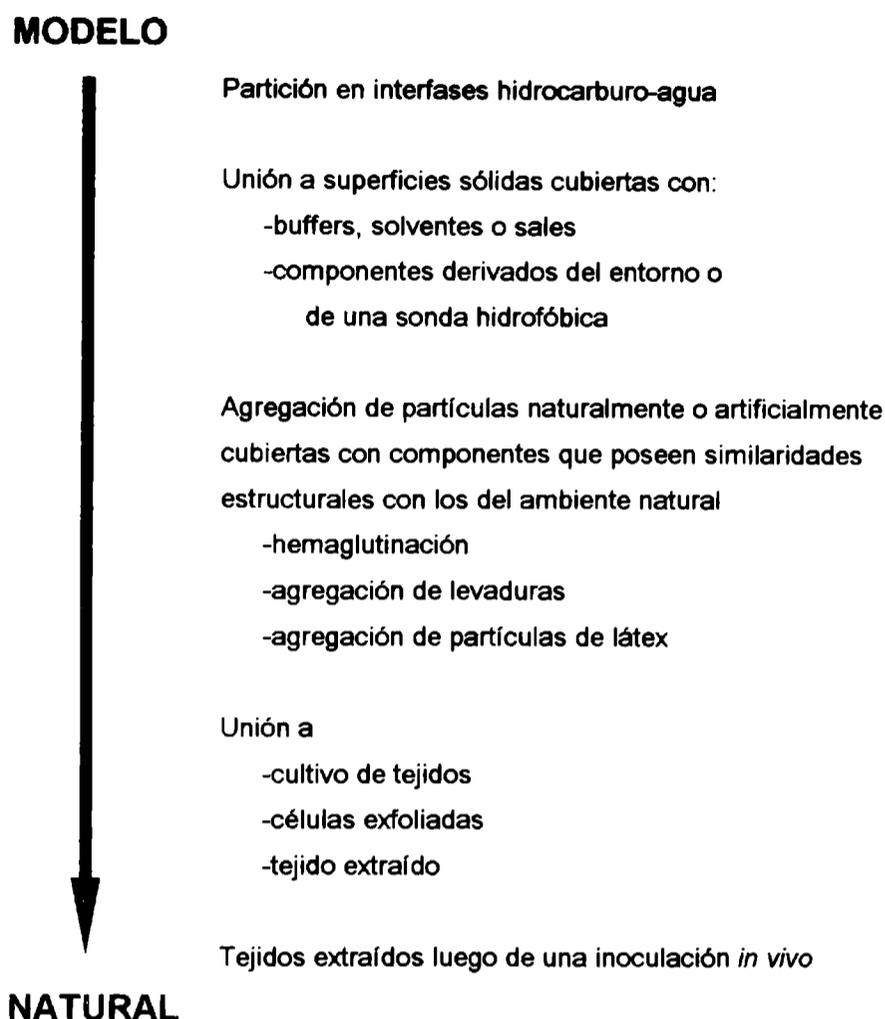
Poca es la información disponible acerca de los mecanismos de adherencia de *Bifidobacterium*, pero es posible que la adhesión a células intestinales se encuentre impulsada por un alto nivel de ácidos grasos y ácidos lipoteicoicos. La fuerte carga electrostática de los polisacáridos también favorece la adhesión de paredes celulares<sup>315,375</sup>. *Bif. longum* ATCC 15707 produce exopolisacáridos ricos en glucosa y galactosa y ácidos urónicos (hexosaminas) en una relación 4:4:1<sup>1</sup>. No se descarta la participación de factores proteicos en la adherencia de estas bacterias al epitelio intestinal<sup>241</sup>.

### **Metodología y modelos para el estudio de la adhesión bacteriana**

La importancia de la adhesión y colonización microbiana fue realmente apreciada desde que se cuenta con técnicas moleculares para analizar los modelos y mecanismos de la interacción célula-sustrato. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un sistema experimental que por sí solo pueda ser utilizado para caracterizar todos los aspectos de dichas interacciones. La mayoría de las técnicas empleadas actualmente ofrecen información parcial, generalmente sobre eventos particulares de una complicada serie de interacciones. A continuación se hace una breve referencia en cuanto a los métodos utilizados en el estudio de la adhesión.

El desarrollo de un sistema modelo para el estudio de la adherencia bacteriana persigue tres objetivos principales: **(1)** desarrollar una forma de caracterizar un sistema natural; **(2)** determinar propiedades de las adhesinas y/o sus receptores; y **(3)** evaluar el rol de moléculas que contribuyen al proceso de adhesión, pero que no participan directamente como lo hacen las adhesinas o los receptores.

Los sistemas modelo con que actualmente se cuenta para el estudio de la adhesión se pueden ordenar jerárquicamente como se ilustra en el siguiente esquema:



**Figura 3.** Sistemas modelo empleados comúnmente en el estudio de la adhesión de microorganismos a entornos naturales. Reproducido de I. Ofek and R. J. Doyle<sup>311</sup>

En un extremo se citan modelos utilizados para monitorear la presencia de moléculas superficiales involucradas en la adhesión, y en el otro extremo se citan aquellos modelos aplicados en el estudio de la adherencia de bacterias sobre superficies blanco. Los sistemas de monitoreo asumen que las moléculas que participan de la interacción juegan un rol en la adhesión de bacterias a superficies blanco. Esta consideración debe ser validada para cada especie bacteriana mediante ensayos de correlación apropiados.

Existen otros sistemas disponibles que pueden ser utilizados para ensayar la expresión de adhesinas o receptores. En el caso de adhesinas bacterianas, la unión a superficies recubiertas con macromoléculas derivadas del entorno es una técnica simple y muy útil especialmente cuando la especificidad del receptor de las adhesinas no ha sido todavía caracterizado. Estas macromoléculas pueden ser componentes de la matriz extracelular (CME). Los CME pueden ser complejos y estar compuestos por una gran variedad de proteínas/glicoproteínas e hidratos de carbono como la laminina, fibronectina, colágenos, vitro-

nectina, heparina, etc.<sup>227,427,115</sup>. Cada uno de estos componentes es estructuralmente complejo y compuesto por múltiples dominios funcionales. Su amplia distribución en el cuerpo del huésped los hace buenos candidatos como receptores de microorganismos que posean la capacidad de colonizar nichos. Es más, muchos microorganismos se unen a uno o más CME a través de interacciones específicas<sup>74,38,406,253</sup>; sin embargo son pocos los componentes de que han identificado o caracterizado. Es posible que un solo CME posea muchos posibles receptores para una gran variedad de ligandos bacterianos como ocurre en *Vibrio cholerae*<sup>457</sup> y *Escherichia coli*<sup>132</sup> que se unen a fibronectina pero en dos regiones diferentes.

Para bacterias con supuestas lectinas superficiales, la agregación o aglutinación de partículas recubiertas de glicoconjugados o de células con estructuras carbohidratadas específicas en su superficie es el modelo de elección<sup>309,86</sup>. La reacción de hemaglutinación se utiliza frecuentemente como sistema de *screening* para ciertas enterobacterias debido a que la superficie de los eritrocitos se asemeja a la de los tejidos normalmente colonizados por dichas bacterias<sup>128</sup>. La hemaglutinación inducida por bacterias es generalmente simple de realizar y se inhibe fácilmente por moléculas simples. Más aún, debido a que los eritrocitos son ricos en glicoconjugados superficiales, los glóbulos rojos constituyen una herramienta valiosísima para determinar actividad de lectinas sobre la bacteria.

Los otros sistemas descritos en la Figura 3 fueron diseñados principalmente para caracterizar la adhesión a superficies naturales o a células vivas. En oposición a los sistemas de monitoreo, la

adhesión a superficies blanco naturales a nivel molecular es más compleja, especialmente en el caso de la adhesión a células animales u otras superficies recubiertas con macromoléculas. Los sistemas de cultivo de tejidos ofrecen algunas ventajas como la uniformidad celular, la reproducibilidad entre ensayos y la simplicidad de los experimentos. Sin embargo, poseen ciertas desventajas considerando que las células en cultivo pueden tener superficies diferentes a las de las parentales especialmente en relación a la distribución y accesibilidad de los receptores. Algunos investigadores han utilizado drogas, anticuerpos y enzimas para modificar la superficie de la monocapa de células en cultivo previamente al ensayo de adherencia. Estas variables han contribuido notoriamente en la elucidación de la naturaleza de los receptores de adhesinas bacterianas.

Las células exfoliadas o *scraped cells* son muy útiles cuando el objetivo es estudiar las propiedades adherentes de bacterias que normalmente colonizan esos tejidos<sup>107</sup>. La ventaja reside en la dificultad en mantener la viabilidad de las células por largos períodos de tiempo. Más aún, estas células albergan microbiota normal que podría ocupar los sitios que se están estudiando.

El modelo más *natural* con que se cuenta lo componen extractos de tejido aunque sólo se han utilizado de fuentes limitadas (biopsias) y generalmente se ha aplicado a segmentos determinados del tracto gastrointestinal.<sup>13,469</sup> El sistema *in vivo* utilizando la inoculación de animales de laboratorio o voluntarios humanos parecería aproximarse al sistema natural óptimo, pero también presenta desventajas. Luego de la

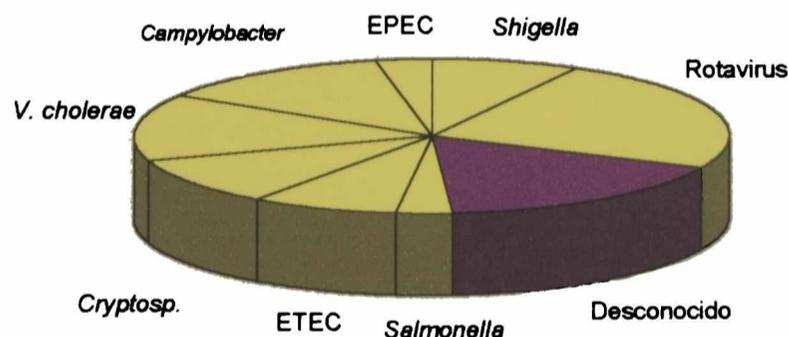
inoculación de los animales, es frecuente la necesidad de sacrificarlos, extraer los tejidos de interés y determinar el grado de adhesión. También es necesario contar con una población de animales lo suficientemente grande que provea

datos estadísticamente representativos. En contraste, los sistemas *in vivo* son excelentes para confirmar datos obtenidos con otros modelos que utilizan blancos artificiales<sup>413</sup>.

### ***Infecciones del tracto gastrointestinal***

En el hombre, la enteritis aguda o colitis puede ser causada por una gran variedad de microorganismos incluyendo hongos, protozoarios, virus y bacterias. Aunque las formas virales son las más frecuentemente diagnosticadas, las infecciones del intestino grueso por patógenos bacterianos son un serio problema clínico. En la Figura 4 se muestran los principales agentes

causantes de infecciones intestinales. En términos generales, la mayoría de los agentes infecciosos pertenecen al grupo de *verdaderos patógenos* definido por Berg<sup>17</sup>, que se ha discutido anteriormente (pág. 11), y pueden ocasionalmente perturbar la homeostasis intestinal generando un severo cuadro diarreico.



**Figura 4.** Agentes etiológicos más importantes en las infecciones gastrointestinales humanas. Estadísticas obtenidas de la World Health Organization en 1990. EPEC, *E. coli* enteropatógena; ETEC *E. coli* entero-toxigénica.

Los patógenos intestinales manifiestan una gran variedad de factores de virulencia que les permiten superar las defensas del hospedador. Los

microorganismos enteroinvasivos se multiplican dentro de los enterocitos o colonocitos y causan finalmente la muerte celular. Ejemplos de esto lo

muestran *E. coli*, salmonelas, shigelas, yersinias, vibrios y aeromonas. Otros patógenos como las cepas EPEC (*E. coli* enteropatógena) y ETEC (*E. coli* enterotoxigénica) son citotóxicas. Ellas secretan una variedad de agentes dirigidos a causar la muerte celular alterando el equilibrio osmótico de los enterocitos. Muchos poseen ambas características: son enteroinvasivos y enterotoxigénicos. Otras bacterias que causan inflamación tienen propiedades altamente adhesivas como la ETEC (enterotoxigénica) o EAEC (enteroagregativa) que se unen fuertemente a la mucosa intestinal.

Durante la evolución, el hombre ha desarrollado mecanismos de defensa contra estos microorganismos invasores. Los mecanismos no inmunológicos más importantes involucran la secreción gástrica, la motilidad intestinal, la producción de lisozima, la secreción pancreática y la bilis. Las mucinas constantemente secretadas por el intestino son una eficiente barrera contra la

invasión y la colonización<sup>336</sup>. Pero la forma de defensa más importante del intestino grueso la compone la flora autóctona. Esta forma de resistencia a bacterias desconocidas, ampliamente estudiada en animales gnotobióticos, es la responsable de la estabilidad a largo plazo de la microbiota intestinal. Más aún, su acción ha sido convincentemente demostrada en humanos en los que pacientes con colitis asociada a *Clostridium difficile* han manifestado una recuperación exitosa luego de una reinstalación de la flora con suspensiones fecales de dadores sanos<sup>41,383</sup>.

Sin embargo, estas defensas pueden ser superadas por microorganismos patógenos generando un cuadro diarreico. Esto puede aparecer debido a toxinas generadas por el patógeno, factores del entorno, inmunidad local, interacciones entre microorganismos, la edad, el estrés, una enfermedad subyacente del hospedador o el efecto de la quimioterapia<sup>131,365</sup>.

### **Probióticos vs. Patógenos**

Desde el punto de vista de las propiedades nocivas, las bacterias intestinales pueden estar involucradas en la manifestación de infecciones localizadas o sistémicas, putrefacción intestinal, formación de toxinas y en la producción de sustancias mutagénicas o carcinogénicas. Alternativamente, algunos microorganismos intestinales como las bifidobacterias y los lactobacilos, confieren propiedades saludables como producción de vitaminas, estimulación del sistema inmune a

través de mecanismos no patogénicos, disminución del nivel de triglicéridos e inhibición del crecimiento y establecimiento de especies microbianas nocivas.

Un rol importante de la flora probiótica relacionado con la resistencia a la colonización se basa en la reducción de actividades metabólicas de las especies patógenas. Existen varios mecanismos mediante los cuales componentes de la flora

benéfica generan dicha resistencia a la colonización. Las bacterias anaeróbicas facultativas mantienen un bajo potencial redox en el colon utilizando rápidamente trazas de O<sub>2</sub> que difunden al lumen intestinal. En neonatos, los microorganismos anaerobios facultativos (coliformes, estreptococos, estafilococos) que aparecen durante los primeros momentos de vida, reducen el potencial redox a medida que desarrollan en el intestino, permitiendo la subsiguiente colonización por las bifidobacterias y eubacterias<sup>103</sup>

Los ácidos orgánicos son los principales productos de fermentación en el colon y a su vez son inhibidores de ciertas bacterias invasivas, incluyendo especies potencialmente patógenas<sup>460</sup>. Se cree que dichos productos de fermentación disminuyen el pH intestinal a niveles a los cuales las especies invasivas son incapaces de competir efectivamente. La producción de ácidos y el mantenimiento de un bajo potencial redox sumado al hecho de la competencia por nutrientes y sitios de adhesión disponibles en la mucosa intestinal son factores importantes que determinan la composición de la flora, causando una rápida eliminación de las especies que son incapaces de competir.

Las interacciones entre las bacterias que determinan que un microorganismo particular sea indígena del colon o transitorio en el contenido luminal no están claros hasta el momento. Sin embargo, algunas bacterias producen sustancias que ayudan a proteger su nicho ecológico. Estos productos pueden ser analizados sobre la base de si su actividad es principalmente contra géneros taxonómicamente relacionados o de si su acción es dirigida a miembros de la misma especie. El ejemplo más conocido es la secreción de

bacteriocinas por *Escherichia coli*. Esta colicina, de bajo peso molecular es efectiva contra otras cepas de *E. coli* y contra enterobacter<sup>188</sup>.

Muchos investigadores han reportado la capacidad de bacterias acidolácticas de producir sustancias antibacterianas activas contra organismos patógenos<sup>272</sup>. Se pueden agrupar en dos categorías:

- productos de fermentación bacteriana, incluyendo metabolitos primarios, como ácido láctico, dióxido de carbono, diacetilo y peróxido de hidrógeno<sup>93</sup>;
- bacteriocinas, compuestos proteicos que manifiestan actividad contra otras bacterias relacionadas.

Hasta el momento se han reconocido tres grupos diferentes de bacteriocinas<sup>99</sup>: péptidos pequeños térmicamente estables, péptidos grandes termolábiles y péptidos modificados como los lantibióticos. Los lactobacilos, lactococos, pediococos, bifidobacterias, leuconostoc, estreptococos y enterococos son productores de bacteriocinas<sup>99,151</sup>. Los trabajos de Dodd y Gasson<sup>99</sup> y de De Vuyst y Vandamme<sup>93</sup> hacen una buena discusión sobre las propiedades de algunas bacteriocinas, cepas productoras, información genética asociada y microorganismos blanco.

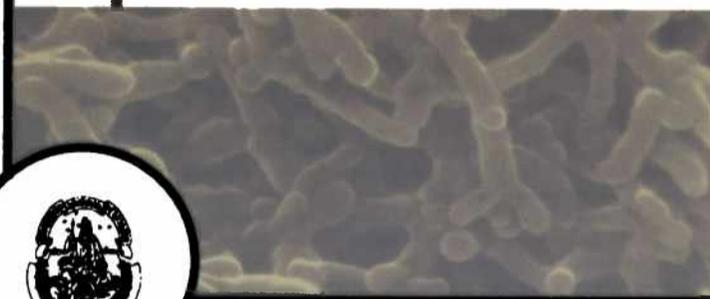
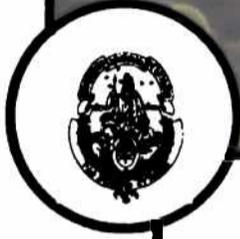
La lactocina 27, producida por *Lb. helveticus* LP27, es un complejo macromolecular compuesto por proteínas y lipopolisacáridos con actividad bacteriostática hacia otros lactobacilos<sup>438</sup>. Otra cepa de *Lb. helveticus* produce helveticina J, una bacteriocina termolábil<sup>224</sup> mientras que *Lb. helveticus* CNRZ450 secreta un complejo pequeño también con actividad bacteriostática hacia un

estrecho rango de bacterias relacionadas<sup>425</sup>. Dos especies de *Lb. acidophilus*, N2 y 11088, producen una sustancia antimicrobiana conocida como lactacina B y F respectivamente<sup>11</sup>, en tanto que la curvacina C ha sido aislada de *Lb. curvatus* LTH1174. Esta bacteriocina causa la lisis de otros lactobacilos y de contaminantes de alimentos como las carnobacterias y las listerias<sup>426</sup>. Itoh y col.<sup>205</sup> demostraron que la gassericina A, producida por *Lb. gasseri*, es bactericida contra *Listeria monocytogenes* y otros patógenos entéricos. Hasta el momento no se han detectado bacteriocinas contra bacterias Gram (-).

*Bifidobacterium* también produce sustancias antagonistas del crecimiento de otras bacterias<sup>419</sup>. El mecanismo mediante el cual esto ocurre ha sido atribuido a la generación de productos de fermentación ácidos (acetato, lactato) durante el crecimiento. Sin embargo, Anand y col.<sup>4</sup> y Mantere-Alhonen y col.<sup>260</sup> han demostrado que las bifidobacterias (*Bif. bifidum* y *Bif. longum*) podrían también inhibir de una forma independiente del pH. Esto ha sido confirmado por Gibson y Wang<sup>151</sup> en una serie de estudios que involucran ensayos

de cocultivos en fermentadores continuos y en batch. Ellos hallaron que extractos de sobrenadantes de ocho especies diferentes de bifidobacterias inhibían directamente el crecimiento de un amplio rango de patógenos intestinales incluyendo bacterias pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Clostridium*.

En síntesis, un gran número de actividades ha sido propuesto como mecanismos responsables de la eliminación de microorganismos foráneos por parte de bacterias tanto autóctonas como probióticas. Estas incluyen: competencia por nutrientes presentes en cantidades limitadas, producción de metabolitos que inhiben la multiplicación de patógenos, estimulación de las defensas del hospedador, generación por parte de los probióticos o de la flora autóctona de condiciones microambientales que afecten negativamente a los patógenos y la competencia por sitios de unión al epitelio intestinal. Uno o varios de estos mecanismos pueden estar operando a la vez.



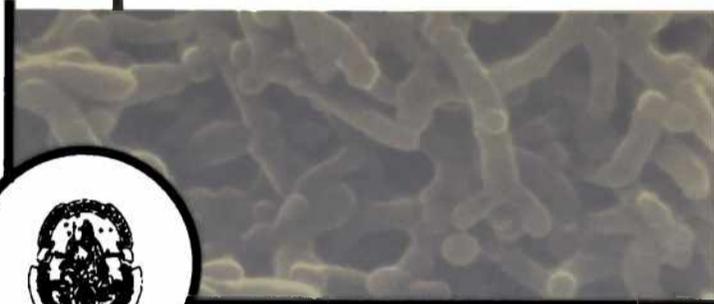
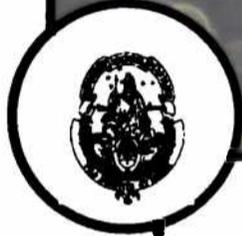
# **O**BJETIVOS **G**ENERALES

## OBJETIVOS GENERALES

Para el presente trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos generales

✿ Desarrollar un método cuantitativo para la determinación de bacterias del género *Bifidobacterium* y evaluar su aplicabilidad en estudios de adherencia y como herramienta en la cuantificación en productos probióticos

✿ Estudiar dos aspectos relacionados con el carácter probiótico de cepas de *Bifidobacterium*: las propiedades superficiales que permitirán especular sobre la capacidad de adherencia intestinal; y la capacidad de competir con bacterias patógenas. Ambos estudios se exploraron en ensayos *in vitro*.



# CAPÍTULO I

## CAPÍTULO I

**E**n los años que sucedieron a los trabajos de Metchnikoff<sup>276</sup>, el concepto de probiótico ha sido aceptado por científicos y consumidores en todo el mundo, lo que desencadenó la evolución en la producción de productos fermentados desde las leches ácidas tradicionales a las preparaciones conteniendo microorganismos con potencial efecto benéfico. A pesar del esfuerzo invertido para elucidar y definir el efecto probiótico, se debe admitir que poco se conoce sobre la forma en que los probióticos actúan.

Sin embargo, es conveniente que para lograr los denominados efectos benéficos, los microorganismos lleguen vivos al intestino considerando que el estómago y el duodeno representan un ambiente hostil a superar. Más aún, aunque logren superar estos obstáculos, la

activa peristalsis de algunas áreas podría eliminar a los microorganismos incapaces de permanecer adheridos como colonizadores o de tener una alta tasa de crecimiento para evitar la dilución<sup>64,163,230,139</sup>. Se deduce de esto que la administración de probióticos en una dosis adecuada es crucial. A pesar de que varios investigadores han sugerido la administración de una cantidad superior a  $10^6$  microorganismos/g por día<sup>367,396</sup> para observar algún efecto evidente, no existen evidencias inequívocas que indiquen cuál es la dosis mínima de probiótico para lograr una respuesta probiótica completa. En Japón, la Fermented Milk and Lactic Acid Beverages Association ha establecido un mínimo de  $10^7$  bifidobacterias vivas/ml en productos lácteos frescos<sup>202</sup>. La Swiss Food Regulation, la International Standard of FIL/IDF y el MERCOSUR requieren que tales productos contengan más de  $10^6$  UFC/g<sup>201,274,396</sup>.

## Capítulo I

Las preparaciones probióticas varían en la forma en que se encuentran en el mercado, afectando consecuentemente su performance. Existen actualmente más de veinte productos probióticos en el mercado británico<sup>139</sup> y son alrededor de 5 las compañías norteamericanas que comercializan productos con lactobacilos y bifidobacterias en los Estados Unidos<sup>367</sup>. La utilización de *Bifidobacterium* en productos probióticos se encuentra más desarrollada en Japón que en Estados Unidos. Hacia 1984 existían ya alrededor de 53 productos conteniendo *Bifidobacterium* en el país asiático<sup>202</sup>. En la Argentina, por el contrario, sólo durante estos últimos años se han puesto en el mercado productos nacionales conteniendo lactobacilos probióticos y hacia 1995 se ha permitido la entrada de productos importados como Yakult. En la década del 80 el Dr. Oliver y su equipo de colaboradores, comenzó en Tucumán el desarrollo de una leche probiótica conteniendo una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y *Lb. casei*. La tecnología desarrollada para producir la "Leche Bio" en acuerdo con la empresa láctea Sancor Cooperativas Unidas Limitada, se vende actualmente en varios países de Latinoamérica, incluyendo Colombia, Ecuador y Venezuela. En conjunto con la firma Christian Hansen, que se encarga de la multiplicación de las cepas a nivel industrial, se planea exportar la tecnología a empresas de Holanda, Puerto Rico y México. Desde fines de la década del 80, la compañía Gándara comercializa yogures y leches cultivadas conteniendo probióticos. Algunos productos de la línea La Serenísima contienen el fermento *Lactobacillus GG* con probados efectos probióticos.<sup>21</sup>

Los productos probióticos pueden presentarse también como polvos, tabletas, pastas o aerosoles con diferentes excipientes para mantener las preparaciones en las condiciones requeridas. El tipo de preparación empleada es determinado por la forma en que se pretende utilizar el probiótico o por su vía de administración<sup>139</sup>, pero todas ellas deben asegurar niveles adecuados de microorganismos viables. En especial, las bifidobacterias han demostrado ser particularmente sensibles a las condiciones de almacenamiento y a los métodos de preparación. De ahí que el mantenimiento de la viabilidad de las bifidobacterias que redunde en una vida útil aceptable haya sido un gran desafío para las industrias lácteas.

A pesar de que muchas entidades recomiendan una concentración mínima de bifidobacterias para recibir los potenciales efectos benéficos de estos microorganismos, no existen recomendaciones sobre una metodología oficial que asegure una enumeración precisa de las bacterias de este género<sup>446</sup>. Como las bifidobacterias son agregadas al producto fermentado generalmente en una etapa final y presentan alta sensibilidad al oxígeno y los bajos pHs, el recuento de bifidobacterias ha causado siempre controversia<sup>396</sup>. En consecuencia, es muy importante contar con una metodología sensible y específica que permita la enumeración de bifidobacterias presentes en productos lácteos o preparaciones probióticas.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son comúnmente enumeradas mediante recuento de viables en medios específicos<sup>160,388,420</sup>. Cuando se analizan preparaciones polimicrobianas, es aconsejable contar con un medio selectivo que reduzca el crecimiento de microorganismos

## Capítulo I

concomitantes que podrían inhibir el desarrollo de las bifidobacterias por sobrecrecimiento o por liberación de sustancias tóxicas. Entre estos medios han sido propuestos medios sólidos selectivos conteniendo vitaminas, LiCl y antibióticos como agentes selectivos<sup>49,200,302,349,398,446,58</sup>. Se caracterizan también por contener sustancias que disminuyen el potencial redox (por ejemplo, cisteína, cistina, ácido ascórbico, sulfito de sodio). Algunos tienen una sola fuente de carbono diferente de la fermentada por bacterias lácticas, como agente selectivo para inhibir el crecimiento de estas bacterias<sup>338</sup>. Sin embargo, estos medios basados en la capacidad de las cepas de fermentar azúcares específicos tienen la desventaja de alcanzar solo una selectividad parcial considerando que no todas las bifidobacterias tienen el mismo perfil de fermentación e inclusive algunos lactobacilos pueden fermentar el azúcar seleccionado<sup>163,233</sup>. Sonoike y col.<sup>409</sup> utilizaron oligosacáridos transgalactosilados (TOS) como única fuente de carbono para preparar un medio selectivo para *Bifidobacterium* en una población mixta con *Lactobacillus* y *Streptococcus*, ya que estos últimos son incapaces de utilizar TOS. Wijsman y col.<sup>458</sup> modificaron este medio agregándole antibióticos y LiCl. Los laboratorios Christian Hansen han propuesto una metodología para realizar recuentos diferenciales de rutina en leches fermentadas, quesos y yogures<sup>8</sup>. Sin embargo, esta metodología involucra la utilización de varios medios de tediosa preparación. El trabajo publicado por Charteris y col.<sup>58</sup> ofrece una buena descripción de otros medios utilizados para diferenciar *Bifidobacterium* en poblaciones mixtas como starters de yogures y quesos.

Desde su primera descripción por Tissier a principios de este siglo<sup>428,429</sup>, la ubicación taxonómica de las bifidobacterias ha causado polémica. Actualmente, este género puede ser diferenciado de bacterias pertenecientes a grupos como *Lactobacillus*, *Actinomyces* y corinebacterias anaeróbicas por medio de una ruta metabólica particular, el "bifid shunt"<sup>338</sup> cuya enzima clave es la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (F6FFC). En consecuencia, la demostración de actividad fosfoacetolasa sirve como herramienta taxonómica en la identificación de este género. Esta enzima clave en la fermentación glicolítica produce la ruptura de la fructosa-6-fosfato para originar acetilfosfato y eritrosa-4-fosfato. El residuo acilo del anhídrido puede ser convertido en ácido hidroxámico por reacción con hidroxilamina<sup>252</sup>. El ácido hidroxámico reacciona con Fe<sup>+3</sup> originando un complejo rojo-púrpura que ha sido utilizado para la detección de la actividad de la enzima<sup>389,61,92,337,378</sup>. Por consiguiente, la demostración de la presencia de esta vía puede ser utilizada como método cuantitativo siempre que se establezca una proporcionalidad entre la actividad enzimática y la biomasa bacteriana. Esta aproximación fue explorada como uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis. Otros autores han puesto en evidencia la participación de esta vía mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) utilizando 3-C<sup>13</sup>-glucosa como sustrato.

Considerando que muchas cepas del género *Bifidobacterium* presentan la propiedad de ser autoagregantes<sup>327</sup>, un método basado en la medida de la actividad enzimática eliminaría los inconvenientes encontrados en metodologías basadas en recuento de viables o medidas turbidimétricas. Por otro lado, la F6FFC es una

## Capítulo I

enzima presente solamente en *Bifidobacterium* y en consecuencia podría utilizarse como herramienta cuantitativa inclusive en presencia de otros microorganismos.

Como se comentó anteriormente, la adhesión al epitelio intestinal es un importante factor a considerarse en la selección de bacterias probióticas. Una aplicación de un método basado en la cuantificación de bifidobacterias mediante la medida de la actividad enzimática sería la estimación cuantitativa de la adherencia de *Bifidobacterium* a monocapas de células epiteliales en cultivo. La medida de la actividad de la F6FFC permitiría determinar sin inconvenientes la

cantidad de bacterias adheridas considerando su ausencia en células humanas o animales que normalmente se utilizan como modelos para estudiar la adherencia bacteriana.

Muchas veces sucede que el caudal de muestras a procesar supera la capacidad operativa técnica, por lo que es deseable encontrar una alternativa que permita también una medida cuantitativa de las bacterias de este género. Una estrategia atractiva es utilizar el ampliamente conocido método estadístico de recuento denominado Número Más Probable (NMP) en combinación con la determinación de la actividad de la F6FFC.

## **Objetivos**

En la primera etapa del presente trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos:

Desarrollar una metodología que permita la cuantificación de bacterias del género *Bifidobacterium* de manera precisa y específica mediante la detección de la actividad de la enzima fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (F6FFC).

Aplicar la metodología desarrollada a la determinación cuantitativa de *Bifidobacterium* adheridos a sustratos biológicos o inertes.

Estudiar la aplicación de la técnica desarrollada para la cuantificación de bifidobacterias en productos lácteos.

## **Metodología**

### **PARTE I: Determinación de la factibilidad de la utilización de la medida de actividad de F6FFC para la cuantificación de *Bifidobacterium***

**Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.** Se utilizaron las cepas de *Bifidobacterium* de las siguientes especies: *Bifidobacterium pseudolongum* CIDCA 531, *Bif. breve* CIDCA 532, *Bif. bifidum* CIDCA 533, CIDCA 536, CIDCA 537, CIDCA 5310 y CIDCA 5311 y *Bif. infantis* CIDCA 538. La cepa CIDCA 531 fue aislada en nuestro laboratorio a partir de un producto comercial<sup>163</sup> mientras que las demás cepas fueron aisladas a partir de materia fecal de neonatos sanos<sup>163,327</sup>. En la Tabla 1 se detalla el origen de las cepas de *Bifidobacterium* utilizadas en este trabajo de Tesis. Las cepas fueron identificadas previamente sobre la base del perfil de fermentación de azúcares, patrón de proteínas totales, actividad de F6FFC, etc.<sup>327</sup>. Las cepas *Bif.*

*bifidum* CIDCA 533, *Bif. bifidum* CIDCA 536 y *Bif. infantis* CIDCA 538 pertenecen actualmente a la colección de Nestlé bajo la denominación NCC 235, NCC 189 y NCC 200 respectivamente.

Las bacterias se conservan normalmente en suspensiones stock a -80 °C con 10% de glicerol estéril. Para este trabajo las cepas se propagaron dos veces inoculando 100 µl de la suspensión congelada en 10 ml de medio Triptone-Phytone-Yeast extract (TPY)<sup>377</sup> o de Man Rogosa Sharpe (MRS)<sup>87</sup> según corresponda, suplementado con cisteína 0.05%, y luego un segundo cultivo al 0.01% en el volumen que se desea utilizar. Los cultivos líquidos de bifidobacterias se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C hasta alcanzar la

## Capítulo I

fase estacionaria. Esta fase se alcanza en diferentes momentos dependiendo del medio de cultivo. La cosecha en medio MRS se realizó a las 24 horas y en TPY a las 48 horas. La composición

de los medios de cultivo, de los colorantes y la descripción de la obtención de las condiciones anaeróbicas se encuentran en el Apéndice I.

**Tabla 1.** Origen de las cepas de *Bifidobacterium* utilizadas en este estudio (Reproducida de Gómez Zavaglia y col.<sup>163</sup> y Pérez y col.<sup>327</sup>)

Cepa <sup>a</sup>	Especie <sup>b</sup>	Fuente <sup>c</sup>	Edad <sup>d</sup>	Alimentación
CIDCA 531	<i>Bif. pseudolongum</i>	leche fermentada		
CIDCA 532	<i>Bif. breve</i>	a	2m 2d	leche materna + formulada
CIDCA 533 (NCC 235)	<i>Bif. bifidum</i>	a	2m 2d	leche materna + formulada
CIDCA 536 (NCC 189)	<i>Bif. bifidum</i>	b	1m 5d	leche materna
CIDCA 537	<i>Bif. bifidum</i>	b	1m 5d	leche materna
CIDCA 538 (NCC 200)	<i>Bif. infantis</i>	c	21d	leche materna
CIDCA 5310	<i>Bif. bifidum</i>	d	6d	leche materna
CIDCA 5311	<i>Bif. bifidum</i>	d	6d	leche materna
CIDCA 5312	<i>Bif. breve</i>	d	6d	leche materna
CIDCA 5313	<i>Bif. bifidum</i>	d	6d	leche materna
CIDCA 5314	<i>Bif. breve</i>	d	6d	leche materna
CIDCA 5315	<i>Bif. adolescentis</i>	e	3m	leche materna

<sup>a</sup> Todas las cepas aisladas dieron reacción positiva para la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa

<sup>b</sup> Determinado por patrón de fermentación de azúcares y perfil de proteínas totales

<sup>c</sup> Cepas con la misma letra fueron aisladas de la misma muestra de heces de neonato

<sup>d</sup> La edad se expresa en meses (m) y en días (d)

Como controles de pureza de rutina de los cultivos de bifidobacterias se realizaron los siguientes análisis:

Estrías del cultivo en agar TPY o MRS incubado a 37 °C en aerobiosis; la presencia de desarrollo microbiano en estas condiciones implica contaminación del cultivo.

Evaluación de las características macroscópicas típicas del cultivo de bifidobacterias (autoagregación, adherencia al vidrio, etc.)

Microscopía óptica de extendidos coloreados con cristal violeta con el objeto de verificar la morfología típica (formas bífidas, pleomorfismo, agregados, etc.)

## Capítulo I

En general, salvo que se indique lo contrario, los cultivos líquidos se procesaron de la siguiente manera:

- 1) Centrifugar el cultivo a 10000 *g* (Sorvall RC-5B, DuPont Co., Wilmington, DE) durante 10 min a 4 °C.
- 2) Descartar el sobrenadante y lavar el pellet dos veces con buffer PBS (phosphate buffered saline) conteniendo 6.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.5 g/l ClNa, pH 7 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Los lavados se realizaron centrifugando a 10000 *g* por 10 min a 4 °C cada vez.
- 3) Descartar el sobrenadante y resuspender las células en PBS. Estas suspensiones stock se llevaron a una cantidad aproximada de 10 mg/ml (suspensiones stock). Estas suspensiones se prepararon cada vez de cultivos frescos y mantenidas a temperatura ambiente por no más de 4 hs hasta el momento del ensayo.

### ***Determinación de actividad de la enzima F6FFC.***

#### **Reactivos:**

- 1) Buffer fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mM pH 6.5 suplementado con cisteína 0.05% p/v
- 2) NaF 6 mg/ml + iodoacetato de Na 10 mg/ml
- 3) Hidroxilamina-HCl 13.9% en H<sub>2</sub>O neutralizada con NaOH hasta pH 6.5
- 4) Ácido tricloroacético (TCA) 15% p/v en H<sub>2</sub>O
- 5) HCl 4M
- 6) FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 5% p/v en HCl 0.1M
- 7) Fructosa-6-fosfato (sal disódica, 98% de pureza) 80 mg/ml en H<sub>2</sub>O

Los reactivos provienen de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a no ser que se indique lo contrario.

**Procedimiento:** Se utilizó una modificación del procedimiento descrito por Scardovi y Trovatelli<sup>378</sup>:

- 1) Cosechar las bacterias y lavarlas dos veces con buffer (1), resuspender en 1 ml de buffer (1)
- 2) Sonicar en frío durante 15 min
- 3) Agregar 20 µl de reactivo (2) y 10 µl de reactivo (7) a 60 µl de sonicado
- 4) Incubar 30 min a 37 °C
- 5) Detener la reacción con 70 µl de reactivo (3)
- 6) Incubar 10 min a temperatura ambiente
- 7) Agregar 40 µl de reactivo (4) y 40 µl de reactivo (5)
- 8) Agregar 40 µl de desarrollador (6)
- 9) Mezclar hasta aparición de color rojo-púrpura que indica la presencia de la enzima
- 10) Centrifugar 3 min a 14000 *g*
- 11) Cargar una placa de microtitulación de 96 fosas con fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 250 µl del sobrenadante
- 12) Leer a 500 nm en un lector de palcas (Spectra Rainbow, TECAN, Viena)

**Precauciones:** La sonicación debe realizarse en frío ya que se podría inactivar la enzima.

**Blancos:** Se realizó un blanco<sub>1</sub> conteniendo todos los reactivos sin colocar bacterias, este es el blanco de reactivos. La absorbancia producida por este blanco debe restarse a la producida por todas las muestras. También es importante realizar un blanco<sub>2</sub> que consiste en incluir una muestra a la que no se le agrega el reactivo (7), como control

de pureza. Un resultado positivo en estas condiciones indica la metabolización de la fructosa

por una vía alternativa al "bifid shunt".

**Tabla 2.** Esquema del protocolo para la reacción enzimática.

	<i>Muestra</i>	<i>Blanco</i>
muestra sonicada	60 µl	60 µl
NaF-Iodoacetato de Na	20 µl	20 µl
fructosa-6-fosfato (F-6-P)	10 µl	-
buffer	-	10 µl
<b>Incubar 30 min a 37 °C</b>		
hidroxilamina	70 µl	70 µl
<b>Incubar 10 min a T amb</b>		
TCA	40 µl	40 µl
HCl	40 µl	40 µl
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	40 µl	40 µl

**Determinación del espectro de absorción del complejo férrico.** Con el objeto de determinar el máximo de absorción del complejo de Fe<sup>+3</sup> para proceder con el desarrollo de la técnica cuantitativa, se utilizaron cultivos bacterianos correspondientes a las cepas *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 y *Bif. bifidum* CIDCA 536.

Luego de realizar la reacción descrita anteriormente se realizó un espectro de absorción en un espectrofotómetro Beckman (Beckman DU-650, Beckman Co., IL) barriendo un rango de 400 a 800 nm. De la misma manera se realizó un espectro de absorción de la muestra blanco<sub>1</sub>. Luego de restar el espectro obtenido para las bacterias del obtenido para el blanco<sub>1</sub>, se determinó el máximo de absorción gráficamente.

**Relación entre la actividad enzimática y la biomasa bacteriana.** Para determinar si la actividad enzimática tiene una relación lineal con la biomasa de bifidobacterias y de esta manera utilizar el ensayo como medida cuantitativa, se realizaron varias diluciones de las suspensiones stock de todas las cepas, de las que se determinó peso seco y actividad enzimática.

El peso seco se determinó colocando 1 ml de cada dilución bacteriana en frascos de vidrio y calentando a 100 °C hasta peso constante. Estas determinaciones fueron realizadas por duplicado con una sensibilidad de 0.01 mg en una balanza Metler AE 240 (Metler Instrumente AG, Zurich, Suiza). La actividad enzimática fue determinada como se describió anteriormente.

Para determinar la linealidad entre la actividad de F6FFC y biomasa se utilizaron dos cultivos

## Capítulo I

independientes de cada cepa. De cada uno se realizaron diluciones y se determinó por duplicado la actividad de la enzima y el peso seco. Finalmente, los valores de absorbancia a 500 nm correspondientes a la actividad enzimática fueron graficados contra los valores de peso seco y se aplicó un análisis de regresión lineal.

### **Optimización de la sensibilidad del ensayo enzimático**

Una de las etapas limitantes del ensayo en relación al tiempo que consume la técnica es la de sonicación. La estrategia fue reemplazar esta etapa por una de permeabilización de la membrana bacteriana pretratando las células con un detergente. De esta manera se ahorra tiempo y se permite procesar una mayor cantidad de muestras. En consecuencia, se evaluaron cultivos puros de bifidobacterias (cepas *Bif. bifidum* CIDCA 536, *Bif. bifidum* CIDCA 537 y *Bif. bifidum* CIDCA 5310) con respecto al desarrollo de color luego del pretratamiento con 0.25% de Triton X-100 (BDH Chemicals Ltd. Poole, England) y se compararon los resultados de pretratamientos combinados de sonicación (de baño o de punta) con y sin Triton X-100. Se evaluaron dos tipos de

sonicación: con un sonicador de baño a 50/60 Hz (Cole-Palmer Ultrasonic Oscillator 8850, Cole-Palmer, IL) o con un sonicador de punta (Soniprep Ultrasonic Disintegrator MSS 150 CX3.1, Sanyo, Japón) a 0 °C durante cinco períodos de 30 seg a la máxima potencia.

Por otro lado, una mayor intensidad de color del complejo coloreado puede ser lograda si se cuenta con una mayor cantidad del reactivo generado durante la primera etapa de la secuencia de reacciones (acilfosfato). Siempre que no se consuman los sustratos de la enzima F6FFC durante la reacción, un incremento en el tiempo de incubación puede originar el efecto deseado. En consecuencia se estudió también el efecto del tiempo de incubación en las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 536, *Bif. bifidum* CIDCA 537 y *Bif. bifidum* CIDCA 5310 frente a distintas concentraciones de fructosa-6-fosfato (F-6-P). Para una concentración bacteriana de alrededor de 0.8 mg/ml (aprox.  $DO_{600} = 1$ ) diferentes concentraciones de sustrato (desde 8 mg/ml hasta un valor de 80 mg/ml) fueron agregadas a la mezcla de reacción y posteriormente se siguió con la determinación como se describió al principio.

## **Parte II: Aplicación de la metodología desarrollada a la cuantificación de la adherencia de *Bifidobacterium a monocapas de células epiteliales en cultivo***

Se utilizó el ensayo desarrollado en la Parte I para cuantificar la adhesión de bifidobacterias a las células epiteliales de la línea Caco-2 en cultivo. Las cepas utilizadas en este ensayo fueron *Bif. breve*

CIDCA 532, *Bif. infantis* CIDCA 538, *Bif. bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537 y CIDCA 5310.

**Preparación de las monocapas.** La línea celular utilizada (Caco-2 HTB-37) proviene de un

## Capítulo I

adenocarcinoma colónico humano y fue obtenida de la colección American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con glutamina (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) y 20% de suero fetal bovino (Gen S.A., Buenos Aires, Argentina) inactivado (30 min a 56 °C). Se agregó estreptomina y penicilina G (Gibco Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) hasta una concentración final de 100 µg/ml y 50 UI/ml respectivamente. Las células fueron sembradas a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/fosa en placas de 24 fosas (Corning Glass Works, Corning, NY) e incubadas a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>-95% aire). El medio de cultivo se cambió cada 2 días por un lapso de 21 días hasta que los cultivos llegaron a postconfluencia. Estos cultivos fueron utilizados entre los pasajes 28 y 36. La composición del medio de cultivo para Caco-2 y las condiciones de amplificación se detallan en el Apéndice I.

**Ensayo de adherencia de *Bifidobacterium a Caco-2*.** Antes de realizar los ensayos de adherencia, las monocapas de Caco-2 de 21 días se lavaron dos veces con buffer fosfato salino estéril (PBS, 6.8 g/l PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 8.6 g/l NaCl, pH 7.0) a T amb. Luego, diferentes cantidades a determinar de bacterias se colocaron dentro de cada fosa de la placa. Luego de una incubación de 1 h a 37 °C,

las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Este fue el procedimiento general para estudiar adherencia bacteriana a monocapas en cultivo. A partir de aquí se tomaron diferentes vías tendientes a determinar en forma precisa la cantidad de bifidobacterias adheridas. La estrategia contempló las siguientes posibilidades:

- 1) Realizar la reacción colorimétrica *in situ*. Para esto se evaluaron superficies de diferentes dimensiones a fin de aumentar la sensibilidad. Se utilizaron botellas de 25 cm<sup>2</sup> además de las placas de 24 fosas (1.13 cm<sup>2</sup>).
- 2) Realizar la reacción colorimétrica desprendiendo el material adherido. Para esto se estudiaron diferentes métodos para desprender la monocapa del soporte plástico y su influencia en la actividad enzimática.

En relación al primer punto, las reacciones se llevaron a cabo agregando los reactivos a las botellas o a las placas según corresponda, en la misma proporción relativa con que se realizaron las curvas de calibración pero variando los volúmenes de forma que toda la monocapa permanezca totalmente cubierta por la mezcla de reacción. Los volúmenes utilizados se detallan en la siguiente Tabla 3

**Tabla 3.** Volúmenes de reactivos para la determinación enzimática utilizados para ensayos en botellas o en placas de 24 fosas.

	<i>placas 24 fosas</i>	<i>botellas 25 cm<sup>2</sup></i>
NaF-Iodoacetato de Na	60 µl	2 ml
F-6-P	30 µl	1 ml
buffer	180 µl	6 ml
hidroxilamina	210 µl	7 ml
TCA	120 µl	4 ml
HCl	120 µl	4 ml
FeCl <sub>3</sub> • H <sub>2</sub> O	120 µl	4 ml

Finalmente, se tomaron 250 µl de cada recipiente, se centrifugaron a 14000 *g* por 5 min y se leyeron los sobrenadantes en el lector de placas.

Con respecto al segundo punto, la estrategia fue levantar el material adherido (células eucarióticas y bacterias) y traspasarlo a un tubo para realizar allí la reacción. Los reactivos generalmente utilizados para este fin son<sup>245</sup>:

- 1) Dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1% + NaOH 0.1N
- 2) NaOH 0.2 N
- 3) H<sub>2</sub>O

Debido a que la utilización de estos reactivos puede afectar la medida de la actividad enzimática, se compararon las medidas enzimáticas de bacterias sin tratar con las correspondientes a bacterias sometidas a estos tratamientos. Un cultivo de 10 ml de la cepa CIDCA 5310 se centrifugó y se lavó dos veces con buffer fosfato, resuspendiéndolo en el mismo buffer. Se tomaron

alícuotas de 100 µl de esta suspensión stock y se procesaron por duplicado de la siguiente manera:

- sin tratar (control)
- con reactivos (1) por 30 min a T amb
- con reactivo (2) por 30 min a T amb
- con reactivo (3) por 30 min a T amb

Luego de los tratamientos, se centrifugaron las muestras y se procedió a la determinación de actividad enzimática como se describió en la Parte I. Un tratamiento se considera adecuado si las medidas colorimétricas (con y sin tratamiento) no difieren en más del 5%.

De acuerdo a los resultados obtenidos (que se detallarán más adelante) la metodología de elección fue utilizar placas de 24 fosas, lisar las monocapas con H<sub>2</sub>O y luego de centrifugar todo el contenido aplicar la determinación de actividad enzimática en tubos eppendorf. En consecuencia, la aplicación del método desarrollado ya descrito se puso en práctica de la siguiente manera:

**Protocolo seleccionado para determinar la adherencia de bifidobacterias a Caco-2.**

Se realizó un ensayo de adherencia como se explicó al comienzo de la Parte II, colocando 0.5 ml de una suspensión de bifidobacterias conteniendo aproximadamente  $0.7 \pm 0.06$  mg ó  $0.35 \pm 0.04$  mg de bacterias en cada fosa de una placa de 24 fosas. Luego de una incubación de 1 h a 37 °C, las monocapas fueron lavadas 3 veces para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente las monocapas fueron lisadas con agua destilada y el material de cada fosa se traspasó a tubos eppendorf para centrifugarlos a 14000 *g* por 10 min. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en la mezcla de reacción del ensayo enzimático para medir la cantidad de bacterias adheridas. Se incluyeron como controles monocapas de Caco-2 sin bacterias.

Los experimentos de adhesión fueron realizados con dos cultivos bacterianos independientes. Para cada placa, la adherencia de cada cepa fue determinada por triplicado.

El porcentaje de adhesión se relacionó al total de actividad fosfocetolasa agregada por fosa y calculado según la siguiente expresión:

$$\% \text{adherencia} = \left( \frac{\text{DO}_{500} \text{ bacterias adheridas}}{\text{DO}_{500} \text{ total de bacterias}} \right) \times 100$$

donde *DO<sub>500</sub> bacterias adheridas*, corresponde a la actividad enzimática de bacterias adheridas y *DO<sub>500</sub> total de bacterias*, corresponde a la actividad enzimática de las bacterias agregadas. Cuatro diluciones seriadas de las suspensiones agregadas en las fosas fueron sometidas a la reacción enzimática para asegurar linealidad en ese rango de densidades bacterianas ya que la ecuación anterior sólo es válida en la porción lineal de la curva.

**Análisis estadístico** La linealidad de la reacción enzimática fue establecida mediante un análisis de regresión lineal. La adherencia de bifidobacterias fue evaluada mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un software de análisis estadístico (Systat 5.0, Systat, Inc. Evanston, IL) para  $\alpha = 0.05$ .

**Parte III: Cuantificación de Bifidobacterium en productos comerciales**

En esta segunda parte se desarrolló otro método para la cuantificación de *Bifidobacterium* a fin de analizar muestras comerciales de productos probióticos que contengan bifidobacterias. En principio, se intentó aplicar la técnica desarrollada

en la Parte II directamente en muestras de productos fermentados comprados en el supermercado. Posteriormente, se modificó esta técnica combinándola con el método estadístico del Número Más Probable.

**Muestras analizadas.** Las siguientes muestras fueron analizadas en este estudio

**Cultivos puros.** Las cepas *Bif. pseudolongum* CIDCA 531, *Bif. breve* CIDCA 532, CIDCA 5312, CIDCA 5314 y CIDCA 5315, *Bif. bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537, CIDCA 5310, CIDCA 5311 y CIDCA 5313 fueron crecidas en medio MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con cisteína 0.05% p/v por 48 hs a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 331, CIDCA 332 y CIDCA 333 y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis* CIDCA 132 y CIDCA 1311 fueron crecidas durante toda la noche en medio MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) a 37 °C en aerobiosis<sup>163,90</sup>.

**Cultivos mixtos.** Los cultivos mixtos analizados fueron preparados mezclando iguales volúmenes de diferentes cultivos conteniendo *Bif. bifidum* CIDCA 5310 y *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 332 crecidos como se describió arriba.

**Starters comerciales.** Se analizaron dos starters comerciales provistos en forma liofilizada o granulada por dos industrias lácteas locales.

**Leches fermentadas.** Cinco leches fermentadas fueron compradas en supermercados o provistas por industrias lácteas locales e inmediatamente analizadas. Además, varias leches fermentadas fueron preparadas en el laboratorio en recipientes de 100 ml de leche UHT (Ultra High Temperature) de la siguiente manera: (a) por inoculación de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*

CIDCA 333 (1% v/v) y cuando el pH llegó a 4.5, el producto resultante fue suplementado con un cultivo en fase estacionaria de *Bif. breve* CIDCA 532 (1% v/v); (b) por inoculación del starter liofilizado provisto por una industria local (0.005% p/v) y cuando el pH llegó a 4.5, el producto resultante su suplementado con un cultivo en fase estacionaria de *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 (1% v/v); (c) subcultivo de una leche fermentada provista por una industria láctea local; (d) por inoculación de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 333 simultáneamente con *Bif. breve* CIDCA 532 (1% v/v, cada uno); (e) por inoculación simultánea del starter liofilizado (0.005% p/v) y *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 (1% v/v). En todos los casos, las leches inoculadas fueron incubadas durante toda la noche en condiciones aeróbicas a 37 °C hasta lograr el pH deseado.

**Cápsulas probióticas.** Se analizaron cápsulas correspondientes a dos suplementos dietarios: *Pro-Biotics Acidophilus*® (Nutrition Now, Inc., Vancouver, WA) y *Potent Acidophilus*® (GNC Natural Brand, Pittsburg, PA). Las cápsulas de 0.5g se disolvieron en 0.1% triptona (Difco Laboratories, Detroit, MI) para su posterior cuantificación.

**Yogures.** Los siguientes productos comprados en supermercados locales fueron estudiados: Yogur de Frutilla Bebible (Marca A), Yogur Entero de Frutilla (Marca A), Yogur Descremado de Vainilla (Marca B).

**Determinación de *Bifidobacterium* en productos lácteos y probióticos.** Para determinar la cantidad de *Bifidobacterium* en

## Capítulo I

productos lácteos y probióticos se exploraron dos estrategias

a) utilizando el ensayo desarrollado en la Parte I; es decir, por medida directa de la actividad enzimática de F6FFC en el producto

b) combinando la medida de actividad enzimática con el método estadístico del Número Más Probable (NMP)

### ***a) Determinación de Bifidobacterium en productos lácteos por medida de la actividad enzimática en forma directa.***

Para evaluar el rendimiento del ensayo, la estrategia consistió en preparar suspensiones stock de diferentes cepas de bifidobacterias y suplementar productos lácteos presentes actualmente en el mercado en diferentes cantidades. Posteriormente se cuantificó el nivel de bifidobacterias realizando el ensayo enzimático desarrollado anteriormente en alícuotas de los yogures y se comparó con la cantidad de bifidobacterias agregada.

El primer inconveniente que se debe superar para obtener las bacterias contenidas en el producto es el de la disgregación del coágulo de caseínas de los productos fermentados utilizados, que podría interferir en la determinación de la actividad enzimática. Se estudiaron diferentes agentes disgregantes para pretratar las muestras de yogur y su efecto en la actividad enzimática. En cada ensayo se calculó el rendimiento de recuperación de bifidobacterias sobre la base de las curvas estándar para cada cepa.

**Procedimiento:** Se prepararon suspensiones stock como se describió en la Parte I. A partir de estas suspensiones, se prepararon 5 diluciones por duplicado las que sirvieron para determinar las curvas estándar ya mencionadas. Por otro

lado, se suplementaron alícuotas de 10 ml de yogur con diferentes volúmenes de la suspensión stock (0.1, 0.5, 1 ó 2 ml). Luego de tratar las muestras de yogur con los agentes disgregantes en diferentes proporciones, se centrifugaron a 10000 *g* por 10 min y se lavaron los pellets tres veces con PBS centrifugando en las mismas condiciones cada vez (Figura 1).

Sobre estos pellets se determinó la actividad fosfocetolasa y finalmente, tras aplicar los factores de dilución correspondientes, se calculó el rendimiento de recuperación con la siguiente expresión:

$$R^{to} \% = (DO_{500} \text{ bacterias en yogur} / DO_{500} \text{ bacterias colocadas}) \times 100$$

donde *DO<sub>500</sub> bacterias en yogur*, corresponde a la actividad enzimática de bacterias que contiene el producto y *DO<sub>500</sub> bacterias colocadas*, corresponde a la actividad enzimática de las bacterias agregadas al producto.

Cuatro diluciones seriadas de las suspensiones agregadas en las fosas fueron sometidas a la reacción enzimática para verificar linealidad en

## Capítulo I

ese rango de densidades bacterianas ya que se discutió anteriormente, la ecuación anterior sólo

es válida en la porción lineal de la curva.

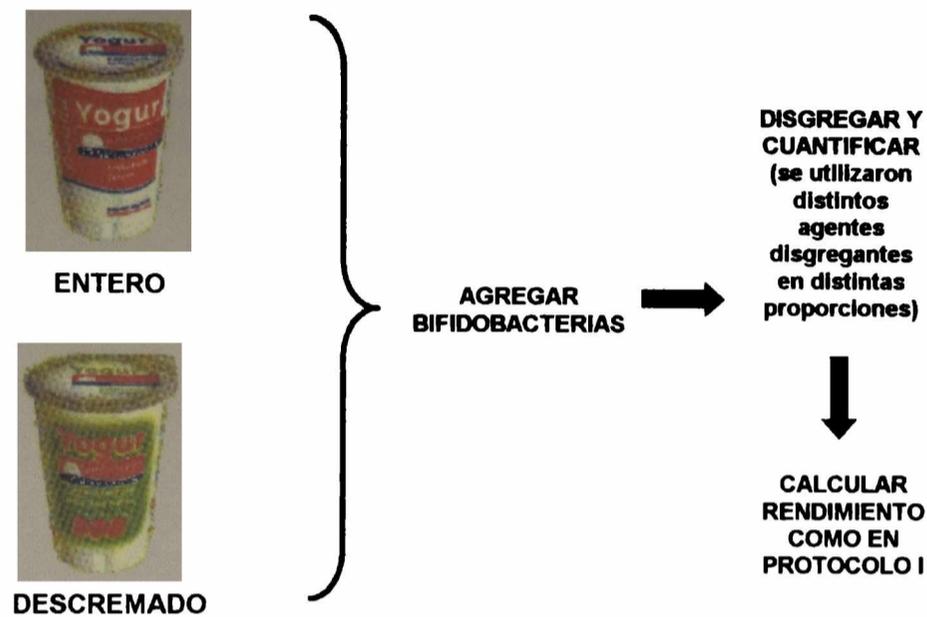


**Figura 1.** Protocolo de trabajo (I) con muestras de productos lácteos para la determinación de *Bifidobacterium*

**Agentes disgregantes/diluyentes.** Se estudiaron los siguientes reactivos con el objeto de disgregar o diluir los coágulos de caseína o bien para diluir la red de que forman estas proteínas:

- 1) Etilendiaminotetraacetato de Na (EDTA) 2%, pH 12 (Mallinckrodt, Chemical Works, St. Louis. MO)
- 2) Tripsina 100 mg/ml en H<sub>2</sub>O (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)
- 3) Citrato de Na 1% en H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt, Chemical Works, St. Louis. MO)
- 4) Buffer fosfato salino (PBS), pH 7

Se estudiaron diferentes yogures preparados con leches descremadas, parcialmente descremadas o enteras con el objeto de obtener muestras con diferente textura y estudiar la influencia de este factor en la cuantificación de *Bifidobacterium*. De la misma manera, los agentes disgregantes fueron agregados en diferentes proporciones agente/muestra para testear la eficiencia del pretratamiento (Figura 2).



**Figura 2.** Protocolo (II) de procesamiento de muestras de yogures para la determinación de *Bifidobacterium*

***b) Determinación de Bifidobacterium en productos lácteos y probióticos utilizando una combinación del NMP con la medida de actividad de F6FFC.***

La segunda estrategia explorada se describe a continuación:

***Optimización de un medio para la cuantificación de Bifidobacterium.*** Con el

objeto de contar con un medio selectivo para el desarrollo de bifidobacterias, se estudió la factibilidad de utilizar medios propuestos por otros investigadores. Los medios utilizados y su composición se detallan en la siguiente Tabla 4.

**Tabla 4.** Composición de medios de cultivo descritos por otros investigadores utilizados en este trabajo (parcialmente reproducida de Vinderola y Reinheimer<sup>446</sup>)

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Agentes selectivos</i>	<i>Composición final (%p/v)</i>
NNL-MRS <sup>a</sup>	ácido nalidíxico	0.0015
	sulfato de neomicina	0.01
	LiCl	0.3
OG-MRS <sup>a</sup>	bilis de buey	0.02
	gentamicina	0.003
LP-MRS <sup>a</sup>	LiCl	0.2
	propionato de Na	0.3
Bile-MRS <sup>a</sup>	bilis	0.15 – 0.9
Medio sintético	AcNH <sub>4</sub>	0.4
	biotina	8 × 10 <sup>-7</sup>
	pantotenato de Ca	8 × 10 <sup>-4</sup>
	cisteína	0.04
	lactosa	7
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	0.5
	AcNa	5
	ácido ascórbico	0.1
	sales <sup>b</sup>	1 ml

<sup>a</sup> Se utilizó MRS como medio base al que se agregó cada uno de los agentes selectivos.

<sup>b</sup> Composición (en g/100 ml): 0.2% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 4% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.135% MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.2% NaCl.

NNL = Nalidíxico Neomicina Litio; OG = Oxgall Gentamicina; LP = Litio Propionato

Se procedió inoculando cepas puras de lactobacilos y bifidobacterias en los medios descritos. Luego de una incubación adecuada según corresponda para cada género, los tubos fueron inspeccionados para detectar crecimiento bacteriano. Los inhibidores fueron preparados en forma separada y esterilizados previamente por filtración (0.45 μm, Millipore Co., Bedford, MA). A no ser que se indique lo contrario, las sales o inhibidores son provenientes de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

**Aplicación del ensayo enzimático basado en el Número Más Probable (EB-MPN).** Las bacterias del género *Bifidobacterium* fueron cuantificadas mediante el método del Número Más Probable (NMP) utilizando el medio selectivo seleccionado sobre la base de los resultados obtenidos en el inciso anterior. Los tubos se prepararon colocando 3.6 ml del medio de cultivo y se esterilizaron en autoclave (121 °C, 15 min). La bilis de buey se preparó aparte, se esterilizó por filtración (0.45 μm, Millipore Co., Bedford, MA) y

## Capítulo I

se agregó a los tubos hasta una concentración final de 0.3%. Posteriormente, 0.4 ml de diluciones apropiadas de las muestras a analizar fueron inoculados en cada tubo. Cada experimento fue diseñado con 5 réplicas por dilución y en general se utilizaron de 3 a 5 diluciones. Luego de incubar los tubos durante 48 hs a 37 °C en condiciones anaeróbicas, los tubos fueron inspeccionados para evidenciar crecimiento bacteriano. Todos aquellos tubos que presentaron crecimiento fueron testeados para evidenciar actividad fosfoacetolasa. Luego del ensayo enzimático, el número más

probable fue calculado mediante el software Most Probable Number Calculator versión 4.04<sup>256</sup>. Este programa permite ingresar el número de réplicas y de diluciones, los volúmenes y los factores de dilución para obtener el NMP y los intervalos de confianza correspondientes. Otra alternativa es utilizar las tablas publicadas por Guinea y col. aplicando las correcciones adecuadas correspondientes a las diluciones y la cantidad de muestra utilizada, siempre que se usen factores de esas cantidades. Estas tablas se reproducen en el Apéndice 2.

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**

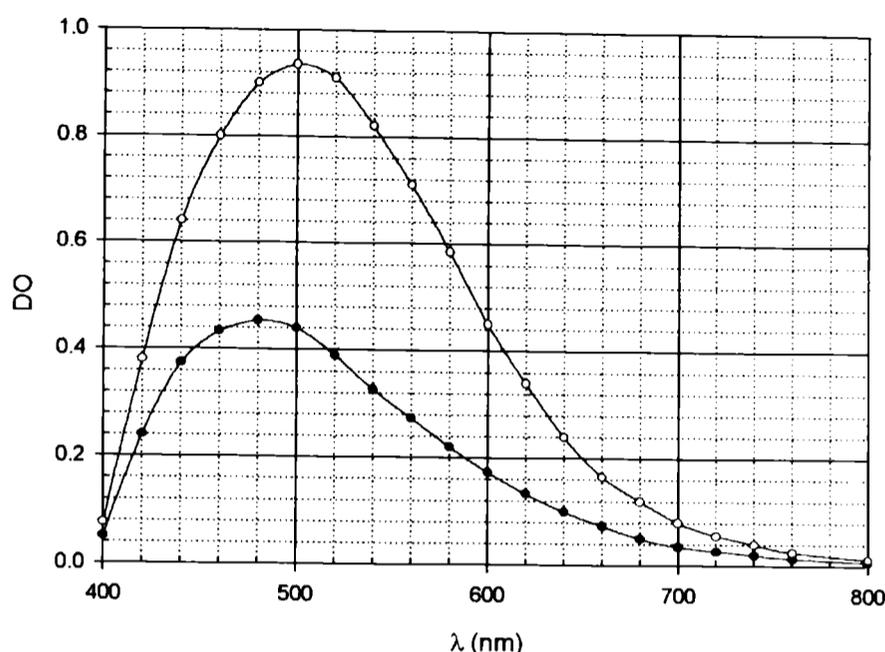
### **Parte I: Determinación de la utilización de la medida de actividad de F6FFC para la cuantificación de Bifidobacterium**

**Determinación del máximo de absorción del complejo férrico.** En la Figura 4 se muestra el espectro de absorción obtenido para las cepas *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 y *Bif. bifidum* CIDCA 536 utilizando como blanco una muestra negativa para el ensayo (blanco<sub>1</sub>). Dependiendo de la concentración del acetyl fosfato producido en la primera etapa de las reacciones (*fructosa-6-P* → *acetyl fosfato* + *eritrosa-4-P*), la coloración del complejo férrico varió entre amarillo-naranja y rojo-púrpura, debido a la presencia cantidades del ion  $Fe^{+3}$  sin reaccionar (*ácido hidroxámico* +  $FeCl_3$

→ *complejo coloreado* +  $FeCl_3$  exceso). Un resultado negativo produjo una coloración amarilla. Para ambas cepas se observó que el máximo de absorción se encuentra entre 490 y 500 nm, rango en el cual el  $FeCl_3$  no absorbe. Todas las lecturas en ensayos posteriores se realizaron a 500 nm.



**Figura 3.** Aspecto de una reacción negativa (arriba) y una positiva (abajo) para la reacción enzimática de la F6FFC en bifidobacterias, en placa de 96 fosas.

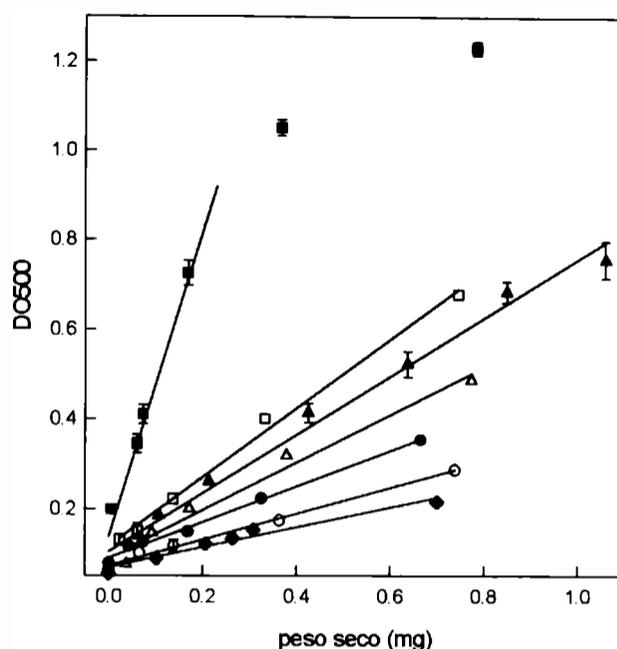


**Figura 4.** Espectro de absorción del complejo coloreado obtenido como producto final de la reacción de la F6FFC bacteriana con fructosa-6-P para las cepas *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 (●) y *Bif. bifidum* CIDCA 536 (○).

**Relación entre la actividad F6FFC y la biomasa bacteriana.** La actividad enzimática de la enzima F6FFC produjo un incremento lineal de la intensidad de la absorción del complejo con el incremento de la biomasa para todas las cepas testeadas (Figura 5). Es decir, que bajo las condiciones de trabajo, existe una clara relación lineal entre la actividad enzimática y la masa bacteriana. El grado de actividad enzimática mostró variaciones entre las especies inclusive a nivel de cepa en la misma especie (comparar por ejemplo, *Bif. bifidum* CIDCA 536 y *Bif. bifidum* CIDCA 5310). Estas diferencias se reflejaron en la pendiente de la curva de regresión lineal realizada en cada cepa, lo que estaría indicando diferente actividad enzimática específica o diferente permeabilidad de las cepas individuales.

De Vries y Stouthamer<sup>92</sup> y Grill y col.<sup>168</sup> han observado también una variación en la actividad específica de esta enzima trabajando con varias cepas de bifidobacterias de diversos orígenes. Por lo tanto, debido a que la actividad enzimática específica puede variar entre diferentes cepas de *Bifidobacterium*, se deben elaborar curvas estándar para cada cepa al momento de realizar una cuantificación.

El ensayo descrito tiene como límite inferior de detección una masa de 0.05 mg de bacterias, mientras que la linealidad se extiende hasta aproximadamente 1 mg de biomasa para la mayoría de las cepas, aunque para la cepa *Bif. breve* CIDCA 532 la linealidad no se observó por sobre los 0.2 mg. Esto se debe probablemente a

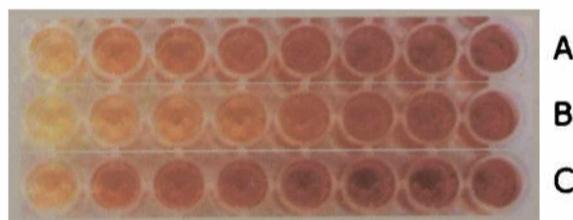


**Figura 5.** Actividad de la F6FFC bacteriana como función de la biomasa para diferentes cepas de bifidobacterias. *Bif. pseudolongum* CIDCA 531 (○), *Bif. breve* CIDCA 532 (■), *Bif. bifidum* CIDCA 533 (◆), *Bif. bifidum* CIDCA 536 (●), *Bif. bifidum* CIDCA 537 (△), *Bif. bifidum* CIDCA 5310 (▲), *Bif. bifidum* CIDCA 5311 (□). Cada dato representa el promedio de duplicados ± desvío estándar. Las barras de error solo se representan cuando son mayores que los símbolos.

un agotamiento del sustrato a concentraciones bacterianas superiores a los valores indicados. Una estimación grosera del límite de detección también se puede realizar suponiendo que el peso promedio de una célula bacteriana es  $9.5 \times 10^{-13} \text{ g}^{304}$ . De esta manera, el ensayo propuesto posee un límite de detección de  $5.2 \times 10^7$  microorganismos.

El color rojo-púrpura del complejo final con hierro fue estable sólo por 2 hs, mostrando una gradual pérdida de intensidad hasta llegar al amarillo, por lo que es aconsejable realizar las medidas espectrofotométricas inmediatamente después de finalizada la reacción. Por otro lado, no se observó desarrollo de color en los tubos control sin bacterias, los que permanecieron amarillos (Figura 6).

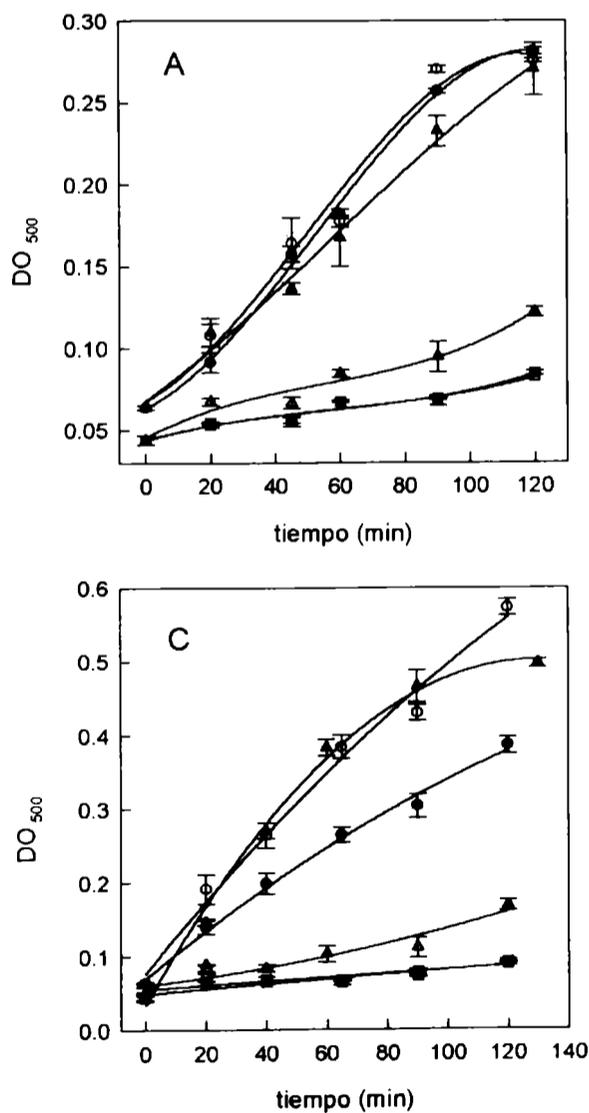
Estudios de reproducibilidad utilizando cultivos independientes de las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 537 y CIDCA 5310 mostraron que no existe una variación significativa en la actividad enzimática ( $P > 0.1$ ) entre cultivos.



**Figura 6.** Aspecto de la placa conteniendo los sobrenadantes correspondientes a las curvas de calibración de las cepas (A) *Bif. bifidum* CIDCA 536, (B) *Bif. bifidum* CIDCA 537 y (C) *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Se utilizaron diferentes cantidades de bacterias entre 0 y 1 mg de peso seco.

**Efecto de los pretratamientos bacterianos sobre la sensibilidad del ensayo.** Para lograr aumentar la sensibilidad del ensayo, se estudió el efecto de la adición de Triton X-100 y de dos condiciones de sonicación en la medida de actividad enzimática. Estos factores fueron estudiados en las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537 y CIDCA 5310 (Figura 7). La sonicación en baño no produjo cambios en la sensibilidad del ensayo para las tres cepas testeadas: las curvas obtenidas fueron similares a los controles (sin sonicación ni adición de detergente). Una sonicación más drástica realizada con sonicador de

punta, generó curvas con una sensibilidad un poco mayor, más evidente en la cepa CIDCA 537 (Figura 7B) que en las otras dos cepas testeadas (Figura 7A y 7C). Para todas las cepas se logró una mejora sensiblemente superior con la adición de Triton X-100 en la mezcla de reacción. Una combinación de sonicación con adición de Triton X-100 mostró que el efecto de la sonicación no fue necesario para mejorar el desarrollo de color. Por otro lado, estos resultados indicaron también que extender el tiempo de incubación por más de 120 min no mejora sensiblemente la medida de actividad enzimática.

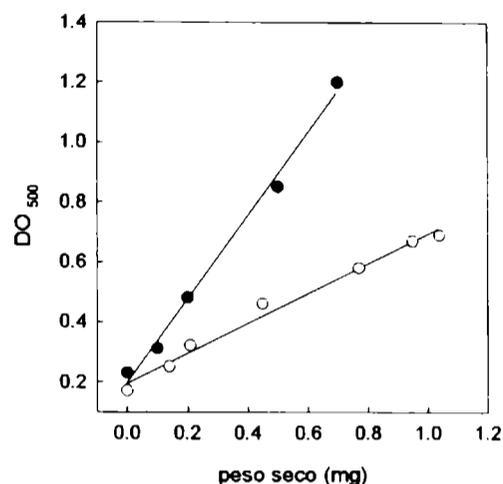


**Figura 7.** Efecto de Triton X-100 y sonicación en la cuantificación de F6FFC en las cepas (A) *Bif. bifidum* CIDCA 536, (B) *Bif. bifidum* CIDCA 537 y (C) *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Los tratamientos aplicados sobre las bacterias fueron: (■) sonicación de baño, (○) sonicación de baño y Triton X-100, (●) solo Triton X-100, (△) sonicación de punta, (▲) sonicación de punta y Triton X-100, (□) sin tratamiento. Cada dato representa el promedio  $\pm$  desvío estándar.

## Capítulo I

El Triton X-100 podría estar actuando como agente permeabilizante sobre la membrana y pared bacteriana de forma de facilitar el tránsito de los reactivos hacia el interior de la bacteria o permitiendo una liberación de la enzima. Posteriormente a la publicación de estos resultados, otros investigadores reportaron que el mismo efecto se puede lograr mediante la utilización del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (bromuro de cetrimonio, CTAB) 0.45 mg/ml en la mezcla de reacción. Estos autores adjudican el incremento en la medida de actividad enzimática a la lisis celular por efecto de este detergente<sup>317</sup>. Sin embargo, la modificación a la técnica original de Scardovi propuesta por estos autores sólo persigue una rápida identificación de bacterias del género *Bifidobacterium* al momento de analizar gran cantidad de muestras y no hacen alusión a su utilización como herramienta de cuantificación. Por otro lado, estos autores realizan las mediciones espectrofotométricas a una longitud de onda de 660 nm que no corresponde al máximo de absorción del complejo.

El hecho de introducir el Triton X-100 en la mezcla de reacción generó la necesidad de verificar la conservación de la linealidad ya probada. Por lo tanto, se realizaron curvas de calibración en las mismas condiciones que las explicadas en la sección anterior pero utilizando 0.25% Triton X-100 en la mezcla de reacción (sin sonicar). Nuestros resultados indicaron que la introducción de Triton X-100 en la mezcla de reacción no generó pérdida de la linealidad en el ensayo. Algunas de esas curvas se muestran en la Figura 8.



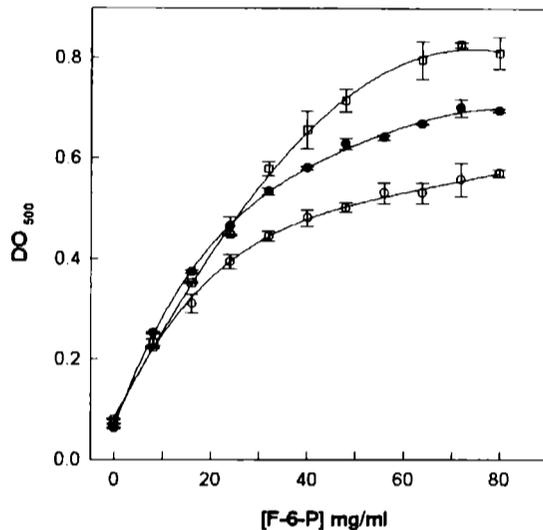
**Figura 8.** Actividad de la F6FFC como función de la biomasa para diferentes cepas de bifidobacterias utilizando Triton X-100 en la mezcla de reacción. (●) *Bif. breve* 532 y (○) *Bif. bifidum* 537.

**Efecto de la concentración de F-6-P en la actividad enzimática.** Las cepas CIDCA 536, CIDCA 537 y CIDCA 5310 fueron testeadas en su actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato. La absorbancia del complejo a 500 nm incrementó con la concentración de F-6-P hasta cierto nivel de saturación (Figura 9). A igual concentración de sustrato, la cepa CIDCA 5310 alcanzó la máxima actividad enzimática mientras que la cepa CIDCA 536 mostró ser la de menor actividad. Esto se correlaciona con los datos mostrados en la Figura 5, que reflejan diferentes actividades específicas.

La actividad enzimática encuentra una meseta a concentraciones de F-6-P superiores a 65 mg/ml para la cepa CIDCA 5310. La cepa CIDCA 537 alcanzó la saturación a 55 mg/ml de F-6-P, mientras que la cepa CIDCA 536 lo hizo a 45 mg/ml. Es decir, que se podrían utilizar

## Capítulo I

concentraciones de F-6-P menores a 80 mg/ml (propuesta por Scardovi y col.<sup>377</sup>) sin perder sensibilidad en las medidas y de esta manera economizar reactivos.



**Figura 9.** Ensayo de F6FFC como función de la concentración de fructosa-6-fosfato. (○) *Bif. bifidum* CIDCA 536, (●) *Bif. bifidum* CIDCA 537, (□) *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Los puntos representan valores promedio  $\pm$  desvío estándar.

El ensayo así descrito muestra ciertas ventajas que incluyen su simplicidad y mínimos requerimientos de equipamiento como así también la utilización de reactivos económicos. Esta técnica es independiente de la tendencia de algunas cepas a la autoagregación (que se va a estudiar en otro capítulo), lo que la diferencia de las técnicas basadas en los recuentos en placa o las técnicas turbidimétricas.

Con respecto a los recuentos en placa, la técnica desarrollada es más conveniente ya que ofrece un resultado más objetivo cuando las

colonias no están lo suficientemente separadas y un procedimiento más rápido y adecuado para su automatización (el recuento de viables es tedioso, difícil de automatizar y requiere largos tiempos de incubación). Además, la magnitud de la agitación para preparar las diluciones puede disgregar los agregados bacterianos en forma de diferente manera en cada dilución generando importantes dispersiones entre los replicados. Las ventajas con respecto a las técnicas turbidimétricas radican en el hecho de que un cultivo o suspensión que presenta bacterias agregadas presentará, a igual masa bacteriana, menor absorbancia que uno en el que las bacterias estén desagregadas. Por lo tanto el tamaño de los agregados introduce un error por defecto en la cuantificación bacteriana.

La búsqueda de técnicas más rápidas y confiables que las técnicas basadas en los recuentos en placa o las técnicas turbidimétricas, generó el desarrollo de técnicas de biología molecular basadas en la utilización de sondas de oligonucleótidos para la detección e identificación de *Bifidobacterium*. Estas sondas en base a secuencias 16S rARN se pueden preparar de forma que hibridicen sólo la secuencia blanco sin hibridizar secuencias relacionadas. Existen también métodos que permiten la hibridización de sondas marcadas de oligonucleótidos en solución, con ácidos nucleicos inmovilizados en soportes sólidos utilizados para bacterias lácticas. Langendijk y col.<sup>240</sup> desarrollaron sondas 16S rARN específicas de género para detectar bifidobacterias. Una sonda, designada Bif164, fue utilizada para determinar la población de *Bifidobacterium* en materia fecal humana sin realizar cultivos. Yamamoto y col.<sup>463</sup> sintetizaron sondas ADN específicas para cinco especies de bifidobacterias de origen humano y Kok y col.<sup>233</sup> desarrollaron

## Capítulo I

primers de la misma manera para la cepa de *Bifidobacterium* LW420 aislada de materia fecal.

Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de biología molecular como herramienta cuantitativa es muy reciente. Ha sido posible realizar un estudio de la composición de bifidobacterias a lo largo de 12 meses en pacientes adultos mediante ribotyping y pulse-field electroforesis. Wang y col.<sup>453</sup> comunicaron la utilización de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) *in situ* para la detección y enumeración de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en materia fecal de humanos y animales. Para ello es necesario aplicar un procedimiento que elimine sustancias interferentes y posteriormente se realiza la reacción PCR directamente sobre las células sin necesidad de cultivo o purificación de ADN. Las bifidobacterias también han sido cuantificadas por microscopía de epifluorescencia seguida de hibridación *in situ* con una sonda específica de especie. Un equipo que permite la fluorimetría de células individuales a través de una cámara de larga exposición y un software adecuado para el análisis de imágenes acoplados al sistema de medida pone en evidencia la complejidad de la técnica.

### **Parte II: Aplicación de la metodología desarrollada a la cuantificación de la adherencia de *Bifidobacterium* a monocapas de células epiteliales en cultivo**

La adherencia al epitelio intestinal es un rasgo que permite seleccionar una determinada cepa bacteriana para la producción de probióticos. Las cepas más adherentes serán favorecidas ya que resistirán la remoción por los movimientos

El ensayo enzimático desarrollado puede ser aplicado a la cuantificación de bifidobacterias en presencia de otras bacterias. Aunque la actividad fosfocetolasa ha sido recientemente demostrada en algunas cepas de *Gardnerella vaginalis*<sup>145</sup>, una reacción positiva es todavía considerada una característica distintiva para *Bifidobacterium*. Al menos, ninguna otra bacteria láctica tiene esta enzima<sup>334</sup>. En nuestro laboratorio, suspensiones preparadas con bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* dieron reacción negativa para fosfocetolasa (Pérez, P., comunicación personal).

A pesar de las ventajas descriptas, el método tiene ciertas limitaciones que deben ser consideradas al momento de diseñar el protocolo experimental, por ejemplo, no puede ser utilizado para cuantificar cepas de bifidobacterias que no posean una considerable actividad fosfocetolasa bajo las condiciones de cultivo utilizadas en el ensayo, como es el caso de las cepas CIDCA 531 y CIDCA 533 (Figura 3). Por otro lado requiere que las cepas estén metabólicamente activas.

peristálticos o por las secreciones del hospedador. Por lo tanto, la disponibilidad de un ensayo simple que permita la cuantificación precisa de la adherencia a sustratos biológicos, como por ejemplo células intestinales en cultivo, es de

## Capítulo I

crucial importancia. En esta parte se exploró la factibilidad de utilizar el ensayo desarrollado en la determinación de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2 y optimizar las condiciones operativas.

De acuerdo a la metodología planteada oportunamente, se observó que la medida de la actividad enzimática *in situ* (i.e. en las fosas que contienen la monocapa de Caco-2) trabajando con las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537 y CIDCA 5310 resultó inadecuada ya que los valores de absorbancia obtenidos fueron bajos (Tabla 5) y relativamente cercanos a los valores obtenidos

para los blancos. Un aumento en la superficie adherente, que generaría una mayor cantidad de bacterias adheridas, no logró incrementar significativamente la medida de absorbancia.

En consecuencia, se intentó evaluar la actividad enzimática desprendiendo la monocapa de células Caco-2 y realizando la reacción fuera de las fosas. Con este objetivo se evaluó el efecto de diferentes agentes comúnmente utilizados para este fin en la actividad enzimática en la cepa CIDCA 5310. En la siguiente tabla se representan los valores de  $DO_{500}$  antes y después de los tratamientos:

**Tabla 5.** Medida de actividad enzimática *in situ* de cultivos puros en ensayos de adhesión realizados en botellas o en placas de 24 fosas.

Cepa	$DO_{500}$	
	botella 25 cm <sup>2</sup>	placa 24 fosas (1.13 cm <sup>2</sup> )
CIDCA 536	0.143 ± 0.003	0.135 ± 0.012
CIDCA 537	0.197 ± 0.007	0.176 ± 0.001
CIDCA 5310	0.153 ± 0.003	0.148 ± 0.005
blanco	0.105 ± 0.006	0.085 ± 0.001

**Tabla 6.** Determinación de la actividad enzimática antes y después de los diferentes tratamientos destinados a despegar las monocapas luego de realizar los ensayos de adhesión.

Tratamiento	$DO_{500}$	
	antes	después
SDS 0.1% + NaOH 0.1N	0.509 ± 0.014	0.096 ± 0.006
NaOH 0.2 N	0.577 ± 0.021	0.087 ± 0.006
H <sub>2</sub> O	0.568 ± 0.018	0.524 ± 0.008
blanco	0.062 ± 0.002	

Como se observa en la Tabla 6, los reactivos utilizados tradicionalmente<sup>245</sup> para levantar las

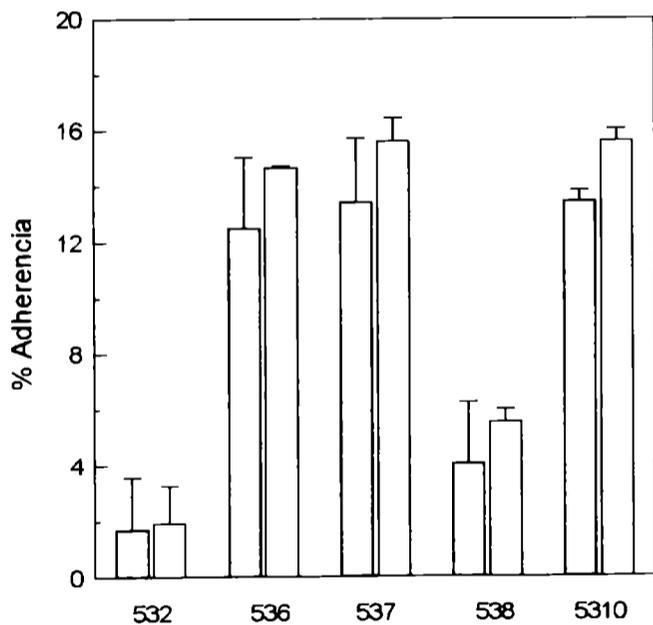
monocapas generaron una disminución en la actividad enzimática por lo que no serían

## Capítulo I

adecuados para este fin. Sin embargo, la utilización de agua destilada no modificó significativamente la absorbancia de las muestras y se presenta como un posible candidato. En este caso, el agua estaría lisando la monocapa sin dañar las bacterias y de esta manera se podría concentrar el material y realizar las medidas en un volumen menor fuera de las fosas.

Por lo tanto, los ensayos siguientes fueron realizados lisando las monocapas con agua destilada, centrifugando el material recogido y resuspendiéndolo en la mezcla de reacción. La secuencia de reacciones son las mismas que las detalladas al comienzo de la Parte I.

**Estudio de la adherencia de *Bifidobacterium a células Caco-2*.** Los estudios de adherencia fueron realizados en el modelo de células epiteliales Caco-2. Todos los resultados de adherencia se calcularon en base a las curvas estándar como las mostradas en la Figura 8, suponiendo que la actividad de fosfoetolasa es la misma en las bacterias adheridas que las presentes en suspensión. En dichos ensayos se observó que la capacidad de las cepas de bifidobacterias para adherirse en este modelo fue variable (Figura 10).



**Figura 10.** Adherencia de bifidobacterias de origen humano a células de epitelio intestinal humano de la línea Caco-2 en cultivo. Las cepas fueron ensayadas a dos densidades bacterianas. (■)  $0.17 \pm 0.02$  mg y (□)  $0.35 \pm 0.03$  mg. Cada valor experimental es el promedio de triplicados realizados sobre dos pasajes de células Caco-2 diferentes y con dos cultivos bacterianos independientes.

Mientras que algunas cepas se adhieren en gran medida a Caco-2, otras cepas mostraron adhesión limitada. El porcentaje de adhesión a las dos concentraciones bacterianas ensayadas fue estadísticamente similar, lo que indicaría que la cantidad de bacterias adheridas se incrementa con la concentración. Estos datos sugieren que las monocapas no se saturan con bifidobacterias, al menos en este rango. Una mayor sensibilidad puede ser lograda utilizando placas de 6 fosas.

Estudios de adherencia realizados mediante el ensayo enzimático propuesto mostraron una buena correlación con observaciones microscópicas y estudios de radiomarca con estas mismas cepas en el modelo de Caco-2 (Pérez, 1998; datos no publicados).

Con respecto a la utilización del ensayo enzimático en la cuantificación de la adherencia de cepas de bifidobacterias a células epiteliales, se observaron grandes ventajas con respecto a las otras técnicas comúnmente utilizadas para este fin: radiomarcado y microscopía óptica. El ensayo propuesto tiene mayor reproducibilidad que los métodos microscópicos debido a que se logra un

resultado más objetivo. Esto se debe a que se elimina la variabilidad inter-operador en la selección de campos representativos y en el recuento de bacterias, que siempre involucra cierto juicio personal. Además, es difícil diferenciar microorganismos independientes cuando se presentan en cúmulos compactos. La medida de la adherencia a través de técnicas de marcación radiactiva tiene la ventaja de su alta sensibilidad pero está limitada por el hecho de que el marcado de bacterias requiere un procedimiento particular (diferentes sustancias para marcado, diferentes medios y condiciones de cultivo, etc.), equipamiento específico y un cuarto aislado para el manejo de material radiactivo con un potencial riesgo para el operador. El ensayo de bioluminiscencia propuesto por Ludwicka y col.<sup>255</sup> no puede ser aplicado en este sistema debido a la interferencia del ATP (adenosina trifosfato) producido por las células eucarióticas. Además de que el ensayo depende del estado fisiológico de las bacterias, la estabilidad del ATP no permite realizar ensayos de larga duración (estos autores encontraron una pérdida del 50% del contenido de ATP luego de 4 h). Por otro lado, no se pueden realizar ensayos con más de un tipo de bacterias.

### Parte III

#### ***a) Determinación cuantitativa de Bifidobacterium en productos lácteos por aplicación directa de la técnica desarrollada***

La aproximación ensayada en esta sección consistió en aplicar directamente la técnica desarrollada en la Parte I y que resultó exitosa para la determinación de bacterias adheridas a

células epiteliales. Los productos lácteos que normalmente se utilizan como vehículos de administración de bacterias probióticas consisten en leches fermentadas, leches cultivadas y

## Capítulo I

yogures. Dependiendo del pH alcanzado durante la fermentación bacteriana, las caseínas de la leche coagularán en mayor o menor grado. En consecuencia, el primer inconveniente a superar para la detección cuantitativa de *Bifidobacterium* es la disgregación del coágulo de caseínas. Para tal fin se aplicó la técnica de Kanasaki y col.<sup>217</sup>

La técnica de Kanasaki propone una dilución de la muestra 1/10 con EDTA 2%, pH 12. Se estudió el rendimiento de la recuperación de las cepas *Bif. breve* CIDCA 532 y *Bif. bifidum* CIDCA 537 en un yogur comercial entero (marca A) agregando diferentes volúmenes de una suspensión stock de bifidobacterias. Las muestras, entonces, se procesaron diluyendo una alícuota de 10 ml de

yogur con 90 ml de EDTA 2%. Luego de centrifugar y lavar los pellets, se realizó el protocolo para determinar actividad fosfoacetolasa. Las medidas de actividad enzimática fueron comparadas con las correspondientes a las cantidades de bacterias agregadas (100%), según las curvas estándar como las utilizadas en la Parte II, representadas en la Figura 8. Las curvas estándar utilizadas fueron las siguientes:

$$DO_{500} (532) = 0.108 + 2.023 \text{ mg } r^2 = 0.97673$$

$$DO_{500} (537) = 0.118 + 1.014 \text{ mg } r^2 = 0.95244$$

Las lecturas espectrofotométricas obtenidas para los diferentes volúmenes de bifidobacterias fueron las siguientes (Tabla 7):

**Tabla 7.** Determinación enzimática en yogures suplementados con diferentes cantidades de bifidobacterias luego de aplicar la técnica de Kanasaki para disgregar el coágulo de caseínas. La actividad enzimática se expresa como  $DO_{500}$ . (nd: no determinada)

Volumen de suspensión de bifidobacterias (ml)	$DO_{500}$	
	CIDCA 532	CIDCA 537
0.1	nd	0.114 ± 0.020
0.5	0.153 ± 0.02	0.106 ± 0.002
1	0.176 ± 0.003	0.102 ± 0.09
blanco <sub>1</sub>	0.121 ± 0.010	

Considerando que el valor del blanco<sub>1</sub> se debe restar al valor de la absorbancia obtenida en cada muestra, las medidas corregidas resultantes cayeron fuera del límite de detección obtenido del cálculo de la regresión lineal y en consecuencia no fue posible calcular el rendimiento obtenido en estos tres casos. Se puede considerar entonces que en este caso el rendimiento fue del 0%.

El pH resultante de la suspensión obtenida al diluir la muestra de yogur con EDTA 2% fue de 11 por lo que es probable que en esas condiciones agresivas se inhiba la enzima y por ello no se obtenga una lectura apreciable. Por consiguiente, se realizó una modificación en la técnica de Kanasaki aplicando otros factores de dilución (1/4 y 1/2). Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 8.

## Capítulo I

En este caso los rendimientos solo se pudieron calcular cuando se mezclaron iguales volúmenes

de EDTA y yogur. En la siguiente Tabla 9 se representan los rendimientos calculados:

**Tabla 8.** Medidas espectrofotométricas en yogures suplementados con diferentes volúmenes de bifidobacterias tratados con EDTA en diferentes relaciones (1/4 y 1/2).

Volumen (ml)	<i>DO</i> <sub>500</sub> (dilución 1/4)		<i>DO</i> <sub>500</sub> (dilución 1/2)	
	CIDCA 532	CIDCA 537	CIDCA 532	CIDCA 537
0.5	0.096 ± 0.006	0.102 ± 0.008	0.357 ± 0.009	0.398 ± 0.050
2	0.092 ± 0.020	0.090 ± 0.004	0.668 ± 0.010	0.676 ± 0.060
blanco	0.109 ± 0.007		0.113 ± 0.007	

**Tabla 9.** Rendimientos de la recuperación de bifidobacterias en yogures suplementados con diferentes volúmenes de suspensión de bacterias utilizando una dilución de la muestras 1/2 con EDTA.

Volumen (ml)	Rendimiento%	
	CIDCA 532	CIDCA 537
0.5	1.82 ± 0.70	4.51 ± 0.78
2	1.04 ± 0.02	2.26 ± 0.25

Sin embargo, los resultados obtenidos fueron demasiado bajos como para poder utilizar esta metodología para estimar el nivel de bifidobacterias. Es probable que durante el tratamiento con EDTA la disgregación de los coágulos de caseína sea parcial y por ello queden bacterias atrapadas en la red proteica. En consecuencia, los sustratos de la enzima no podrían acceder eficientemente y de ahí el bajo rendimiento. Los estabilizantes y espesantes utilizados normalmente en yogures podrían también retener en su matriz a las bacterias que se quieren cuantificar. Entre los estabilizantes que componen la formulación de estos productos, se

encuentran la carboximetilcelulosa y las pectinas. Estos compuestos químicos son muy difíciles de solubilizar y un tratamiento con EDTA no los afecta. En base a esta hipótesis, se decide diluir la muestra de yogur con PBS previo al tratamiento con EDTA. De esta manera, existiría una menor cantidad de caseína para disgregar. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 10). El rendimiento utilizando esta estrategia fue mayor, sin embargo, no fue lo suficientemente alto como para conferirle alta sensibilidad al ensayo. Por lo tanto, se inspeccionó la posibilidad de aplicar el método a productos de consistencia más laxa como es el caso de yogures descremados o

bebibles. En base a esto se evaluaron los siguientes yogures con la cepa CIDCA 537 (Tabla 11).

**Tabla 10.** Rendimientos en la recuperación de bifidobacterias luego de diluir las muestras con PBS previamente al tratamiento con EDTA. Los volúmenes de suspensión agregados están en ml.

Volumen (ml)	Rendimiento %	
	CIDCA 532	CIDCA 537
0.5	10.9	-
2	2.18 ± 0.40	3.05 ± 0.95

**Tabla 11.** Rendimientos de recuperación de bifidobacterias de la cepa CIDCA 537. Comparación en yogures de diferente textura.

Volumen (ml)	Rendimiento%	
	descremado (marca B)	bebible (marca A)
0.5	0.44 ± 0.32	7.81 ± 0.34
2	3.09	4.45 ± 0.02

En este caso se observó que un aumento en el rendimiento cuando se suplementaron 0.5 ml de suspensión de bifidobacterias a un yogur bebible. Debido a que todavía sigue siendo un rendimiento muy bajo, se estudió el efecto de otros disgregantes (citrato, tripsina).

Con respecto al citrato, luego de los correspondientes lavados, se observó turbidez al agregar los reactivos para el revelado de la reacción enzimática que no se pudo eliminar con la centrifugación. Consecuentemente, la turbidez de fondo no permitió realizar las medidas espectrofotométricas y por lo tanto se descartó el

citrato como alternativa para el tratamiento de las muestras. La tripsina resultó igualmente ineficiente ya que luego del tratamiento, el pellet de caseínas que se obtuvo fue mucho mayor que el obtenido con el tratamiento con EDTA y en consecuencia impediría el acceso de los reactivos para la medida de actividad fosfoetolasa.

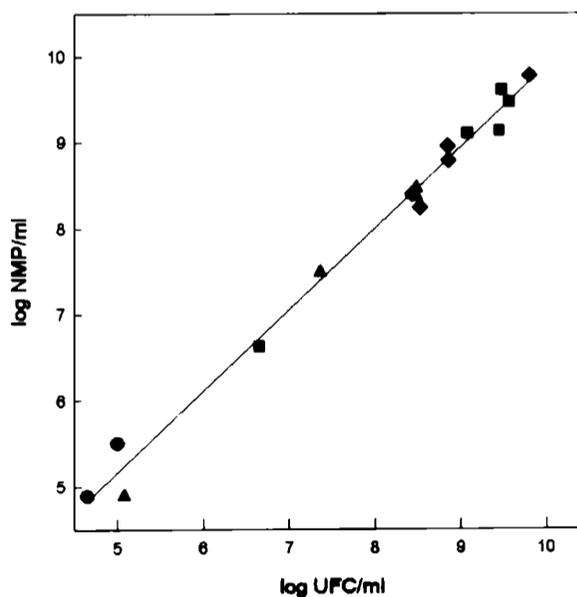
Tras estos resultados desalentadores, se decidió cambiar la estrategia. Se propone entonces realizar una cuantificación con el método del Número Más Probable revelando los tubos con desarrollo bacteriano mediante el método de F6FFC.

**b) Determinación cuantitativa de *Bifidobacterium* en productos lácteos y probióticos mediante una combinación del método del Número Más Probable con la determinación de actividad F6FFC (EB-MPN)**

La presencia de actividad de la enzima fosfocetolasa ha sido utilizada comúnmente como herramienta de identificación de *Bifidobacterium* y su aplicación cuantitativa se detalló en el apartado anterior. En este apartado, se propone realizar medidas de la actividad de la F6FFC en combinación con el ampliamente utilizado NMP como método de enumeración de *Bifidobacterium*. Considerando que la enzima no ha sido descrita en otras bacterias lácticas, una reacción positiva se considera como una confirmación de la presencia de *Bifidobacterium*. Más aún, la utilización de un medio selectivo para reducir el crecimiento de bacterias acompañantes de los starters podría mejorar la sensibilidad en la enumeración de bifidobacterias.

Para evaluar la aplicabilidad del método EB-MPN, se realizaron recuentos de suspensiones de las cepas CIDCA 531, CIDCA 532, CIDCA 536 y CIDCA 5310 crecidas en MRS mediante como se describió en la sección Metodología. Aquellos tubos que evidenciaron desarrollo bacteriano fueron caracterizados mediante la reacción enzimática de la F6FFC. Los resultados obtenidos de esta manera fueron comparados con recuentos de las mismas cepas en placas de MRS sólido (Figura 11). Los resultados se analizaron por regresión lineal y mostraron un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.99588. Esta fuerte correlación positiva avaló la utilización del método basado en el NMP como una herramienta adecuada para el recuento de *Bifidobacterium*.

**Figura 11.** Cuantificación comparativa de bifidobacterias mediante el ensayo EB-MPN y recuento de viables en medio MRS. Cada punto corresponde a un cultivo independiente de las cepas CIDCA 531 (◆), CIDCA 532 (■), CIDCA 5310 (▲) y CIDCA 5313 (●).



**Optimización de un medio selectivo para el crecimiento de Bifidobacterium.** Numerosos medios descriptos hasta el momento<sup>49,200,302,349,398,446,58</sup> fueron utilizados en nuestra colección de bifidobacterias y lactobacilos. Muchos de estos medios, incluyendo el recomendado por la International Dairy Federation<sup>201</sup> se basan en la capacidad de las cepas de fermentar azúcares específicos. Sin embargo, esta estrategia no es completamente efectiva para permitir el crecimiento de todas las cepas de bifidobacterias en base a sus perfiles de fermentación de azúcares. Además, es posible que algunos lactobacilos puedan fermentar los azúcares seleccionados, especialmente *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis* que fermenta un gran espectro de azúcares<sup>163</sup>. Otros autores recomiendan la suplementación con antibióticos, vitaminas y factores de crecimiento a fin de lograr selectividad. Sin embargo, el poder inhibitorio de las soluciones selectivas puede afectar las bacterias acompañantes en diferente medida.

Todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer en los medios citados a excepción de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 332. Considerando que la mayoría de las cepas de lactobacilos fueron capaces de crecer en estos medios, y que el objetivo es obtener un medio selectivo, se estudió la bilis como agente inhibitorio. Vinderola y Reinheimer<sup>446</sup> proponen la utilización de bilis 0.15% como agente inhibitorio adicionado al medio MRS para el recuento de bifidobacterias que se encuentren en presencia de lactobacilos y estreptococos. Sin embargo, no todas las cepas de lactobacilos utilizadas en este trabajo fueron inhibidas con este nivel de bilis. En base a estudios anteriores que demostraron que los lactobacilos y bifidobacterias poseen una

sensibilidad diferente a la bilis<sup>163,230,64</sup> se prepararon diferentes medios basados en el MRS, adicionados de concentraciones crecientes de bilis (0.3, 0.6 y 0.9% p/v) con el objeto de encontrar la mínima concentración de bilis capaz de inhibir el crecimiento de lactobacilos sin afectar el crecimiento de las bifidobacterias. Luego de 24 hs de incubación, no se observó crecimiento de las cepas de lactobacilos CIDCA 331, CIDCA 332 y CIDCA 333; sin embargo el crecimiento de las bifidobacterias fue bastante pobre a todas las concentraciones de bilis ensayadas. Una prolongación del tiempo de incubación a 48 hs logró aumentar la turbidez de los cultivos de bifidobacterias manteniendo nulo el crecimiento de lactobacilos. Con un nivel de bilis de 0.6 y 0.9% p/v las bifidobacterias mostraron un desarrollo más pobre que los tubos que tenían un nivel de bilis del 0.3% p/v. Consecuentemente, se eligió bilis al 0.3% y 48 hs de incubación como las condiciones estándar para la aplicación del método basado en el NMP ya que resultó en un adecuado balance entre crecimiento y sensibilidad. El medio se denominó MRS-bilis modificado (MB-MRS).

#### **Optimización del ensayo basado en el NMP.**

La Tabla 12 y la Figura 12 detallan los resultados obtenidos para la enumeración de bifidobacterias utilizando el ensayo EB-MPN en el que se empleó el medio MB-MRS. El ensayo fue aplicado a diferentes muestras: cepas puras, cultivos mixtos, sarters comerciales, leches fermentadas (comerciales y preparadas en el laboratorio), preparaciones probióticas. En cultivos puros, se logró detectar bifidobacterias cuando estaban

**Tabla 12.** Enumeración de bifidobacterias en diferentes muestras. Comparación entre recuento de viables y el método EB-MPN<sup>a</sup>.

<i>Muestras</i>	<i>Recuentos UFC/ml</i>	<i>NMP/ml<sup>b</sup></i>
<b><i>Cultivos puros</i></b>		
CIDCA 531	$4.65 \pm 1.7 \times 10^9$	$3.78 \times 10^9$ ( $8.62 \times 10^8 - 8.80 \times 10^9$ )
<b><i>Cultivos mixtos</i></b>		
CIDCA 5310 + CIDCA 332	$3.04 \pm 0.41 \times 10^{7c}$	$2.30 \times 10^7$ ( $7.18 \times 10^6 - 7.34 \times 10^7$ )
<b><i>Starters comerciales</i></b>		
liofilizado	$1.5 \times 10^{8d}$	$5.70 \times 10^{7e}$ ( $1.87 \times 10^7 - 1.73 \times 10^8$ )
congelado granulado	$8.3 \times 10^{10d}$	$5.76 \times 10^{11}$ ( $2.44 \times 10^{10} - 1.18 \times 10^{12}$ )
<b><i>Leches fermentadas comerciales</i></b>		
compradas en el supermercado <sup>f</sup>	nd	$< 10^1$
suplementada con CIDCA 532	$2.35 \pm 0.39 \times 10^{6c}$	$4.22 \times 10^6$ ( $1.62 \times 10^6 - 1.10 \times 10^7$ )
provista por industria I	$4.2 \times 10^{8d}$	$8.69 \times 10^7$ ( $4.11 \times 10^7 - 1.97 \times 10^8$ )
provista por industria II	$3.2 \times 10^{7d}$	$7.18 \times 10^7$ ( $3.40 \times 10^7 - 1.63 \times 10^8$ )
<b><i>Leches fermentadas preparadas en el laboratorio</i></b>		
preparada con CIDCA 333 hasta pH 4.2 y luego suplementada con CIDCA 532)	$1.10 \pm 0.09 \times 10^{9c}$	$9.93 \times 10^8$ ( $5.32 \times 10^8 - 1.85 \times 10^{10}$ )
preparada con el starter liofilizado hasta pH 4.2 y luego suplementada con CIDCA 531)	$3.34 \pm 0.39 \times 10^{8c}$	$1.73 \times 10^8$ ( $8.90 \times 10^7 - 3.31 \times 10^8$ )
preparada con leche fermentada I	nd	$1.23 \times 10^8$ ( $5.71 \times 10^7 - 2.55 \times 10^8$ )
preparada con CIDCA 333 y CIDCA 532	$1.20 \times 10^{8c}$	$1.23 \times 10^8$ ( $3.80 \times 10^7 - 3.93 \times 10^8$ )
preparada con el starter liofilizado y CIDCA 531	nd	$2.00 \times 10^8$ ( $7.40 \times 10^7 - 5.38 \times 10^8$ )
<b><i>Cápsulas probióticas</i></b>		
Pro-Biotics Acidophilus	$9.8 \times 10^{8d}$	$3.65 \times 10^{8e}$ ( $6.68 \times 10^7 - 5.51 \times 10^8$ )

<sup>a</sup> en todos los casos se utilizó como medio base MRS suplementado con bilis (0.3% p/v), la desviación estándar fue menor del 5%. ND, no determinada

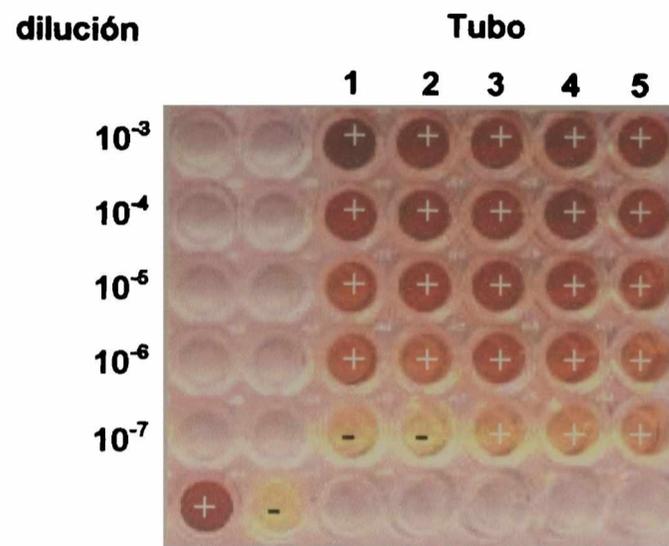
<sup>b</sup> valor promedio, números entre paréntesis representan el intervalo de confianza ( $P > 0.01$ )

<sup>c</sup> recuentos de bifidobacterias en agar MRS fueron determinados antes de la adición de lactobacilos

<sup>d</sup> recuentos de bifidobacterias fueron determinados por el productor en agar MRS suplementado con dicloxacilina (0.5 mg % p/v) (microorganismos/g de producto). Resultados provistos por el productor.

<sup>e</sup> expresado en NMP/g de producto

<sup>f</sup> fueron analizados tres productos diferentes



**Figura 12.** Resultados obtenidos con el método EB-MPN en productos lácteos provistos por una empresa láctea. Las fosas rojo-púrpura corresponden a reacciones positivas y las fosas amarillas a reacciones negativas. El blanco fue realizado agregando todos los reactivos para la reacción enzimática sin bacterias. Se incluyó un control positivo preparado con un cultivo puro de *Bifidobacterium*. Cuando el color no es evidentemente positivo, se realizan medidas espectrofotométricas y se las compara con la del blanco (-).

presentes en una concentración de  $10^6$  a  $10^{11}$  NMP/ml. Para las mismas muestras los valores de recuentos de viables correspondieron al mismo rango. En las muestras preparadas mezclando iguales volúmenes de cultivos puros de *Bif. bifidum* CIDCA 5310 y *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 332 se encontró que los resultados obtenidos con el método de EB-MPN correlacionó con los recuentos de viables.

La decisión final de asignar a un resultado el valor de "positivo" o "negativo" se obtiene por inspección ocular (Figura 12). Pero en algunos casos el color de las fosas puede no ser claramente "positivo" probablemente por la cantidad de bacterias crecidas. De todas maneras, es posible solucionar este problema realizando una lectura espectrofotométrica a 500 nm del

contenido de la fosa y compararla con la lectura correspondiente al blanco. Toda lectura superior a la lectura del blanco  $+ \sigma_{n-1}$  se considera positiva para fosfocetolasa. Este fue el caso para una de las muestras de leche fermentada (Figura 12; dilución  $10^{-7}$ ).

También fueron analizadas muestras de starters y leches fermentadas provenientes de dos industrias locales. En estas muestras se encontraron concentraciones variables de bifidobacterias en el rango de  $10^7$  a  $10^{11}$  NMP/ml. Es importante puntualizar que todos estos valores se corresponden con los resultados provistos por ambas industrias para recuentos de bifidobacterias. Sorprendentemente, las muestras de leches fermentadas comerciales compradas en

## Capítulo I

supermercados arrojaron valores considerablemente más bajos ( $<10^1$  NMP/ml) que aquellos obtenidos para leches fermentadas preparadas en el laboratorio. Solamente cuando la cepa *Bif. breve* CIDCA 532 fue agregada a una leche fermentada fue posible recuperar  $4.22 \times 10^6$  CFU/ml.

Varias leches fermentadas fueron preparadas en nuestro laboratorio con diferentes cepas de lactobacilos y *Bif. pseudolongum* CIDCA 531. Además, el starter liofilizado (conteniendo *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*) provisto por una industria local fue utilizado para preparar leches fermentadas en el laboratorio. El starter se inoculó en leche y cuando el pH alcanzó el valor de 4.2 se adicionó la cepa CIDCA 531. En ambos experimentos, los recuentos de bifidobacterias fueron alrededor de  $10^8$  NMP/ml (Tabla 12).

De las dos cápsulas probióticas seleccionadas, sólo una logró disolverse en buffer para preparar la suspensión de bifidobacterias. Probablemente los excipientes utilizados en preparar las cápsulas no son los mismos y en consecuencia se debería buscar un solvente más adecuado para el caso de la cápsula que no logró solubilizarse. El producto *Pro-Biotics Acidophilus* mostró niveles de bifidobacterias similares a los declarados por el fabricante.

La aplicación del ensayo permitió observar que los productos comerciales analizados contenían bajas cantidades de bifidobacterias inclusive antes de ser distribuidas en los supermercados. La manipulación de bacterias probióticas durante la preparación de productos afecta altamente su supervivencia y la performance del producto.

Desafortunadamente, en muchos casos no son observadas las precauciones adecuadas durante el procesamiento y en consecuencia se obtienen valores de bacterias viables menores que los especificados por el productor. El almacenamiento de bifidobacterias sigue siendo problemático para la industria tanto como para los laboratorios de investigación debido a la baja resistencia de estos microorganismos al oxígeno y al bajo pH<sup>34,391,395,462</sup>. Con respecto a esto y considerando que la cadena de frío puede ser interrumpida durante la distribución de productos con la consecuente caída de pH, es de esperar que los productos en la góndola muestren bajos recuentos. Esta hipótesis fue confirmada al preparar leches fermentadas en el laboratorio. En este caso, se obtuvieron valores de  $10^8$  NMP bifidobacterias/ml. Se obtuvieron resultados similares cuando diferentes cepas fueron adicionadas a leches fermentadas comerciales (Tabla 12). En nuestro estudio se encontró que las leches fermentadas provenientes de supermercados contenían bajas cantidades de bifidobacterias, mientras que aquellos productos en forma de cápsulas coincidieron con los valores declarados por el productor. En una publicación reciente<sup>171</sup>, solo 2 de los 13 productos probióticos analizados en el Reino Unido tenían los niveles declarados por el productor. Más aún, muchos productos no contenían los microorganismos declarados en la etiqueta.

El ensayo descrito presenta nuevamente ciertas ventajas con respecto a los recuentos de viables que emplean medios selectivos o diferenciales: un resultado más objetivo cuando las colonias no están lo suficientemente separadas. Considerando que las técnicas de recuentos de viables son tediosas y en algunos casos requieren

## Capítulo I

largos tiempos de incubación, el método EB-MPN representa un procedimiento más rápido y conveniente adecuado para su automatización. Los recuentos de bifidobacterias pueden ser problemáticos debido a las propiedades de autoagregación de algunas cepas<sup>163,327</sup>, por lo tanto el método desarrollado se presenta como una alternativa interesante para testear el nivel de bifidobacterias frente a las técnicas de recuentos de viables.

El método es adecuado para la detección de bifidobacterias no sólo cuando se adicionan en el producto final, sino también cuando estos microorganismos son crecidos en presencia de otras bacterias del starter. Esto indicaría que ciertas cepas de bifidobacterias dañadas por el bajo pH y por el nivel de oxígeno pueden ser recuperadas mediante esta metodología a pesar de crecer en conjunto con otras bacterias del starter. Esta metodología permite la detección de cantidades muy bajas de bifidobacterias ya que una sola bacteria puede alcanzar una concentración de por lo menos  $10^5$  UFC/ml luego de una incubación en MRS por 48 hs a 37 °C. Esto significa que es suficiente con que una sola bacteria esté presente en una de las réplicas de cualquier dilución del NMP para que se origine una cantidad de bacterias que pueda ser revelada mediante la reacción para F6FFC.

Se han descrito otros métodos para la detección de bifidobacterias en leches fermenta-

das<sup>162,90</sup>. Sin embargo, debido a sus altos límites de detección no resultan útiles cuando las muestras a analizar poseen menos de  $10^8$  bacterias/ml. Los métodos basados en técnicas de la polimerasa en cadena (PCR) tienen el inconveniente de detectar células no viables junto con las viables. Además, es necesario eliminar las caseínas de la leche antes de extraer el ADN de las bacterias y los subsecuentes lavados pueden reducir el número de bifidobacterias.

El método EB-MPN tiene una aplicación directa en control de calidad industrial y también puede ser utilizado en el seguimiento de las etapas de elaboración de productos lácteos conteniendo bifidobacterias. En el desarrollo de un producto probiótico, es importante que se encuentren presentes microorganismos vivos en un nivel adecuado de acuerdo con las legislaciones actuales, que pueden variar de país en país. El método desarrollado permite detectar valores de bifidobacterias recomendados por la Swiss Food Regulation, la International Standard of FIL/IDF y el MERCOSUR e inclusive menores. Además, mediante medidas de absorbancia se pueden eliminar resultados dudosos o problemáticos (Figura 12). Además, puede ser aplicado por personal sin grandes conocimientos de microbiología ya que la técnica propuesta no requiere diferenciar colonias para asignar un resultado a la lectura, sino se basa en la detección de color.

## **Conclusiones**

Se desarrolló un ensayo *in vitro* simple, rápido y específico basado en la medida cuantitativa de la actividad de la enzima fosfocetolasa como estimación del número de bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, estableciendo las condiciones óptimas para su implementación. Debido a su formato, el método permite la determinación de varias muestras simultáneamente.

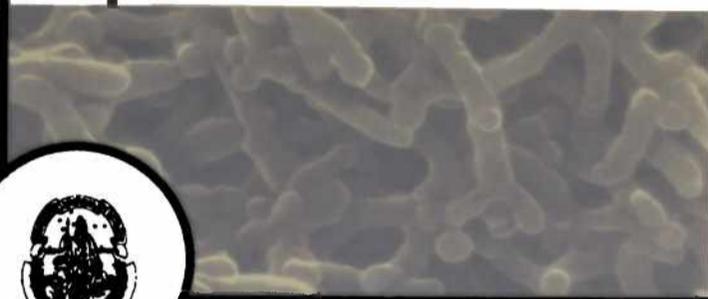
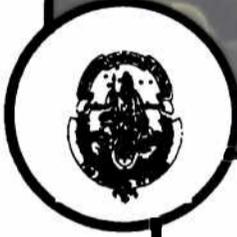
El ensayo desarrollado fue aplicado con éxito a la determinación de la adherencia de *Bifidobacterium* a células intestinales en cultivo, presentándose como una herramienta útil en la evaluación de uno de los criterios de selección de bacterias probióticas: adherencia a epitelio intestinal.

A través de una combinación del método del Número Más Probable y de la determinación de actividad fosfocetolasa se desarrolló una

metodología que permitió la cuantificación de bacterias del género *Bifidobacterium* en productos lácteos y probióticos (EB-MPN). El método utilizando un medio conteniendo bilis como agente selectivo, permite determinar específicamente bacterias de este género en productos o cultivos polimicrobianos.

La sensibilidad del ensayo EB-MPN permite su aplicación directa en control de calidad industrial y también puede ser utilizado en el seguimiento de las etapas de elaboración de productos lácteos conteniendo bifidobacterias.

El método desarrollado permite detectar valores de bifidobacterias recomendados por la Swiss Food Regulation, la International Standard of FIL/IDF y el MERCOSUR. La sensibilidad del método permitiría su implementación en legislación y regulación de productos probióticos que contengan bifidobacterias.



## **CAPÍTULO II**

## CAPÍTULO II

**E**n las últimas décadas se ha reconocido la importancia de la microflora intestinal en la salud tanto de niños como de adultos. La colonización de diferentes porciones del tracto gastrointestinal por microorganismos benéficos constituye la primera barrera defensiva contra la invasión de microorganismos patógenos o sustancias tóxicas<sup>401</sup>. La capacidad de adherencia al epitelio intestinal y la capacidad de competir con otros microorganismos parece ser un rasgo crucial en una cepa probiótica para colonizar el tracto gastrointestinal<sup>21,114</sup>.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son habitantes normales del intestino de animales y humanos, donde juegan un papel importante en la prevención de desórdenes gastrointestinales<sup>298,234</sup>. Las bifidobacterias han sido exitosamente utilizadas para prevenir diarreas relacionadas a antibióticos y diarreas infantiles agudas. La protección del epitelio intestinal podría ser

atribuida a las propiedades adherentes de algunas cepas y a la liberación de sustancias antimicrobianas como los ácidos láctico y acético<sup>229,327,20</sup>.

Una aproximación para obtener información acerca del probable comportamiento adherente en el ecosistema intestinal es estudiar las propiedades superficiales de las cepas seleccionadas. La adherencia de microorganismos a ecosistemas naturales se puede deducir estudiando las propiedades superficiales de las bacterias utilizando una combinación de metodologías<sup>229,327,311</sup>. Este procedimiento incluye la evaluación de las propiedades superficiales mediante técnicas como partición en interfases hidrocarburo-agua, determinación del potencial  $\zeta$  (zeta), unión a superficies sólidas, capacidad de agregar partículas, adherencia a monocapas de células en cultivo. Hasta ahora, no ha sido desarrollada una técnica que por sí misma pueda caracterizar adecuadamente todos los aspectos de

## Capítulo II

la interacción microorganismo-sustrato. Por lo tanto es imprescindible conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas anteriormente nombradas.

La aplicación de cualquier sistema modelo al estudio de la adhesión bacteriana debe tener tres objetivos primarios:

- (1) desarrollar una manera de caracterizar un sistema natural relacionado;
- (2) determinar las propiedades de adhesinas y/o receptores; y
- (3) examinar el rol de las moléculas que contribuyen al proceso de adhesión pero que no participan directamente como adhesinas o receptores.

Cuando se diseña una estrategia para el estudio de la superficie bacteriana, los métodos deben

estandarizarse cuidadosamente. Es importante observar los buffers de resuspensión ya que la fuerza iónica y el pH pueden afectar los resultados obtenidos. La temperatura a la cual se desarrollan los ensayos así como también las condiciones en las que las bacterias son crecidas pueden afectar las características superficiales de las mismas. Cuando se desean realizar comparaciones entre laboratorios, es recomendable incluir en los estudios cepas de referencia con diferentes propiedades adherentes.

Con el objeto de caracterizar la superficie bacteriana hemos aplicado varias metodologías a una colección de bifidobacterias aisladas en el CIDCA. Este procedimiento permitió clasificar cepas adherentes sobre la base de su capacidad de interaccionar con diferentes superficies y correlacionar estas propiedades con la naturaleza de la superficie bacteriana.

## **Objetivos**

En la segunda etapa del presente trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudio sistemático de las propiedades superficiales de bifidobacterias, focalizando en la adherencia como un rasgo probiótico, a través de una metodología adecuada que incluye los siguientes aspectos:
  - estudio de la hidrofobicidad superficial mediante un método cinético (optimización de la técnica)
  - estudio de la capacidad autoagregante (determinación de parámetros cuantitativos)
  - estudio de la capacidad hemaglutinante en combinación con estudios de inhibición de hemaglutinación
  - estudio de la capacidad de adherirse a partículas cubiertas con mucinas
  - estudio de la capacidad de adhesión a sustratos inertes (poliestireno)
  - estudio de la capacidad de adhesión a sustratos biológicos (monocapas de células epiteliales en cultivo)
- Estudio de las condiciones de crecimiento en la manifestación de las propiedades superficiales
- Caracterización de la superficie de las bifidobacterias a fin de identificar la naturaleza de las moléculas involucradas en la adhesión

## **Metodología**

### **Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.**

Se utilizaron las cepas de *Bifidobacterium* de las siguientes especies: *Bifidobacterium pseudo-longum* CIDCA 531, *Bif. breve* CIDCA 532, *Bif. bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537, CIDCA 5310 y CIDCA 5313 y *Bif. infantis* CIDCA 538. El origen de las cepas y la preparación de los medios de cultivo utilizados se especificaron en el Apéndice I y en el Capítulo I. Las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 536 y *Bif. infantis* CIDCA 538 pertenecen actualmente a la colección de Nestlé bajo la denominación NCC 189 y NCC 200, respectivamente.

Inicialmente se realizaron estudios cinéticos a fin de establecer el tiempo de cosecha para los ensayos de propiedades superficiales. Un modelado matemático permitió calcular los parámetros de crecimiento. Uno de los modelos más recomendado<sup>149,148,471</sup> es la ecuación de Gompertz modificada:

$$A = A_0 + a \times \exp\{-\exp[-(t-m)/b]\}$$

donde **A** es la absorbancia de la suspensión medida a 600 nm, **A<sub>0</sub>** es la absorbancia asintótica cuando el tiempo tiende a 0 (aprox. equivalente a la absorbancia inicial de bacterias) medida a 600 nm, **a** es la absorbancia asintótica cuando el tiempo tiende a infinito (*i.e.* la absorbancia máxima) medida a 600 nm, **t** es el tiempo expresado en horas, **m** es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento expresado en horas, y **b** es la velocidad relativa de crecimiento expresada en horas<sup>-1</sup> a tiempo **m**.

A partir de estos parámetros se pueden calcular la velocidad específica de crecimiento,  $\mu = 1/(b \times \ln a)$ , expresada en h<sup>-1</sup>; la duración de la fase de latencia,  $Lag = m - b$ , expresada en horas; y la máxima densidad de población,  $A_{m\acute{a}x} = A_0 + a$ ,

expresada en unidades de absorbancia. Se aplicó este modelado para las bifidobacterias crecidas en

caldo MRS y en caldo TPY.

### **1) Propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana**

Dentro de los modelos que se utilizan frecuentemente para inferir la capacidad de adherencia de los microorganismos se encuentra el estudio de la *hidrofobicidad superficial*. Este tipo de ensayo se encuentra entre los más generales y menos específicos, pero puede ser de gran ayuda al momento de hacer una preselección de cepas si se cuenta con un gran número de ellas. También permite verificar cambios en las propiedades superficiales debido al crecimiento en diferentes medios de cultivo.

El ensayo utilizado en este trabajo se denomina MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) y está basado en la tendencia de ciertos microorganismos a adherirse a la superficie de gotas de hidrocarburos líquidos, durante un breve período de agitación<sup>102</sup>.

**Material:** Los tubos de vidrio utilizados en este ensayo se lavaron con mezcla sulfocrómica\* y se enjuagaron con agua bidestilada, debido a que ciertos surfactantes pueden interferir con los resultados. En algunos casos es incompatible la utilización de pipetas y cubetas de plástico (por ejemplo con *p*-xileno). En estas experiencias se utilizó *n*-hexadecano como hidrocarburo de

referencia, que no ofrece problemas con materiales plásticos y posee menor toxicidad.

**Preparación de microorganismos:** Se utilizaron microorganismos crecidos en caldo TPY o MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI). La composición de los medios, su forma de preparación y el procesamiento de los cultivos se detalla en el Apéndice I. Luego de los lavados, la densidad óptica de la suspensión stock de bacterias se ajustó aproximadamente a 0.8 - 1.0 a 600 nm.

**Hidrocarburo referencia:** Entre los hidrocarburos que se aconsejan utilizar para este tipo de ensayos se encuentran: *n*-hexano, *n*-octano y *p*-xileno<sup>101</sup>. En este trabajo se utilizó *n*-hexadecano (J. T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ). Se verificó la ausencia de surfactantes en el hidrocarburo colocando unas gotas de éste en el buffer (sin bacterias). La presencia de una emulsión o si las gotas no coalescieran rápidamente, indica la presencia de un contaminante que debería ser removido mediante una resina de intercambio iónico (*e. g.* MB 3).

**Ensayo preliminar:** El método para comparar la hidrofobicidad superficial de bacterias involucra medidas cinéticas; es decir, considerando que la hidrofobicidad superficial es tiempo-dependiente, la adhesión a diferentes volúmenes de hidrocarburo debe evaluarse en función del tiempo de agitación. En forma preliminar se diferenciaron

\* La mezcla sulfocrómica se preparó disolviendo 200 g de Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>K<sub>2</sub> en 100 ml de agua y suavemente se agregaron 1600 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> agitando. Como la mezcla es muy higroscópica y corrosiva, se conservó en botellas de vidrio borosilicato color caramelo bien tapadas y en un lugar seguro. Cuando la mezcla tomó color verde, se descartó.<sup>138</sup>

## Capítulo II

las cepas hidrofóbicas de las que no-hidrofóbicas mediante el siguiente ensayo:

A un volumen de 1.2 ml de suspensión stock de bacterias se le agregaron cantidades crecientes de hexadecano (40  $\mu$ l, 80  $\mu$ l, 150  $\mu$ l y 200  $\mu$ l). Las diferencias en la relación de volúmenes entre la fase acuosa y orgánica afectarán los resultados. Los tubos se agitaron en vortex (Maxi Mix II, Thermolyne Barnstead, Dubuque, IO) por un período de 2 min a potencia máxima, luego del cual se permitió que se separen las fases. Si no ocurriera adhesión, las fases deberían coalescer y separarse completamente. En caso de haber adhesión, se formará una capa superior "cremosa" compuesta de gotas de hidrocarburo cubiertas de bacterias. La adhesión a hidrocarburo se confirmó microscópicamente mediante la observación de las gotas. De esta manera fue posible diferencias entre cepas hidrofóbicas y no-hidrofóbicas.

*Ensayo cinético:* Se tomó un grupo de tubos conteniendo 1.2 ml de suspensión bacteriana de cada cepa. A cada uno de ellos se les colocaron 10  $\mu$ l de hexadecano y se agitó cada tubo por un período de tiempo diferente hasta un máximo de 2 min (*e. g.*, 0 seg, 5 seg, 10 seg, 20 seg, 45 seg, 1 min y 2 min). Cada tiempo se evaluó por duplicado, es decir, se prepararon dos tubos para cada tiempo. Luego se tomó otro grupo de tubos para los que se aplicó el mismo procedimiento pero colocando 40  $\mu$ l de hexadecano. Luego, se repitieron las medidas con tubos conteniendo 80  $\mu$ l, 150  $\mu$ l y 200  $\mu$ l de hexadecano. Luego de la agitación se permitió a las fases que se separasen y se extrajo la fase inferior acuosa con una micropipeta o con jeringa y aguja y se transfirió a una cubeta para medir la turbidez a 600 nm

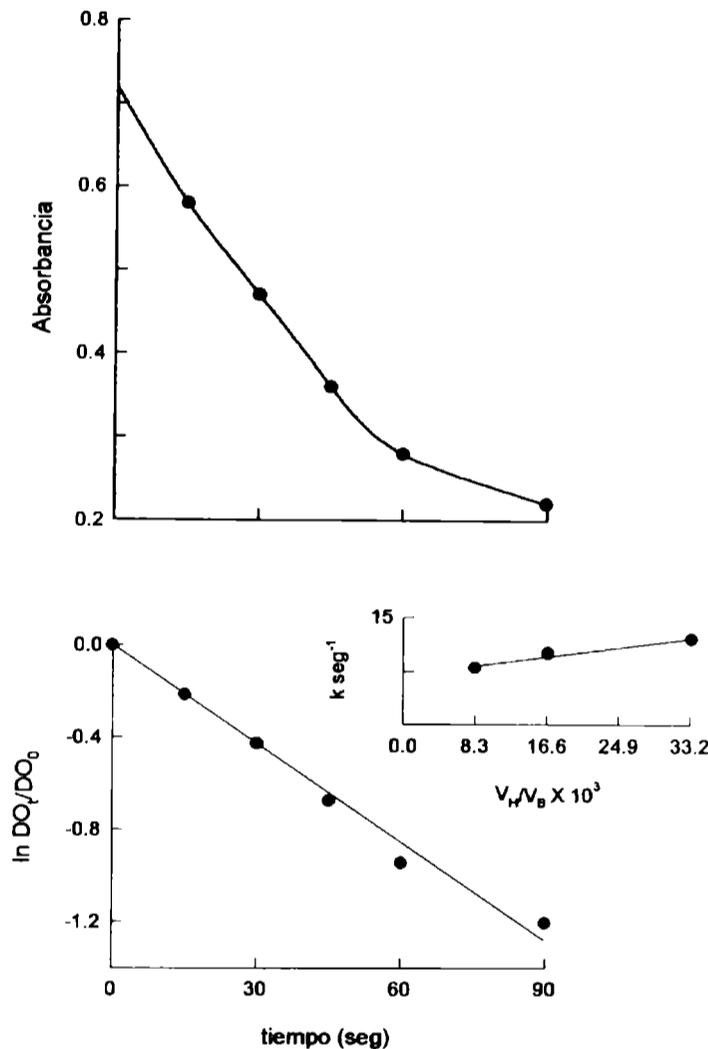
(Beckman DU-650, Beckman Co., IL). Se evitó en todo momento contaminación de la fase inferior acuosa con la fase superior orgánica.

La disminución de la turbidez se comparó con la turbidez de la suspensión con hexadecano sin vortear ( $t = 0$ ). Es erróneo incorporar como control un tubo vorteadado sin hidrocarburo, los microorganismos podrían adherirse a las paredes del tubo y ésta precisamente es una característica de las cepas que se van a estudiar. El cero de absorbancia se fijó en el espectrofotómetro con un tubo de buffer con el mismo volumen de hidrocarburo que se utilizará en la batería de tubos correspondientes. Las medidas se realizaron entre 25 y 27 °C. La temperatura es un factor importante ya que el punto de solidificación del hexadecano está cerca de los 20 °C.

Para cada relación hidrocarburo/buffer, la disminución de la turbidez en el tiempo sigue una cinética de primer orden con una constante de velocidad denominada *constante de remoción* ( $k$ ). Por lo tanto, para obtener este parámetro, se graficaron los resultados de  $\ln DO_t/DO_0$  (donde  $DO_0$  es la densidad óptica inicial sin agitar y  $DO_t$  es la densidad óptica a tiempo de agitación  $t$ ) en función del tiempo y mediante regresión lineal se determinó a partir de la pendiente, la *constante de remoción* ( $k$ ). Un gráfico de las constantes de remoción en función de las relaciones de volumen hidrocarburo/buffer, genera una línea recta de cuya pendiente se obtiene el *coeficiente de remoción* ( $K$ ). Este parámetro se utilizó para caracterizar la hidrofobicidad superficial de las bifidobacterias. En la Figura 1 se representan a título ilustrativo los resultados obtenidos por Doyle

## Capítulo II

y Rosenberg<sup>102</sup> utilizando esta misma metodología.



**Figura 1.** Adhesión de *Streptococcus cricetus* AHT a hexadecano. (*Superior*) Adhesión al hidrocarburo como función del tiempo de agitación. (*Inferior*) Representación de la cinética de primer orden para la adhesión de *S. cricetus* a hexadecano, utilizando los datos derivados del gráfico superior. (*Inserto*) Pendiente de la cinética de primer orden ( $k \text{ seg}^{-1}$ ) versus la relación de hexadecano a buffer ( $V_H$  y  $V_B$ , respectivamente). El volumen de células en el buffer fue de 3 ml para la curva superior, mientras que la cantidad de hexadecano fue de 100  $\mu\text{l}$ . Los datos fueron extraídos de Doyle y Rosenberg<sup>102</sup>.

### 2) Interacciones bacteria-bacteria

Definimos como autoagregación o autoaglutinación a la capacidad de una cepa bacteriana de crecer en un medio de cultivo líquido formando grumos o agregados visibles macroscópicamente. Estos agregados están formados generalmente por grandes clusters de células, los cuales son difíciles de diferenciar individualmente al microscopio óptico. Es probable que determinados compo-

nentes del medio de cultivo favorezcan la expresión de estas propiedades. Si un cultivo o una suspensión bacteriana se agita y se deja inmóvil durante un período de tiempo, las bacterias autoagregantes pueden ser distinguidas de las que no lo son, porque las primeras sedimentan clarificando el medio mientras que las últimas persisten dispersas en el seno de la

## Capítulo II

suspensión. Algunos agregados son relativamente estables inclusive luego de una vigorosa agitación o de lavados con buffer, pero pueden ser disgregados mediante un tratamiento con detergentes. Las diferencias entre cepas autoagregantes y las no-autoagregantes pueden caracterizarse en forma semicuantitativa por medio del *índice de autoagregación* y el *tiempo de autoagregación*.

***Índice de autoagregación (IA):*** Una manera de cuantificar la capacidad de autoagregación es determinando la concentración bacteriana en mg/ml de peso seco por unidad de DO<sub>600</sub>. A igual concentración, las bacterias autoagregantes darán menor densidad óptica que las no-autoagregantes debido a diferencias en el número de partículas en suspensión.

Para determinar el índice de autoagregación, se realizaron cultivos con un inóculo al 1% en 50 ml en diferentes medios. Los medios utilizados fueron diseñados con la finalidad de determinar el/los componentes que produce las características de autoagregación y se detallan en el Apéndice I. Las condiciones de cultivo ya se detallaron en el capítulo anterior. Cuando se alcanzó la fase estacionaria, se sacaron los erlenmeyers de las jarras de anaerobiosis, se raspó con un policeman de goma todo el material adherido a las paredes y se homogeneizó suavemente el contenido para no desarmar los grumos. De estas suspensiones se tomaron dos alícuotas para medir DO<sub>600</sub>. La concentración bacteriana se determinó de la siguiente manera: se midió el volumen de cultivo a la décima de ml y se trasvasó a tubos de centrífuga. Las suspensiones se centrifugaron

durante 10 min a 4 °C a 10000 *g* en una centrífuga Sorvall (Sorvall RC-5B, DuPont Co., Wilmington, DE). Se eliminó el sobrenadante sin arrastrar pellet para no eliminar bacterias y se lavó dos veces con PBS. Se procedió de la misma manera realizando un último lavado en agua bidestilada en tubos de vidrio tarados hasta la centésima de mg (Metler AE 240, Greifensee, Suiza). Luego de eliminar el sobrenadante se llevan a estufa de 100 °C hasta peso constante. Se debe tomar especial precaución en el lavado ya que por tratarse de la determinación de masa bacteriana, debe reducirse al mínimo la pérdida de masa por lavados.

Los cálculos se realizaron para cada cultivo independiente por separado y luego se promediaron los valores de (mg/ml)/DO<sub>600</sub> para *c/cepa* en *c/medio*. El índice de autoagregación se calculó con la siguiente expresión:

$$IA = \text{peso seco (mg/ml)}/DO_{600}$$

***Tiempo de autoagregación (TA):*** Los cambios en la turbidez de una suspensión que sedimenta espontáneamente puede ser monitoreada en función del tiempo. A partir de los cambios en la DO se pueden calcular los cambios relativos en la sedimentación mediante la siguiente expresión:

$$DO_{rel} = [(DO-DO_i)/(DO_{sat}-DO_i)]$$

donde DO es la turbidez de una muestra a un tiempo dado, DO<sub>i</sub> es la turbidez inicial de la muestra y DO<sub>sat</sub> es la turbidez de saturación obtenida a tiempo infinito (a largos tiempos). Los valores de DO<sub>rel</sub> se graficaron en función del tiempo para varias diluciones de las cepas. Es importante notar que a partir de una determinada

## Capítulo II

dilución las curvas se superponen. En esas condiciones se puede determinar el tiempo de autoagregación como el tiempo al cual la absorbancia relativa alcanza el 50% del valor de saturación independientemente de la dilución.

Para calcular estos parámetros, se crecieron y cosecharon las bacterias como se describió en el capítulo I y se ajustó la DO de las suspensiones a 1.0 - 1.5. Un ml de cada suspensión se colocó en una cubeta y se evaluó el cambio en la turbidez por aproximadamente 20 min a intervalos

regulares hasta que no se observaron cambios en un espectrofotómetro Metrolab RC 235 (Laboratorio Rodríguez Corswant, Bernal). El procedimiento se repitió con diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas. Finalmente se calculó la  $DO_{rel}$  a cada tiempo utilizando la expresión dada arriba y se representó la variación de  $DO_{rel}$  en función del tiempo para cada dilución. Utilizando solo aquellas curvas en las cuales la sedimentación es independiente de la dilución, se halló el correspondiente TA como el tiempo para el cual  $DO_{rel} = 0.5$ .

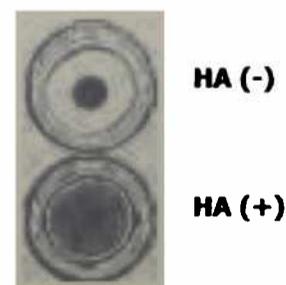
### 3) Interacciones bacteria-eritrocito

Los eritrocitos son una fuente conveniente para evaluar las propiedades superficiales de las bacterias ya que contienen una miríada de dominios externos para adhesinas bacterianas. La mayoría de las adhesinas bacterianas son detectables como hemaglutininas cuando una reacción de *hemaglutinación* (HA) da positiva con bacterias intactas. En la mayoría de los casos, los sitios expuestos para las adhesinas bacterianas son antígenos que también son expresados en las células del epitelio intestinal. Por esta razón, la HA es un sistema experimental adecuado para predecir las interacciones específicas entre las bacterias y los eritrocitos<sup>214,219,447,53,314,351</sup>.

Para evaluar la capacidad hemaglutinante se realizaron ensayos de hemaglutinación en placas de ELISA de 96 fosas con fondo en U (Nunc, Roskilde, Dinamarca) utilizando solución fisiológica estéril como diluyente. Cada cepa se evaluó en una fila de fosas diferente en la que se enfrentaron

25  $\mu$ l de diluciones seriadas al medio de las suspensiones bacterianas (inicial 2mg/ml) con igual volumen de una suspensión al 2% de eritrocitos humanos (grupos AB, A ó O) lavados en PBS. Se homogeneizó suavemente y se dejó sobre una superficie horizontal a T amb. Al cabo de 1 h se realizó la lectura de las placas. Los resultados se expresaron como la inversa de la máxima dilución bacteriana que produce hemaglutinación a simple vista. Todas las titulaciones fueron realizadas por duplicado con dos cultivos independientes. Como control negativo se preparó una fosa sin suspensión bacteriana.

Cuando no existe HA (resultado negativo) los glóbulos rojos son capaces de sedimentar en el fondo de la fosa. Un resultado positivo se



## Capítulo II

evidencia por la presencia de una red de glóbulos rojos-bacterias que cubre completamente la fosa. Para que estos efectos se manifiesten claramente, es importante utilizar placas con fosas de fondo en U o en V, pero nunca con fondo plano.

Los glóbulos rojos se obtuvieron por extracción de aproximadamente 10 ml de sangre venosa con aguja y jeringa estéril. La sangre se colocó en un tubo estéril con anticoagulante (citrato de Na, 2.6%; ácido cítrico, 0.3%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.22%; glucosa, 3.2%; pH 7.35) en una relación 10 ml sangre/1.5 ml anticoagulante. El anticoagulante se esterilizó por filtración con membrana de 0.45 µm (Millipore Co., Bedford, MA). Las muestras de sangre se descartaron cuando se observaron los primeros indicios de hemólisis.

**Modificación de la hemaglutinación.** Aquellas cepas que mostraron HA fueron sometidas a diferentes tratamientos físicos, químicos o enzimáticos con el objeto de caracterizar química y morfológicamente los componentes superficiales responsables de esta propiedad.

Se incubaron las bacterias con lisozima 5 mg/ml o Triton X-100 0.5% por 1 h a 37 °C. Las bacterias fueron lavadas con PBS y resuspendidas en el mismo buffer para lograr una concentración de 2 mg/ml. En otro grupo de experimentos, las bacterias fueron sometidas a sonicación (Branson 200, Danbury, CT) tres veces en períodos de 30 seg a la máxima potencia en un tubo en un baño de hielo. Finalmente, una alícuota de bacterias lavadas y llevadas a 2 mg/ml fue agitada a 120 rpm a T amb por 1 h ya que ha sido publicado que la agitación elimina adhesinas de la superficie

bacteriana en otras cepas<sup>363</sup>. Se aplicaron además otros tratamientos, que por tratarse de tratamientos utilizados también en otros modelos se detallan en el inciso 6.

**Inhibición de hemaglutinación.** Este ensayo permite identificar componentes involucrados en la interacción con eritrocitos mediante la competencia con los mismos componentes en forma soluble. Se trata de ensayar la suspensión bacteriana con diluciones seriadas del compuesto competente soluble frente a los eritrocitos. Para este ensayo, habiendo establecido la participación de componentes carbohidratos en la interacción con eritrocitos (ver Resultados), se realizó la competencia con diferentes azúcares simples, oligosacáridos y mucinas.

Este ensayo consta de dos etapas, una inicial en la que se estableció la mínima concentración de bacterias necesaria para lograr HA; y una segunda etapa donde se enfrentaron bacterias con azúcares o mucinas frente a eritrocitos a fin de establecer la concentración de azúcar necesaria para lograr desplazamiento de bacterias e inhibir la hemaglutinación. El protocolo de ensayo se describe a continuación:

- se desarrolló en placas de ELISA de 96 fosas con fondo en U (Nunc Co., Roskilde, Dinamarca) usando solución fisiológica estéril como diluyente
- se prepararon diluciones seriadas de una suspensión de bacterias inicialmente de 2 mg/ml en solución fisiológica. Las diluciones se realizaron de manera que resulten mínimas las diferencias entre sí a fin de establecer con mayor precisión la mínima cantidad de bacterias necesarias para

## Capítulo II

producir HA (por ejemplo: 1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, etc.)

- una vez hallada la dilución límite, se amplió el rango de diluciones para lograr aún una mayor sensibilidad. La concentración mínima que produce hemaglutinación es la que se utilizó en la segunda etapa

- se prepararon soluciones de los azúcares que se utilizarían como competidores, los cuales se diluyeron de manera secuencial en las fosas de la placa conteniendo 25  $\mu$ l de solución fisiológica. Los azúcares empleados y su concentración se detallan en la Tabla 1. Las concentraciones iniciales de azúcar utilizadas dependen de su solubilidad. Otros autores utilizaron concentraciones en el rango de 100-200 mM<sup>128,53,59</sup>

- las glicoproteínas testeadas fueron fetuína, mucina originaria de glándula submaxilar bovina (BSM) y mucina originaria de mucus estomacal porcino (PSM) provenientes de Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Se disolvieron hasta lograr una concentración de 1 mg/ml. Otros autores han utilizado concentraciones de mucinas en el rango de 0.5-5 mg/ml<sup>222,53</sup>

- luego de realizar las diluciones de los azúcares o mucinas, se colocaron en cada fosa 25  $\mu$ l de la suspensión de bacterias.

- finalmente se agregaron 25  $\mu$ l de una suspensión al 2% de glóbulos rojos humanos en cada una de las fosas de la fila. Se homogeneizó y se dejó sobre una superficie horizontal a T amb. Al cabo de 1 h se realizó la lectura.

**Tabla 1.** Azúcares utilizados en el ensayo de inhibición de hemaglutinación. Se indican las concentraciones utilizadas, las mismas fueron establecidas de acuerdo a la solubilidad de los azúcares y corresponden a las concentraciones finales.

<b>Azúcar</b>	<b>concentración mM</b>	<b>Azúcar</b>	<b>concentración mM</b>
<i>l(-) fucosa</i>	773	<i>d(-) amigdalina</i>	400
<i>d(+)</i> fucosa	786	<i>d(+)</i> rafinosa	223
<i>d(+)</i> xilosa	800	<i>d(+)</i> celobiosa	153
<i>l(-)</i> xilosa	790	<i>NAcGalactosamina</i>	300
<i>maltosa</i>	390	<i>l(-)</i> ramnosa	440
<i>d(+)</i> manosa	793	$\alpha$ -lactosa	233
<i>d(+)</i> galactosa	433	<i>l(+)</i> arabinosa	443
<i>d(-)</i> fructosa	770	<i>d(-)</i> arabinosa	845
<i>arbutina</i>	371	<i>NAcGlucosamina</i>	416
<i>d-manitol</i>	656	<i>sacarosa</i>	984
<i>l(-)</i> sorbosa	988	<i>d(+)</i> glucosa	893
<i>mio-inositol</i>	593	ác. glucónico	827
<i>esculina</i>	143	<i>d-sorbitol</i>	723

**Controles:** se preparó un control positivo de HA reemplazando la solución de azúcar con solución fisiológica y un control negativo en el que no se colocó la suspensión de bacterias. Para verificar que la alta concentración de azúcar no modifique la morfología del eritrocito, se preparó un control con la máxima concentración de azúcar al que no se le agregó suspensión de bacterias. Como control adicional, se realizó una observación al

microscopio óptico (Zeiss, Alemania) de una muestra tomada del control positivo y del control negativo, así también como una muestra de la fosa que contiene la máxima concentración de azúcar sin bacterias. Nuevamente, un resultado negativo se evidenció por la sedimentación de glóbulos rojos en el fondo de las fosas. Los resultados se expresaron como la inversa de la máxima dilución que produce inhibición.

#### **4) Adherencia a superficies o partículas inertes o modificadas**

**Adherencia a partículas de Sepharose cubiertas con mucinas.** Para este ensayo se digirieron previamente las mucinas de la siguiente manera: se prepararon suspensiones al 5% de cada una en buffer Tris-salino suplementado con  $\text{Ca}^{+2}$  (8 g/l NaCl, 25 mM Tris, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) y fueron digeridas con tripsina adicionada dos veces por día durante 5 días (2U/adición) a 37 °C. Las suspensiones fueron mezcladas frecuentemente cada día. Luego de inactivar térmicamente la enzima a 75°C por 20 min, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 3000 *g* y los sobrenadantes fueron químicamente conjugados a partículas de Sepharose-6B (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

Las partículas de Sepharose fueron conjugadas con d-manosa o las mucinas digeridas de acuerdo al método de la divinil sulfona (DVS)<sup>129</sup>. Brevemente, 50 ml de partículas Sepharose-6B fueron lavados exhaustivamente con 200 volúmenes de agua bidestilada y agitados suavemente con 50 ml de 0.5 M buffer carbonato (pH 11) y 5 ml de DVS por 70 min a T amb. Las partículas fueron luego exhaustivamente lavadas

con agua bidestilada y conjugadas durante toda la noche con cada una de las siguientes soluciones: 50 ml de d-manosa 20% o las mucinas digeridas en 0.5 M buffer carbonato pH 10.

Para determinar la adherencia de las bacterias a las partículas cubiertas con mucinas, se desarrolló el siguiente protocolo: 8 ml de bacterias lavadas ( $\text{DO}_{600} = 3$ ) se mezclaron con 2 ml de partículas cubiertas de mucinas durante 2 hs a temperatura ambiente en tubos cónicos de 10 ml (Corning, Corning Co., NY). Los tubos fueron agitados por inversión a intervalos regulares. Luego de la incubación, los tubos fueron ubicados en forma vertical hasta que sedimenten las partículas y los sobrenadantes fueron descartados. Los pellets fueron lavados dos veces con 10 ml de buffer PBS agitando por 15 min como se describió arriba para eliminar las bacterias no unidas que podrían estar atrapadas u ocluidas, y finalmente resuspendidos en 10 ml de buffer PBS. La cantidad de bacterias unidas fue cuantificada en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  a través del ensayo de F6FFC detallado en el Capítulo I. El porcentaje de adherencia se

## Capítulo II

relacionó a la cantidad total de bacterias agregadas y se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\%Adh = (DO_{500} \text{ bacterias unidas} / DO_{500} \text{ bacterias totales agregadas}) \times 100$$

donde *DO<sub>500</sub> bacterias unidas*, corresponde a la actividad enzimática de bacterias adheridas a las partículas conjugadas y *DO<sub>500</sub> total de bacterias agregadas*, corresponde a la actividad enzimática de las bacterias agregadas.

Cuatro diluciones de la suspensión original de bacterias fueron sometidas al ensayo de la F6FFC con el objeto de confirmar la linealidad en el rango de densidad bacteriana trabajado, ya que la ecuación anterior es válida solamente en la porción lineal de la curva. Los experimentos fueron realizados en duplicado con dos cultivos independientes. Los controles utilizados consistieron en bacterias lavadas incubadas con partículas sin conjugar o con partículas conjugadas con manosa.

**Adherencia al vidrio.** La capacidad de estas cepas de crecer adheridas a las paredes del tubo de ensayo en las que son incubadas fue evaluada por inspección ocular antes y después de una agitación manual suave. Aquellas bacterias que más fuertemente manifiesten esta propiedad resistirán la agitación y permanecerán adheridas a las paredes del tubo de vidrio. Los resultados semicuantitativos se expresaron como (+) para las adherentes al vidrio y (-) para las no adherentes al vidrio. Para este ensayo se utilizaron tubos de ensayo de vidrio convencionales.

**Adherencia a poliestireno.** La adherencia bacteriana a superficies es considerada como la primera etapa en la colonización. Las cepas que forman agregados pueden también crecer adheridas a las paredes del tubo o del erlenmeyer (observaciones preliminares). Por lo tanto, la cuantificación de la capacidad de adherirse al vidrio o al poliestireno puede ser empleada para caracterizar las cepas. La cuantificación de la adherencia a superficies sólidas puede ser realizada mediante diferentes metodologías: microscopía óptica, tinciones, radiomarcado, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), bioluminiscencia, actividad enzimática, etc<sup>63</sup>.

Para determinar la adherencia a poliestireno, las bacterias se crecieron y se cosecharon como se describió anteriormente y la densidad óptica se ajustó a 1.0 -2.0 a 600nm. Se agregaron 500 µl de la suspensión bacteriana a una placa para cultivo de células de 24 fosas (Corning, Corning Co., NY) y se incubaron por 1 h a 37 °C. Posteriormente las fosas se lavaron 3 veces con PBS a fin de eliminar bacterias no adheridas. La cuantificación se realizó mediante las técnicas de tinción con cristal violeta<sup>407</sup> y el ensayo de F6FFC.

Se estudió la capacidad adherente de diferentes cepas de *Bifidobacterium* resuspendidas en PBS. Se incluyó un blanco (fosa vacía) y un control negativo (fosa con PBS).

**1) Tinción con cristal violeta.** Luego del ensayo de adherencia se siguió el siguiente protocolo:

- Fijar las placas con bacterias adheridas en estufa a 60 °C por 20 min

## Capítulo II

- Colocar 1 ml de solución de cristal violeta (Merck, Darmstadt, Alemania) (0.5 g en 20 ml de etanol 96% y llevar a 100 ml con agua bidestilada) en cada fosa. Las placas selladas se incuban por 30 min sin agitar
- Lavar 5 veces o más con PBS para eliminar exceso de colorante
- Incubar 45 min con buffer desarrollador en placas selladas. El buffer desarrollador citrato se prepara de la siguiente manera: (A) 10.09 g de ácido cítrico en 350 ml de agua bidestilada,

agregar 150 ml de etanol 96%. (B) 8.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 350 ml de agua bidestilada, agregar 150 ml de etanol 96%. Al mezclar (A) con (B) 1:1, el pH resultante es 4.3.

- Colocar 250  $\mu\text{l}$  de cada fosa en placas de 96 fosas con fondo plano
- Leer a 550 nm

**2) Ensayo de F6FFC.** El protocolo de aplicación del ensayo enzimático se detalló en el Capítulo I.

### **5) Adherencia a superficies biológicas. Interacción bacteria-células intestinales**

**Adherencia a células de la línea Caco-2.** Sobre la base de que la microflora intestinal juega un rol preponderante en la homeostasis del intestino, la importancia de las interacciones entre las bacterias y las células intestinales radica no solo en brindar la posibilidad de retener microorganismos para contrarrestar los movimientos peristálticos sino también en el desencadenamiento de respuestas celulares<sup>34,379</sup>. Las células de la línea Caco-2 han sido ampliamente aceptadas como modelo *in vitro* para estudiar las interacciones entre las bacterias y los enterocitos<sup>21,22</sup>. Esta línea celular deriva de un adenocarcinoma de colon y muestra similitudes morfológicas y diferenciación funcional con las de los enterocitos. Las células Caco-2 en post-confluencia tardía (21 días en cultivo) muestran microvellosidades apicales y ribete en cepillo con actividad enzimática similar a la del epitelio intestinal<sup>331,440,186,265</sup>. Otras líneas celulares (por ejemplo, HT-29 y T84) pueden ser utilizadas también para estudiar este tipo de interacciones bacteria-enterocito<sup>94,20,67</sup>. Consecuentemente, los

protocolos experimentales deben ser adecuadamente adaptados a las líneas que se estudian.

En este caso se estudió la adherencia de bifidobacterias mediante un protocolo ya explicado en el Capítulo I que a continuación se transcribe:

- Sembrar las células Caco-2 (pasaje 23 o superior, alrededor de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) en placas para cultivo de 24 fosas. Si se va a realizar una observación microscópica las células se crecen sobre cubreobjetos de vidrio (Assistent, Alemania) colocados dentro de las fosas
- Incubar las placas durante 21 días a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>-95% aire) cambiándoles el medio cada 2 días.
- Lavar las monocapas con solución GKN (Glucosa-K-Na) o medio de cultivo de células sin suero fetal bovino a temperatura ambiente

## Capítulo II

- Agregar 0.5 ml de suspensión bacteriana (0.5 - 1.0 unidades de absorbancia a 600 nm) a las monocapas conteniendo 1 ml de GKN. Homogeneizar
- Incubar a 37 °C por 1 h sin agitación
- Lavar 3 veces con solución GKN para remover bacterias no adheridas
- Cuantificar o caracterizar la adherencia mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido o el ensayo de F6FFC.

Los cubreobjetos de vidrio son preparados de la siguiente manera: se hierven en una solución al 5% v/v de un detergente no-iónico (Extran MA02 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) por 5 min y luego se enjuagan exhaustivamente con agua de la canilla. Se lavan 5 veces con etanol 96% y 5 veces con agua bidestilada (Barntead Thermolyne, Dubuque, IO). Finalmente se esterilizan en autoclave por 15 min y se secan a 60 °C.

La menor densidad bacteriana que se puede utilizar para los ensayos de adherencia depende del método de detección elegido. Los ensayos de adherencia se revelaron con diferentes técnicas que fueron optimizadas como parte de este trabajo de Tesis :

- **Microscopía óptica**
- **Microscopía electrónica de barrido**
- **F6FFC**

**1) Microscopía óptica.** Las observaciones por microscopía óptica se realizaron en un microscopio Zeiss (Alemania). Se aplicaron diferentes protocolos de coloración a fin de determinar la

coloración que permita una clara observación de la monocapa con las bacterias adheridas.

### *Tinción de Gram*

- fijar el preparado con metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) por 5 min
- lavar con agua bidestilada
- colocar durante 3 min 0.5 ml de cristal violeta (Merck, Darmstadt, Alemania) (solución etanólica al 10%, previamente filtrado con papel de filtro Whatman #1) en cada fosa
- lavar con agua bidestilada
- colocar durante 30 seg gotas de solución de Lugol (I<sub>2</sub>, 2 g; KI, 20 g; agua bidestilada 1 litro) (Anedra, San Fernando, Argentina)
- lavar con agua bidestilada
- decolorar con etanol-acetona 70-30% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- contracolorar con solución de safranina (Merck, Darmstadt, Alemania) (solución etanólica 10%) diluída 1/10 en agua bidestilada
- lavar con agua bidestilada. Observar en microscopio de inmersión con 1000 aumentos

### *Tinción de Gram modificada*

- la modificación consistió en decolorar con etanol 70% en lugar de con la mezcla etanol-acetona 70-30% luego del agregado del mordiente y antes de contracolorar con safranina

### *Tinción de Giemsa*

- se puede realizar con la monocapa fijada con metanol por 5 min o sin fijar
- colocar 0.5 ml de solución de Giemsa (Biopur, Buenos Aires, Argentina) (dilución 1/10 de reactivo original) en cada fosa durante 5 min a T amb

## Capítulo II

- lavar con buffer fosfato 10 mM y dejar secar. Observar en microscopio de inmersión con 1000 aumentos

### *Tinción de May-Grünwald/Giemsa*<sup>84</sup>

- colocar 0.5 ml de solución May-Grünwald (Biopur, Buenos Aires, Argentina) en cada fosa durante 3 min
- agregar buffer fosfato 10 mM en la misma proporción a la del colorante
- homogeneizar suavemente y dejar 5 min
- lavar con buffer fosfato 10 mM
- agregar solución de Giemsa (dilución 1/10 de reactivo original) y dejar 20 min
- lavar con buffer fosfato y dejar secar. Observar en microscopio de inmersión con 1000 aumentos (Zeiss, Alemania)

### **2) Microscopía electrónica de barrido (MEB).**

Los ensayos de adherencia fueron evaluados por MEB. Previamente, se optimizaron las etapas de fijación y deshidratación en las bacterias y las células eucarióticas por separado en experimentos individuales como se describe a continuación.

Los microorganismos fueron crecidos como de rutina, recuperados por centrifugación y lavados una vez con PBS. Muestras de 0.5 y 1 ml de suspensiones bacterianas resuspendidas en PBS fueron tratadas con 1.5% ó 2.5% glutaraldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) o 1.5% o 2.5% formaldehído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones se prepararon en el mismo día y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización. Luego de enjuagar las bacterias con PBS, los microorganismos fueron deshidratados gradualmente

con soluciones de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania) desde 10% al 100%, 10 min con cada uno. Las muestras fueron ubicadas en isoamilacetato durante 10 min y secadas por punto crítico en CO<sub>2</sub> líquido (Baltec CP-30). Las muestras secas fueron colocadas en tacos metálicos y cubiertas con Au 24 durante 10 min por evaporación en vacío (Fine Coat, Sputer JFC-1100). Un microscopio JSM-T 100 (Jeol Ltd., Japón) se utilizó para la observación operado a 15 ó 25 kV.

Las células Caco-2 fueron crecidas a postconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio (Assistant, Alemania) ubicadas en placas de 24 fosas (Corning Glass Works, Corning, NY). Las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con glutaraldehído 2.5% o formaldehído 1.5% durante 1 h a T amb. Los vidrios con las monocapas fueron sumergidos en las soluciones de manera secuencial transportándolos con pinzas. Los siguientes pasos fueron similares a los detallados para las bacterias.

Los ensayos de adherencia fueron desarrollados como se describió anteriormente y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta sección, luego de 1 h de incubación, la monocapas con bacterias fueron lavadas 5 veces y fijadas con glutaraldehído 2% en PBS para su preparación para el MEB.

Además de la optimización de la fijación sin utilizar OsO<sub>4</sub>, una de las innovaciones de esta metodología fue la forma de lavar las bacterias. Cuando se trató de suspensiones bacterianas, estas fueron retenidas en un papel de filtro de teflon resistente a los solventes orgánicos (Millipore Co., Bedford, MA) y los lavados se realizaron haciendo pasar las soluciones con ayuda

## Capítulo II

de una jeringa a través del filtro contenido en un portafiltro. De la misma manera se hicieron pasar las soluciones de deshidratación de alcohol. Por razones obvias, no se pudo utilizar esta metodología con las monocapas de Caco-2.

### **6) Caracterización química de la superficie bacteriana**

La composición química de la superficie bacteriana puede ser inferida estudiando el efecto de diferentes tratamientos sobre las bacterias que posteriormente se utilizan a cualquiera de los ensayos que anteriormente se describieron. Los tratamientos con agentes caotrópicos permiten evidenciar moléculas unidas no-covalentemente a la superficie. La presencia de factores proteicos puede ser demostrada luego de un tratamiento de las bacterias con proteasas. El metaperiodato es útil en la confirmación de la participación de hidratos de carbono en dichas propiedades.

Luego de crecer y cosechar las bacterias como se describió en el Apéndice I se ajustó la  $DO_{600}$  entre 0.5 - 1 y se aplicaron independientemente los siguientes tratamientos.

#### *Tratamiento con agentes caotrópicos*

- Centrifugar 1 ml de la suspensión bacteriana a 14000 g por 2 min
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de cloruro de guanidinio (GnCl) 3M o LiCl 5M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).
- Incubar 1 hora a 37 °C en un agitador.

**3) Ensayo enzimático. Medida de actividad de F6FFC.** La cuantificación se realizó como se describió en el Capítulo I.

- Lavar 2 veces con PBS y resuspender en 1 ml del mismo buffer.
- Realizar ensayos de hemaglutinación, adherencia a poliestireno, adherencia a Caco-2, etc.

El GnCl se preparó disolviendo la droga sólida en agua destilada tibia (40°C) y finalmente se filtró con kitasato con una membrana de 0.45  $\mu$ m (Millipore Co., Bedford, MA). La cantidad retenida en el filtro sólo modificó el título de la solución en un 0.3%. El LiCl no presenta problemas de solubilidad.

#### *Tratamiento con etilendiaminotetraacetato (EDTA)*

- Centrifugar 1 ml de la suspensión bacteriana a 14000 g por 2 min.
- Descartar el sobrenadante y lavar las bacterias tres veces con EDTA 20 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS. Si se trata de células Caco-2, lavar la monocapa tres veces con la misma solución y luego con GKN para eliminar el EDTA.
- Lavar 2 veces con PBS y resuspender en 1 ml del mismo buffer
- Realizar con las bacterias tratadas los ensayos de hemaglutinación, adherencia a Caco-2, etc.

## Capítulo II

### *Tratamiento con metaperiodato*

- Centrifugar 1 ml de la suspensión bacteriana a 14000 *g* por 2 min.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de metaperiodato de sodio 50 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS.
- Incubar por 30 min a T amb.
- Lavar 2 veces con PBS y resuspender en 1 ml del mismo buffer.
- Realizar con las bacterias tratadas los ensayos de hemaglutinación, adherencia a Caco-2, etc.

### *Tratamiento con enzimas proteolíticas*

- Preparar las soluciones de enzimas (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) en una concentración final de 2.5 mg/ml en los

siguientes buffers: tripsina [EC 3.4.4.4] y quimotripsina [EC 3.4.4.5] en Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8; pepsina [E.C. 3.4.4.1] en glicina-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 2.2<sup>24</sup>

- Centrifugar 1 ml de la suspensión bacteriana a 14000 *g* por 2 min.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de las soluciones enzimáticas correspondientes
- Incubar 1 hora a 37 °C
- Inactivar la tripsina y la quimotripsina con 100  $\mu$ l de suero fetal bovino
- Lavar 2 veces con PBS y resuspender en 1 ml del mismo buffer
- Realizar con las bacterias tratadas los ensayos de hemaglutinación, adherencia a Caco-2, etc.

## **7) Estudio de proteínas superficiales**

La composición proteica de la superficie de las bacterias fue estudiada por medio de diferentes técnicas. Por un lado se optimizó un protocolo de extracción de proteínas con LiCl o GnCl (cloruro de guanidinio) aplicado a cepas de lactobacilos y posteriormente se aplicó a bifidobacterias. Por otro lado, se extrajeron mecánicamente las paredes bacterianas de bifidobacterias analizando su composición proteica.

### • **Extracción de proteínas superficiales**

Se trabajó con las cepas *Lb. kefir* CIDCA 8328, *Lb. parakefir* CIDCA 8322 y *Lb. brevis* CIDCA 8323, aislados de gránulos de kefir y con las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 537 y CIDCA 5310. Los lactobacilos fueron crecidos en MRS en condiciones

anaeróbicas a 30 °C durante 48 hs. Las bifidobacterias se crecieron en TPY o MRS en anaerobiosis a 37 °C durante 48 hs. Todas las cepas se cosecharon por centrifugación a 10000 *g* por 10 min y se lavaron 2 veces con buffer fosfato (PBS). Posteriormente se ajustó la DO<sub>600</sub> a 1-1.5. Las proteínas superficiales se extrajeron con LiCl 5M en una relación 4 ml de solución cada 1 ml de suspensión bacteriana. La extracción se realizó por agitación continua a 200 rpm (Environ Shaker, Lab-line Instruments Inc., Melrose Park, IL) a 37 °C por 1 hora. Al finalizar la extracción, se centrifugaron las células a 10000 *g* por 10 min a 4 °C (Sorval RC-5B, DuPont, Wilmington, DE), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer hasta una DO<sub>600</sub> de 1-1.5. El sobrenadante conteniendo las proteínas extraídas,

## Capítulo II

se dializó a 4 °C contra agua bidestilada utilizando una membrana de 1000 Da de tamaño de poro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 48 hs. Luego se liofilizó y se guardó a -80 °C.

### • **Obtención de proteínas totales solubles**

Las bacterias tratadas con los agentes caotrópicos y las no tratadas se procesaron de la siguiente manera para obtener las proteínas totales solubles: 100 µl de las suspensiones se trataron con 10 mg/ml lisozima (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 3 hs a 37 °C. Luego de agregar 10 µl de SDS 20%, se calentó a 100 °C durante 10 min y se centrifugó a 10000 *g* por 10 min. Los pellets se diluyeron en buffer de muestra y analizaron electroforéticamente.

### • **Obtención de paredes celulares**

Las paredes celulares de las bifidobacterias fueron obtenidas por centrifugación a partir de bacterias lisadas mecánicamente de la siguiente manera: el pellet obtenido de cultivos de 800 ml,

se lavó y se concentró en 20 ml de buffer PBS o hasta llegar a una DO<sub>600</sub> superior a 30 (medida a través de diluciones apropiadas en PBS). Posteriormente, se colocó la muestra en la Prensa X S-17523 (AB Biox, Järfälla, Suecia) y se sumergió en un baño refrigerante a -30 °C durante 1 h. La muestra se prensó dos veces a una presión de 100 kN cada vez, congelando durante 30 min entre cada prensada. La muestra se descongeló y se determinó nuevamente la DO<sub>600</sub>. El rendimiento de ruptura se calculó como la relación de DO<sub>600</sub> antes y después del proceso.

La muestra prensada se centrifugó a 10000 *g* durante 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont Co., Wilmington, DE) para eliminar células no rotas. Se descartó el pellet, y el sobrenadante se procesó por ultracentrifugación (TL Optima, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA) a 30000 *g* por 15 min a 4°C. Las condiciones de centrifugación de cada una de las etapas fueron elegidas de acuerdo a los resultados obtenidos por Lortal y col.<sup>254</sup> y Zubay<sup>470</sup> (Tabla 2)

**Tabla 2.** Condiciones de separación de componentes celulares por centrifugación<sup>470</sup>

	<b>veces <i>g</i></b>	<b>tiempo (min)</b>
<i>células eucarióticas</i>	1 000	5
<i>membranas, núcleos</i>	4 000	10
<i>células bacterianas</i>	15 000	20
<i>membranas y paredes bacterianas</i>	30 000	30
<i>ribosomas</i>	100 000	180

Las células bacterianas no rotas sedimentan en la primera etapa del protocolo. En la etapa de

concentración de paredes, las condiciones son tales que no se logra contaminación con

ribosomas. El pellet obtenido que consistió en restos de membranas y paredes celulares se lavó al menos 10 veces con buffer PBS para eliminar proteínas que no pertenecen a estas estructuras. La eficiencia del lavado se monitoreó realizando medidas espectrofotométricas a 280 nm en las aguas de lavado. Las paredes lavadas se resuspendieron en 1 ml de PBS y se conservaron a -80°C.

### • **Análisis electroforético de proteínas**

Para estudiar el perfil de proteínas totales solubles de bacterias tratadas y sin tratar y de las paredes obtenidas mecánicamente, se realizaron corridas electroforéticas desnaturalizantes/disociantes en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se prepararon geles continuos al 15% p/v en el gel separador y 5.3% en el gel apliador según el método de Laemmli<sup>237</sup> utilizando una celda Mini Protean II de 0.75 mm de espesor (BioRad Laboratories, Richmond, CA). La composición de las soluciones empleadas se detallan en el Apéndice I. Las muestras se diluyeron con buffer de muestra y se calentaron a baño María durante 5 min. Antes de sembrar, se centrifugan 2 a 3 min a 14000 *g* con el objeto de eliminar impurezas insolubles. Se sembraron entre 10 y 20 µg de proteína por calle de cada muestra. Luego de realizadas las corridas, los geles de colorearon y decoloraron con las soluciones descritas y se analizó la posición de las bandas.

### • **Cuantificación de proteínas**

Para determinar el contenido de proteínas de las muestras se utilizó una técnica de Bradford<sup>42</sup>. En esta técnica, la unión del colorante a las

proteínas causa un desplazamiento del máximo de absorción del colorante de 465 nm (especie roja) a 595 nm (especie azul). La cuantificación de proteínas es posible debido a que el coeficiente de extinción del complejo colorante/proteína es constante en un amplio rango de concentraciones.

El colorante se preparó como una solución stock a partir de la cual se realizaron los ensayos. El reactivo contiene 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) disueltos en 50 ml de etanol 95%. Esta solución se mezcló con 100 ml de ácido fosfórico 85% p/v, se diluyó en agua bidestilada hasta 1 litro y se filtró.

Se realizó una curva de calibración utilizando cinco diluciones de una solución stock de seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) de 1 mg/ml aproximadamente, para cubrir el rango lineal de 50 µg/ml a 500 µg/ml. La concentración exacta de seroalbúmina se determinó mediante la medida de  $DO_{280}$  de una dilución apropiada de la solución stock y se calculó a través de la siguiente expresión:

$$\text{mg/ml albúmina patrón} = DO_{280}/0.63$$

donde 0.63 es el coeficiente de extinción molar de la albúmina.

Muestras de 0.01 ml de las soluciones estándar y de las muestras a ensayar se pipetearon en diferentes fosas de una placa de microtitulación de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Luego se agregaron 0.2 ml del reactivo a cada fosa y se mezcló cuidadosamente. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min como mínimo, y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas

## Capítulo II

(Spectra Rainbow, Tecan, Viena). Como la absorbancia tiende a aumentar en el tiempo, las muestras se deben leer antes de 1 h de transcurrida la reacción. Tanto la curva de calibración como las medidas de las muestras se realizaron por duplicado.

### ***Observación de la superficie bacteriana por microscopía electrónica de transmisión (MET).***

En esta etapa se aplicó la técnica de microscopía de transmisión con el objeto de identificar apéndices externos en las cepas de *Bifidobacterium*. Se tomaron como ejemplo las cepas 537, 5310 y 5313 crecidas en medio líquido y en medio sólido. La técnica utilizada de tinción negativa consiste en el siguiente protocolo:

- 10 ml de cultivo en fase estacionaria se centrifugaron 2 min a 14000 *g*, se lavaron con buffer PBS y se resuspendieron en 1 ml de buffer. Para cultivos en medio sólido, se tomó una ansada de una colonia y se resuspendió en 0.1 ml de buffer

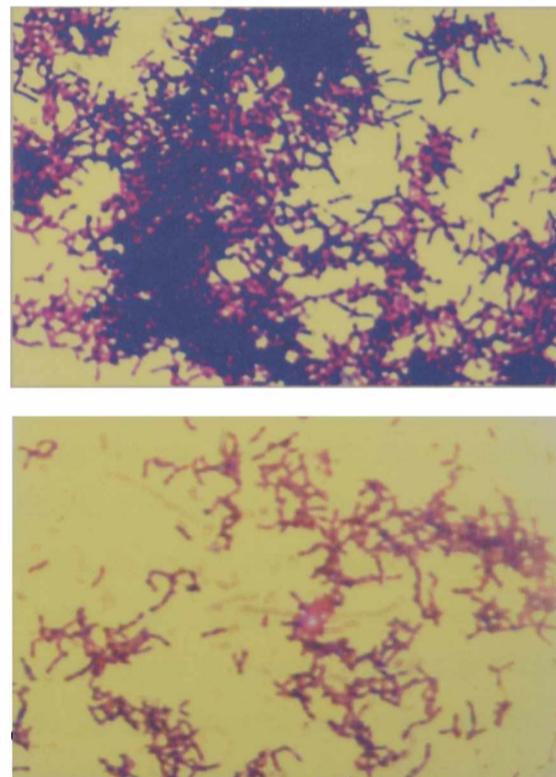
- una gota de la suspensión se colocó en el soporte para la observación que consiste en una grilla de cobre recubierta con una membrana plástica vaporizada con carbón
- se dejó secar 30 seg y se colocó una gota de ácido fosfotúngstico 1.5% en buffer PBS y se dejó secar otros 30 seg
- se realizó la observación en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-1200 EX II (JEOL Ltd., Japón)

### ***Análisis estadístico***

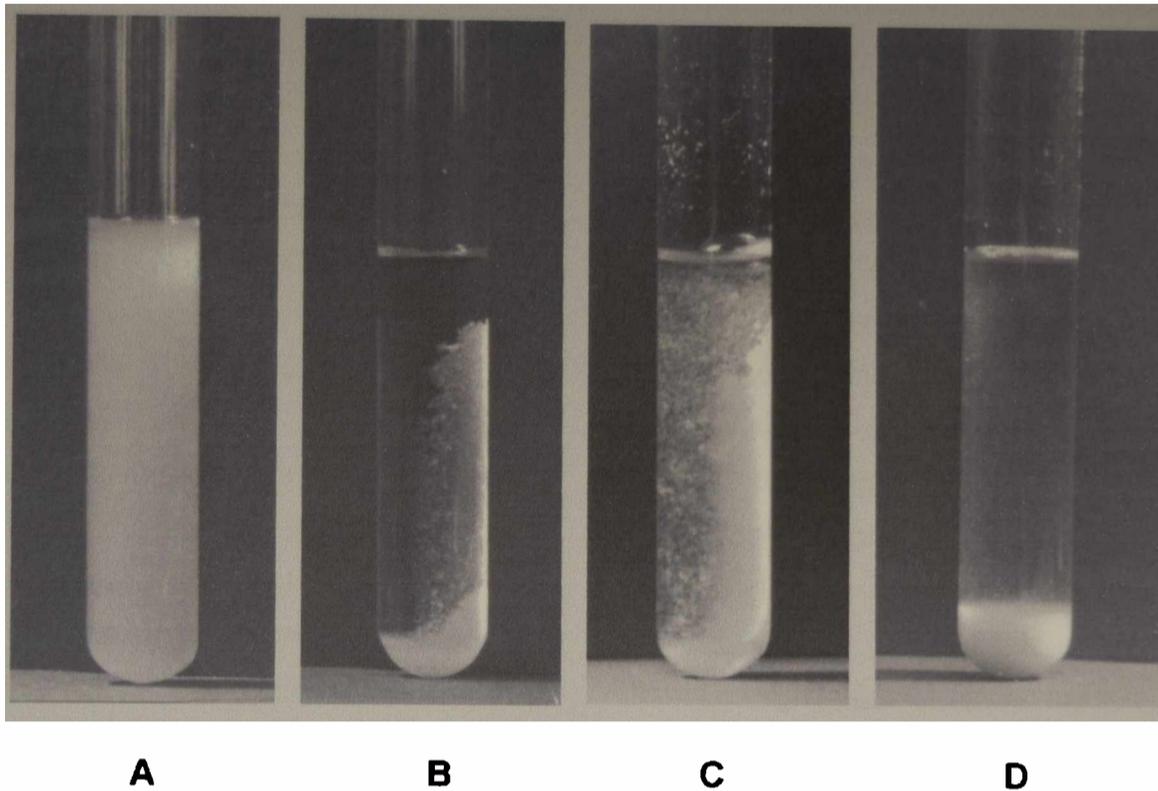
La linealidad de las curvas utilizadas para determinar el coeficiente de remoción (K) fue establecida mediante un análisis de regresión lineal. La adherencia de bifidobacterias a poliestireno, mucinas y células eucarióticas fue evaluada mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un software de análisis estadístico (Systat 5.0, Systat, Inc. Evanston, IL) para  $\alpha = 0.05$ .

### **Resultados y discusión**

Las cepas de *Bifidobacterium* crecidas en medio líquido fueron clasificadas en dos grupos sobre la base del aspecto visual de las suspensiones como se muestra en la Figura 3. Un grupo denominado autoagregantes o autoaglutinantes sedimentaron dejando el seno de la solución límpido. Otro grupo denominado no-autoagregante o no-autoaglutinante produjeron una turbidez en todo el tubo de cultivo estable por largos períodos de tiempo (por lo menos 24 hs). Estos comportamientos macroscópicos se pueden explicar mediante la formación de grandes agregados bacterianos en el caso de las cepas correspondientes al primer grupo (Figura 3B) y la ausencia de agregados en el caso de las cepas correspondientes al segundo grupo (Figura 3A) que se reflejan también a nivel microscópico (Figura 2).



**Figura 2.** Aspecto microscópico de una cepa no autoagregante (abajo: *Bif. breve* CIDCA 532) y una autoagregante (arriba: *Bif. bifidum* CIDCA 5310). Tinción de Gram. Aumento 1200 x



**Figura 2.** Aspecto macroscópico de bifidobacterias autoagregantes y no-autoagregantes. (A) Las cepas no-autoagregantes (*Bif. breve* CIDCA 532) permanecen en suspensión luego de más de 24 hs. (B) Las cepas autoagregantes (*Bif. bifidum* CIDCA 5310) forman grumos visibles al ojo desnudo. (C) El mismo cultivo luego de agitarlo. (D) Estas cepas dejan el seno de la suspensión límpida una vez sedimentados los flóculos.

En consecuencia, las bifidobacterias se pueden clasificar inicialmente en dos grupos auto-agregantes y no-autoagregantes. Sin embargo, esta propiedad fue más evidente cuando las cepas se crecieron en caldo TPY que en caldo MRS; es decir, los grumos producidos en medio TPY fueron de mayor tamaño y más compactos, mientras que los producidos en MRS fueron más inestables y de tamaño heterogéneo. Sin embargo, el volumen de biomasa aparentó ser mayor en medio MRS que en TPY. En consecuencia se decidió estudiar en mayor

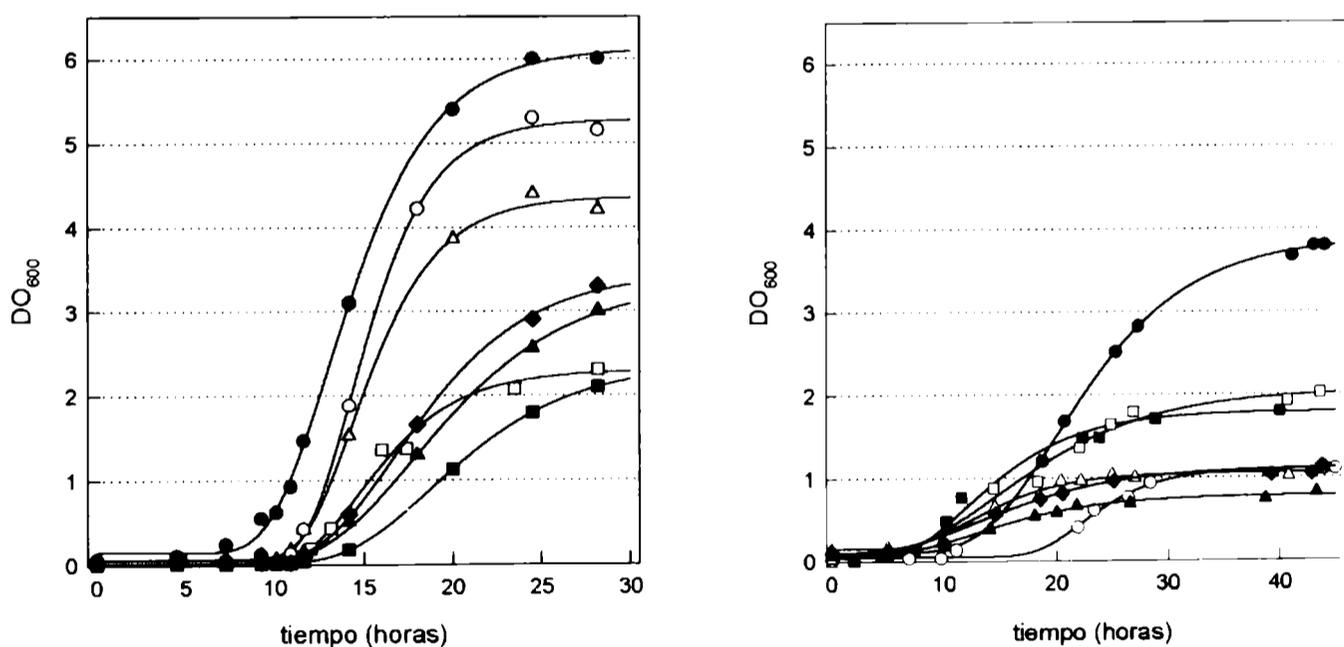
profundidad el comportamiento comparado en estos dos medios. Se comenzó realizando un estudio de la cinética de crecimiento en ambos medios (a fin de establecer alguna diferencia cuantificable a nivel de crecimiento y establecer las condiciones de cultivo para ensayos posteriores) y más tarde se evaluaron las propiedades superficiales como la hidrofobicidad superficial, el índice de agregación, etc. en ambos medios. Las cepas no-autoagregantes mostraron el mismo aspecto en ambos medios

**Cinética de crecimiento en medio líquido.**

Las curvas de crecimiento en medio líquido de las cepas de *Bifidobacterium* mostraron el comportamiento típico del crecimiento bacteriano (Figura 4). La ecuación de Gompertz modificada resultó adecuada para el ajuste de las curvas de crecimiento de las cepas en ambos medios.

El desarrollo en medio MRS fue significativamente diferente que en TPY, particularmente a nivel de la velocidad específica de crecimiento y la cosecha máxima (Tabla 3). Todas las cepas mostraron una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mayor en MRS que en TPY. Otros autores han encontrado valores de  $\mu$  similares a los obtenidos en nuestros trabajos. *Bif. longum* ATCC 15707 creciendo en medio PY conteniendo 5% de lactosa mostró una velocidad específica de crecimiento de 0.33 1/h<sup>1</sup>.

En general, todas las cepas alcanzaron la fase estacionaria entre las 21.7 y 31.0 horas en MRS y entre las 35.0 y 46.7 horas en TPY. En base a esta información, para ensayos posteriores, las bacterias se cosecharon a las 24 hs cuando se crecieron en MRS y a las 40 cuando se crecieron en TPY. Es importante remarcar que en medio TPY se alcanzó una menor cosecha máxima ( $DO_{600}^{m\acute{a}x}$ ) en comparación con MRS y como ya se anticipó el aspecto del cultivo fue diferente a nivel de la formación de agregados. Los agregados fueron más definidos en TPY que en MRS sobre todo para las cepas 5310 y 5313. Las cepas 536 y 537 formaron agregados en ambos medios pero fueron menos definidos que en las cepas anteriores. Se considera que los agregados son definidos si persisten luego de una agitación suave y si el cultivo no presenta turbidez de fondo, es decir,



**Figura 4.** Comportamiento cinético de las bifidobacterias crecidas en caldo TPY (*derecha*) y caldo MRS (*izquierda*). Las curvas fueron ajustadas mediante el modelo de Gompertz modificado. Clave: (●) *Bif. pseudolongum* 531; (■) *Bif. breve* 532; (△) *Bif. bifidum* 536; (○) *Bif. bifidum* 537; (□) *Bif. infantis* 538; (▲) *Bif. bifidum* 5310; (◆) *Bif. bifidum* 5313.

**Tabla 3. (A)** Parámetros cinéticos de las bifidobacterias crecidas en MRS.

Cepa	Parámetros			
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Lag (h)	DO <sub>máx</sub>	t (DO <sub>máx</sub> )
531	0.17	13.0	5.97	25.1
532	0.20	18.7	2.37	28.8
536	0.22	14.3	4.29	23.3
537	0.24	14.2	5.22	21.7
538	0.16	14.6	2.37	23.5
5310	0.14	17.7	3.34	31.0
5313	0.23	16.7	3.44	29.0

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento en 1/h; Lag corresponde al tiempo lag; DO<sub>máx</sub> es la máxima DO alcanzada, medida a 600 nm y t (DO<sub>máx</sub>) es el tiempo al que se alcanza la DO<sub>máx</sub>.

**Tabla 3. (B)** Parámetros cinéticos de las bifidobacterias crecidas en TPY.

Cepa	Parámetros			
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Lag (h)	DO <sub>máx</sub>	t (DO <sub>máx</sub> )
531	0.067	19.9	3.80	46.7
536	0.021	12.3	1.08	35.0
537	0.052	22.1	1.10	40.1
538	0.027	14.6	2.02	47.2
5310	0.031	12.8	0.82	38.7
5313	0.021	12.9	1.04	42.2

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento en 1/h; Lag corresponde al tiempo de latencia; DO<sub>máx</sub> es la máxima DO alcanzada, medida a 600 nm y t (DO<sub>máx</sub>) es el tiempo al que se alcanza la DO<sub>máx</sub>.

que el medio quede límpido. Las cepas que no formaron agregados en TPY tampoco lo hicieron en MRS (531, 532 y 538).

La adherencia al vidrio fue una característica de las cepas 531, 536, 537, 5310 y 5313 y se presentó tanto en MRS como en TPY. Esta apreciación se realizó por inspección ocular del

biofilm adherido antes y después de una suave agitación y se discutirá oportunamente.

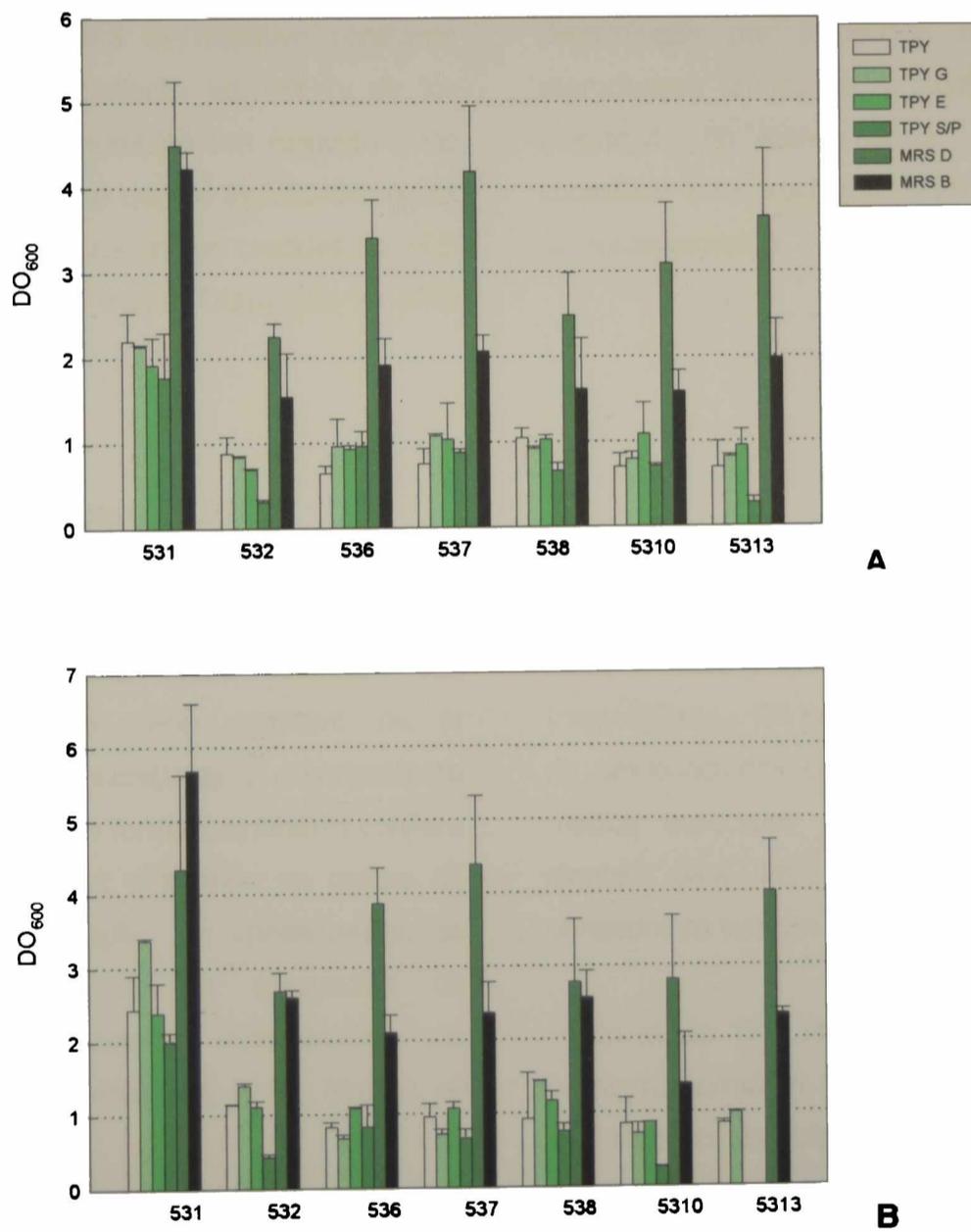
A fin de determinar el o los componentes que generan estas diferencias, se analizó la composición de los medios. Ambos medios poseen una composición similar, diferenciándose en cuanto al contenido de glucosa (5 g/l en TPY vs.

## Capítulo II

20 g/l en MRS) y a la presencia de peptona de soja en TPY reemplazada por el extracto de carne en MRS. En consecuencia, se evaluaron diferentes formulaciones con el fin de identificar el o los componentes que causan las diferencias anteriormente citadas. Los medios diseñados se describen en el Apéndice I. Brevemente, el medio

denominado TPY S/P no posee la peptona de soja de la formulación original del TPY. El medio TPY E posee extracto de carne y no posee peptona de soja. El medio TPY G posee glucosa a una concentración igual a la presente en el MRS (20 g/l).

**Figura 5.** Cosecha máxima de bifidobacterias en diferentes medios a las 24 hs (A) y a las 48 hs (B).



## Capítulo II

El crecimiento de las cepas se estudió entonces, en los medios TPY, TPY E, TPY G, TPY S/P y dos marcas comerciales de MRS (Difco y Biokar) evaluando en este caso solamente la cosecha máxima y el aspecto visual de los cultivos. Para ello se trabajó con dos o tres cultivos independientes para cada situación. La cosecha máxima se determinó por medida de  $DO_{600}$  a las 24 hs y a las 48 hs (Figura 5). A las 24 horas de crecimiento, se confirmó una vez más que el caldo MRS genera un rendimiento mayor que el TPY. Todas las modificaciones hechas en el caldo TPY no lograron aumentar el rendimiento. A las 48 hs, el rendimiento en MRS se mantuvo constante mientras que el rendimiento en TPY (y de los medios modificados) aumentó con respecto a las 24 horas pero nunca se mejoró significativamente con respecto al MRS. Las cepas crecidas en MRS Difco alcanzaron una mayor  $DO_{600}$  que en MRS

### ***Índice de autoagregación (IA)***

Por mucho tiempo, las publicaciones referidas a agregación microbiana han basado sus observaciones en el juicio subjetivo de la observación ocular. Sin embargo, la descripción de cualquier fenómeno en forma cuantitativa confiere un mayor significancia y permite un campo de comparación más amplio. En consecuencia, se estimó cuantitativamente la agregación de bifidobacterias mediante la determinación del *índice de autoagregación (IA)* y el *tiempo de autoagregación (TA)*.

En el primer caso, la hipótesis de trabajo fue considerar que a igual concentración de biomasa, una cepa que crece de manera desagregada dará

Biokar. Debido a esto último, para trabajos posteriores se trabajó con MRS Difco.

La adherencia al vidrio no varió con las formulaciones diseñadas: las cepas adherentes al vidrio en TPY y MRS lo fueron también en los medios especiales y las no adherentes al vidrio en TPY y MRS (532, 538) tampoco lo fueron en estos medios.

En principio, parecería no existir diferencia en el crecimiento de las bifidobacterias en estos medios. Sin embargo, la firmeza de los agregados en TPY determinada por inspección ocular, no logró reproducirse en los otros medios en la misma magnitud. En consecuencia, se procedió a cuantificar esta propiedad determinando el Índice de autoagregación.

mayor turbidez que una cepa que crece agregada. Estas últimas presentarán un mayor valor de  $[mg/ml]/DO_{600}$ . En esta etapa se determinó el IA de bifidobacterias crecidas en TPY, MRS y los medios especiales utilizando cultivos independientes para los replicados. Los resultados obtenidos se vuelcan en la Tabla 4.

En medio TPY, las cepas que bajo inspección ocular no formaron agregados (531, 532 y 538), mostraron bajos valores de IA si se los compara con aquellos obtenidos para las cepas autoagregantes. Las cepas que mostraron los valores más altos de IA fueron la 5310 y la 5313 y fueron significativamente diferentes a las cepas

531, 532 y 538 ( $P < 0.05$ ). La misma observación se puede aplicar para el medio TPY S/P (sin peptona de soja). En el medio TPY G (conteniendo glucosa 20g/l) las cepas no autoagregantes continuaron mostrando esta propiedad, mientras que las autoagregantes disminuyeron su IA. La cepa 5313 mostró una diferencia significativa con el resto de las cepas en este medio. En medio TPY E (conteniendo extracto de carne) las cepas marcadamente autoagregantes (5310 y 5313) se diferenciaron de las no-autoagregantes; no así las de menor autoagregación (536). Finalmente, en medio MRS los valores de IA se nivelaron para

todas las cepas no observándose diferencias significativas entre las autoagregantes y las no-autoagregantes. Esto es, en cierta medida, una confirmación de los resultados observados inicialmente al comparar la capacidad agregante en TPY y en MRS: las cepas crecidas en TPY muestran un carácter autoagregante más evidente que cuando son crecidas en MRS. Con respecto a los medios especiales, las combinaciones empleadas no permitieron elucidar la identidad de los componentes responsables de estas diferencias ya que en los tres casos se observó un fenómeno similar que en TPY.

**Tabla 4.** Índice de agregación de las bifidobacterias crecidas en diferentes medios. Cada medida se realizó por duplicado de dos o tres cultivos independientes.

Cepa	Medio				
	TPY	TPY G	TPY E	TPY S/P	MRS D
531	0.15 <sup>a1</sup>	0.17 <sup>a1</sup>	0.26 <sup>a1</sup>	0.13 <sup>a1</sup>	0.22 <sup>a1</sup>
532	0.26 <sup>a21</sup>	0.23 <sup>a2</sup>	0.25 <sup>a1</sup>	0.20 <sup>a1</sup>	0.27 <sup>a1</sup>
536	0.42 <sup>32b</sup>	0.27 <sup>a2</sup>	0.30 <sup>a21</sup>	0.34 <sup>a2</sup>	0.25 <sup>a1</sup>
537	0.33 <sup>a32</sup>	0.24 <sup>a2</sup>	nd	0.37 <sup>a432</sup>	0.29 <sup>a1</sup>
538	0.15 <sup>a1</sup>	0.16 <sup>a1</sup>	0.15 <sup>a1</sup>	0.17 <sup>a1</sup>	0.26 <sup>b1</sup>
5310	0.70 <sup>a4</sup>	0.25 <sup>b2</sup>	0.49 <sup>a32</sup>	0.59 <sup>a5</sup>	0.30 <sup>b1</sup>
5313	0.53 <sup>a43</sup>	0.59 <sup>a3</sup>	0.56 <sup>ba3</sup>	0.45 <sup>a543</sup>	0.38 <sup>b1</sup>

En las columnas se evalúa el efecto del medio de cultivo. Números iguales indican ausencia de diferencia significativa para  $P > 0.05$ . En las filas se evalúa el comportamiento de cada cepa. Letras iguales indican ausencia de diferencia significativa para  $P > 0.05$ . (nd: no determinado).

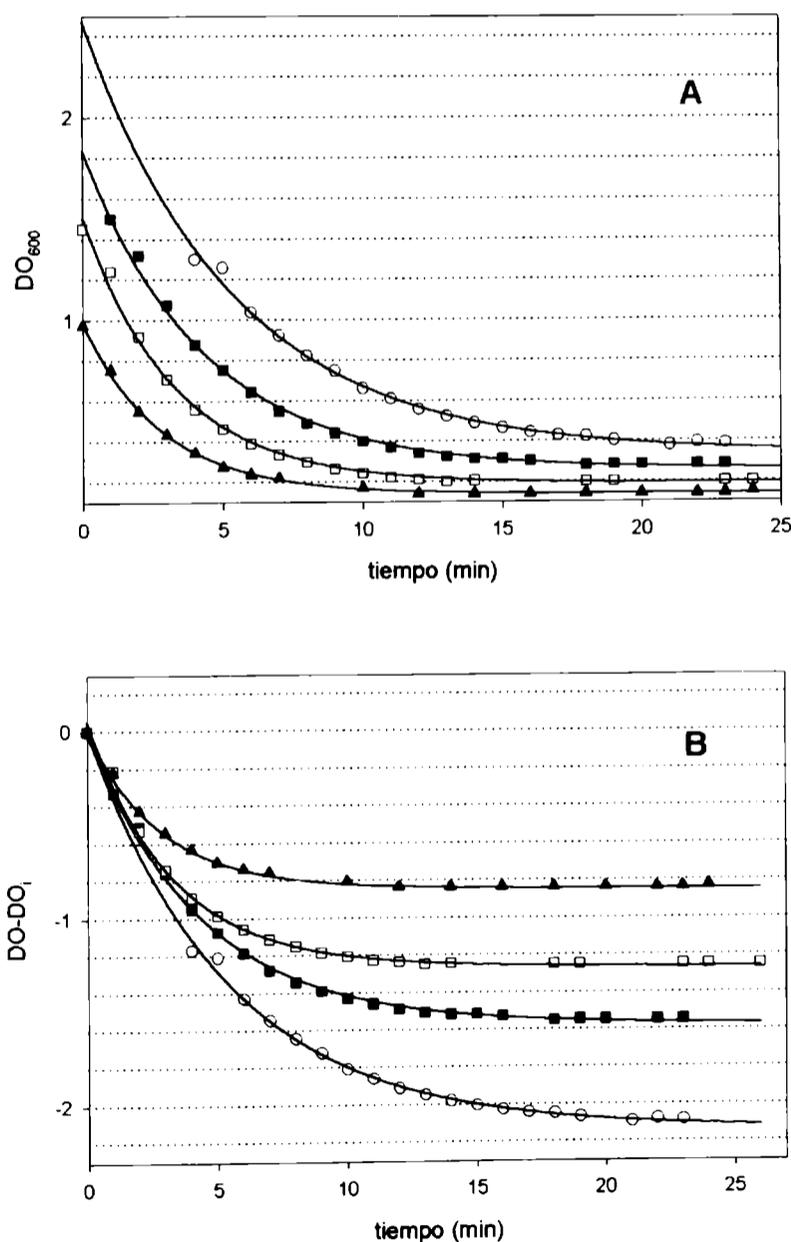
Evaluando las cepas individuales en cada medio, se observó que en general las no-autoagregantes mostraron esta propiedad en todos los medios utilizados, mientras que las autoagregantes manifiestan un IA menor en MRS con respecto a los demás medios. Esta diferencia se podría explicar según la siguiente hipótesis: si consideramos que el crecimiento en caldo MRS fue mucho mayor que en TPY (Figura 5), se podría suponer que si bien los cultivos de bacterias

autoagregantes inicialmente crecen agregados en medio MRS, se alcanzaría un tamaño crítico de los grumos a partir del cual, los microorganismos en exceso quedarían desagregados en suspensión y de esta manera originarían bajos IA. De la misma manera, es probable que como consecuencia de la alta densidad bacteriana del cultivo, los agregados resulten inestables y se desarmen generando la turbidez de fondo que genera altos valores de  $DO_{600}$ , con la consecuente disminución del IA.

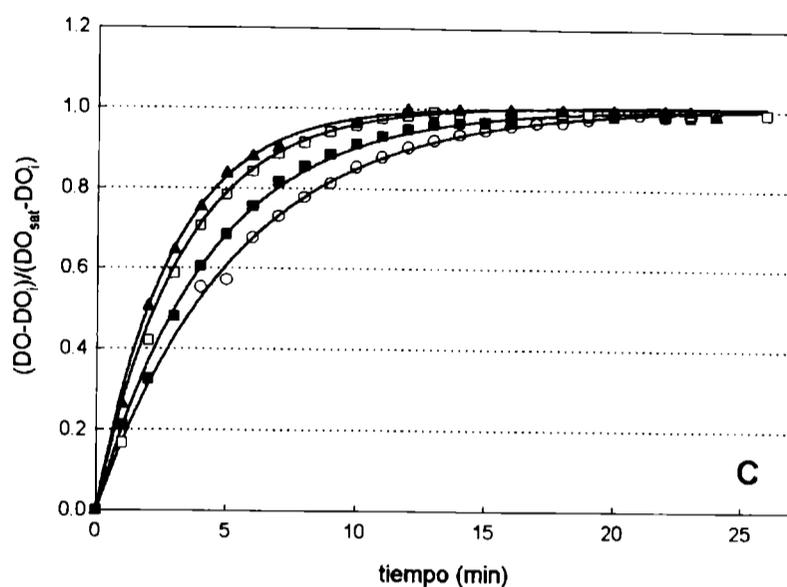
**Tiempo de autoagregación (TA)**

Si se monitorea turbidimétricamente la sedimentación por gravedad, se puede obtener la tasa de sedimentación. Esto será función de la masa promedio de los agregados individuales y permite obtener información acerca del tamaño de los agregados aunque no de su cantidad. A partir de estos cambios de la turbidez en función del tiempo se calcularon los cambios relativos en la sedimentación. El TA y el IA se encontrarían relacionados entre sí: valores altos de IA corresponderían a agregados de mayor tamaño y en consecuencia darían bajos valores de TA.

En la Figura 6 se muestran a modo de ejemplo las representaciones utilizadas para determinar el TA para la cepa 5310 crecida en TPY. Una vez determinados los perfiles de sedimentación de las cepas, que depende de la concentración bacteriana (Figura 6A), se normalizaron con respecto a la  $DO_i$  (Figura 6B) y finalmente se obtuvo la  $DO_{rel}$  (Figura 6C). Cuando las curvas de  $DO_{rel}$  se hacen insensibles a la dilución, se determinó el TA que corresponde al tiempo en el que la  $DO_{rel} = 0.5$ .



**Figura 6.** (A) Perfil de sedimentación para la cepa *Bif. bifidum* CIDCA 5310 evaluada en diferentes diluciones. (B)  $DO - DO_i$  con datos derivados del gráfico anterior. (○) dilución 1/2; (■) dilución 1/4; (□) dilución 1/8; (▲) dilución 1/16.



**Figura 6. continuación.**  
**(C)**  $DO_{rel}$  calculada con los datos derivados del gráfico anterior (B). Para aquellas diluciones coincidentes se calcula TA para  $DO_{rel} = 0.5$ .  
 (○) dilución 1/2; (■) dilución 1/4; (□) dilución 1/8; (▲) dilución 1/16.

En caldo TPY las cepas 531, 532 y 538 mostraron los mayores valores de TA (Tabla 5). Estas mismas cepas resultaron las de menor IA (Tabla 4). De la misma manera, las cepas que presentaron TA cortos (536, 537, 5310 y 5313) fueron las de mayores IA.

Comparando los resultados obtenidos para ambos medios, las cepas que en medio TPY presentaron largos TA, también lo hicieron en MRS. Las cepas con cortos TA en TPY mostraron cortos tiempos de agregación en MRS, pero en todos los casos los valores fueron superiores a aquellos de las cepas crecidas en TPY (Figura 7).

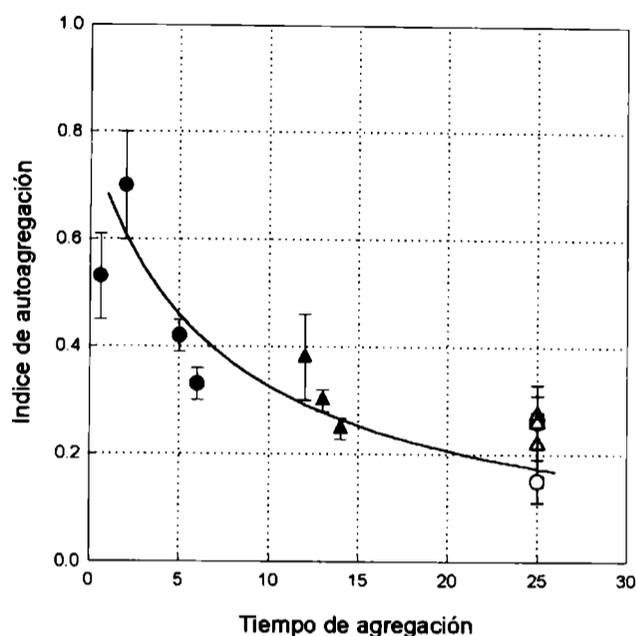
En particular, el parámetro TA permitió diferenciar el comportamiento de las cepas 536 (TA = 14), 5310 (TA = 13) y 5313 (TA = 12) crecidas en MRS, que no había sido posible mediante el índice IA. Todas estas cepas poseen valores de IA estadísticamente iguales en medio MRS.

**Tabla 5.** Tiempo de agregación (TA) para las bifidobacterias crecidas en diferentes medios. El TA se expresa en minutos.

Cepas	TPY	MRS
531	>25	>25
532	>25	>25
536	5	14
537	6	nd
538	>25	>25
5310	2	13
5313	0.6	12

nd= no determinado

Una vez más estos resultados confirman las observaciones realizadas con respecto al IA: es claro que el medio TPY intensifica el carácter autoagregante de las cepas. El interrogante que surge de estos resultados es si existen otras propiedades superficiales afectadas de la misma medida por el medio de cultivo.



**Figura 7.** Representación de la relación entre el Índice de autoagregación y el Tiempo de agregación para las bifidobacterias crecidas en MRS (triángulos) y TPY (círculos). Los símbolos negros representan cepas que macroscópicamente fueron clasificadas como autoagregantes y los símbolos blancos representan aquellas no-autoagregantes.

### **Hidrofobicidad superficial**

Durante la última década, ha habido un gran interés en la hidrofobicidad superficial bacteriana y su relación con la adhesión bacteriana. Datos recientes sobre hidrofobicidad superficial bacteriana han sido resumidos por Doyle y Rosemberg<sup>101</sup>. Se ha encontrado que estreptococos con antígenos de superficie proteicos solos o en combinación con polisacáridos son principalmente hidrofóbicos mientras que aquellos con antígenos polisacáridicos solamente son hidrofílicos<sup>454</sup>. Los mutantes sin cápsula de ácido neuramínico son más hidrofóbicos y se adhieren más fuertemente al epitelio bucal que las cepas ricas en ácido neuramínico que podría estar enmascarando las proteínas superficiales hidrofóbicas. Millsap y col.<sup>279</sup> mostraron que cepas de lactobacilos hidrofílicos con alta carga negativa superficial raramente se adhieren a biomateriales y

que sólo aquellas cepas con superficie hidrofóbica y menor carga negativa fueron adherentes. Se sabe que las esporas de *Bacillus cereus* se adhieren a muchos tipos de superficie<sup>199</sup> y comparadas con otras especies, estas son las más adherentes y las más hidrofóbicas, remarcando una vez más la relación entre hidrofobicidad y adherencia<sup>5,353</sup>. Otras especies altamente hidrofóbicas que muestran alta adherencia a células eucarióticas son *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Bordetella pertussis* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>236</sup>. Por lo tanto, como observación preliminar de la habilidad de un microorganismo para adherirse a un sustrato, es claro que la hidrofobicidad superficial puede ser de gran utilidad. En consecuencia, de la misma manera que se trabajó con los parámetros

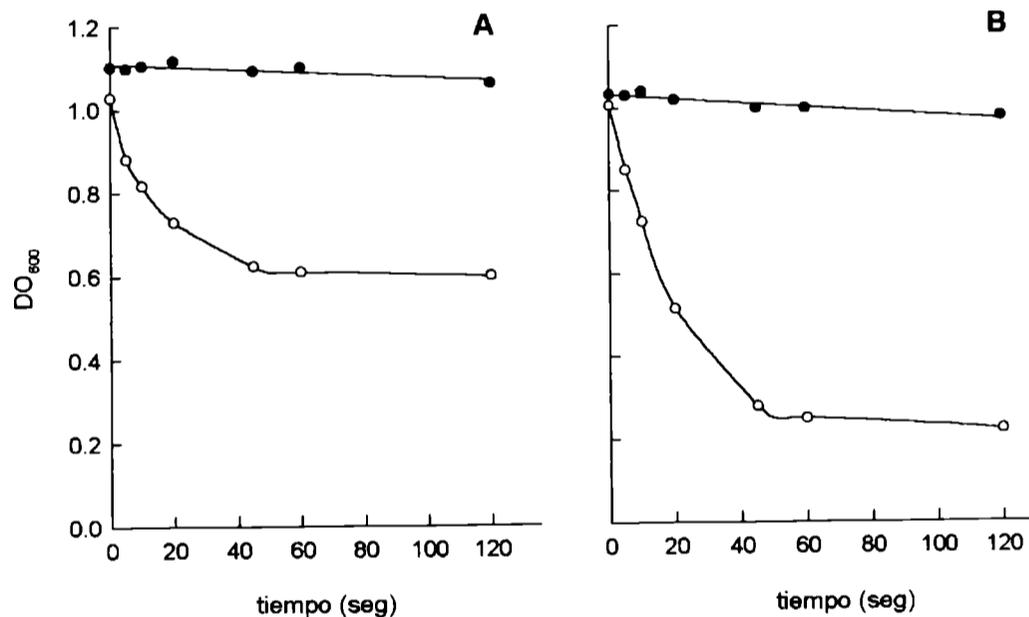
## Capítulo II

anteriores, se evaluó la hidrofobicidad superficial de las bifidobacterias.

Un estudio preliminar permitió agrupar las bifidobacterias en dos grupos, las hidrofóbicas y las no-hidrofóbicas. Las pertenecientes al primer grupo, se repartieron preferencialmente en el solvente hidrofóbico gradualmente en el tiempo

clarificando el buffer que las contenía, mientras que las no-hidrofóbicas permanecieron en el buffer durante el tiempo que se empleó para realizar la experiencia. La partición de las cepas hidrofóbicas en el hexadecano fue más efectiva cuando se utilizó mayor volumen del solvente. A modo de ejemplo se muestran algunos casos en la Figura 8.

**Figura 8.** Adhesión de *Bif. breve* CIDCA 532 (●) y *Bif. bifidum* CIDCA 537 (○) a hexadecano. Las curvas representan la adhesión de las bifidobacterias al hidrocarburo como función del tiempo de agitación para  $V_H/V_B = 0.067$  (A) y  $V_H/V_B = 0.125$  (B).



En esta figura se aprecia el carácter marcadamente no-hidrofóbico de la cepa 532 reflejado en la constancia del valor de turbidez de la fase acuosa. La cepa 537 reveló su carácter hidrofóbico al migrar a la fase orgánica con sólo 5 segundos de agitación. La variación de turbidez fue más evidente cuando la relación de volúmenes de fases empleadas fue mayor debido,

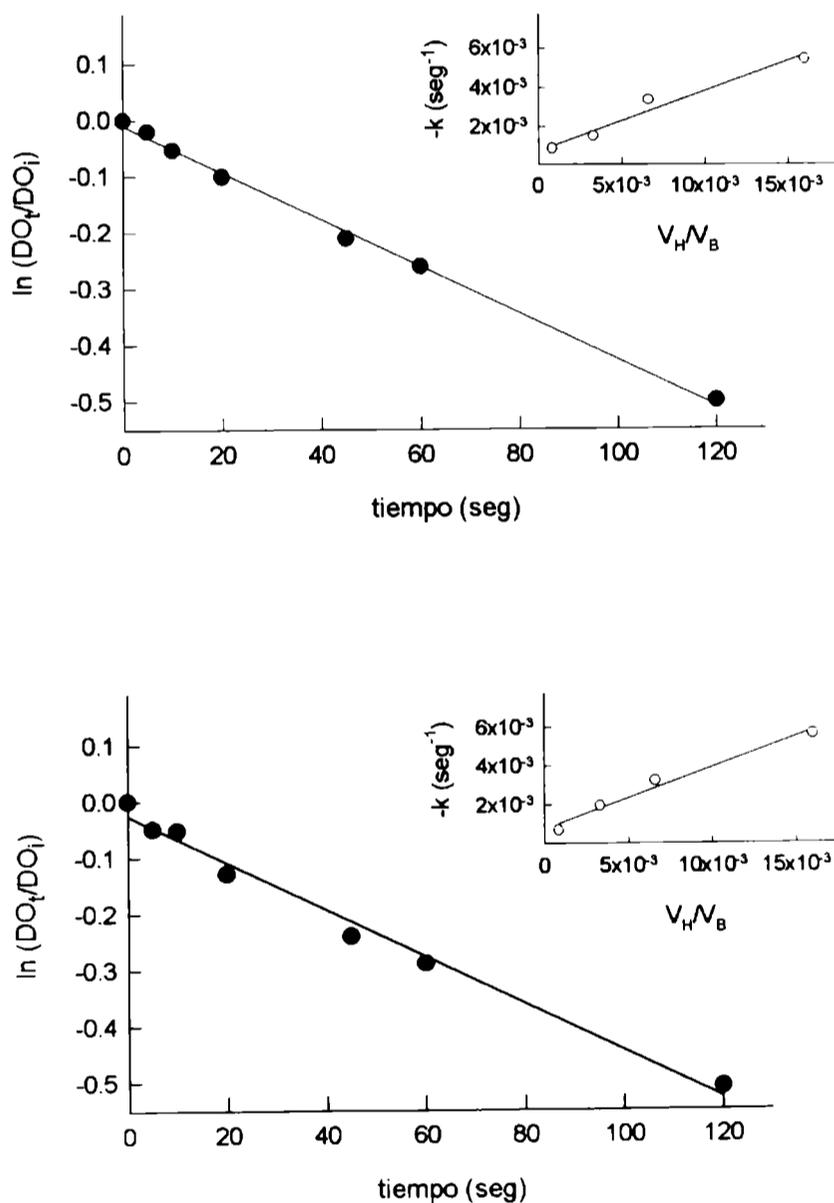
lógicamente, a que los microorganismos tuvieron mayor cantidad de fase orgánica para migrar. El valor mínimo de turbidez para  $V_H/V_B = 0.067$  fue aprox. 0.6 mientras que para  $V_H/V_B = 0.125$  llegó a 0.2 (donde  $V_H$  y  $V_B$  son los volúmenes de hidrocarburo y del buffer, respectivamente). Para ambas relaciones de volumen una agitación

Capítulo II

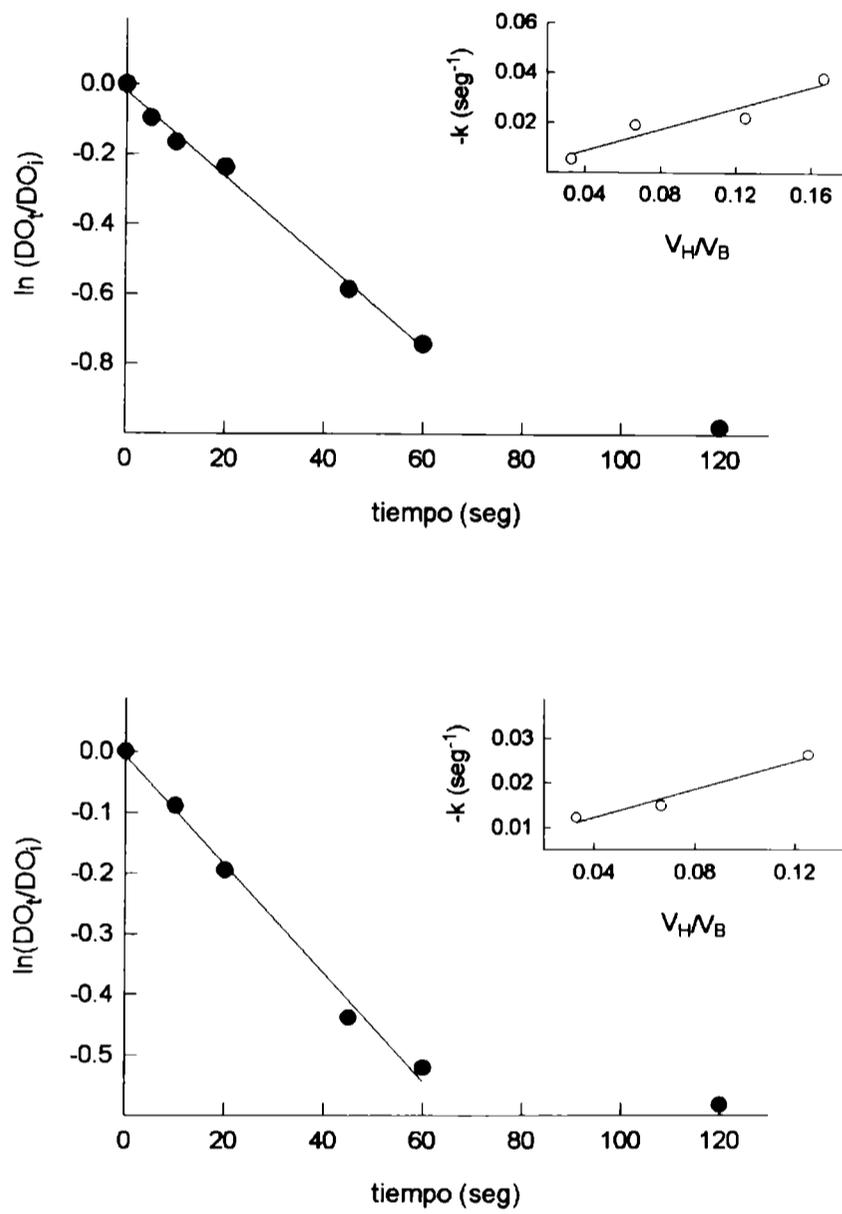
superior a los 60 seg no introdujo cambios en la partición de los microorganismos entre las fases.

De acuerdo a estas observaciones, se decidió determinar el coeficiente de remoción (K) para las cepas hidrofóbicas en TPY y en MRS. En esta etapa se determinó la hidrofobicidad mediante el método MATH que se describió en la sección de

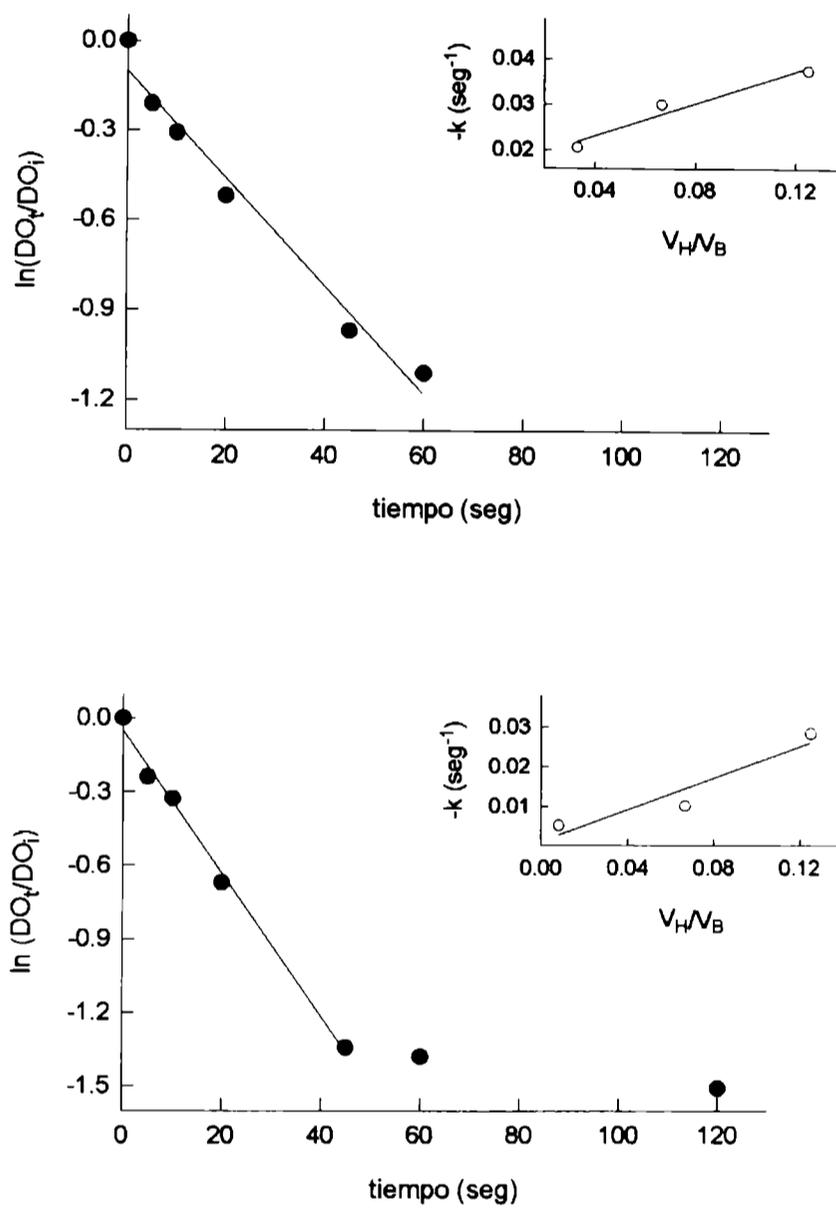
Metodología. En la Figura 9 (A, B, C y D) se representaron algunos ejemplos de las curvas obtenidas. Analizando 3 ó 4 relaciones de volumen para cada cepa en cada medio, se lograron obtener coeficientes de remoción con un nivel adecuado de confianza, según lo indican los parámetros de regresión lineal aplicados (Tabla 6).



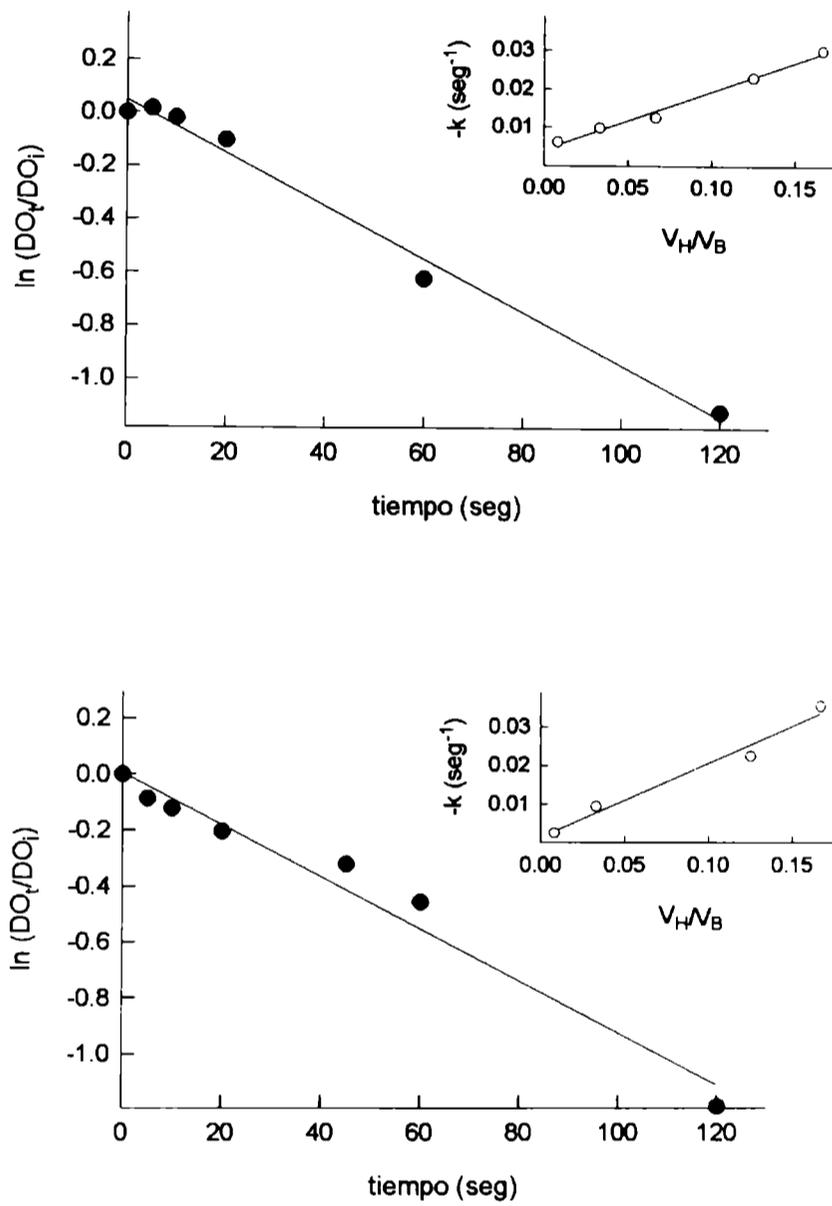
**Figura 9.** (A) Representación de la cinética de primer orden para la adhesión de *Bif.pseudolongum* CIDCA 531 a hexadecano utilizando datos derivados de las curvas como las de la Figura 10. (A) en TPY; (B) en MRS. *Curvas interiores:* la pendiente de las regresiones de primer orden ( $k \text{ seg}^{-1}$ ) versus la relación de hexadecano a buffer ( $V_H/V_B$ ), corresponde al coeficiente de remoción (K).



**Figura 9. (B)** Representación de la cinética de primer orden para la adhesión de *Bif. bifidum* CIDCA 536 a hexadecano utilizando datos derivados de las curvas como las de la Figura 10. (A) en TPY; (B) en MRS. *Curvas interiores:* la pendiente de las regresiones de primer orden ( $k \text{ seg}^{-1}$ ) versus la relación de hexadecano a buffer ( $V_H/V_B$ ), corresponde al coeficiente de remoción ( $K$ ).



**Figura 9. (C)** Representación de la cinética de primer orden para la adhesión de *Bif. bifidum* CIDCA 537 a hexadecano utilizando datos derivados de las curvas como las de la Figura 10. (A) en TPY; (B) en MRS. *Curvas interiores:* la pendiente de las regresiones de primer orden ( $k \text{ seg}^{-1}$ ) versus la relación de hexadecano a buffer ( $V_H/V_B$ ), corresponde al coeficiente de remoción ( $K$ ).



**Figura 9. (D)** Representación de la cinética de primer orden para la adhesión de *Bif. bifidum* CIDCA 5310 a hexadecano utilizando datos derivados de las curvas como las de la Figura 10. (A) en TPY; (B) en MRS. *Curvas interiores:* la pendiente de las regresiones de primer orden ( $k \text{ seg}^{-1}$ ) versus la relación de hexadecano a buffer ( $V_H/V_B$ ), corresponde al coeficiente de remoción ( $K$ ).

**Tabla 6.** Coeficientes de remoción (K) para las bifidobacterias crecidas en MRS y en TPY, obtenidos graficamente de las curvas como las representadas en las Figuras 9. Los valores se expresan en h<sup>-1</sup>.

	MRS	TPY
531	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
532	-	-
536	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02
537	0.20 ± 0.05	0.17 ± 0.04
538	-	-
5310	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.06
5313	nd	nd

(-) no-hidrofóbica; (nd) no determinada

El valor de K para las bacterias no-hidrofóbicas no se puede calcular por este método debido a que los microorganismos no se reparten significativamente en hexadecano. Los valores de K para las bacterias hidrofóbicas permitieron diferenciar a la cepa 531 del resto de las cepas. Esta cepa 531 mostró un valor de hidrofobicidad más bajo, con lo que se la puede considerar como de hidrofobicidad moderada. Por otro lado, los valores de K no mostraron diferencias significativas entre ambos medios utilizados, indicando que el medio de cultivo no modificaría significativamente las características superficiales en cuanto a la hidrofobicidad, y estaría de acuerdo con Nikovskaya y Gordienko<sup>306</sup> que encontraron que la hidrofobicidad superficial es una característica estable e independiente de la fase de crecimiento y de las condiciones de cultivo.

Observaciones preliminares realizadas en nuestro laboratorio indican que una disminución de la carga negativa superficial incrementa la autoagregación y la hidrofobicidad, e inclusive

cepas no-hidrofóbicas aumentan su hidrofobicidad sensiblemente al disminuir su potencial  $\zeta$  de -42 mV a -15.9 mV (considerando el valor absoluto del potencial  $\zeta$  como la intensidad de carga negativa). La disminución de la repulsión electrostática resultaría en una mayor adhesión o agregación permitiendo el acercamiento de las superficies hidrofóbicas.

Propiedades como la hidrofobicidad superficial o el potencial  $\zeta$  representan un comportamiento de la composición química total de la superficie. Para una limitada colección de *Lactobacillus*, *Cuperus* y col.<sup>83</sup> encontraron que cepas con relativamente elevado punto isoeléctrico por arriba de pH 3 fueron las más hidrofóbicas y se debía a la presencia de grupos proteicos, ricos en nitrógeno, en la superficie bacteriana.

Los valores de K obtenidos en este trabajo fueron medidos a pH 7 (en PBS), pero es posible que estos valores aumenten al bajar el pH. Observaciones realizadas por Pérez y col.<sup>327</sup> indican

## Capítulo II

que la cepa CIDCA 5317 aumenta su hidrofobicidad y su carácter autoaglutinante al disminuir el pH de 7 a 2. Millsap y col.<sup>279</sup> trabajando con 27 cepas de *Lactobacillus*, observaron que cinco de ellas mostraron una mayor remoción a bajos pHs con un pico entre pH 2 y 4. Estos autores también encontraron una correlación entre la relación N/C (nitrógeno/carbono), O/C (oxígeno/carbono) y la hidrofobicidad: aquellas cepas con mayor relación N/C, posiblemente debido componentes ricos en N (proteínas), fueron las más hidrofóbicas mientras que las de mayor relación O/C, es decir componentes ricos en oxígeno como fosfatos o polisacáridos, conferían carga negativa a las bacterias y menor hidrofobicidad. Las mismas observaciones se encontraron para estreptococos<sup>442</sup> y para estafilococos<sup>443</sup>. Se publicó que la hidrofobicidad superficial de *Listeria monocytogenes* y su adherencia a superficies incrementaba con la disminución del pH<sup>257,106</sup>

La contribución de proteínas al carácter hidrofóbico se evidencia luego de un tratamiento con proteasas. La cepa *Bif. bifidum* CIDCA 5310 disminuye dramáticamente su hidrofobicidad y el carácter autoagregante cuando es tratada con tripsina<sup>327</sup>. Sin embargo, el potencial  $\zeta$  no se modifica. Por lo tanto, las uniones hidrofóbicas pueden formarse cuando las proteínas exponen aminoácidos no polares y se produce como consecuencia agregación. El pH puede afectar entonces la formación de estas uniones.

Se ha descrito que los ácidos lipoteicoicos (ALT) están presentes en la superficie de algunas cepas de *Bifidobacterium* exponiendo los ácidos

grasos (oleico) de la parte lipídica de la molécula al exterior<sup>315</sup>. Además, la importancia de la parte lipídica en los ácidos lipoteicoicos de bifidobacterias en la unión a células eucarióticas correlacionaría bien con el rol de los ALT en la contribución a la hidrofobicidad superficial de las bacterias<sup>281</sup>, resaltando la importancia de la orientación de estas moléculas en la pared.

En conclusion, el carácter hidrofóbico estaría conferido por una combinación de proteínas superficiales que exponen sus grupos no polares al exterior y de la parte no polar de ácidos lipoteicoicos. Si bien se esperan altos índices de autoagregación en casos de alta hidrofobicidad y bajos potenciales superficiales, éstas parecerían ser dos propiedades independientes que modulan la autoagregación de las bifidobacterias. Lo que sí es claro es la observación de que las bifidobacterias autoagregantes son hidrofóbicas. Esta relación entre el carácter hidrofóbico superficial y la autoagregación puede explicarse sobre bases termodinámicas. La "unión hidrofóbica" es un proceso entrópico en el que las moléculas hidrofóbicas se agrupan lejos del contacto con las moléculas polares o hidrofílicas. De esta manera, la formación de agregados estables de bacterias hidrofóbicas sería más favorable que la presencia de bacterias desagregadas.

De todas maneras, hay excepciones: la cepa 531 presenta hidrofobicidad superficial aunque posee bajo índice de autoagregación, lo que estaría sugiriendo una diferencia en la composición superficial en las bacterias de esta cepa.

**Hemaglutinación**

El ensayo de *hemaglutinación* (HA) permite poner en evidencia el reconocimiento por parte de la bacteria de estructuras sobre la superficie de los glóbulos rojos. Muchas de estas estructuras son expresadas también en la superficie de otros tejidos, como las mucinas<sup>128</sup> o en otras células del organismo incluídas las del epitelio intestinal. Por ejemplo, las células HT-29 -una línea celular epitelial intestinal humana- provienen de un individuo A<sup>+</sup> y expresan en su superficie dicho antígeno de grupo. Estos hechos permitirían considerar la utilización de este sistema experimental para el estudio de la interacción entre células eucarióticas y procarióticas sin necesidad de recurrir a ensayos *in vitro* más sofisticados o a ensayos *in vivo*.

Las bifidobacterias fueron evaluadas en cuanto a su capacidad hemaglutinante frente a eritrocitos humanos correspondientes a los grupos A, AB y O (Tabla 7).

Las cepas 531, 532 y 538 resultaron no-hemaglutinantes frente a todos los grupos sanguíneos ensayados independientemente del medio de cultivo en las que fueron crecidas. Las cepas 536, 537, 5310 y 5313 mostraron un patrón claramente hemaglutinante frente a todos los grupos sanguíneos ensayados. Este resultado fue el mismo cuando las cepas se crecieron en MRS o en TPY. En ambas situaciones, las cepas 536 y 537 resultaron levemente menos hemaglutinantes que las cepas 5310 y 5313. En todos los casos se confirmaron los resultados mediante observación microscópica. Se conoce por ensayos anteriores realizados en nuestro laboratorio que estas cepas también aglutinan eritrocitos de oveja, lo que sugiere una baja especificidad de las bacterias por los receptores en los eritrocitos y/o que esta interacción es independiente del número de receptores.

**Tabla 7.** Título de hemaglutinación (HA) para las bifidobacterias crecidas en diferentes medios (MRS Y TPY) frente a eritrocitos humanos de diferentes grupos. Los resultados se expresan como la inversa de la mayor dilución que produce hemaglutinación.

Cepa	Grupo A		Grupo AB		Grupo O	
	MRS	TPY	MRS	TPY	MRS	TPY
531	-	-	-	-	-	-
532	-	-	-	-	-	-
536	1/4	1/4	nd	1/4	1/4	1/4
537	1/4	1/4	1/2	1/4	1/2	1/4
538	-	-	-	-	-	-
5310	1/4	1/8	1/8	1/4	1/8	1/8
5313	1/8	1/4	1/8	1/8	1/8	1/8

(-) no hemaglutinante; nd: no determinado

## Capítulo II

Posteriormente se realizaron diferentes ensayos tendientes a obtener información acerca de la naturaleza de las moléculas involucradas en esta interacción. Las bacterias fueron sometidas a diferentes tratamientos en forma independiente, que variaron desde una suave agitación hasta fuertes tratamientos químicos y enzimáticos (Tabla 8).

De acuerdo a resultados publicados para otros microorganismos<sup>299,297,370</sup> la agitación de las suspensiones bacterianas eliminaría de la superficie solamente apéndices bacterianos. Todas las cepas ensayadas continuaron siendo hemaglutinantes luego de este suave tratamiento sugiriendo la que tales estructuras no serían responsables de esta interacción o no estarían presentes.

**Tabla 8.** Actividad hamaglutinante de bifidobacterias luego de diferentes tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. Las bacterias fueron enfrentadas a eritrocitos humanos pertenecientes al grupo A<sup>+</sup>.

		Cepa			
		536	537	5310	5313
<b>control</b>	<i>sin tratamiento</i>	+	+	+	+
<b>tratamientos físicos</b>	<i>agitación</i>	nd <sup>a</sup>	+	+	+
	<i>sonicación</i>	nd	+	+	+
	<i>calentamiento</i>	-	-	-	-
<b>tratamientos químicos</b>	<i>LiCl</i>	+↓ <sup>b</sup>	+↓	+↓	+↓
	<i>GnCl</i>	+↓	+↓	+↓	+↓
	<i>metaperiodato</i>	-	-	+↓	+↓
	<i>Triton X-100</i>	nd	+	+	+
	<i>EDTA</i>	+	+	+	nd
<b>tratamientos enzimáticos</b>	<i>lisozima</i>	nd	+	+	+
	<i>tripsina</i>	+↑ <sup>c</sup>	+↑	+↑	+↑
	<i>quimotripsina</i>	+↑	+↑	+↑	+↑
	<i>pepsina</i>	-	-	-	-

<sup>a</sup> no determinado

<sup>b</sup> disminución de hemaglutinación

<sup>c</sup> aumento de hemaglutinación

Otros tratamientos más drásticos como la sonicación y tratamientos con lisozima y Triton X-100 persiguieron eliminar estructuras más firmemente establecidas en la superficie. La sonicación fue aplicada de tal forma que no generó

lisis celular (evaluada microscópicamente). La lisozima y el Triton X-100 son dos reactivos comúnmente empleados para extraer o facilitar la extracción de fimbrias de la superficie. Luego del tratamiento con estos reactivos, las bifidobacterias

## Capítulo II

no perdieron su actividad hemaglutinante sugiriendo nuevamente la ausencia de estos apéndices superficiales. Muestras bacterianas observadas por microscopía electrónica de transmisión preparadas por tinción negativa muestran la ausencia de apéndices bacterianos (datos no mostrados).

Con respecto a los tratamientos con enzimas proteolíticas, se observó que en todas las cepas la única enzima capaz de eliminar la HA fue la pepsina, indicando que los responsables de la interacción con eritrocitos serían componentes proteicos sensibles a la pepsina. Un tratamiento con tripsina y quimotripsina, contrariamente a lo esperado, no solo no elimina ni reduce la hemaglutinación sino que la incrementa. Al observar macroscópicamente las suspensiones bacterianas luego de estos tratamientos se observó una dispersión de los agregados por lo que probablemente los microorganismos se encontrarían más disponibles para formar la red con los eritrocitos. Soluciones de tripsina y quimotripsina no producen hemaglutinación. Fontaine y col.<sup>128</sup> demostraron que una incubación con pronasa por 10 min disminuye en un 25% la HA en *Bif. bifidum* DSM 20082, pero se pierde completamente luego de 4 h. Por lo tanto, es probable que la acción proteolítica de la tripsina y quimotripsina sobre las bacterias sea más visible luego de un tiempo de incubación más prolongado. De todas maneras, la selectividad de las proteasas permitiría diferenciar factores sensibles a pepsina pero resistentes a tripsina y quimotripsina.

El tratamiento térmico eliminó completamente el carácter hemaglutinante en todas las cepas. Probablemente este efecto se haya logrado a través de una desorganización de la superficie

bacteriana y consecuentemente una modificación estructural de los factores hemaglutinantes.

En cuanto a los tratamientos químicos, los agentes caotrópicos disminuyeron la HA en todas las cepas sugiriendo cierta participación de componentes unidos no covalentemente a la superficie o un desplegamiento de las estructuras estabilizadas por uniones no covalentes. El metaperiodato actúa oxidando hidratos de carbono<sup>51,268</sup> por lo que la pérdida de HA luego de un tratamiento con este reactivo pondría en evidencia factores carbohidratos involucrados en esta interacción ya sea formando parte de glicoproteínas o como estructuras independientes (polisacáridos de cápsula). Las cepas 536 y 537 perdieron completamente su carácter hemaglutinante luego de un tratamiento con metaperiodato mientras que las cepas 5310 y 5313 sólo lo perdieron parcialmente.

Veerkamp y col.<sup>445</sup> describieron tres unidades estructurales en las paredes celulares de *Bif. bifidum*: peptidoglicano, polímeros de ramnosa glucosilada y estructuras tipo ácidos teicoicos (oligómeros de manitol fosfato). Estas últimas han sido descritas también en *Lactobacillus acidophilus*<sup>77</sup> y *Streptococcus sanguis*<sup>111</sup>. Sobre la base de que ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram positivas han demostrado poseer alta afinidad por membranas de células de mamíferos<sup>15,75,228,402</sup>, las estructuras descritas pueden haber sido el blanco del metaperiodato y por lo tanto tener una potencial participación en la interacción con células eucarióticas. Si bien la unión a los glóbulos rojos ocurriría espontáneamente vía la parte lipídica<sup>75,309</sup>, la cadena carbohidratada resultaría dañada por el metaperiodato con la consecuente pérdida de

## Capítulo II

estructura necesaria para establecer la unión con células eucarióticas. Por otro lado, se han descrito ácidos lipoteicoicos (ALT) en *Bif. bifidum*. moléculas anfifílicas encontradas en muchas bacterias Gram positivas<sup>228,239</sup> estructuralmente uniformes y generalmente constituídas por una cadena central de poliglicerol fosfato unida covalentemente a un glico- o fosfoglicolípido idéntico o muy relacionado con los de la membrana<sup>316</sup>. La presencia de una estructura central de glicerol fosfato y de estructuras polisacáridicas terminales (compuestas por glucosa y galactosa), distinguen los ácidos lipoteicoicos de *Bif. bifidum* de todas las otras estructuras de ácidos lipoteicoicos descritas. Los ALT muestran tener alta afinidad por enterocitos, uniéndose en forma específica y reversible<sup>315</sup> a través de los ácidos grasos (oleico) de la parte lipídica de la molécula. En consecuencia, una proteína o glicoproteína con especificidad para ácidos grasos se presentaría como un potencial receptor en los enterocitos. Ácidos grasos relacionados como el palmítico se unen a albúmina con la misma afinidad<sup>154</sup>. La fibronectina podría ser un receptor en la membrana de las células ya que unen ALT a través de sus ácidos grasos como lo hace la albúmina<sup>76</sup>. Iwasaki y col.<sup>206</sup> y Flecher<sup>127</sup> describieron la estructura de ácidos lipoteicoicos de cinco especies de *Bifidobacterium* conteniendo cadenas de glucosa, galactosa y glicerol. Se ha propuesto que los ácidos lipoteicoicos tienen una importante contribución en las propiedades electroquímicas de la pared celular<sup>318</sup>. Los ésteres de d-alanina de los ALT determinan la carga aniónica neta de la pared.

Como indicaron previamente Kleeman y Klaenhammer, cationes di y trivalentes podrían actuar como mediadores entre la superficie de la bacteria y de la célula eucariótica en varios

sistemas en donde se observa adherencia. Estos autores han demostrado que la adhesión en estos sistemas estaba promovida por el catión  $Ca^{+2}$ . La totalidad de las cepas estudiadas en este trabajo poseen adherencia a eritrocitos de una manera  $Ca$ -independiente. Las mismas consideraciones fueron evidenciadas por Fuller<sup>136</sup> y Chauvière y col.<sup>59</sup> quienes observaron que la adherencia de *Lactobacillus* a células intestinales no fue afectada por un tratamiento con EDTA.

En otra etapa se estudió el efecto inhibitorio de azúcares simples, mucinas y otros agentes químicos en la HA. Para ello se utilizaron las cepas aglutinantes y fueron analizadas frente a glóbulos rojos del grupo A (Tabla 9). Los únicos azúcares simples que lograron inhibir la hemaglutinación fueron la fucosa y la galactosa en sus isómeros d(+) y la lactosa.

Conway y Kjelleberg<sup>70</sup> encontraron que la d-fucosa inhibe en un 25% la adherencia de *Lactobacillus fermentum* 737 a epitelio gástrico de ratón, aunque consideran que no es un valor suficientemente alto como para considerar a la fucosa como un determinante de adhesión. Nuestros resultados indicarían que la vía de interacción no sería a través de residuos de manosa como se propuso para muchos géneros como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp.<sup>312,393,124,108</sup> sino por residuos de glucosa, fucosa y galactosa presentes en los ácidos lipoteicoicos o en polisacáridos de superficie. La glicosilación de proteínas puede ser un blanco para lectinas presentes en los eritrocitos por lo que cadenas carbohidratadas conteniendo estos residuos podrían ser las responsables de la interacción bacteria-glóbulo rojo. Sin embargo, estos resultados deben ser evaluados con cautela

Capítulo II

ya que la inhibición ocurrió a una concentración muy elevada indicando un bajo poder inhibitorio y en consecuencia baja especificidad. En otro modelo experimental, la d-manosa inhibe la hemaglutinación de *Vibrio parahaemolyticus* KN77

a una concentración de 0.05 mM y la d-glucosa lo hace a 1 mM<sup>297</sup>. Garber y col.<sup>142</sup> inhibieron la hemaglutinación de *Pseudomonas aeruginosa* con galactosa 0.5 mM y N-Acetil-Galactosamina 0.2 mM en experimentos independientes.

**Tabla 9.** Inhibición de hemaglutinación de bifidobacterias por azúcares simples evaluadas frente a eritrocitos humanos pertenecientes al grupo A<sup>+</sup>. Las bacterias fueron crecidas en MRS.

Azúcar	[mM] <sup>a</sup>	Cepa			
		536	537	5310	5313
<i>l(-) fucosa</i>	773	-	-	-	-
<i>d(+) fucosa</i>	786	193 <sup>b</sup>	193	386	193
<i>d(+) xilosa</i>	800	-	-	-	-
<i>l(-) xilosa</i>	790	-	-	-	-
<i>maltosa</i>	390	-	-	-	-
<i>d(+) manosa</i>	793	-	-	-	-
<i>d(+) galactosa</i>	433	216	216	432	216
<i>d(-) fructosa</i>	770	-	-	-	-
<i>arbutina</i>	371	-	-	-	-
<i>d-manitol</i>	656	-	-	-	-
<i>l(-) sorbosa</i>	988	-	-	-	-
<i>mio-inositol</i>	593	-	-	-	-
<i>esculina</i>	143	-	-	-	-
<i>d(-) amigdalina</i>	400	-	-	-	-
<i>d(+) rafinosa</i>	223	-	-	-	-
<i>d(+) celobiosa</i>	153	-	-	-	-
<i>NAcGalactosamina</i>	300	nd	nd	-	-
<i>l(-) ramnosa</i>	440	-	-	-	-
<i>α-lactosa</i>	233	58	58	116	58
<i>l(+)</i> arabinosa	443	-	-	-	-
<i>d(-)</i> arabinosa	845	-	-	-	-
<i>NAcGlucosamina</i>	416	-	-	-	-
<i>sacarosa</i>	984	-	-	-	-
<i>d(+) glucosa</i>	893	-	-	-	-
ác. glucónico	827	-	-	-	-
<i>d-sorbitol</i>	723	-	-	-	-

<sup>a</sup> máxima concentración ensayada de acuerdo a la solubilidad de cada azúcar

<sup>b</sup> mínima concentración de azúcar que inhibe la hemaglutinación (mM)

nd: no determinado; (-) no inhibe

Capítulo II

La hemaglutinación fue completamente inhibida o sustancialmente reducida por BSM y PSM en todas las cepas, mientras que se observó una débil inhibición de la fetuína en las cepas 5310 y 5313 (Tabla 10). La mucina proveniente de glándula submaxilar bovina (BSM) es una glicoproteína de aproximadamente 400 kDa de peso molecular cuya fracción proteica es solo del 36.6%. Además de ácido siálico y N-acetil-galactosamina, esta mucina posee pequeñas cantidades de fructosa y galactosa. Bettelheim y col.<sup>23</sup> publicaron que el contenido de carbohidratos de esta macromolécula es del 56.7% y que su forma es la de un bastón.

Downs y Pigman<sup>100</sup> y Pigman y col.<sup>328</sup> sugirieron que esta macromolécula posee una estructura repetitiva de glicopéptido. La mucina de estómago porcino (PSM) es una glicoproteína de >160kD altamente glicosilada (>80%). Las cadenas de oligosacáridos están unidas al núcleo proteico (rico en treonina y serina) via uniones O-glicosídicas compuestas por N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, d-galactosa, l-fucosa y ácido siálico. La fetuína está compuesta por un solo péptido que contiene tres oligosacáridos unidos vía enlace O-glicosídicos y tres oligosacáridos unidos a través de enlaces N-glicosídicos.

**Tabla 10.** Inhibición de hemaglutinación de bifidobacterias por mucinas, poliaminas y deoxicolato frente a eritrocitos humanos A<sup>+</sup>. Las bacterias fueron crecidas en MRS.

<i>Inhibidor</i>	<i>Cepas</i>		
	<i>537</i>	<i>5310</i>	<i>5313</i>
<i>fetuína</i>	1/2048 <sup>a</sup>	1/8	1/16
<i>BSM</i>	1/2048	1/2048	1/2048
<i>PSM</i>	1/2048	1/2048	1/2048
<i>BSA</i>	1/2048	1/2048	1/2048
<i>poli-Lys</i>	1/2048	1/2048	1/2048
<i>espermidina</i>	1/2048	1/2048	1/2048
<i>deoxicolato</i>	1/2048	1/2048	1/2048

<sup>a</sup> título expresado como la recíproca de la máxima dilución que produce inhibición  
 nd: no determinado  
 BSM: bovine submaxilar mucin; PSM: porcine stomach mucin; BSA: seroalbúmina bovina

Los resultados obtenidos con las mucinas correlacionaron bien con aquellos obtenidos con azúcares simples en los que solo fucosa, lactosa y galactosa fueron inhibitorios. Sin embargo, las mucinas mostraron un poder inhibitorio mucho mayor que los azúcares simples. La seroalbúmina bovina (BSA) es una proteína inusualmente no

glicosilada y por consiguiente constituye un excelente control experimental para comparar los efectos de la glicosilación observables en otras proteínas séricas. Los resultados mostraron que la BSA fue un poderoso inhibidor de la hemaglutinación y en consecuencia, es probable que la interacción de las bifidobacterias con las

## Capítulo II

mucinas dependa en mayor medida en las estructuras peptídicas que de las estructuras hidrocarbonadas, o que la parte lipídica de los ácidos lipoteicoicos responsables de la hemaglutinación queden enmascarados por la albúmina. Simpson y col.<sup>402</sup> demostraron que los ácidos lipoteicoicos de estreptococos se unen efectivamente a la región de unión de ácidos grasos de la seroalbúmina.

La fetuína contiene mucho ácido siálico e inhibe la HA. Una pérdida en la HA luego de un tratamiento con neuraminidasa en los GR evidenciaría que el receptor es ácido siálico. Otros microorganismos probióticos como *Lb. fermentum* 104-S se adhieren a gelatina y varias fracciones de mucus gástrico porcino<sup>183</sup>. Este mucus posee un 28% de lípidos y se sabe que estos poseen receptores para lactobacilos<sup>174</sup>.

Inesperadamente, los reactivos utilizados como controles como la espermidina, la poli-lisina (poli-Lys) y el deoxicolato también bloquearon la hemaglutinación. La espermidina y la poli-Lys son dos poliaminas cuyo poder inhibitorio puede ser adjudicado a las interacciones iónicas a través de diversos mecanismos. Entre ellos se encuentran la posibilidad de que las cargas de la superficie bacteriana hayan evolucionado para contribuir a

fortalecer la interacción con aquellas células del epitelio gastrointestinal humano a las cuales las bifidobacterias normalmente se adhieren o como un artefacto que resulta de la unión de las poliaminas a la superficie bacteriana. De esta manera, los factores que median la adhesión se encontrarían estéricamente ocultos o bloqueados o inhibidos de manera no específica. El ácido deoxicólico podría estar actuando como un detergente y la posible relevancia de este punto es la observación que las cepas testeadas tienen una superficie altamente hidrofóbica y consecuentemente, el deoxicolato podría actuar desorganizando la superficie bacteriana y así modificar la estructura de los factores hemaglutinantes.

En síntesis, la interacción de bifidobacterias con eritrocitos parece tener un carácter multifactorial en el que estarían participando factores proteicos e hidratos de carbono, que podrían estar formando parte de la estructura de glicoproteínas o ácidos lipoteicoicos. Por otro lado, se evidencia una importante contribución de regiones hidrofóbicas y de estructuras que pueden ser fácilmente removidas con agentes caotrópicos. Estas estructuras podrían estar participando directamente dirigiendo la interacción o como responsables del mantenimiento de la estructura de adhesinas

### ***Adherencia a superficies o partículas inertes o conjugadas***

Generalmente los materiales pueden ser divididos en dos clases principales<sup>127</sup>. Están los de "alta energía", hidrofílicos y en general cargados negativamente, usualmente materiales inorgánicos como vidrio, metales o minerales; y los de "baja

energía" que son relativamente hidrofóbicos, bajos en carga electrostática y generalmente son polímeros orgánicos como los plásticos. Debido a que la adherencia también se debe a las características fisicoquímicas de las superficies

## Capítulo II

materiales como de las bacterias, hay que tener en cuenta el objetivo del estudio para seleccionar el

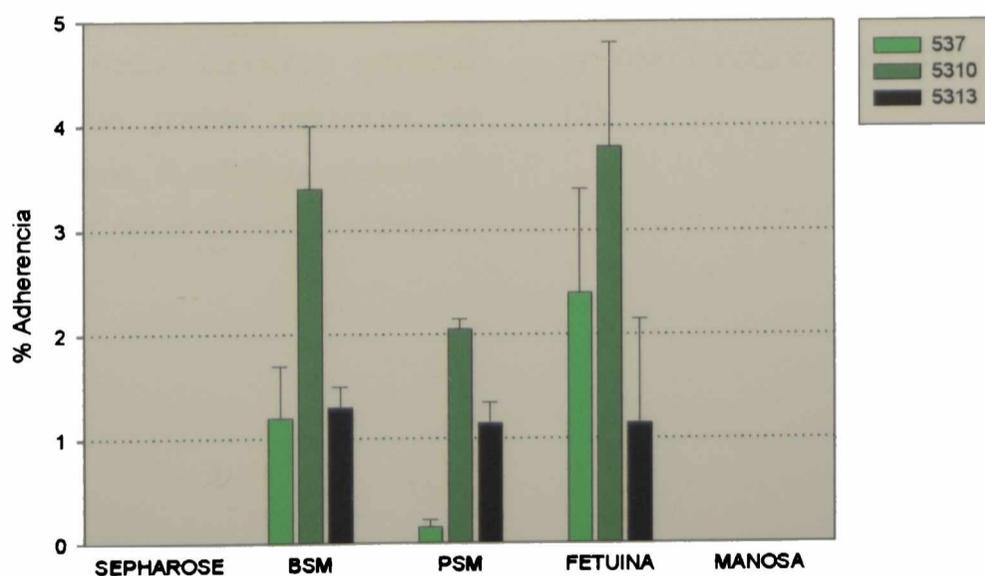
### **Adherencia a partículas de Sepharose**

La unión a partículas de *Sepharose* cubiertas con mucinas fue observada para todas las bifidobacterias que aglutinaron eritrocitos y cuya hemaglutinación fue inhibida por mucinas solubles (Figura 10). A pesar de que ninguna de las cepas reaccionó fuertemente con las partículas de Sepharosa recubiertas de mucinas, la cepa 5310 fue la más reactiva. Con las otras cepas se observaron reacciones más débiles. Por otro lado, no se observó reacción alguna con partículas desnudas o con aquellas conjugadas con d-manosa -utilizadas como controles- sugiriendo la especificidad de estas reacciones. Ouwehand y col.<sup>319,320</sup> estudiaron la adhesión de *Bifidobacterium* en un

material.

modelo *in vitro* preparado inmovilizando glicoproteínas de mucus intestinal encontrando que cuatro cepas estudiadas se adhieren entre un 6 y un 18%. Si bien se conoce que las bifidobacterias se adhieren a polisacáridos<sup>371</sup>, es probable que el tipo de glicosilación se traduzca en estas diferencias en la adherencia. Por otro lado, la composición de mucinas varía en las diferentes regiones del intestino y en consecuencia la adherencia se podría ver modificada también a este nivel. *Bif. bifidum* se une mejor a O-glicoproteínas que a N-glicoproteínas y a N- y O-glicosilproteínas.

**Figura 10.** Adherencia de bifidobacterias crecidas en MRS a mucinas comerciales. El nivel de bacterias adheridas fue determinado mediante el ensayo enzimático de F6FFC. Se incluyeron como controles partículas sin conjugar y partículas conjugadas con d-manosa. BSM: bovine submaxilar mucin; PSM: porcine stomach mucin; BSA: seroalbúmina bovina.



### ***Adherencia a poliestireno***

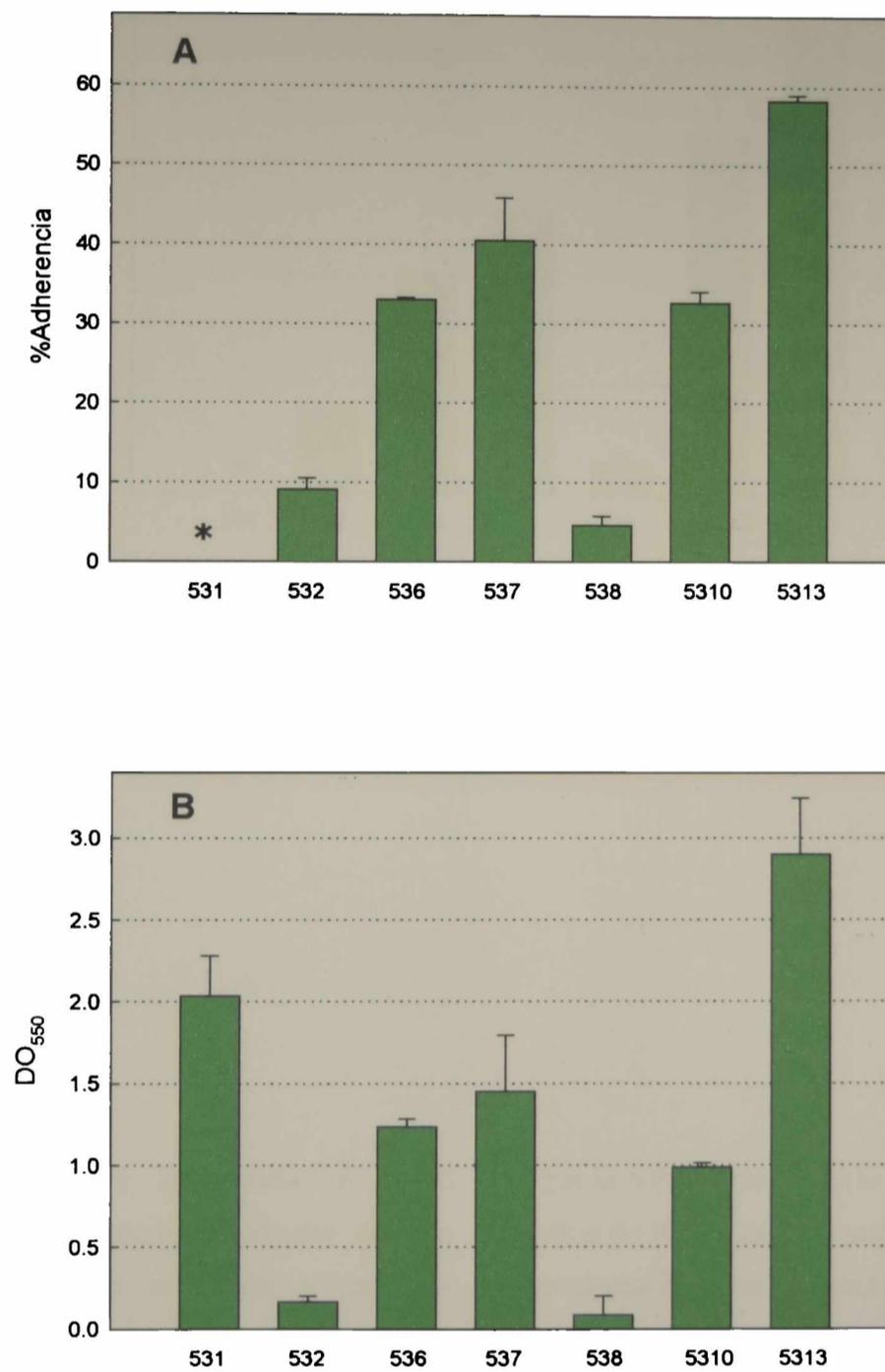
Una de las observaciones macroscópicas más evidentes en los cultivos de bifidobacterias es la habilidad de ciertas cepas de crecer adhiriéndose al vidrio del recipiente en las que se cultivan. En base a esto y considerando que la adhesión a una superficie es considerada como el primer paso en la colonización, se cuantificó la capacidad de las cepas de adherirse a poliestireno a fin de ampliar su caracterización. La cuantificación de bacterias adheridas a sustratos sólidos puede realizarse a través de diferentes técnicas como microscopía óptica, tinciones, radiomarcado, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), bioluminiscencia, actividad enzimática, etc. En este caso se cuantificó la adherencia a poliestireno mediante el ensayo de actividad de F6FFC desarrollado en nuestro laboratorio (Capítulo I) y mediante la tradicional técnica de tinción con cristal violeta.

Los resultados obtenidos revelando los ensayos con el método enzimático indican que las cepas 536, 537, 5310 y 5313 fueron las más adherentes logrando valores de adherencia superiores al 30%. Las cepas 532 y 538, por el contrario, no alcanzaron valores superiores al 9%. Debido a que la cepa 531 no posee suficiente actividad fosfocetolasa, no fue posible evidenciar su adherencia a poliestireno. Si embargo, ensayos de adhesión revelando las placas con cristal violeta

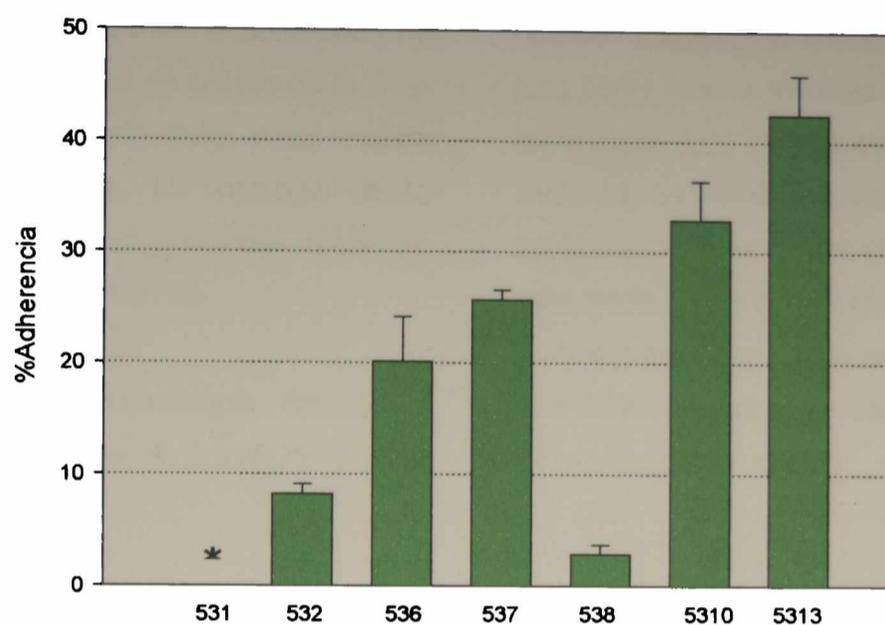
(Figura 11) mostraron que esta cepa posee alta adherencia a poliestireno logrando valores similares a los de la cepa 5313. Los resultados obtenidos revelando las placas con el ensayo de fosfocetolasa correlacionaron con los obtenidos revelando con cristal violeta. La equivalencia con un método tradicional de revelado de bacterias adheridas a superficies avala la utilización del ensayo enzimático con este fin. Estos ensayos fueron realizados a pH 7 resuspendiendo las bacterias en buffer PBS.

Analizando estos resultados en comparación con los valores de hidrofobicidad, se puede observar que las cepas no hidrofóbicas resultaron ser las menos adherentes, mientras que las más hidrofóbicas fueron las más adherentes. Sin embargo, a pesar de su bajo valor de hidrofobicidad superficial, la cepa 531 mostró valores de adherencia inusualmente altos.

Una comparación de los resultados obtenidos con las cepas crecidas en MRS y en TPY revelados mediante la actividad enzimática, permitió observar que el perfil relativo de adherencia se mantuvo constante para todas las cepas (Figura 12).



**Figura 11.** Adherencia a poliestireno de bifidobacterias crecidas en MRS y resuspendidas en PBS. Ensayo revelado mediante la reacción de F6FFC (A) o por tinción con cristal violeta (B). (\*) la cepa 531 no puede evaluarse mediante la reacción enzimática debido a su baja actividad



**Figura 12.** Adherencia a poliestireno de bifidobacterias crecidas en TPY y resuspendidas en PBS. Ensayo revelado mediante el ensayo de F6FFC. (\*) la cepa 531 no puede evaluarse mediante la reacción enzimática debido a su baja actividad.

### **Adherencia a vidrio**

La manifestación de adherencia al vidrio permitió clasificar las cepas estudiadas en dos grupos: las adherentes al vidrio y las no-adherentes al vidrio. Las cepas no-adherentes al vidrio fueron *Bif. breve* CIDCA 532 y *Bif. bifidum* CIDCA 538. El resto de las cepas se adhirieron al vidrio con diferente intensidad. Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten señalar

que la adherencia al vidrio se relaciona con valores altos de hidrofobicidad superficial. La cepa 531 se presentaría como una excepción ya que posee baja hidrofobicidad y es adherente al vidrio. Sin embargo, también mostró alta adherencia al poliestireno indicando que en esta cepa los mecanismos de adherencia a superficies involucrarían no solamente factores hidrofóbicos.

**Adherencia a superficies biológicas**

**Adherencia a células Caco-2 en cultivo**

En esta sección se determinó la adherencia de bifidobacterias a monocapas de células de la línea Caco-2 mediante microscopía óptica y por medida de actividad fosfocetolasa. La topología de la adherencia se evaluó posteriormente mediante microscopía electrónica de barrido.

Con respecto a la microscopía óptica, se evaluaron diferentes técnicas de coloración a fin de

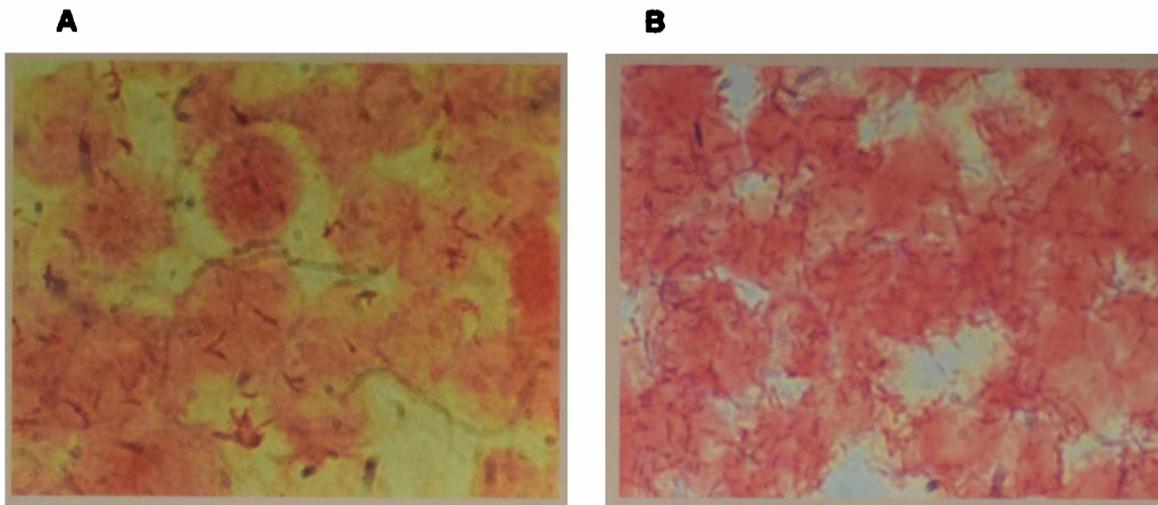
obtener imágenes lo suficientemente claras como para poder realizar medidas semicuantitativas de la adherencia. Los resultados se presentan en la Tabla 11. La técnica de Gram modificada resultó ser la más adecuada para observar los ensayos de adherencia sobre células Caco-2. En la Figura 13. se muestran imágenes de los resultados obtenidos en ensayos de adhesión con bifidobacterias sobre las monocapas en cultivo

**Tabla 11.** Evaluación de las coloraciones para realizar medidas semicuantitativas de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2

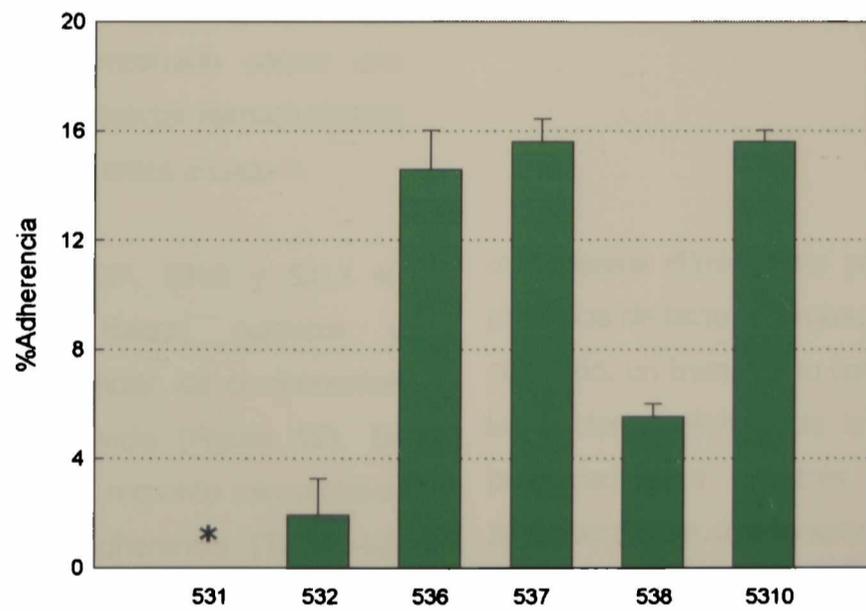
<b>Coloración</b>	<b>Observaciones</b>
<b><i>Giemsa sin fijar</i></b>	Células eucarióticas teñidas débilmente o no teñidas. Bacterias teñidas nítidamente pero no se individualizan en los cúmulos.
<b><i>Giemsa con fijación</i></b>	Células eucarióticas y bacterias teñidas fuertemente de azul. No se diferencian las bacterias de las células eucarióticas en el fondo.
<b><i>May-Grünwald/Giemsa</i></b>	Células eucarióticas y bacterias teñidas fuertemente de rosa. Idem anterior, no se diferencian las bacterias del fondo.
<b><i>Gram</i></b>	Se diferencian bien las bacterias de las células eucarióticas, aunque el fondo es muy oscuro.
<b><i>Gram modificada</i></b>	Buen contraste de colores entre las bacterias y las células eucarióticas. Se diferencian muy bien las bacterias de las células eucarióticas.

Los resultados obtenidos para la adherencia de bifidobacterias por medida de la actividad fosfocetolasa (Capítulo I), se representan en la Figura 14. La adherencia de las bifidobacterias a Caco-2 varió considerablemente entre las cepas. Las cepas 532 y 538 mostraron adherencia menor del 5% mientras que las cepas 536, 537 y 5310

fueron las que mostraron los mayores valores de adherencia (>14%). Si bien por medida de actividad enzimática no se puede evaluar a la cepa 531, una observación microscópica demostró que esta cepa no se adhiere apreciablemente a la monocapa de células Caco-2 (Figura 13).



**Figura 13.** Observaciones microscópicas de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2. (A) cepa no-adherente (CIDCA 531); (B) cepa adherente (CIDCA 5310). Aumento  $\times 1200$



**Figura 14.** Adherencia a células Caco-2 de bifidobacterias. Ensayo revelado por medida de actividad fosfocetolasa. (\*) la cepa 531 no se puede evaluar mediante la reacción enzimática debido a que posee baja actividad.

Los resultados de adherencia a Caco-2 fueron estadísticamente similares cuando se utilizaron bacterias crecidas en MRS o en TPY. Elo y col.<sup>113</sup> trabajando en el modelo Caco-2 obtuvieron baja adherencia o ninguna para cepas de *Bif. bifidum* de diferentes fuentes. Lankaputhra y Shah<sup>241</sup> encontraron una gran variabilidad en la adherencia de bifidobacterias a células HT-29: desde 8 bacterias por campo hasta 665 bacterias por campo.

Las cepas no hidrofóbicas y no hemaglutinantes resultaron adherentes a Caco-2, aunque en muy baja proporción. Es probable que en la adherencia a Caco-2 intervengan otros factores que no son necesarios para la interacción con eritrocitos. Se ha encontrado en otras bacterias que los componentes que rigen la adherencia a células epiteliales pueden ser diferentes que los que rigen la hemaglutinación<sup>203</sup>. Por otro lado, las cepas 536, 537 y 5310 que han demostrado poseer una superficie hidrofóbica y un carácter hemaglutinante resultaron ser las más adherentes a Caco-2.

Para las cepas 536, 537, 5310 y 5313 se realizaron tratamientos físicos, químicos y enzimáticos a fin de evidenciar los componentes involucrados en la adherencia (Figura 15). En algunos casos se realizó un recuento microscópico a fin de cuantificar la adherencia (Tabla 12) mientras que en la mayoría de los casos se realizó una medida semicuantitativa de esta propiedad (Tabla 13).

Para las cuatro cepas, un tratamiento con tripsina y quimotripsina disminuyó la adhesión a las células en cultivo mientras que un tratamiento

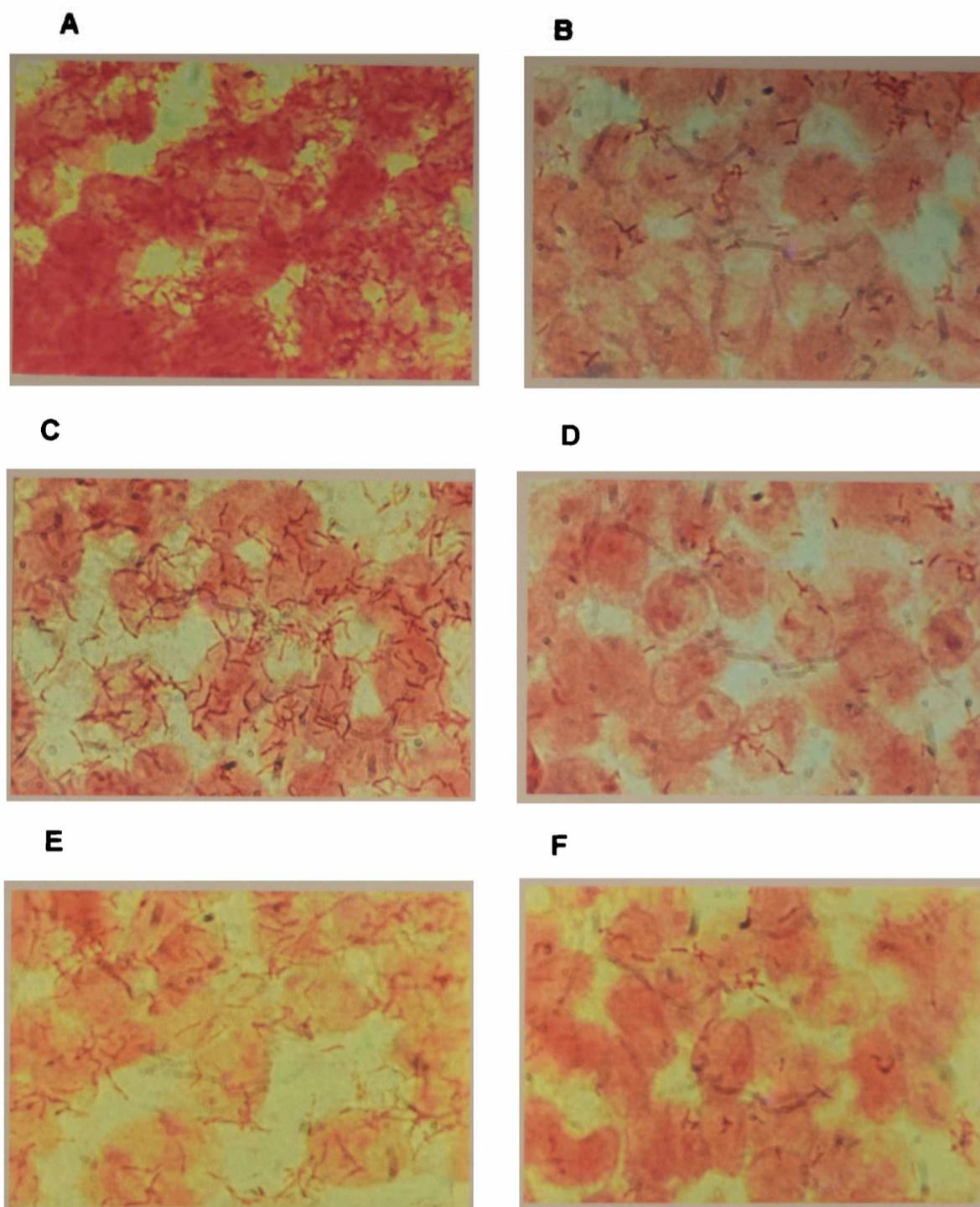
**Tabla 12.** Modificación de la adherencia a Caco-2 para la cepa CIDCA 5310 sometida a tratamientos físicos, químicos y enzimáticos (recuentos por Gram)

	Recuento - DS
<i>control</i>	336 ± 25
<i>LiCl</i>	25 ± 3
<i>GnCl</i>	- <sup>a</sup>
<i>metaperiodato</i>	-
<i>tripsina</i>	140 ± 15
<i>quimotripsina</i>	-
<i>pepsina</i>	-
<i>calor (100 °C, 30 min)</i>	-

Los resultados se expresan en número de bacterias adheridas cada 10 células Caco-2. Cada ensayo fue realizado por duplicado en células de dos pasajes diferentes. Para cada monocapa, el número de bacterias adheridas se contaron en 20 campos microscópicos elegidos al azar.

<sup>a</sup> cuando menos de 5 bacterias por campo fueron observadas el resultado se considera negativo.

con pepsina eliminó esta propiedad, indicando la presencia de factores proteicos en la adhesión. Por otro lado, un tratamiento con metaperiodato sobre las bacterias eliminó de la misma manera esta propiedad para las tres cepas sugiriendo la participación de componentes hidrocarbonados en la adherencia a Caco-2. La adherencia de las cepas 536, 537 y 5310 resultó altamente afectada por pretratamientos con agentes caotrópicos. El GnCl mostró un efecto más drástico. Estos resultados avalan la idea de que algunas de las moléculas superficiales responsables de la adherencia están unidas no covalentemente a la pared bacteriana.



**Figura 15.** Adherencia de *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 a monocapas de Caco-2. Efecto de diferentes tratamientos sobre las bacterias. Tinción de Gram modificada. Aumento  $\times 1200$  (A) Control sin tratamiento; (B) bacterias tratadas con metaperiodato 50mM; (C) bacterias tratadas con tripsina 1 mg/ml; (D) bacterias tratadas con GnCl 3M; (E) bacterias tratadas con LiCl 5M; (F) bacterias tratadas con tripsina y GnCl.

**Tabla 13.** Modificación de la adherencia a Caco-2 con bifidobacterias sometidas a diferentes tratamientos físicos, químicos y enzimáticos

Tratamiento	Adherencia a Caco-2		
	CIDCA 536	CIDCA 537	CIDCA 5310
<i>control</i>	++++	++++	++++
<i>LiCl</i>	+	+	+(+)
<i>GnCl</i>	-	-	-
<i>metaperiodato</i>	-	-	-
<i>tripsina</i>	++	++	++
<i>quimotripsina</i>	nd	++	++
<i>pepsina</i>	-	-	-
<i>calor</i>	nd	-	-

Escala: (-) no adhesión; (+) muy poca adhesión; (++) poca adhesión; (+++) mucha adhesión. Cuando el número de bacterias adherentes fue menor de 5 microorganismos por campo, se considera no adhesión (-)

La adherencia de bifidobacterias a las células Caco-2 se eliminó luego de un calentamiento de las bacterias a 100 °C. Estos resultados sugieren la presencia de un factor termolábil en la participación de la interacción bacteria-célula.

La cepa 537 fue utilizada para estudiar la presencia de factores solubles como mediadores de la adhesión bacteriana. Cuando el sobrenadante de cultivo en TPY fue reemplazado por medio fresco o buffer PBS, no se observó una reducción en la adherencia. Más aún, un tratamiento con tripsina o calor del sobrenadante, mostró los mismos patrones de adherencia que los de aquellas células resuspendidas en buffer. Estos resultados no apoyan la hipótesis de que un factor proteico secretado al sobrenadante sea el mediador de la adherencia ni que se inactive por

calor como sí ocurre en algunas cepas de lactobacilos<sup>59</sup>.

Similares resultados fueron obtenidos por Lankaputhra y Shah<sup>241</sup> trabajando con sobrenadantes de bifidobacterias crecidas en MRS adheridas a células HT-29, aunque no encontraron factores glicoproteicos involucrados en la adherencia de *Bif. infantis* 1912: un tratamiento con periodato no modificó las propiedades adherentes. Sin embargo, mediante microscopía de transmisión, estos autores pusieron en evidencia material intercelular proveniente de las células epiteliales HT-29 que actuaría como puente en la adherencia de *Bif. infantis* 1912, *Bif. bifidum* 1900 y *Bif. adolescentis* 1920 y sería de naturaleza proteica e hidrogenocarbonada.

Nuestras observaciones indican que existirían componentes superficiales fácilmente eliminables

con agentes caotrópicos involucrados en los mecanismos de adherencia de las cepas estudiadas a células intestinales humanas en cultivo. Estos determinantes de adhesión podrían ser glicoproteínas o cadenas de polisacáridos unidas a la pared celular. Las cepas ensayadas mostraron alta adherencia a Caco-2 y se encuentran entre otras cepas altamente adherentes aisladas en el CIDCA<sup>327</sup>. Probaron ser, además, altamente adherentes en comparación con resultados obtenidos por otros investigadores en estudios similares con otras bifidobacterias de origen humano<sup>21</sup>. El mecanismo de adherencia parece ser diferente de aquel de algunas cepas de lactobacilos, que se adhieren a través de componentes proteicos secretados<sup>67,184</sup>. Aunque se ha encontrado que cepas de lactobacilos se adhieren a células intestinales a través de mecanismos sensibles a proteasas<sup>21,67,60,167,347</sup> a veces con actividad de lectina hacia un hidrato de carbono específico<sup>2</sup>. Se ha sugerido que los ácidos lipoteicoicos son mediadores de la adherencia bacteriana<sup>423</sup>.

La adhesión de bifidobacterias a células intestinales se encuentra impulsada por un alto nivel de ácidos grasos y ácidos lipoteicoicos. La fuerte carga electrostática de los polisacáridos también favorece la adhesión de paredes celulares<sup>375,315</sup>. *Bif. longum* ATCC 15707 produce exopolisacáridos ricos en glucosa y galactosa y ácidos urónicos (hexosaminas) en una relación 4:4:1<sup>1</sup>.

Muchas estructuras moleculares están implicadas en la adherencia bacteriana, incluyendo fimbrias y vesículas extracelulares, adhesinas como lectinas, hemaglutininas y su actividad proteínica<sup>329</sup> y lipopolisacáridos<sup>266,267</sup>. También

han sido descritas estructuras consistentes en pili, fimbrias, componentes de pared celular o de la membrana externa y proteínas secretadas para una gran variedad de bacterias, tanto aeróbicas como anaeróbicas<sup>29,45,54,70,209,243,301</sup>. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que las cepas posean apéndices involucrados en la adherencia. Microscopías electrónicas de transmisión realizadas con bacterias de las cepas 537, 5310 y 5313 no mostraron apéndices (fimbrias o estructuras fibrilares) a los que se les podría adjudicar las propiedades de adherencia. Se observaron los mismos resultados con cultivos en medio líquido o en medio sólido. (datos no mostrados).

Se publicó que la adherencia de lactobacilos podría estar regulada por el pH<sup>166,167,184</sup>. La adherencia de *Lb. fermentum* 104 a epitelio escamoso de estómago de pollo es más efectiva a pH altos mientras que la adherencia a poliestireno de la misma cepa es mayor a pH entre 2 y 4<sup>184</sup>. Por otro lado, la adherencia de cepas de *Lactobacillus* a células del epitelio ileal aisladas de intestino de pollos fue insensible a los cambios de pH entre 4 y 7 aunque bajó marcadamente a pH 8<sup>213</sup>. Pero aunque el pH juegue un rol importante en estimular la adherencia, no es el único factor involucrado: *Lb. acidophilus* La10, una cepa no adherente, permaneció no adherente a cualquier pH<sup>166</sup>. Nuestros ensayos fueron realizados a pH neutro en los que la carga superficial de las bacterias es negativa.

Se ha propuesto un rol como mediador en la adherencia a los polisacáridos bacterianos. Costerton y col.<sup>72,73</sup> han sugerido un rol primordial de las capas de exopolisacáridos en todas las bacterias en la mediación o en el mantenimiento

## Capítulo II

de la adherencia al huésped. Cassels y col.<sup>54</sup>, publicaron la utilización de polisacáridos de pared celular como adhesina coagregante en *Streptococcus sanguis*. Exopolisacáridos de *Pseudomonas putida* y *Ps. fluorescens* parecen mediar la adherencia a superficies sólidas<sup>341</sup>. De la misma manera, la capa extracelular en *Mycoplasma mobile* podría actuar como adhesina temporaria en la mediación de la adherencia a su sustrato<sup>254</sup>. Por todo esto, no se descarta la posibilidad de la presencia de exopolisacáridos como mediadores de la adherencia en *Bifidobacterium*. Estos polisacáridos que podrían tener alguna participación en la hidrofobicidad superficial serían modificados por un tratamiento con metaperiodato eliminando las propiedades adherentes. Hosono y col.<sup>193</sup> aislaron exitosamente polisacáridos solubles producidos por *Bif. adolescentis* M101-4, *Bif. pseudocatenulatum* MBL8320 y *Bif. catenulatum* MBL8318 compuestos por cadenas de galactosa y glucosa, pero solo se exponen o se liberan cuando las células son lisadas.

Las ventajas de las células Caco-2 radican en que estas células expresan una diferenciación morfológica y funcional *in vitro* y muestran características de enterocitos maduros. Estas células muestran dos dominios claramente distinguibles: una zona apical y una basolateral separadas por uniones intercelulares<sup>399</sup>. Estos dominios poseen diferente composición proteica y lipídica que se evidencian ultraestructuralmente. Por ejemplo, el borde apical posee peptidasas, disacaridasas y fosfatasa alcalina<sup>331,176</sup>, el dominio basolateral contiene varios receptores peptídicos involucrados en el control de la secreción hidroelectrolítica intestinal<sup>235</sup> y las uniones

intercelulares contienen proteínas específicas. Por consiguiente, estas células son un modelo conveniente para estudiar los procesos de adhesión bacteriana. Debido a que los supuestos receptores de adherencia en las células Caco-2 pueden madurar a lo largo de la diferenciación, es importante conocer la etapa de diferenciación en la que se hacen los ensayos. Chauvière y col.<sup>59</sup> reportaron que *Lactobacillus* no se adhiere exitosamente a Caco-2 durante los primeros días de cultivo de estas células para luego incrementar su adherencia con el correr del tiempo, sugiriendo que la expresión de receptores está fuertemente relacionado con el estado de diferenciación de las células.

Algunos autores han publicado estudios de adhesión utilizando monocapas entre los pasajes 40 a 90 Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos encontrado resultados similares utilizando pasajes tan bajos como 23. El medio RPMI-1640 (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) puede ser reemplazado por DMEM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) sin diferencias significativas en los resultados. Se debe tener especial precaución con respecto a la suplementación del medio de cultivo ya que altas concentraciones de aminoácidos no esenciales al medio RPMI-1640 genera redondeo de las células las que pueden llegar a desprenderse de las fosas. Para proteger las monocapas los lavados se deben realizar con las soluciones correspondientes a T amb o a 37 °C.

Nuestros resultados indican que el modelo de células de la línea Caco-2 en cultivo fue adecuado para el estudio de la adherencia de bifidobacterias de la colección CIDCA a enterocitos.

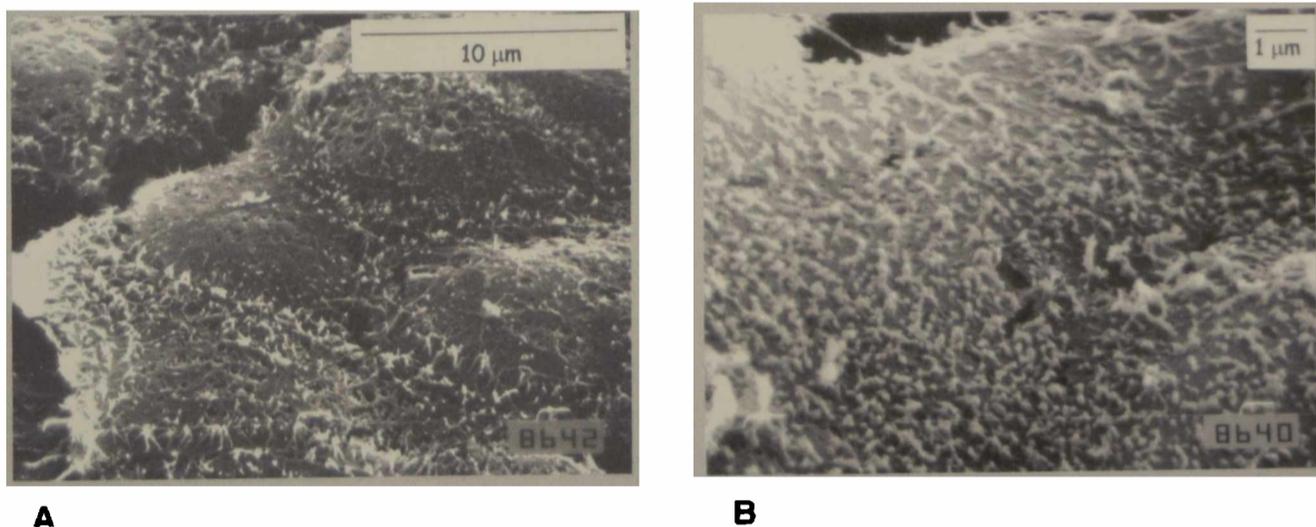
**Desarrollo de una técnica para observar la topología de la adherencia de bifidobacterias a Caco-2**

La adherencia de bifidobacterias y de otras bacterias probióticas a células epiteliales en cultivo ha sido anteriormente demostrada por microscopía electrónica de barrido (MEB)<sup>401,59,331,20,67,213,381</sup> mediante la técnica tradicional que involucra la utilización de OsO<sub>4</sub> como postfijador. En esta sección se propone un método alternativo para caracterizar morfológicamente la adhesión de bifidobacterias a Caco-2 evitando la utilización de OsO<sub>4</sub> considerando su toxicidad y costo.

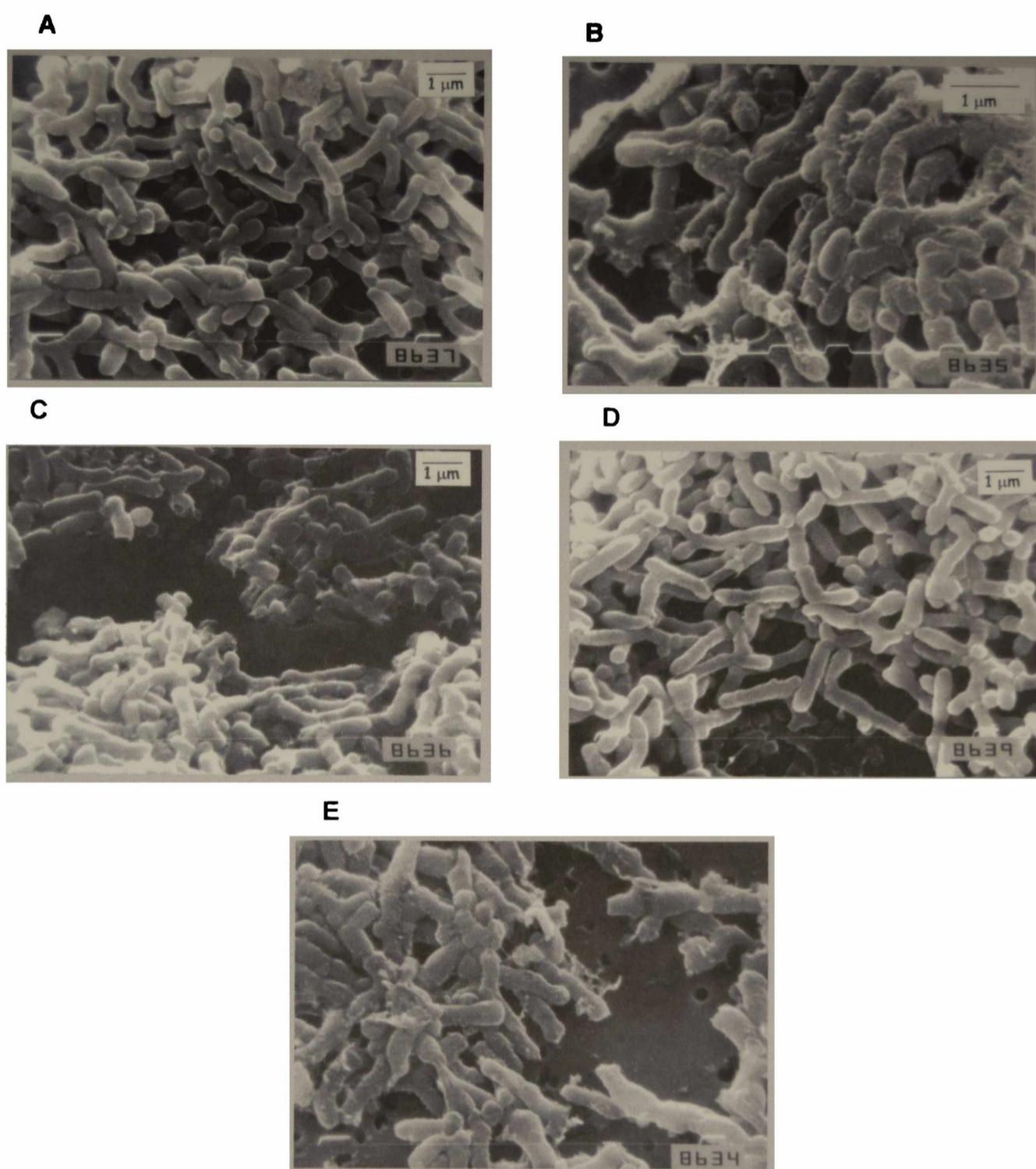
Como se explicó en la sección Metodología, se ensayaron diferentes fijadores y diferentes concentraciones de fijador a fin de determinar las condiciones óptimas de pretratamiento. Considerando que la pared de peptidoglicano confiere una protección osmótica adicional a las bacterias que no poseen las células eucarióticas, sugiriería que las etapas de fijación serían diferentes en ambos

casos, se trabajó con células bacterianas y con células eucarióticas por separado. Una de las innovaciones introducidas en este trabajo fue la implementación práctica de la fijación y los lavados de las bacterias. Las mismas fueron colocadas en una membrana resistente a solventes orgánicos contenida en un filtro plástico y a través de una jeringa se lavaron, enjuagaron y fijaron en sucesivas etapas.

Para las células Caco-2, se obtuvieron imágenes con buena definición independientemente del fijador utilizado (Figura 16). En ambos casos se mantuvo la integridad estructural de las células (*e.g.* se observan las microvellosidades intactas). Para las bacterias, se obtuvieron imágenes más limpias utilizando cultivos bacterianos más diluidos y mayor concentración de fijador. Fue mejor con glutaraldehído que con formaldehído (Figura 17).



**Figura 16.** Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido en el ensayo de puesta a punto del pretratamiento de células intestinales. (A) fijación con formaldehído 2.5%. (B) fijación con glutaraldehído 3%.



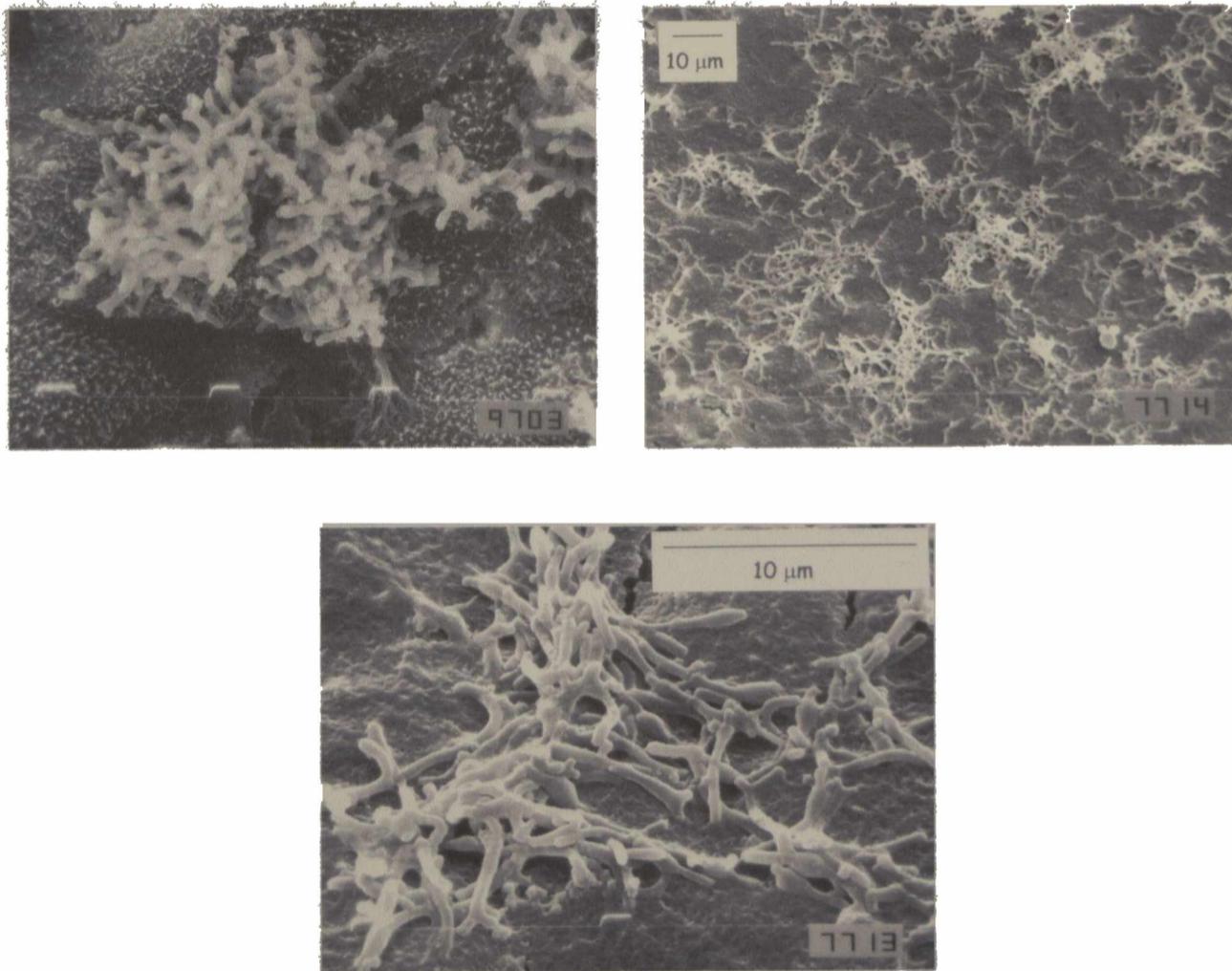
**Figura 17.** Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido en el ensayo de puesta a punto del pretratamiento de bacterias correspondientes a la cepa *Bif. bifidum* CIDCA 5310. (A) cultivo bacteriano (0.5 ml) fijado con formaldehído 1.5%; (B) cultivo bacteriano (1 ml) fijado con formaldehído 1.5%; (C) cultivo bacteriano (0.5 ml) fijado con formaldehído 2.5%; (D) cultivo bacteriano (0.5 ml) fijado con glutaraldehído 3%; (E) cultivo bacteriano (1 ml) fijado con glutaraldehído 3%.

A pesar de que se esperaba un efecto diferencial sobre las bacterias que sobre las células eucarióticas, no se observaron diferencias en las micrografías electrónicas de las células eucarióticas sometidas a similares tratamientos de fijación que

las bacterias (Figura 17). En base a estos resultados, los ensayos de adherencia fueron preparados para el MEB utilizando glutaraldehído 2.5% en PBS como fijador.

Las micrografías de barrido ilustran claramente que las células Caco-2 son extensamente colonizadas por las bacterias y que la unión de las bacterias ocurre en la superficie de los enterocitos (Figura 18). Las bifidobacterias interactúan con el borde apical de las células Caco-2 diferenciadas. Aunque las bifidobacterias producen ácido láctico y ácido acético como productos finales de su metabolismo que podrían alterar la integridad de la superficie apical, se observó que la adherencia

bacteriana ocurrió sin daño celular (observar las microvellosidades). Es notable la presencia de clusters densos en lugar de un patrón de adherencia difuso, indicando que existirían además interacciones bacteria-bacteria. Las bacterias se encuentran distribuidas al azar sobre la superficie formando una red de bacterias adheridas paralelamente a la superficie de la monocapa interactuando con la superficie celular y entre ellas mismas.



**Figura 18.** Topología de la adherencia de bifidobacterias a células Caco-2 por microscopía electrónica de barrido.

### Resumen de propiedades superficiales

En las tablas siguientes se resumen las observaciones realizadas con respecto a las propiedades superficiales estudiadas en este

Capítulo (Tabla 14 y 15) para cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

**Tabla 14.** Propiedades superficiales de *Bifidobacterium* en MRS y TPY

Propiedad	Medio	Cepa						
		531	532	536	537	538	5310	5313
<b>Índice de agregación (IA)</b>	TPY	0.15	0.26	0.42	0.33	0.15	0.70	0.53
	MRS	0.22	0.27	0.24	0.29	0.26	0.30	0.38
<b>Tiempo de agregación (TA)</b>	TPY	>25	>25	5	6	>25	2	0.6
	MRS	>25	>25	14	nd	>25	13	12
<b>Hidrofobicidad superficial (K)</b>	TPY	0.03	-	0.19	0.17	-	0.15	nd
	MRS	0.03	-	0.16	0.19	-	0.16	nd
<b>Hemaglutinación*</b>	TPY	-	-	1/4	1/4	-	1/4	1/8
	MRS	-	-	1/4	1/4	-	1/8	1/4
<b>Adherencia a Sepharose deriv.<sup>a</sup></b>	TPY	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	MRS	nd	nd	nd	1.20	nd	3.35	1.22
<b>% Adherencia a poliestireno</b>	TPY	nd	8.23	20.11	25.65	2.91	nd	nd
	MRS	43.61	9.05	33.01	40.53	4.55	32.74	58.27
<b>% Adherencia a Caco-2</b>	TPY	-	1.93	14.60	15.60	5.53	15.61	nd
	MRS	-	0.70	16.92	19.52	3.10	16.11	nd

\* Hemaglutinación evaluada frente a glóbulos rojos humanos grupo A

<sup>a</sup> Partículas de Sepharose cubiertas con BSM

(-) no-hemaglutinante, o no-hidrofóbica, o no-adherente

Nuestros resultados permitieron clasificar a las bifidobacterias en dos grupos: las autoagregantes y las no-autoagregantes. Las cepas pertenecientes al primer grupo correspondieron todas a la especie *bifidum*. Las no autoagregantes pertenecieron a las especies *pseudolongum*, *breve* e *infantis*. Con respecto a las propiedades superficiales evaluadas: todas las cepas autoagregantes resultaron hidrofóbicas y esta propiedad también se relacionó con la hemaglutinación. Estudios de adherencia indicaron que estas propiedades están

relacionadas con la adherencia a poliestireno y a células intestinales en cultivo. Estas cepas también se adhirieron a mucinas conjugadas a partículas de *Sepharose*. El medio de cultivo no influyó significativamente en las casi totalidad de las propiedades estudiadas; sólo se observó una modificación del grado de agregación reflejado en los valores de IA y TA.

Una excepción a estas observaciones la constituye la cepa 531 quien a pesar de ser no

## Capítulo II

autoagregante, mostró cierta hidrofobicidad superficial y alta adherencia a poliestireno. Estas últimas observaciones avalan fuertemente el carácter cepa dependiente de las propiedades superficiales.

Los tratamientos efectuados sobre las bacterias agregantes/adherentes a fin de establecer la naturaleza de las moléculas involucradas en las propiedades superficiales, indicaron que un tratamiento con proteasas elimina o reduce sensiblemente la autoagregación, la hemaglutinación y la adherencia a Caco-2, evidenciando la participación de factores proteicos en esta interacción. Un tratamiento con agentes caotrópicos reduce o elimina la hemaglutinación y la adherencia a Caco-2 aunque no la autoagregación. Esto indicaría que las moléculas involucradas en la interacción con células eucarióticas están unidas a la superficie

bacteriana por medio de uniones no covalentes. Un tratamiento térmico desestabilizaría la organización superficial y de este modo la interacción con eritrocitos y enterocitos se ve fuertemente afectada. Finalmente, un tratamiento con metaperiodato evidencia factores carbohidratos como mediadores de la hemaglutinación y la adherencia a células intestinales.

En conclusión, las propiedades superficiales de las bifidobacterias estarían tendrían un carácter multifactorial y estarían conferidas por factores proteicos e hidratos de carbono. Estos últimos como entidades independientes o como cadenas constituyentes de glicoproteínas o de ácidos lipoteicoicos. La hidrofobicidad superficial se puede adjudicar a regiones no polares de estas proteínas o de los ácidos lipoteicoicos.

**Tabla 15.** Modificación de las propiedades superficiales de *Bifidobacterium*

	<i>Autoagregación</i>				<i>Hemaglutinación</i>				<i>Adherencia a Caco-2</i>		
	536	537	5310	5313	536	537	5310	5313	536	537	5310
<i>control</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>calor</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	-	-
<i>tripsina</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	↓	↓	↓
<i>quimotripsina</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	nd	↓	↓
<i>pepsina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>LiCl</i>	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>GnCl</i>	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>EDTA*</i>	+	+	+	nd	+	+	+	nd			
<i>metaperiodato</i>	+	+	↓	+	-	-	↓	↓	-	-	-

\* la monocapa de Caco-2 se debilita luego de una incubación en presencia de EDTA, por lo que no se logró evaluar este tratamiento luego de lavados con EDTA

↓ : propiedad reducida

nd: no determinado

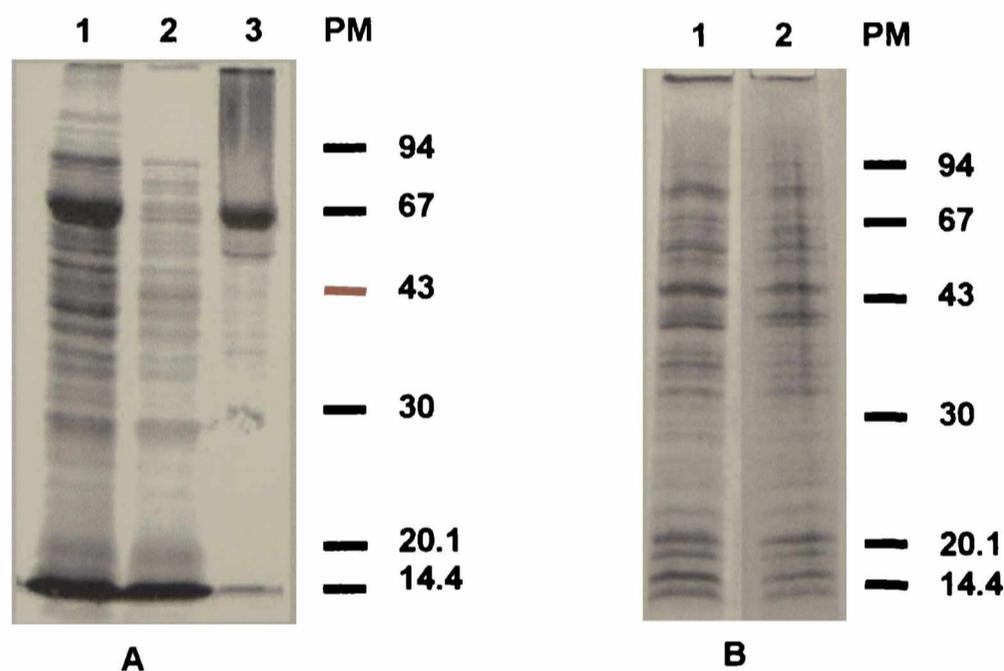
(-) propiedad eliminada

**Estudio de proteínas superficiales**

Nuestros estudios sobre propiedades superficiales de bifidobacterias sugieren la presencia de factores proteicos como responsables de la adherencia a células eucarióticas (eritrocitos, enterocitos). También se conoce que varias bacterias lácticas contienen, como varias otras bacterias Gram positivas, una capa de proteínas en el exterior de su pared celular. Estas proteínas forman parte de la llamada capa S (superficial) en subunidades idénticas que cubren completamente la superficie bacteriana y pueden constituir hasta el 20% del contenido total de proteínas. Se ha reportado la presencia de capa S en cepas de *Lb.brevis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus* y *Lb.*

*halveticus*<sup>449,35,430,50</sup>. Recientemente hemos detectado la presencia de capa S en cepas de *Lb. parakefir* y *Lb. kefir* provenientes de gránulos de kefir (datos no publicados).

Por lo tanto se aplicó una metodología para la extracción de proteínas pertenecientes a estas estructuras que fue optimizada en nuestro laboratorio para las cepas en estudio. La optimización de la metodología fue, en parte, realizada junto con la Dra. Graciela Garrote. Los extractos proteicos fueron analizados mediante electroforesis conjuntamente con las proteínas totales de las bacterias sin tratar y las extraídas.



**Figura 19.** Efecto del tratamiento con LiCl sobre las bacterias en el perfil de proteico de (A) *Lactobacillus parakefir* 8328 y en (B) *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310. Calles 1: proteínas totales solubles; Calles 2: proteínas totales solubles luego de la extracción con LiCl; Calle 3: extracto proteico dializado; PM patrones moleculares (en KDa)

Con respecto a las cepas de lactobacilos, el perfil de proteínas totales solubles muestra un patrón complejo de bandas, muchas de ellas bien

definidas (Figura 19). Entre ellas es notable la presencia de una banda más intensa de una masa molecular aproximada de 65 KDa. Luego de un

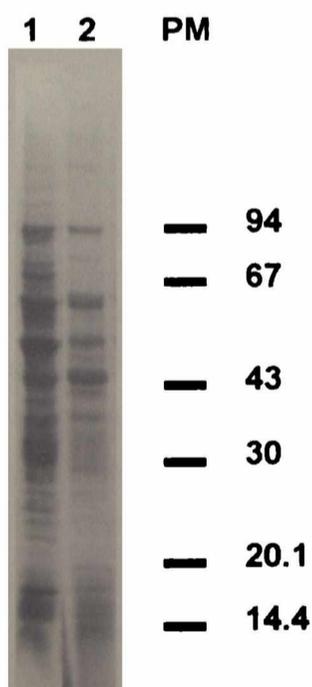
tratamiento con LiCl, se extrae principalmente dicha banda ya que se recupera mayoritariamente en el extracto dializado. Considerando su masa molecular, la técnica utilizada para su extracción y la cantidad relativa con respecto a las otras bandas, estaríamos en condiciones de considerar dicha banda como componente de capa S en lactobacilos.

Otra banda muy intensa se encuentra en el frente de corrida y corresponde a la lisozima utilizada en el proceso de obtención de proteínas totales solubles de las bacterias<sup>163</sup>.

Esta técnica se utilizó con éxito en la extracción de proteínas de capa S en otras 18 cepas de lactobacilos aisladas de diferentes gránulos de kefir y también en cepas de *Lb. kefir* y *Lb. parakefir* de colección. En consecuencia, este procedimiento se empleó para explorar la presencia de capa S en bifidobacterias.

El perfil de proteínas totales solubles obtenido para la cepa *Bif. bifidum* 5310 coincide con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en estudios de taxonomía de bacterias lácticas<sup>163</sup>. En dicho perfil no se observa una banda mayoritaria que se destaque del resto. Luego de un tratamiento con LiCl, la cepa 5310 muestra un perfil en el cual no se diferencia una banda que desaparezca mayoritariamente. Analizando la composición del sobrenadante de la extracción, se observa también un alto grado de complejidad sugiriendo que se estarían extrayendo una variada cantidad de péptidos.

Otro de los agentes caotrópicos comúnmente utilizados para la extracción de capa S es el GnCl. El tratamiento con este reactivo no mostró la extracción mayoritaria de una banda o de un grupo limitado de péptidos. En consecuencia, nuestros resultados indicarían la ausencia de una estructura tipo capa S en la superficie de las cepa 5310.

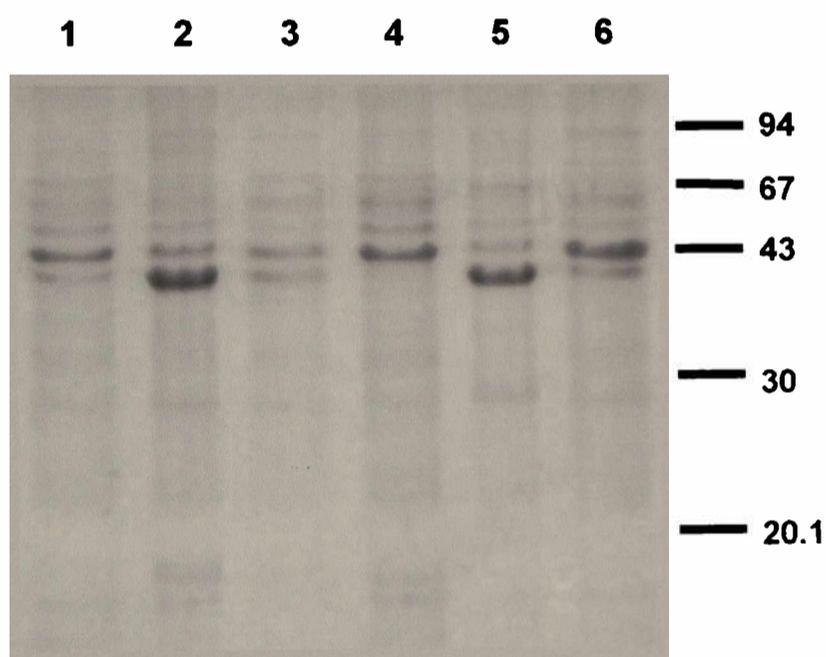


**Figura 20.** Efecto del tratamiento con GnCl sobre *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 en el perfil de proteínas totales. Calle 1: proteínas totales solubles; Calle 2: proteínas totales luego de la extracción con GnCl. (gradiente 10-18%); PM patrón de pesos moleculares (en KDa).

## Capítulo II

En vista de la complejidad que presentó el análisis de proteínas superficiales extraídas con LiCl y GnCl, y las evidencias experimentales que avalan fuertemente la participación de factores proteicos, se procedió a estudiar la composición proteica de paredes celulares extraídas mecánicamente. Los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 21. Las dos cepas estudiadas (*Bif. bifidum* 537 y *Bif. bifidum* 5310)

mostraron claramente la presencia de proteínas en la fracción correspondiente a paredes celulares. En este caso, se obtuvieron geles con una buena resolución. Por otro lado, las cepas 537 y 5310 poseen un perfil diferente cuando provienen de crecimiento en TPY o en MRS. Una banda de peso molecular aproximado de 42 kDa solo es visible cuando las bacterias fueron crecidas en MRS.



**Figura 21.** Perfil de proteínas de paredes celulares de las cepas *Bif. bifidum* CIDCA 537 y *Bif. bifidum* CIDCA 5310 crecidas en TPY o MRS. Efecto del pretratamiento de las bacterias con pepsina 2.5 mg/ml. Calle 1: *Bif. bifidum* 537 crecida en TPY; calle 2: *Bif. bifidum* 537 crecida en MRS; calle 3: *Bif. bifidum* 537 crecida en MRS tratada con pepsina; calle 4: *Bif. bifidum* 5310 crecida en TPY; calle 5: *Bif. bifidum* CIDCA 5310 crecida en MRS; *Bif. bifidum* 5310 crecida en MRS tratada con pepsina. PM patrón de pesos moleculares (en kDa)

De acuerdo a los resultados mostrados en este capítulo acerca de las propiedades superficiales, se demostró que ambas cepas son autoagregantes y hemaglutinantes e hidrofóbicas; y presentan estas propiedades en los dos medios estudiados. Por lo tanto, la banda de 42 kDa observada en las paredes de los microorganismos crecidos en MRS no sería una responsable directa en la manifestación de las propiedades citadas. Esto se

debe a que dicha banda no está presente cuando las bacterias son crecidas en TPY (cepa 5310) o esta presente en baja proporción (cepa 537).

Un tratamiento de las bacterias frescas con pepsina reduce sensiblemente la cantidad del péptido de 42 kDa cuando las cepas son crecidas en MRS. Este punto es de relevancia considerando que por ejemplo, el carácter hemaglutinante

## Capítulo II

desaparece en estas cepas luego de un tratamiento con esta proteasa. De esta manera, el péptido podría tener participación en la manifestación de esta propiedad.

Analizando ambos resultados concluimos que aún con estos ensayos, no fue posible identificar el/los componente(s) proteicos que estarían confiriendo las propiedades estudiadas en este capítulo, ya que por un lado, los microorganismos que presentan hidrofobicidad, hemaglutinación y autoaglutinación cuando son crecidos en ambos medios, manifiestan un diferente patrón de bandas en las electroforesis; y por otro lado, un tratamiento con pepsina que elimina la hemaglu-

tinación de estas cepas, elimina una banda que está ausente en las paredes de bacterias que siguen manifestando hemaglutinación.

Las péptidos analizados podrían estar actuando de manera indirecta, estabilizando otras estructuras que participan directamente en la manifestación de estas propiedades.

Es importante notar que luego de realizar el prensado de las bacterias (prensa X), las mismas fueron centrifugadas inmediatamente y procesadas en frío de modo que la presencia de cualquier actividad proteolítica de componentes citoplasmáticos queda descartada.

### **Conclusiones**

- Se caracterizó la superficie de microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium* a través de un estudio sistemático que emplea una secuencia de modelos experimentales.
- Los modelos utilizados permitieron obtener información acerca de la naturaleza de los componentes superficiales de las bifidobacterias y la participación de estos factores en los mecanismos de adherencia, considerada como un criterio de selección de bacterias probióticas.
- Se correlacionaron las propiedades de superficie: la hidrofobicidad se relaciona con un alto índice de agregación. En general, las bacterias hidrofóbicas estudiadas resultaron hemaglutinantes y adherentes a superficies inertes o biológicas. Por el contrario, aquellas cepas no hidrofóbicas no formaron agregados, no hemaglutinaron y no se adhirieron a sustratos sólidos y biológicos.
- En general, todas las que presentaron las propiedades adherentes e hidrofóbicas fueron *Bifidobacterium bifium* y desde el punto de vista cualitativo, no presentaron diferencias en su características de superficie.
- Los mecanismos de adherencia a células eucarióticas mostraron un carácter multifactorial en el que estarían involucrados factores hidrofóbicos, probablemente de origen proteico; factores glucídicos, como estructuras independientes o formando parte de glicoproteínas o ácidos lipoteicoicos. Los factores involucrados estarían unidos a la pared bacteriana mediante uniones no covalentes. Estos factores podrían mantener su estructura mediante interacciones no

## Capítulo II

---

covalentes y por lo tanto, un tratamiento con agentes caotrópicos desplegaría las estructuras variando la posición de los dominios adherentes.

● Las correlaciones entre propiedades superficiales son de relevancia al momento de seleccionar bacterias probióticas cuando se cuenta con un gran número de cepas candidatas, ya que las medidas experimentales requeridas son simples y rápidas y permiten diferenciar en forma preliminar

aquellas con mayor potencial para adherirse al epitelio intestinal.

● En el caso particular de este estudio, si el objetivo es seleccionar bacterias con capacidad de adherirse a células de origen intestinal, los candidatos serían las cepas *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 536, CIDCA 537, CIDCA 5310 y CIDCA 5313.



## **CAPÍTULO III**

## CAPÍTULO III

**N**umerosas actividades fisiológicas han sido propuestas como mecanismos responsables de la eliminación de microorganismos patógenos por parte de las bacterias probióticas. Los mecanismos propuestos de acuerdo a evidencias científicas incluyen:

- *competencia por nutrientes presentes en cantidades limitadas.* La hipótesis de que la competencia por nutrientes es responsable de la exclusión de microorganismos foráneos del intestino está basada en una serie de observaciones que indican que los mecanismos de control poblacionales en el intestino son consistentes con la teoría del quimiostato<sup>3</sup>. Haines y Harmon<sup>169</sup> demostraron un efecto inhibitorio de las bacterias lácticas debido a competencia por vitaminas esenciales como biotina y niacina. La captación de hierro por las bifidobacterias podría causar inhibición de bacterias entéricas por limitación del mismo<sup>298</sup>;
- *producción de metabolitos que inhiben la multiplicación de patógenos,* como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetilo o compuestos inhibitorios específicos (bacteriocinas). En presencia de O<sub>2</sub>, las bacterias lácticas producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podría causar peroxidación de los lípidos de membrana<sup>293</sup>. El diacetilo, producido por metabolización del piruvato, interfiere en la utilización de arginina en bacterias Gram positivas<sup>208</sup>. Gran cantidad de bacteriocinas han sido aisladas de bacterias lácticas y caracterizadas en su modo de acción<sup>139,298</sup>;
- *generación de condiciones microambientales que afecten negativamente a las bacterias patógenas.* La disminución del potencial redox o del pH luminal mediante la producción de ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico) puede llevar

a un antagonismo competitivo<sup>298</sup>, el CO<sub>2</sub> producido por fermentación de hexosas o a partir de arginina, citrato o malato también contribuye a la actividad antimicrobiana creando un ambiente anaeróbico reemplazando el O<sub>2</sub>;

- *modulación de la respuesta inmune*, por inducción de actividad celular (en natural killer, monocitos o macrófagos) o en la producción de inmunoglobulinas y citoquinas; y
- *competencia por sitios de unión al epitelio intestinal*. Kabir y col.<sup>215</sup> reportaron la habilidad de *Lb. salivarius* de inhibir la adherencia de *Helicobacter pylori*. Otros investigadores han demostrado la exclusión competitiva de enteropatógenos por bifidobacterias<sup>20</sup> y por lactobacilos<sup>65</sup> a través de un bloqueo de los sitios de unión de los patógenos o por impedimento estérico.

La adherencia de microorganismos a la superficie epitelial es uno de los eventos iniciadores más importantes en muchas infecciones gastrointestinales, ya que de esta manera los patógenos evitan ser removidos por las secreciones del hospedador o por el flujo intestinal<sup>118</sup>. Esta asociación específica con las células intestinales promueve lesiones en el ribete en cepillo, permite la entrada de los microorganismos y posteriormente la proliferación bacteriana que conlleva a la muerte celular y descamación. Una inhibición en la asociación e invasión de microorganismos patógenos disminuirá la colonización intestinal y modificará los procesos de patogenicidad. Por lo tanto, esta propiedad es considerada una característica de selección de bacterias probióticas y cumpliría un rol positivo en la prevención y tratamiento de desórdenes

gastrointestinales. Si bien la microflora indígena en el intestino puede inhibir la colonización de microorganismos foráneos, en algunos casos los microorganismos patógenos son capaces de penetrar y/o colonizar estas superficies del cuerpo debido a un ataque masivo o por una reducción temporal de la resistencia a la colonización. Los mecanismos de toxicidad celular causados por los microorganismos patógenos en la mucosa intestinal pueden reflejarse a nivel estructural como inflamación, necrosis o liberación de fluidos al lumen intestinal, ya sea directamente por invasión o por liberación de toxinas<sup>55,165</sup>. La invasión de los enterocitos por *Shigella*, por ejemplo, puede iniciar una recto-colitis destructiva que causa síntomas de disentería y es posible que como consecuencia la respuesta inmune pueda limitar la diseminación sistémica<sup>368</sup>. *Salmonella*, por el contrario desarrolló la estrategia de supervivencia intracelular, mientras que *Yersinia* posee gran potencial antifagocítico que le permite permanecer luego de la invasión intestinal, en forma extracelular en los nódulos linfáticos infectados<sup>210</sup>. Las bacterias probióticas se presentan entonces como una alternativa para inhibir alguna de las etapas involucradas en el daño celular producido por los patógenos.

*Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son dos géneros que han demostrado ser adherentes al epitelio intestinal *in vitro*<sup>315,371,82,327</sup> y evidencias de esto se mostraron en el Capítulo II de esta Tesis. Varios autores han demostrado que de esta manera se puede evitar la interacción entre las células epiteliales y enteropatógenos como *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, EPEC (*E. coli* enteropatógena), ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), etc.<sup>60,20,32,78</sup> Los mecanismos mediante los cuales las bacterias probióticas

pueden interactuar con las patógenas en el entorno gastrointestinal son:

- *exclusión competitiva*, en el que una especie bacteriana instalada sobre un sustrato ocupa sitios de adherencia de otras especies con las cuales compete;
- *desplazamiento*, en el cual una especie desplaza de su adhesión a un sustrato a una especie previamente instalada; o
- *competencia*, en el que dos especies compiten en el mismo momento por sitios de adhesión.

Debido a la complicación que originan los estudios de infección en humanos, es común la utilización de modelos animales o estudios *in vitro*. Los cultivos de tejidos *in vitro* ofrecen nuevamente un modelo experimental adecuado. En particular, las células Caco-2 son un modelo estable y reproducible que permite una evaluación de la capacidad de bacterias probióticas para inhibir la asociación o invasión de enteropatógeno *in vitro*.

### **Objetivos**

En la tercera parte de este trabajo de Tesis se abordaron los siguientes objetivos:

- Caracterizar bacterias patógenas gram negativas obtenidas de muestras clínicas en cuanto a sus propiedades adherentes e invasivas en el modelo *in vitro* de cultivo de células de la línea Caco-2
- Estudiar la interacción entre cepas de *Bifidobacterium* y bacterias patógenas en el modelo *in vitro* de cultivo de células Caco-2, evaluando la influencia de *Bifidobacterium* en la invasión y/o asociación de patógenos a las monocapas de células Caco-2
- Estudiar el efecto citopático de enteropatógenos frente a células Caco-2 y la potencial protección por bifidobacterias

## **Metodología**

**Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.** Las cepas de bacterias Gram negativas utilizadas en este trabajo fueron provistas por el Dr Horacio Lopardo (Hospital Garrahan, Bs. As., Argentina). Las cepas fueron aisladas de muestras clínicas de pacientes con desórdenes gastrointestinales. Se trabajó con las cepas *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 18773, *Escherichia coli* entropatogénica (EPEC) 18731, *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) 173, *Salmonella enterica* serovar. *infantis*, *Salmonella* sp. 521, *Shigella sonnei* 170, *Shigella sonnei* 171 y *Shigella flexneri*.

Las cepas se reactivaron por inoculación de una ansada en caldo nutritivo (0.3% extracto de carne, 0.5% peptona de carne) (Merck, Darmstadt, Alemania) a partir de estrías en agar nutritivo

conservadas a 0 °C. La incubación se realizó en aerobiosis a 37 °C por 24 hs. Luego se hizo un segundo repique al 1% en caldo nutritivo incubando en las mismas condiciones. Esta suspensión se utilizó en los ensayos que se describirán más adelante.

Se realizó una tipificación de rutina en base a las pruebas bioquímicas que establece el Manual Bergey. Además, para algunas cepas se realizó una tipificación mediante el sistema EM Ident E® (Merck, Darmstadt, Alemania). Como información adicional, las cepas fueron caracterizadas por el Dr. G. Kociubinski y la Dra. G. L. Garrote en cuanto a su sensibilidad a antibióticos mediante un antibiograma (Britania S.A., Buenos Aires, Argentina). La sensibilidad a antimicrobianos que presentan estas cepas se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Sensibilidad de patógenos aislados de muestras clínicas a antimicrobianos.

Antimicrobiano	EPEC 18731	EIEC 173	EHEC 18773	Salmonella 521	Salmonella enterica	Shigella sonnei 170	Shigella sonnei 171
Ampicilina	R	R	S	R	S	S	S
Neomicina	I	I	S	I	I	I	I
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S
TMS	S	R	S	S	S	S	S
Cloramfenicol	S	S	S	R	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S	nd	S
Colistina	I	I	I	I	I	I	I
Gentamicina	R	I	I	R	R	R	R

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena; EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva; EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica; TMS: Trimetoprima + Sulfametoxazol; S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente

**Determinación de la relación entre DO<sub>600</sub> y UFC/ml.**

En los ensayos de competencia, exclusión o desplazamiento que se realizaron en este trabajo entre bacterias patógenas y bifidobacterias, fue necesario preparar suspensiones bacterianas de concentraciones predeterminadas. Para ello, un parámetro útil que facilitó la realización de los experimentos fue conocer el número de UFC/ml por unidad de DO<sub>600</sub>. De esta manera, cuando se utilizaron cultivos en la misma fase de crecimiento, realizando medidas de absorbancia a 600 nm se conoció el título bacteriano aproximado de las suspensiones a

utilizar, sin tener que esperar el resultado del recuento de viables.

El protocolo es sencillo y consistió en medir la DO a 600 nm de suspensiones bacterianas por duplicado y luego, tras diluciones apropiadas en triptona 0.1%, se realizó un recuento de viables en agar nutritivo para las bacterias patógenas o en agar MRS para las bifidobacterias. Las condiciones de incubación se detallaron en el Capítulo I. Se contaron las placas conteniendo de 30 a 300 colonias.

**1) Caracterización de la adherencia y capacidad invasiva de bacterias patógenas en el modelo Caco-2**

Para determinar el nivel de internalización o invasión de bacterias patógenas a células Caco-2 y posteriormente estudiar el efecto de las bifidobacterias sobre esta propiedad, se realizó un ensayo comúnmente utilizado<sup>21</sup> para obtener

información acerca de diferentes eventos en la asociación e invasión *in vitro*. Dicho ensayo se basa en diferenciar bacterias "adheridas" de bacterias "internalizadas" en la monocapa de células Caco-2 por medio de una incubación con el

antibiótico aminoglucósido gentamicina. Como la gentamicina no difunde a través del dominio apical de las células Caco-2, las bacterias sensibles a gentamicina que no se internalizan en las Caco-2 son rápidamente destruidas por el antibiótico, mientras que las localizadas dentro de las Caco-2 no. Luego del tratamiento y tras sucesivos lavados para eliminar el antibiótico, el número de bacterias invasivas se cuantifica, tras diluciones adecuadas, por recuento de viables de un lisado de la monocapa. Por consiguiente, fue necesario determinar la concentración y el tiempo de incubación con gentamicina necesario para lograr matar las bacterias adheridas que posteriormente permitió conocer el perfil de invasividad de las bacterias patógenas seleccionadas.

***Determinación de la concentración bactericida de gentamicina.*** Un antibiograma realizado previamente en nuestro laboratorio reveló que las bacterias patógenas son resistentes o poseen sensibilidad intermedia frente a gentamicina (Tabla 1). El protocolo utilizado para conocer las condiciones bactericidas de un tratamiento con gentamicina fue una modificación del ensayo estándar para obtener la concentración bactericida mínima:

- Preparar una suspensión de cada una de las bacterias patógenas de aprox.  $10^7$  UFC/ml en triptona 0.1% (Difco Laboratories, Detroit, MI) a partir de un cultivo de 24 hs. Si bien esta suspensión se preparó en forma aproximada en base a la relación (UFC/ml)/ $DO_{600}$  obtenida previamente, se realizó en paralelo un recuento de viables confirmatorio con una alícuota de esta suspensión.

- Fraccionar las suspensiones en dos grupos de 4 tubos de ensayo estériles para cada cepa.
- A un grupo de tubos adicionar gentamicina (Droguería Gatti, La Plata, Argentina; 619 U/mg) en una concentración final de 150  $\mu$ g/ml. Al otro grupo de tubos se les adiciona gentamicina hasta una concentración final de 300  $\mu$ g/ml.
- Incubar todos los tubos en aerobiosis sin agitación a 37 °C.
- Luego de 60 min, se saca un tubo de cada cepa de la estufa, se toman dos alícuotas de 100  $\mu$ l de cada uno y se reparten en sendas cajas de Petri preparadas con agar nutritivo. Las cajas se incuban en aerobiosis a 37 °C y al cabo de 24 hs se cuentan las colonias presentes.
- Se repite esta operación con los tubos correspondientes a las 2, 3 y 4 hs de incubación con gentamicina.
- El tiempo de incubación al cual no se observan colonias y su correspondiente concentración de gentamicina serán las condiciones en las cuales se realizarán los ensayos de invasividad.

***Ensayo de adherencia e invasión.*** Una vez conocida las condiciones bactericidas, se plantea el siguiente ensayo para determinar la capacidad adherente e invasiva de las cepas enteropatógenas.

- Cultivar una monocapa de células Caco-2 en una placa de 24 fosas durante 21 días como se describió en los Capítulos I y II.

- Lavar la monocapa 2 veces con buffer PBS a 37 °C para eliminar el medio de cultivo y restos de células eucarióticas dañadas.
- Preparar una suspensión de bacterias enteropatógenas de 10<sup>8</sup> UFC/ml en PBS.
- Destinar 4 fosas de la placa para cada cepa y colocar 0.5 ml de suspensión de cada microorganismo en dichas fosas. Incubar durante 1 h a 37 °C.
- Luego de la incubación, lavar tres veces con buffer PBS con el objeto de eliminar los microorganismos no adheridos.
- Para determinar "asociación" (bacterias adheridas + bacterias internalizadas), colocar 0.5 ml de agua bidestilada estéril para despegar la monocapa. Realizar diluciones apropiadas de cada suspensión y plaquear en agar nutritivo.
- Para determinar "invasión", colocar 0.5 ml de gentamicina 200 µg/ml para eliminar bacterias

adheridas que no lograron invadir la monocapa. Incubar 1 h a 37 °C (condiciones que fueron obtenidas en los ensayos propuestos en el inciso anterior). Luego de la incubación, despegar la monocapa dos veces para eliminar el antimicrobiano y adicionar 0.5 ml de agua bidestilada estéril para levantar la monocapa. Realizar diluciones apropiadas de cada suspensión y plaquear en agar nutritivo. Representar el nivel de adherencia e invasión para cada cepa como UFC/fosa.

Es importante aclarar que mediante este ensayo se pueden determinar en forma directa las bacterias asociadas y las invasivas. Las bacterias asociadas incluyen tanto las adheridas que no lograron invadir como las internalizadas.

## **2) Efecto de bifidobacterias sobre asociación de patógenos a células epiteliales en cultivo**

El efecto de las bifidobacterias sobre la asociación (adherencia + invasión) de enteropatógenos fue evaluado de acuerdo a un protocolo ampliamente utilizado para estudiar desplazamiento, exclusión o competencia entre cepas bacterianas sobre monocapas de células intestinales<sup>60,67,122</sup> Se describe a continuación el ensayo estándar del cual se hicieron modificaciones que se detallarán oportunamente.

- Cultivar una monocapa de células Caco-2 en una placa de 24 fosas durante 21 días como se describió en los Capítulos I y II.
- Lavar la monocapa 2 veces con buffer PBS a 37 °C (también puede ser solución GKN) para eliminar el medio de cultivo y restos de células eucarióticas dañadas.
- Preparar una suspensión de bifidobacterias y de bacterias patógenas en PBS o GKN en concentraciones que se establecerán de acuerdo al

ensayo, utilizando la relación (UFC/ml)/DO<sub>600</sub> calculada previamente. Realizar un recuento confirmatorio de bacterias patógenas por plaqueo en agar nutritivo.

- Colocar 0.5 ml de suspensión de bifidobacterias en tres fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Colocar 0.5 ml de suspensión de patógenos en las mismas fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Lavar las fosas al menos tres veces a fin de eliminar microorganismos no adheridos.
- Colocar 0.5 ml de agua bidestilada estéril e incubar 1 h a 37 °C para lisar la monocapa.
- Realizar diluciones apropiadas en triptona 0.1% y plaquear en agar nutritivo. Incubar las placas 24 hs a 37 °C en aerobiosis. En estas condiciones no desarrollan las bifidobacterias y por lo tanto las únicas colonias que aparecen corresponden a las provenientes de bacterias patógenas.
- Expresar el resultado en UFC/fosa o %Asociación

**Controles:** Los controles tienen el objeto de conocer la adherencia de patógenos sin el agregado de bifidobacterias. Se prepararon en la

misma placa en la que se realizaron los ensayos con bifidobacterias de la siguiente manera:

- Sobre una monocapa lavada, colocar 0.5 ml de buffer PBS durante 1 h a 37 °C (durante este tiempo, las fosas contiguas poseerán suspensión de bifidobacterias).
- Colocar 0.5 ml de suspensión de patógenos en tres fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Lavar las fosas al menos tres veces a fin de eliminar microorganismos no adheridos.
- Colocar 0.5 ml de agua bidestilada estéril e incubar 1 h a 37 °C para lisar la monocapa.
- Realizar diluciones apropiadas en triptona 0.1% y plaquear en agar nutritivo. Incubar las placas 24 hs a 37 °C.
- Expresar el resultado en UFC/fosa o %Asociación

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada placa, con dos cultivos independientes (de bifidobacterias y enteropatógenos) sobre células Caco-2 entre los pasajes 23 a 42. En cada etapa de incubación se observó el estado de la monocapa en un microscopio invertido XSB-1A (Wuzhou Optical Instrument Factory).

### ***3) Efecto de bifidobacterias sobre la invasión de patógenos a células epiteliales en cultivo***

Básicamente se trata de un ensayo similar al anterior en el que se intercala un tratamiento con gentamicina para eliminar bacterias adheridas y así

diferenciar las internalizadas de las que no lograron invadir la monocapa. El protocolo estándar se describe a continuación.

- Cultivar una monocapa de células Caco-2 en una placa de 24 fosas durante 21 días como se describió en los Capítulos I y II.
- Lavar la monocapa 2 veces con buffer PBS a 37 °C (también puede ser solución GKN) para eliminar el medio de cultivo y restos de células eucarióticas dañadas.
- Preparar una suspensión de bifidobacterias y de bacterias patógenas en PBS o GKN en concentraciones que se establecerán de acuerdo al ensayo, utilizando la relación (UFC/ml)/DO<sub>600</sub> calculada previamente. Realizar un recuento confirmatorio de bacterias patógenas por plaqueo en agar nutritivo.
- Colocar 0.5 ml de suspensión de bifidobacterias en tres fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Colocar 0.5 ml de suspensión de patógenos en las mismas fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Lavar las fosas al menos tres veces a fin de eliminar microorganismos no adheridos.
- Colocar 0.5 ml de gentamicina 200 µg/ml en PBS e incubar 1 h a 37 °C
- Lavar las fosas dos veces con PBS para eliminar el antibiótico y colocar 0.5 ml de agua bidestilada estéril e incubar 1 h a 37 °C para lisar la monocapa.
- Realizar diluciones apropiadas en triptona 0.1% y plaquear en agar nutritivo. Incubar las placas 24 hs a 37 °C en aerobiosis.
- Expresar el resultado en UFC/fosa o %Invasión.

**Controles:** Los controles tienen el objeto de conocer la invasividad de patógenos sin el agregado de bifidobacterias. Se prepararon en las mismas placas en las que se realizaron los ensayos con bifidobacterias:

- Sobre una monocapa lavada, colocar 0.5 ml de buffer PBS durante 1 h a 37 °C (durante este tiempo, las fosas contiguas poseerán suspensión de bifidobacterias).
- Colocar 0.5 ml de suspensión de patógenos en tres fosas e incubar 1 h a 37 °C.
- Lavar las fosas al menos tres veces a fin de eliminar microorganismos no adheridos.
- Colocar 0.5 ml de gentamicina 200 µg/ml en PBS e incubar 1 h a 37 °C
- Lavar las fosas dos veces con PBS para eliminar el antibiótico y colocar 0.5 ml de agua bidestilada estéril e incubar 1 h a 37 °C para lisar la monocapa.
- Realizar diluciones apropiadas en triptona 0.1% y plaquear en agar nutritivo. Incubar las placas 24 hs a 37 °C en aerobiosis.
- Expresar el resultado en UFC/fosa o %Invasión.

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada placa, con dos cultivos independientes (de bifidobacterias y enteropatógenos) sobre células Caco-2 entre los pasajes 23 y 42. En cada etapa de incubación se observó el estado de la monocapa en un microscopio invertido XSB-1A (Wuzhou Optical Instrument Factory).

**OBSERVACIÓN:** El protocolo descrito permite obtener información sobre la *exclusión* de patógenos por las cepas de bifidobacterias. Pero esta metodología se puede utilizar además para estudiar *competencia* de probióticos y patógenos. En este caso se realiza una incubación conjunta de ambas especies bacterianas sobre la monocapa. También se puede utilizar para estudiar *desplazamiento* de patógenos y para ello se incuban previamente las bacterias patógenas y luego se realiza una incubación con las bifidobacterias. El estado fisiológico y la concentración bacteriana, así como los tiempos de incubación pueden variarse según sea el efecto buscado.

**Microscopía electrónica de barrido.** Las monocapas de células Caco-2 se observaron por microscopía electrónica de barrido de acuerdo al protocolo anteriormente detallado (Capítulo I,<sup>27</sup>).

Brevemente, las monocapas de crecieron en cubreobjetos de vidrio y sobre ellas se realizaron los ensayos de adherencia e invasión ya descritos. Luego de lavar las monocapas tres veces con PBS para eliminar bacterias no adheridas se fijaron con glutaraldehído 3% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) a 15-18 °C por 16 hs. Posteriormente, las monocapas se lavaron dos veces con buffer PBS y se deshidrataron en forma secuencial con soluciones de etanol (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada de concentraciones crecientes: 15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% (etanol absoluto).

Los especímenes se colocaron en isoamilalcohol (Merck, Darmstadt, Alemania) durante

10 min y se secaron por punto crítico en CO<sub>2</sub> líquido (Baltec CP-30, Japón). Las muestras secadas se montaron en tacos metálicos y se cubrieron con una lámina de Au 24 durante 4 a 5 min en vacío (Fine Coat Sputer JFC-1100). Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico (Jeol JSM-T 100, Jeol Ltd., Japón) operado a 10 o 15 kV.

Se analizaron muestras de monocapas Caco-2 incubadas solamente con *Salmonella entérica*, solamente con *Bif. bifidum* (537 ó 5310) e incubadas con ambos microorganismos.

**Ensayos de coagregación bacteriana.** Un método cinético fue utilizado para determinar la presencia de coagregación entre bifidobacterias y enteropatógenos. Si se monitorea la sedimentación por gravedad turbidimétricamente en el tiempo, se puede obtener la tasa de sedimentación. Esta es función de la masa promedio de los agregados. Tomando la pendiente en el origen de estas curvas se puede conocer la masa promedio de los agregados. Por lo tanto, este método mide solamente el tamaño de los agregados independientemente de su cantidad<sup>51</sup>.

Estos experimentos se desarrollaron incubando 0.5 ml de una suspensión de enteropatógenos con 0.5 ml de una suspensión de bifidobacterias en las concentraciones que se utilizaron para los ensayos de adherencia. Luego de 1 h a 37 °C, la suspensión mixta resultante se colocó en una cubeta plástica en un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Fullerton, CA) o Metrolab RC 325 (Laboratorio Rodríguez Corswant, Bernal) se monitoreó el descenso en la turbidez por

sedimentación durante 15-20 min a intervalos regulares. Suspensiones de bifidobacterias solas

fueron utilizadas como controles. Cada experimento fue realizado por duplicado.

#### **4) Evaluación de daño celular o efecto citopático.**

La cuantificación del daño celular fue realizado a través de medidas de actividad metabólica o bioquímica de las células eucarióticas. Se implementaron dos tipos de ensayos que se describirán a continuación:

##### **a) Reacción del MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio)**

Este ensayo pone en evidencia la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células eucarióticas. Las sales amarillas del reactivo tratrazolio son oxidadas a un compuesto púrpura de formazán, por células metabólicamente activas. Por consiguiente, el daño celular se relaciona con una menor actividad mitocondrial. Este ensayo ha sido utilizado con anterioridad para medir proliferación celular y citotoxicidad<sup>123</sup>). Considerando que las bacterias podrían interferir en esta reacción oxidando el reactivo, se incluyeron controles bacterianos sin monocapa. El protocolo consistió en los siguientes pasos:

- Luego de realizar los ensayos de exclusión o competencia, colocar 0.5 ml de buffer PBS y despegar la monocapa pipeteando vigorosamente.
- Colocar en cada fosa 50 µl de reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil

tetrazolio) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 5 mg/ml en PBS. Homogeneizar bien.

- Incubar 4 hs a 37 °C
- Centrifugar el contenido de cada fosa a 14000 × *g* por 1 min (IE Centra MP4R, Needham, MA).
- Eliminar el sobrenadante y colocar 0.5 ml de HCl 0.1N en isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania) para extraer el colorante del precipitado. Agitar vigorosamente.
- Centrifugar a 14000 × *g* por 1 min.
- Dispensar 200 µl de cada muestra en microplacas de titulación con fondo plano (Nunc, Dinamarca) y leer a 550 nm con referencia a 650 nm (Tecan, Viena, Austria).

**Controles:** Para determinar la oxidación del reactivo por parte de las bacterias, se prepararon diferentes diluciones de bacterias probióticas o bacterias probióticas + enteropatógenos hasta una concentración equivalente a la colocada en las monocapas. Se aplicó el protocolo detallado anteriormente y se graficaron los valores de DO<sub>550</sub>-DO<sub>650</sub> en función de la concentración bacteriana.

### b) Tinción con cristal violeta

Tsen y col.<sup>436</sup> propusieron una metodología para determinar cuantitativamente la alteración y posterior despegue de monocapas de células en cultivo luego de un tratamiento con un agente nocivo. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- Luego de realizados los ensayos de competencia o exclusión, lavar las fosas 2 veces con 0.5 ml de solución GKN o buffer PBS
- Agregar 0.5 ml de formol 2% e incubar por 1 min a T amb
- Lavar 2 veces con 0.5 ml de GKN o buffer PBS para eliminar el fijador
- Agregar 0.5 ml de colorante (cristal violeta 0.13% en GKN, etanol 5%, formol 2%).
- Incubar 20 min a T amb.
- Lavar al menos 5 veces con GKN o buffer PBS hasta que no se extraiga más colorante.
- Agregar 1 ml de etanol 50% (preparado en el momento)

- Incubar 1 h a T amb
- Leer 200  $\mu$ l en placas de microtitulación a 650 nm

La intensidad de la lectura corresponde a la cantidad de monocapa que persistió adherida a la fosa luego de los lavados.

**Controles:** Se utilizaron como controles dos fosas vacías para determinar la cantidad de colorante que queda adherido al plástico.

### *Análisis estadístico*

Los niveles de asociación de bacterias enteropatógenas en presencia y ausencia de bifidobacterias, los niveles de invasión de dichas bacterias en el mismo sistema y el daño celular sobre las células Caco-2 fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un software de análisis estadístico (Systat 5.0, Systat, Inc. Evanston, IL) para  $\alpha = 0.05$ .

## **Resultados y Discusión**

### **1) Caracterización de la adherencia e invasión de bacterias patógenas**

Antes de realizar los estudios de competencia y exclusión con bacterias patógenas, se determinó por un lado la sensibilidad de estas cepas a la gentamicina y así poder establecer las condiciones de trabajo. Por otro lado, se determinó la concentración de bacterias por unidad de DO y así estimar el título de las suspensiones stock de trabajo.

Con respecto a la sensibilidad a gentamicina, se observó que las cepas *E. coli* EPEC 18731 y la cepa *Salmonella* sp. 521 resultaron ser altamente resistentes al antimicrobiano para las condiciones estudiadas (Tabla 2). Ambas cepas mostraron crecimiento confluyente en medio sólido inclusive luego de un tratamiento de 4 hs con gentamicina 300 µg/ml. Por este motivo, y considerando que

una concentración más alta de antibiótico no sería recomendable en un estudio sobre monocapas de células Caco-2, estas dos cepas no se podrán utilizar en ensayos que involucren estudios de invasividad.

Si bien la cepa *Salmonella enterica* serovar. *infantis* y la cepa *Shigella sonnei* 171 mostraron desarrollo luego de 1 h de tratamiento, la disminución en el número inicial de bacterias fue superior al 99.99% para ambas concentraciones de gentamicina en ambas cepas. En consecuencia, se establecieron las siguientes condiciones para el tratamiento con gentamicina en los ensayos de invasividad:

**- 200 µg/ml gentamicina durante 1 h a 37 °C**

**Tabla 2.** Estudio de la sensibilidad a gentamicina de las bacterias entéricas a diferentes tiempos de incubación. Los resultados se expresan en UFC/ml

Cepa	t = 0	gentamicina 150 µg/ml				gentamicina 300 µg/ml			
		t = 1h	t = 2hs	t = 3hs	t = 4hs	t = 1 hs	t = 2hs	t = 3 hs	t = 4hs
EHEC 18773	3.1 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
EPEC 18731	4.2 x 10 <sup>8</sup>	C	C	C	C	C	C	C	C
EIEC 173	1.8 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Sal. enterica	5.5 x 10 <sup>8</sup>	7.0 x 10 <sup>3</sup>	5.5 x 10 <sup>1</sup>	-	-	2.0 x 10 <sup>1</sup>	-	-	-
Sal. sp 521	5.1 x 10 <sup>8</sup>	C	C	C	C	C	C	C	C
Sh. sonnei 170	2.7 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh. sonnei 171	6.2 x 10 <sup>8</sup>	3.1 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Sh. flexneri	1.8 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

c: crecimiento confluyente; -: no desarrollo

Nuestros resultados no difirieron sensiblemente de las condiciones utilizadas por otros investigadores. Hudault y col.<sup>197</sup> utilizan 50 µg/ml de gentamicina durante 1h para estudiar invasión de *Salmonella typhimurium* a Caco-2, mientras que para *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica) y DAEC (*Escherichia coli* de adherencia difusa) se utiliza hasta 100 µg/ml del antibiótico<sup>21</sup> en las mismas condiciones. Van Asten y col.<sup>441</sup> utilizan una incubación con 300 µg/ml de colistina durante 2 hs a 37 °C para estudios de invasión de *Salmonella enterica* en Caco-2.

Finalmente, Dinjus y Hänel<sup>98</sup>, utilizan 150 µg/ml de gentamicina durante 2 hs para salmonelas de diferente origen.

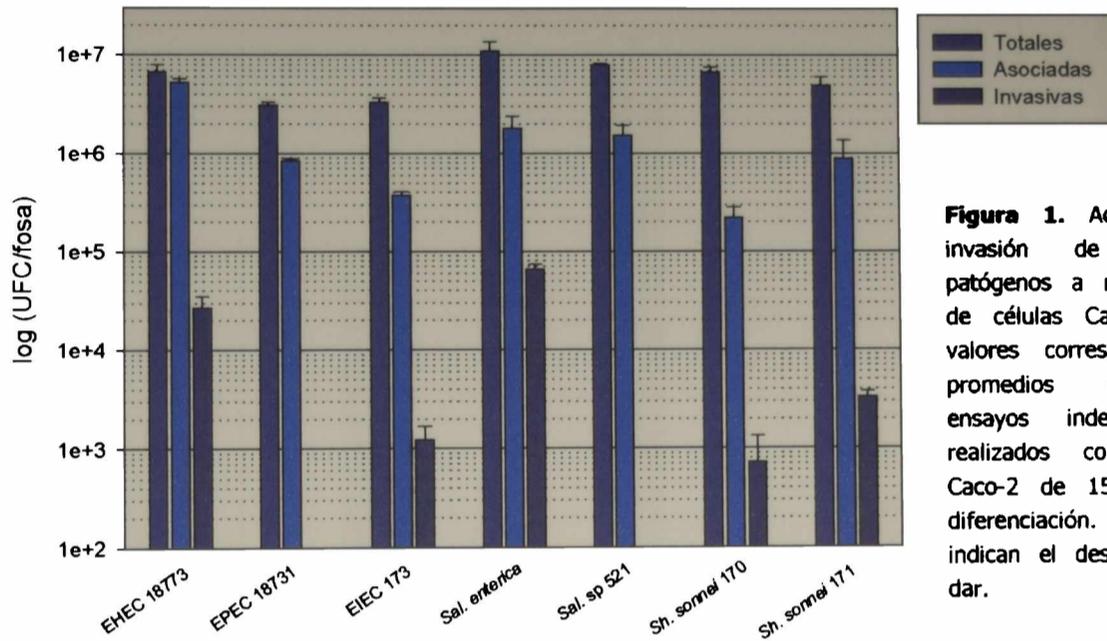
Para realizar los ensayos de competencia, fue necesario establecer un valor aproximado de recuento por unidad de DO<sub>600</sub>, de la misma manera que la escala de McFarland establece un valor de recuento en base a la turbidez dada por soluciones de BaSO<sub>4</sub>. Los valores obtenidos por medidas en tres o más cultivos independientes se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Relación entre medidas turbidimétricas y recuento para bacterias patógenas y para bifidobacterias

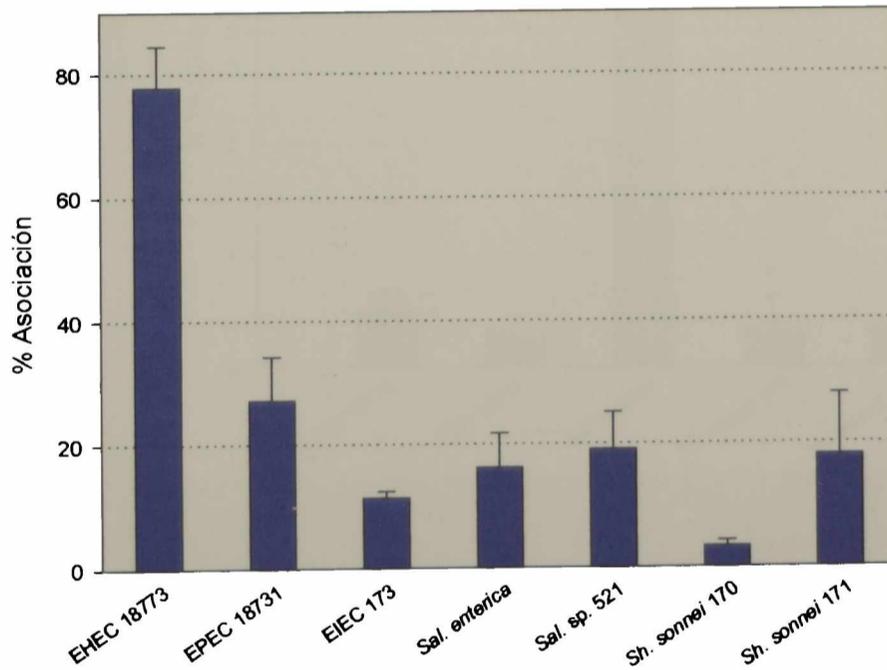
Enteropatógenos	(UFC/ml)/DO <sub>600</sub>	Bifidobacterias	(UFC/ml)/DO <sub>600</sub>
EHEC 18773	4.0 ± 1.0 × 10 <sup>8</sup>	<i>Bif. pseudolongum</i> 531	8.7 ± 2.4 × 10 <sup>7</sup>
EPEC 18731	1.2 ± 0.1 × 10 <sup>9</sup>	<i>Bif. breve</i> CIDCA 532	4.7 ± 0.2 × 10 <sup>7</sup>
EIEC 173	9.6 ± 0.6 × 10 <sup>8</sup>	<i>Bif. bifidum</i> CIDCA 536	3.1 ± 1.1 × 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella enterica</i>	1.1 ± 0.6 × 10 <sup>9</sup>	<i>Bif. bifidum</i> CIDCA 537	3.7 ± 2.9 × 10 <sup>7</sup>
<i>Salmonella sp.</i> 521	nd	<i>Bif. infantis</i> CIDCA 538	2.1 ± 0.7 × 10 <sup>7</sup>
<i>Shigella sonnei</i> 170	4.9 ± 0.6 × 10 <sup>8</sup>	<i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5310	3.2 ± 1.7 × 10 <sup>7</sup>
<i>Shigella sonnei</i> 171	5.6 ± 0.8 × 10 <sup>8</sup>	<i>Bif. bifidum</i> CIDCA 5313	2.7 ± 0.9 × 10 <sup>7</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	1.5 ± 0.8 × 10 <sup>9</sup>		

**Estudio de la adherencia e invasividad de bacterias enteropatógenas.** Para realizar los estudios de competencia de bifidobacterias con enteropatógenos, fue importante determinar el perfil de asociación e invasión de los patógenos en el modelo de células Caco-2 en cultivo (Figura 1).

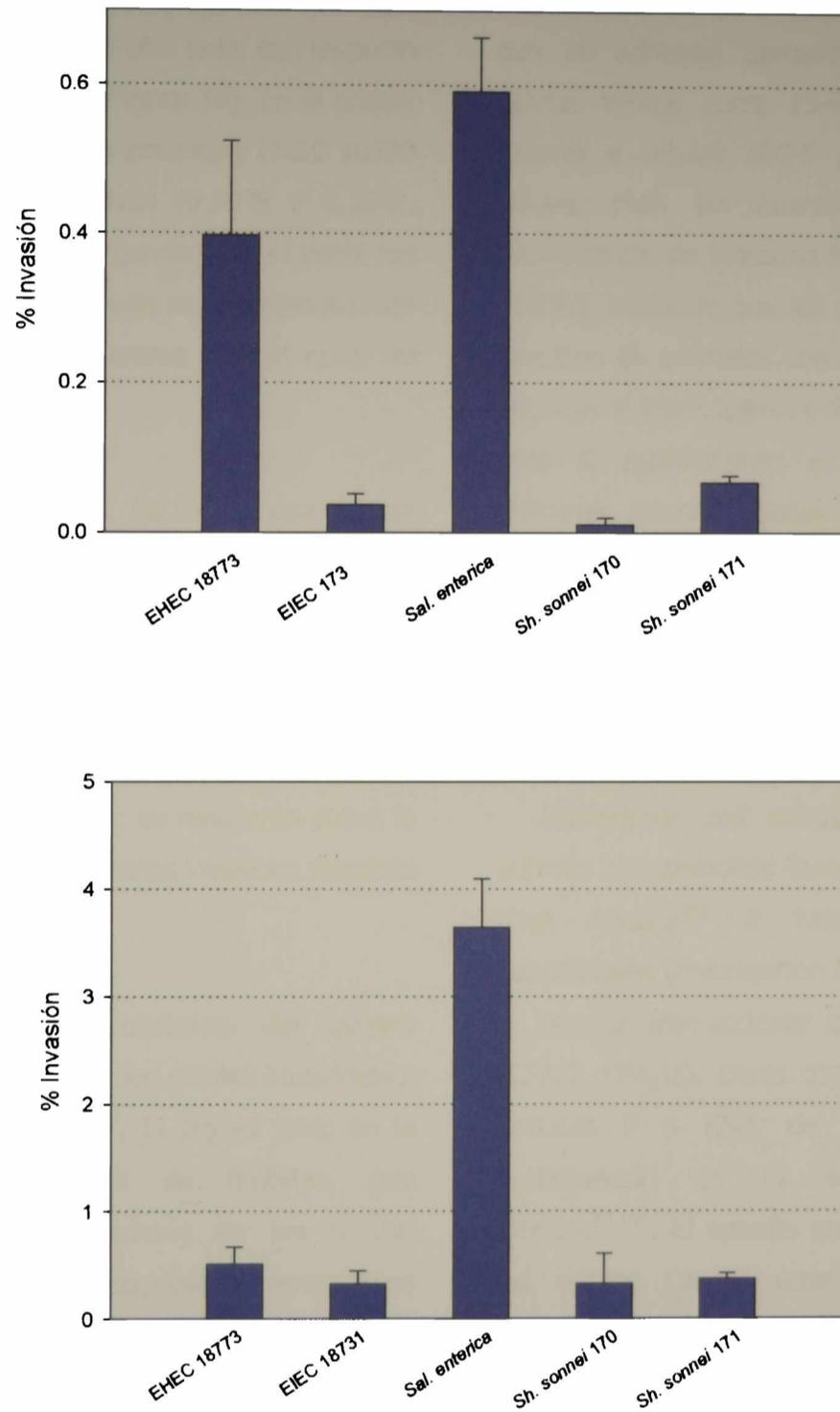
La cepa EHEC 18773 resultó ser la que interaccionó con la monocapa de células Caco-2 en mayor proporción (Figura 2). El total de bacterias asociadas (*i.e.* adheridas + internalizadas) fue del 78% mientras que para el resto de las bacterias estudiadas fue menor del 25%. La menor cantidad de bacterias asociadas se observó



**Figura 1.** Adhesión e invasión de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con células Caco-2 de 15 días de diferenciación. Las barras indican el desvío estándar.



**Figura 2.** Asociación (adherencia + invasión) de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2. Los valores fueron calculados con datos derivados de la Figura 1. El porcentaje de asociación se calculó en función de los recuentos de bacterias agregadas. Las barras indican el desvío estándar.



**Figura 3.** Invasión de enteropatógenos a monocapas de células Caco-2. Los valores fueron calculados con datos derivados de la Figura 1. El porcentaje de invasión se calculó en función de los recuentos de bacterias agregadas (A) o en función de bacterias asociadas (B). Las barras indican el desvío estándar.

para la cepa *Shigella sonnei* 170 (3.3%). El carácter invasivo se puede evaluar de dos maneras diferentes. Por un lado, se puede considerar el nivel de bacterias internalizadas con respecto a las colocadas (Figura 3A) y por otro lado, con respecto a las bacterias asociadas (Figura 3B). En el primer caso, las cepas *Salmonella enterica* y EHEC 18773 resultaron las más invasivas (0.59% y 0.39%, respectivamente). En el segundo caso el perfil fue diferente. La cepa *Salmonella enterica* mostró ser la más invasiva 3.6% mientras que el resto no superó el 0.5%.

Considerando que las bacterias con mayor potencial para colonizar o invadir la monocapa son las que en alguna medida logran establecer un contacto físico con ella, la representación más adecuada es la que relaciona las bacterias invasivas en función de las asociadas. Por lo tanto, las evaluaciones posteriores se realizaron sobre la base del porcentaje de bacterias invasivas respecto de las asociadas.

Se conoce que las bacterias del género *Salmonella* adhieren e invaden células intestinales, incluyendo las Caco-2<sup>122,147</sup>. El primer paso en la adhesión sería a través de fimbrias, que reconocerían ciertos receptores en las células eucarióticas<sup>121</sup>. *Salmonella* expresa diferentes tipos de fimbrias, siendo la más común la fimbria tipo 1 sensible a manosa<sup>155</sup>. La adherencia de *Salmonella* depende fuertemente de la línea celular a la que es enfrentada, probablemente debido a los

determinantes superficiales de ésta última. Un estudio realizado con 24 cepas de *Salmonella* aisladas de intestino o heces de cabras enfermas (con desórdenes gastrointestinales y otros) mostró que se adhieren aproximadamente un 31% a células VERO, entre 15-59% (dependiendo del origen) a células IEC-6 y menos del 20% en células pKD. En cuanto a la invasión, las provenientes de intestino fueron las más invasivas (2.5%), mientras que las aisladas de heces y de intestino de animales con otras enfermedades no llegaron al 1%<sup>98</sup>. Lehto y Salminen<sup>245</sup> hallaron que para *S. typhimurium*, el 7% de las bacterias aplicadas fueron capaces de adherirse a células Caco-2 (establecen adhesión tratando las bacterias con azida que inhibe la invasión, por ser éste un proceso que requiere bacterias metabólicamente activas).

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) se adhiere a enterocitos humanos y a células de la línea Caco-2<sup>303</sup> a través de componentes superficiales (colonization factor antigen CFA) que le permite interaccionar con el ribete en cepillo (CFA/I, CFA/II). Otras cepas de *E. coli* expresan fimbrias P o K88, de las que se identificó participación en la adherencia a epitelio urinario<sup>57,141</sup>. El epitelio polarizado constituido por las células Caco-2 retiene entre 2-3% de la población de ETEC<sup>60</sup>.

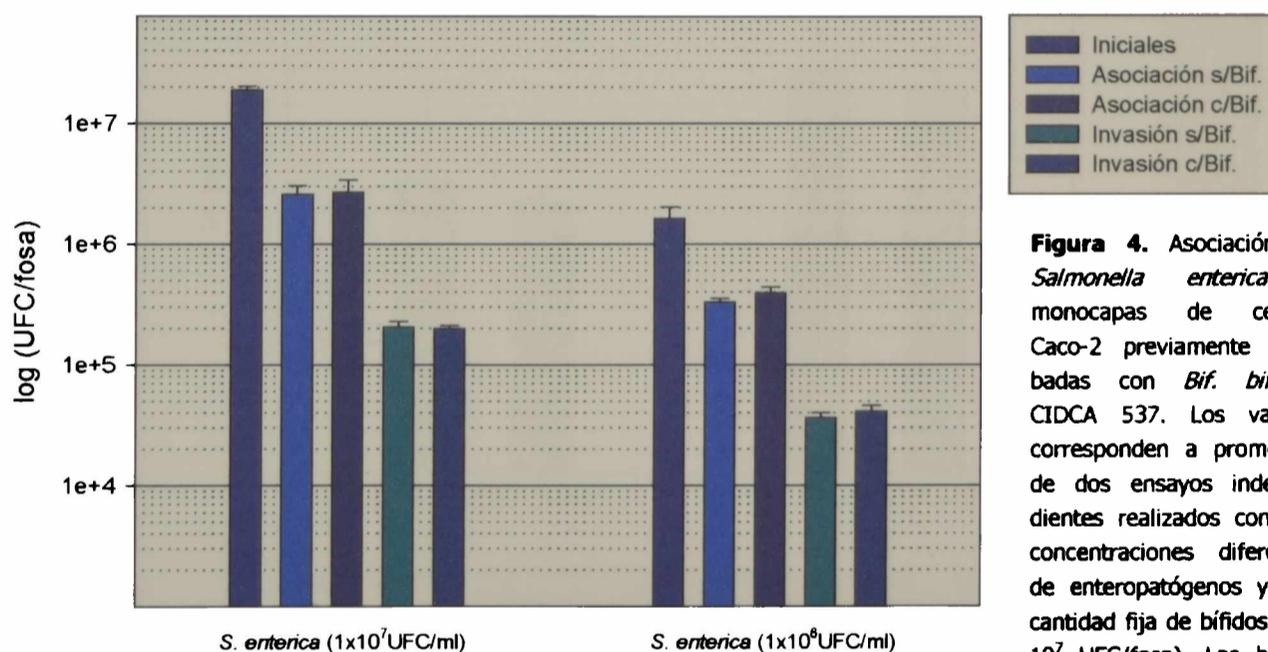
Otras enterobacterias como *Shigella flexneri*, se asocian a células Hela en un 12-13%<sup>300,313</sup>.

**2) Efecto de bifidobacterias sobre asociación de patógenos a células epiteliales en cultivo**

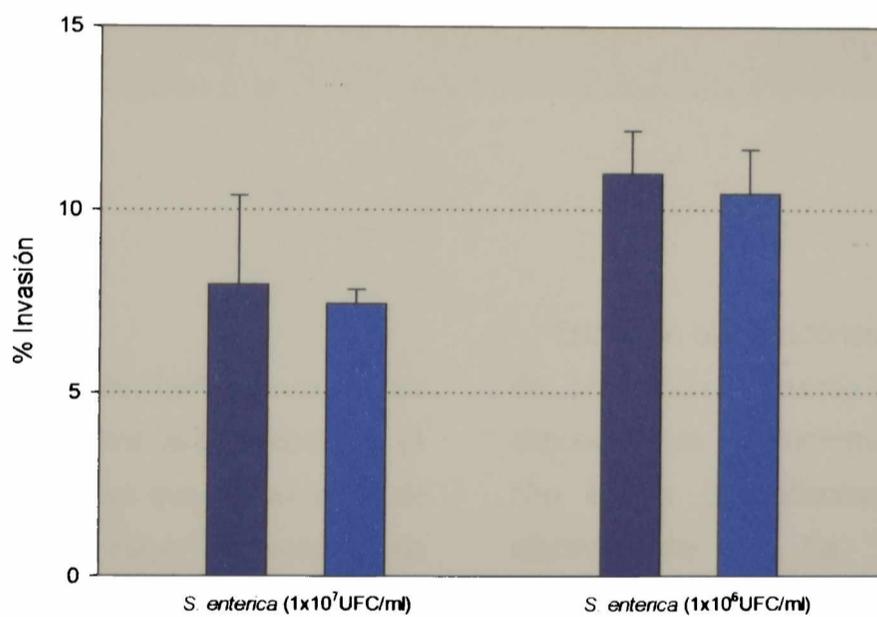
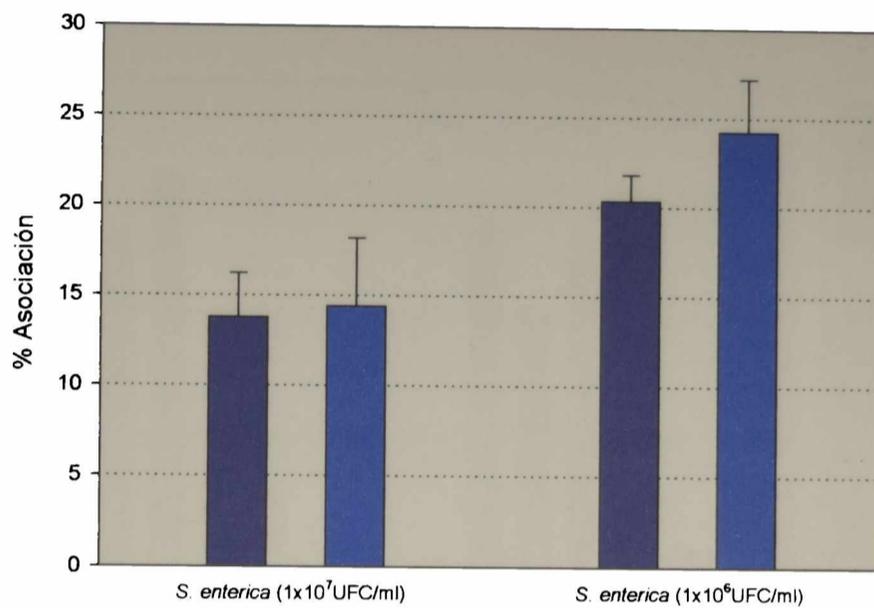
**Efecto de la incubación de *Bif. bifidum* 537 sobre la asociación e invasión de *S. enterica*.**

Sobre la base al perfil de asociación/invasión obtenido en la sección anterior, se seleccionó a la cepa *S. enterica*, que resultó la más invasiva, para realizar ensayos de competencia con bifidobacterias. La exclusión de *S. enterica* de monocapas de células Caco-2 fue estudiada en dos concentraciones diferentes ( $1 \times 10^7$  UFC/fosa y  $1 \times 10^6$  UFC/fosa) que corresponden a una relación [probiótico]/[patógeno] de 1 y de 10, respectivamente (Figura 4). En ambas situaciones, la asociación en presencia de *Bif. bifidum* 537 ( $1 \times$

$10^7$  UFC/fosa) fue estadísticamente igual a la asociación en ausencia de bifidobacterias (Figura 5A). Esto indicaría que las bifidobacterias no fueron capaces de excluir competitivamente a *S. enterica* bloqueando los sitios de adhesión de este último en la monocapa. Tampoco se observó una inhibición de la invasión del patógeno (Figura 5B). Es decir que la cepa *Bif. bifidum* 537 fue incapaz de proteger células epiteliales en cultivo de la asociación e invasión de *S. enterica* inclusive a concentraciones diez veces superior a la del patógeno.

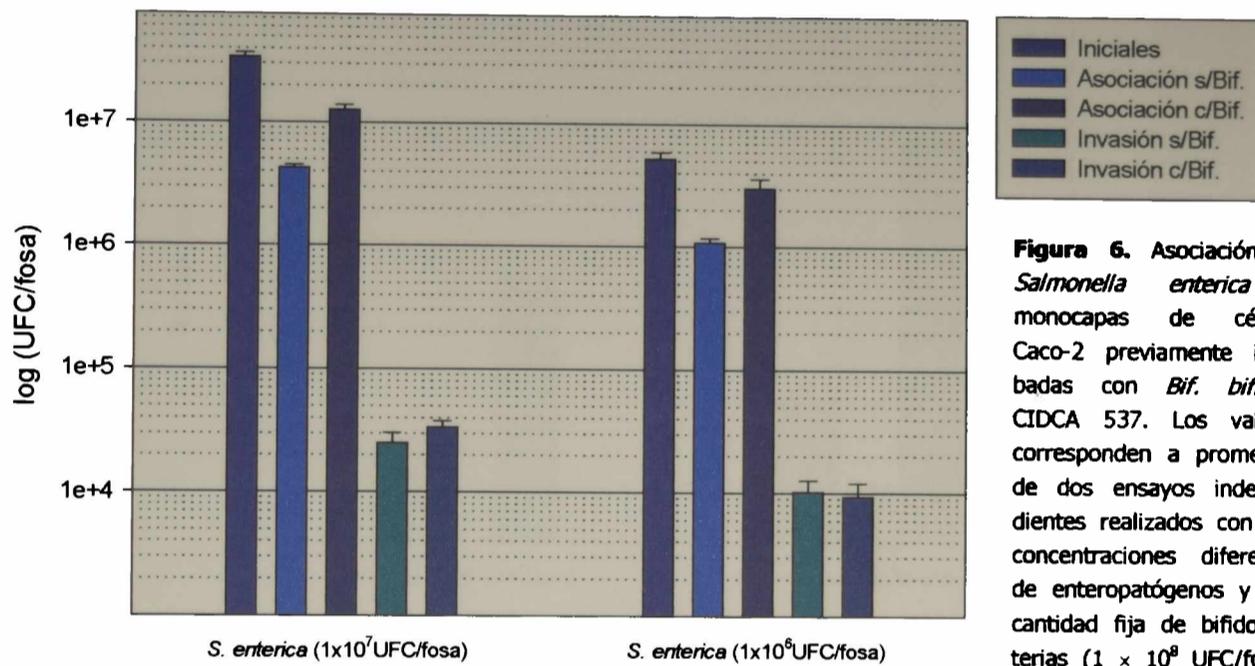


**Figura 4.** Asociación de *Salmonella enterica* a monocapas de células Caco-2 previamente incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 537. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con dos concentraciones diferentes de enteropatógenos y una cantidad fija de bífidos ( $1 \times 10^7$  UFC/fosa). Las barras indican el desvío estándar.



sin Bif.  
 con Bif.

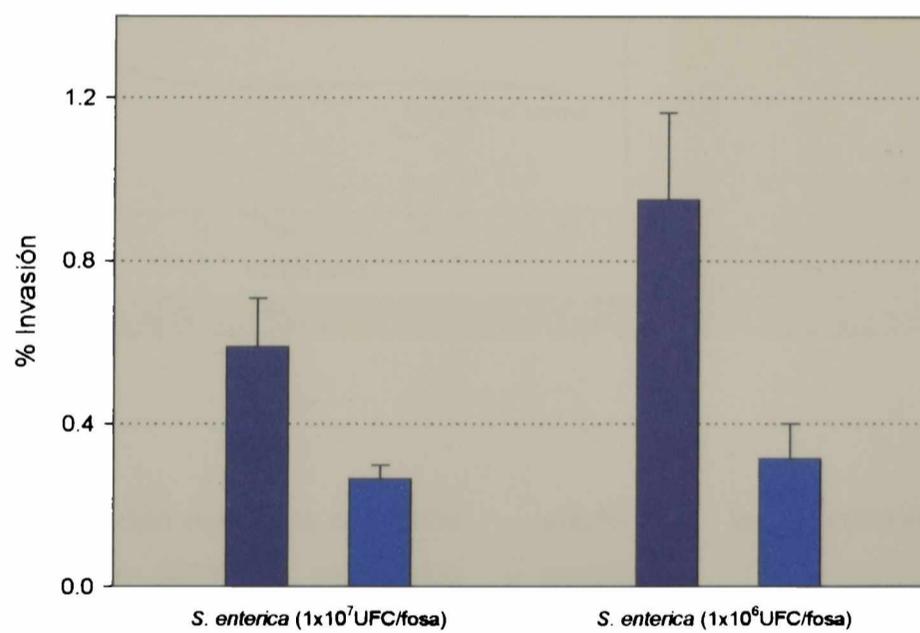
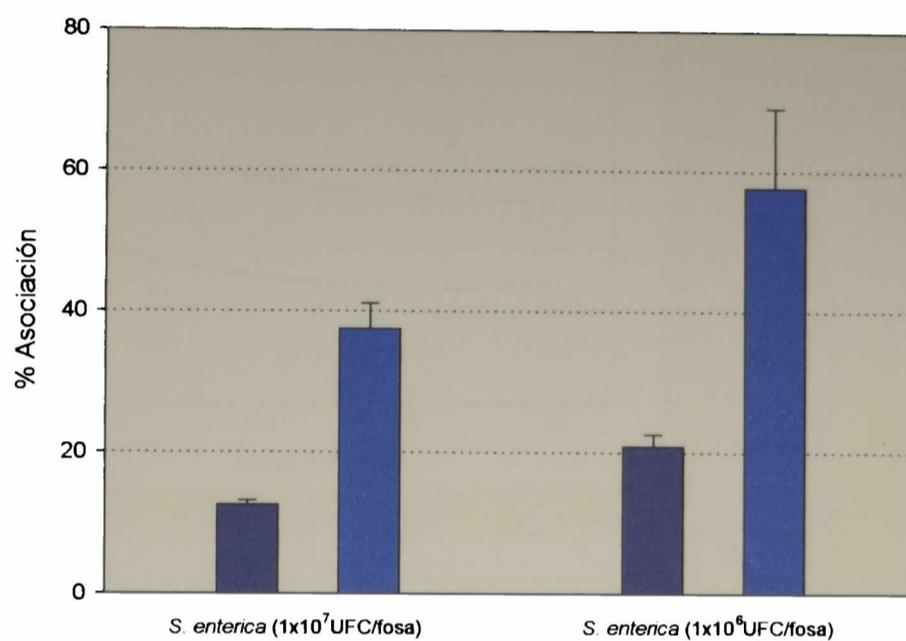
**Figura 5. (A)** Asociación% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. **(B)** Invasión% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. Los valores fueron calculados con datos derivados de la Figura III.4.



**Figura 6.** Asociación de *Salmonella enterica* a monocapas de células Caco-2 previamente incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 537. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con dos concentraciones diferentes de enteropatógenos y una cantidad fija de bifidobacterias ( $1 \times 10^8$  UFC/fosa). Las barras indican el desvío estándar.

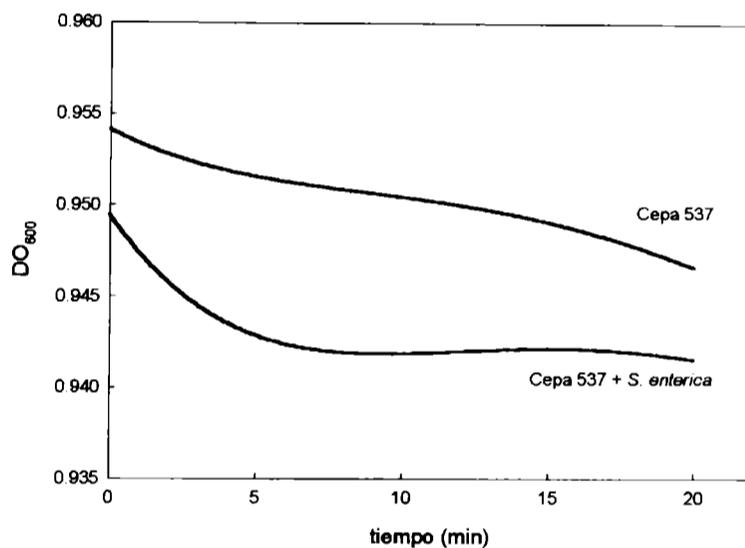
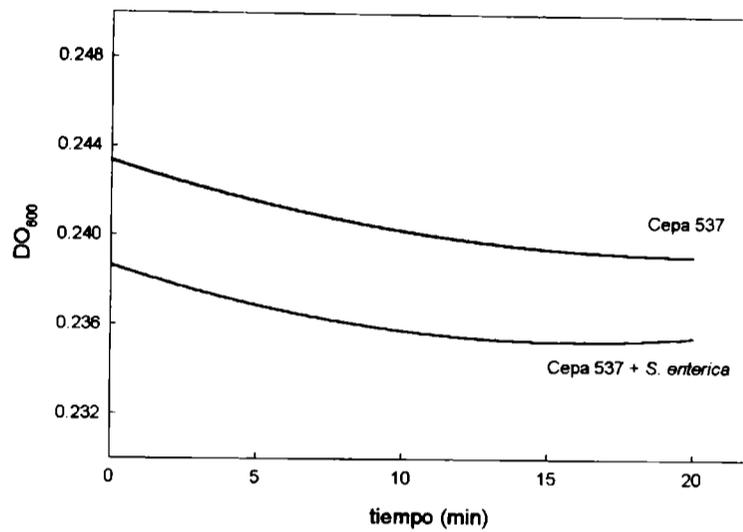
Cuando se trabajó preincubando la monocapa con concentraciones mayores de bifidobacterias ( $1 \times 10^8$  UFC/fosa), se observó que la asociación de *S. enterica* a Caco-2 fue mayor en presencia de bifidobacterias que en su ausencia (Figura 6) llegando a ser de hasta 3 veces superior a la de los controles sin bifidobacterias (Figura 7A). Sin embargo, para ambas concentraciones de patógeno, la cepa 537 fue capaz de inhibir su invasión a la monocapa (Figura 7B).

Estas dos observaciones sugieren que el efecto de protección vinculado a las bifidobacterias dependería de la concentración de probiótico. Un alto inóculo de *Bifidobacterium* retendría más efectivamente a las bacterias patógenas impidiendo su invasión. Si bien la cantidad de patógenos por fosa que invaden la monocapa es igual en presencia que en ausencia de probióticos (Figura 6), el hecho de que la asociación sea mayor en presencia de probióticos sugiere una interacción entre patógenos y la cepa *Bif. bifidum* CIDCA 537.



sin Bif.  
 con Bif.

**Figura 7. (A)** Asociación% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. **(B)** Invasión% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. Los valores fueron calculados con datos derivados de la Figura 6.



**Figura 8.** Ensayos de coagregación con *S. enterica* y *Bif. bifidum* CIDCA 537. (A) con *Bif. bifidum* 537 en  $1 \times 10^7$  UFC/ml. (B) con *Bif. bifidum* 537 en  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La concentración de *S. enterica* fue de  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

Estudios de coagregación realizados con estas bacterias muestran que, de hecho, estas dos especies coagregan a altas concentraciones de bifidobacterias (Figura 8), confirmando la hipótesis anterior. Los enteropatógenos ocluidos en los cúmulos de bifidobacterias serían secuestrados por las bacterias probióticas y podrían eventualmente ser removidos de la superficie epitelial ya sea por

efecto de las secreciones, descamación o peristalsis.

Por otro lado, los agregados de bifidobacterias generarían un microambiente hostil para las bacterias patógenas debido probablemente a productos finales ácidos del metabolismo. De ser confirmada, esta teoría apoyaría la importancia de la viabilidad de las bifidobacterias en la

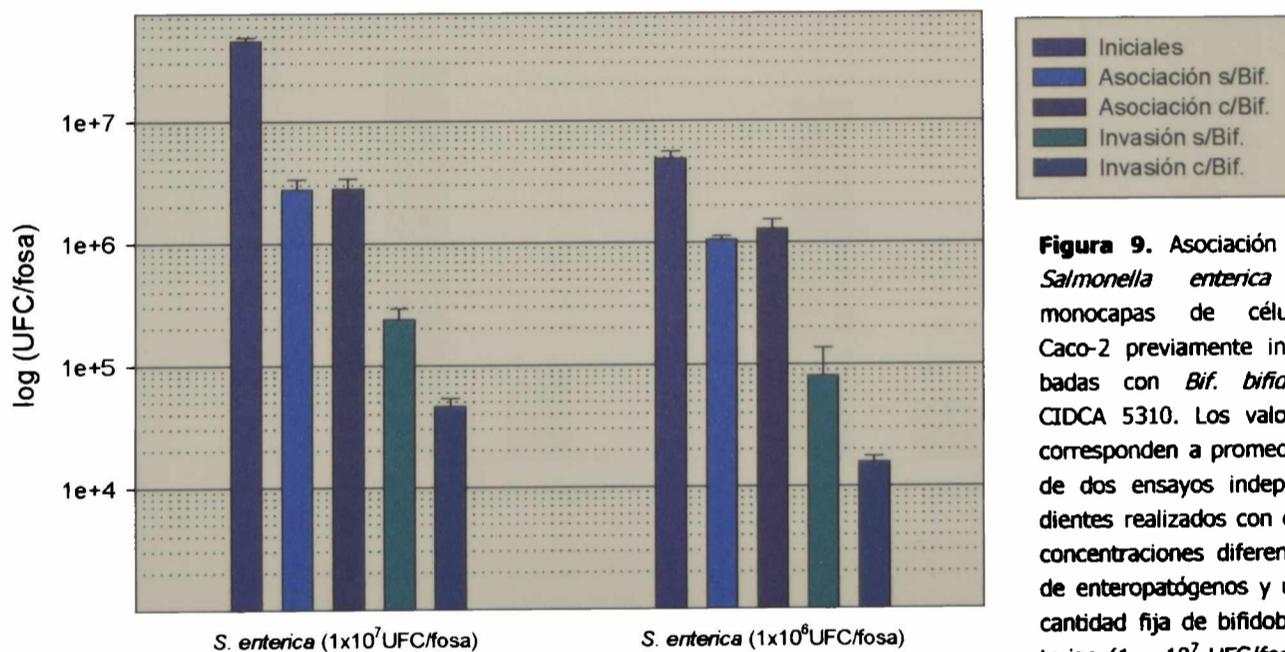
manifestación del efecto probiótico. Bielecka y col.<sup>28</sup> encontraron que 15 cepas de *Bifidobacterium* (pertenecientes a las especies *Bif. animalis*, *Bif. globosum* y *Bif. breve*) fueron antagonistas con

*Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. Realizando estudios de cocultivo, hallaron que el efecto era bactericida.

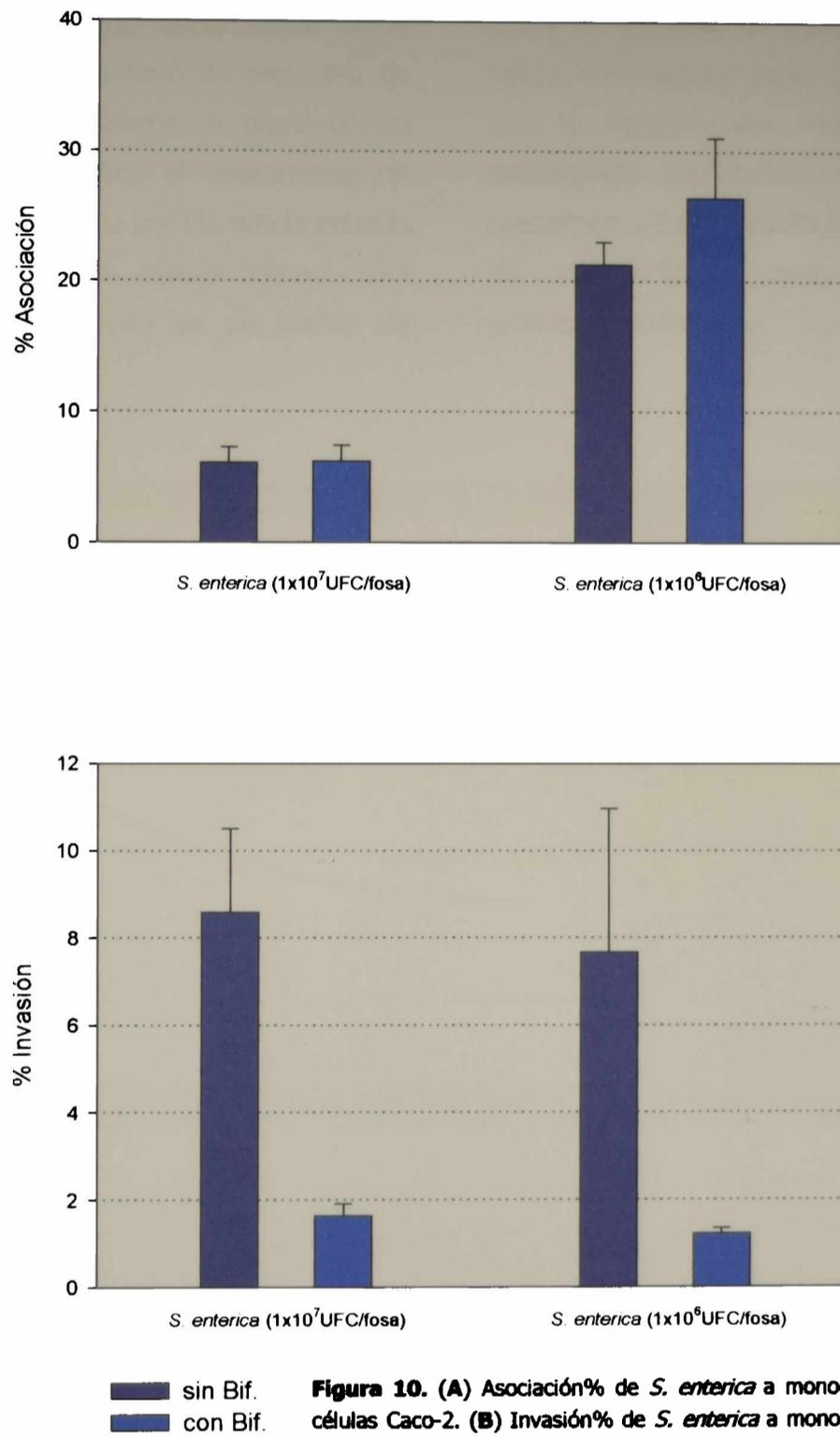
**Efecto de la incubación de *Bif. bifidum* 5310 sobre la asociación e invasión de *S. enterica*.**

Estudios similares a los realizados con la cepa 537 fueron desarrollados con la cepa *Bif. bifidum* 5310. Cuando se preincubó la monocapa con  $1 \times 10^7$  UFC/fosa de bifidobacterias, la asociación de *S. enterica* fue estadísticamente similar a la de los controles sin bifidobacterias (Figura 9 y 10A). Con respecto a la invasión, a diferencia de la cepa 537

a esta concentración, *Bif. bifidum* 5310 fue capaz de inhibir fuertemente la invasión de los patógenos inclusive cuando se incuban en igual concentración ( $[\text{probiótico}]/[\text{patógeno}] = 1$ ) (Figura 10B). El mismo efecto inhibitorio se observó al utilizar mayor cantidad de bifidobacterias para preincubar la monocapa ( $6 \times 10^7$  UFC/fosa, datos no mostrados).



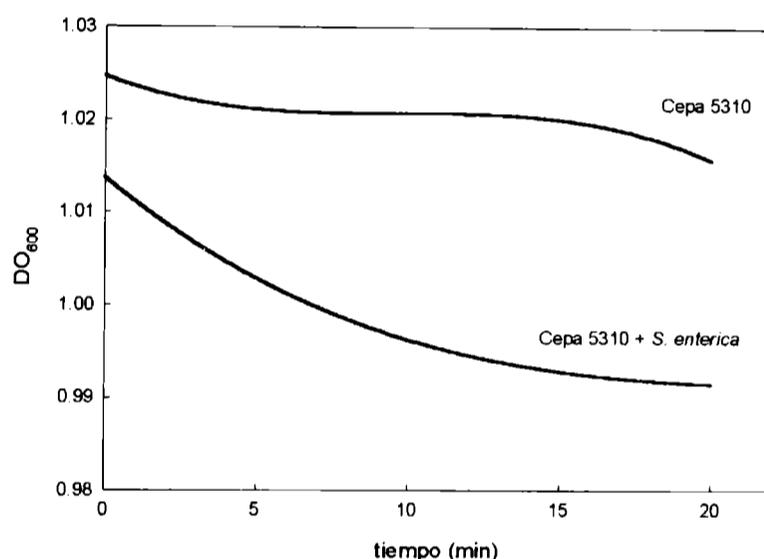
**Figura 9.** Asociación de *Salmonella enterica* a monocapas de células Caco-2 previamente incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con dos concentraciones diferentes de enteropatógenos y una cantidad fija de bifidobacterias ( $1 \times 10^7$  UFC/fosa). Las barras indican el desvío estándar.



**Figura 10. (A)** Asociación% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. **(B)** Invasión% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2. Los valores fueron calculados con datos derivados de la Figura 9.

La cepa *Bif. bifidum* 5310 fue capaz de coagregar con *S. enterica* (Figura 11), con lo que se puede aplicar la misma especulación de la participación de un mecanismo de secuestro de patógenos por los probióticos. A pesar de no conocerse en profundidad el mecanismo de inhibición de la invasión, es posible que la entrada de los patógenos a las células Caco-2 esté bloqueado por la formación de un biofilm de

bacterias probióticas. Nuestros experimentos indican que aunque una cepa determinada no sea capaz de prevenir la asociación de patógenos a células intestinales, pueda interactuar de forma que la invasión sea fuertemente disminuida, modificando consecuentemente el proceso de patogénesis. Estos resultados avalan fuertemente las características cepa-dependiente de la protección probiótica.



**Figura 11.** Ensayos de co-agregación con *S. enterica* ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) y *Bif. bifidum* CIDCA 5310 ( $1 \times 10^8$  UFC/ml).

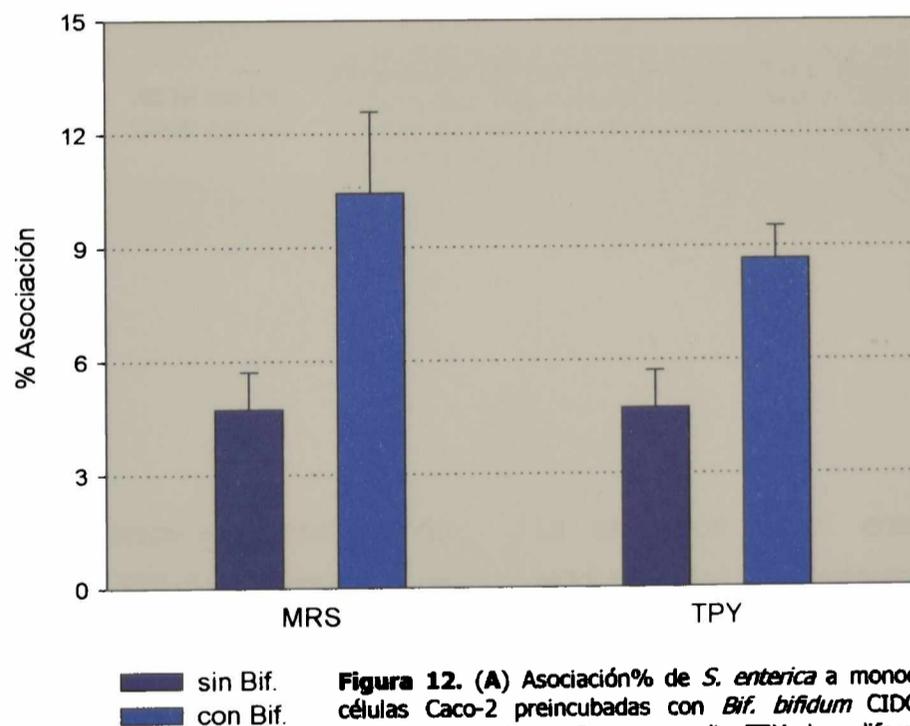
### **Estudio de diferentes factores en el efecto de bifidobacterias sobre patógenos**

**a) Efecto del medio de cultivo.** Es sabido que las propiedades fisiológicas y estructurales de los microorganismos están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo. En el Capítulo II se mostraron evidencias experimentales del efecto del medio de cultivo sobre las propiedades

superficiales de varias cepas de *Bifidobacterium*. Las propiedades más afectadas resultaron la capacidad autoagregante y la composición proteica de la pared celular. En consecuencia se estudió comparativamente la exclusión de *S. enterica* por *Bif. bifidum* 5310 crecida en medio TPY y en MRS.

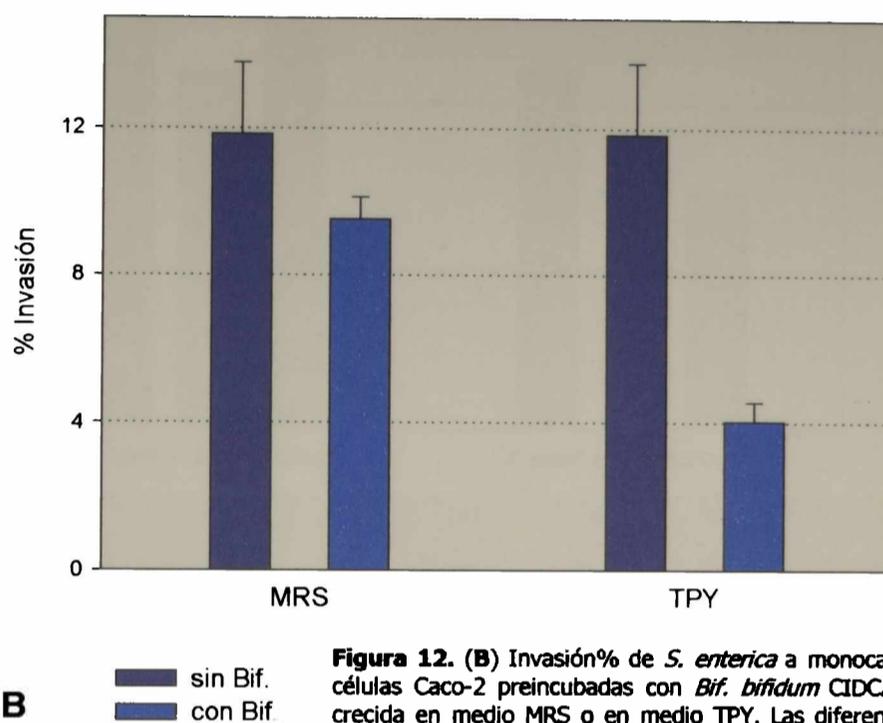
Cuando se preincubó la monocapa con un inóculo de bifidobacterias 10 veces mayor que el de *S. enterica*, se observó que la asociación de patógenos a Caco-2 es mayor en presencia de probióticos que en los controles sin probióticos (Figura 12A) e independiente del medio de cultivo en el que se crecieron los probióticos ( $P > 0.1$ ). Sin embargo, en relación a la invasión se observó un efecto más notable cuando las bacterias fueron crecidas en TPY que cuando se hizo en MRS

(Figura 12B). La disminución en la invasión fue más importante cuando las bacterias probióticas fueron crecidas en TPY. Considerando que la cepa 5310 presenta un fenotipo más agregante cuando es crecida en TPY que en MRS, se podría especular que el medio TPY produciría un fenotipo diferente en el que se daría lugar a la formación de una trama o malla de bacterias probióticas que secuestraría más efectivamente los patógenos y evitaría así su invasión a las células subyacentes.



A

**Figura 12. (A)** Asociación% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2 preincubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 5310 crecida en medio MRS o en medio TPY. Las diferencias se establecieron para  $P < 0.1$ .



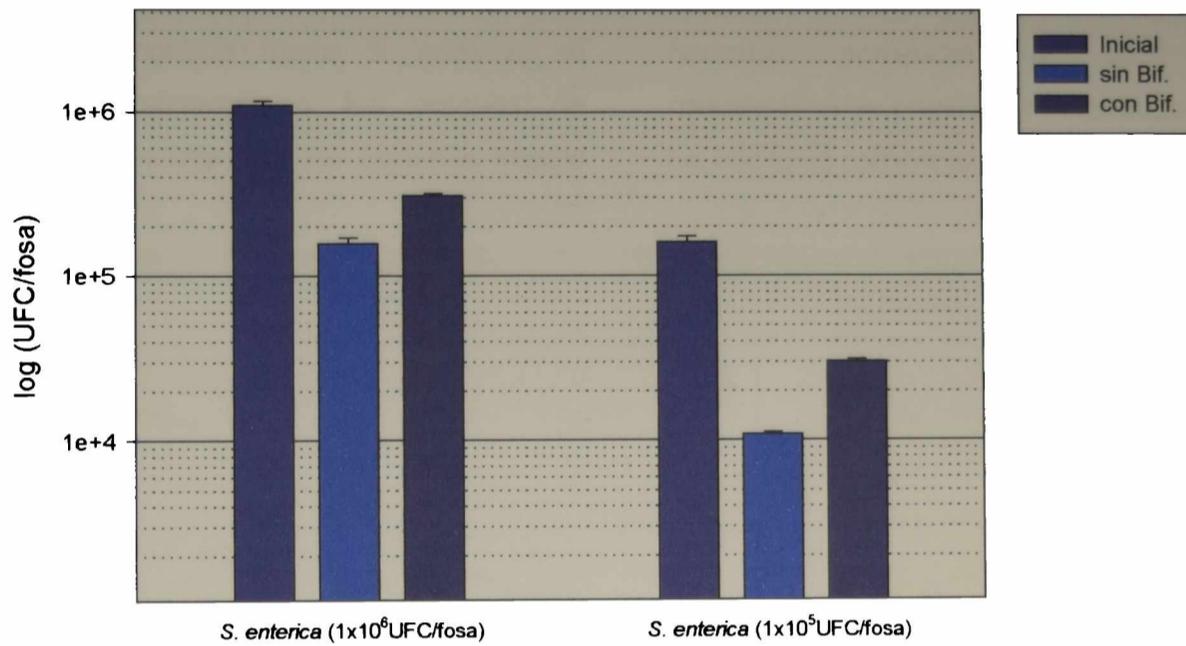
**Figura 12. (B)** Invasión% de *S. enterica* a monocapas de células Caco-2 preincubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 5310 crecida en medio MRS o en medio TPY. Las diferencias se establecieron para  $P < 0.1$ .

**B**

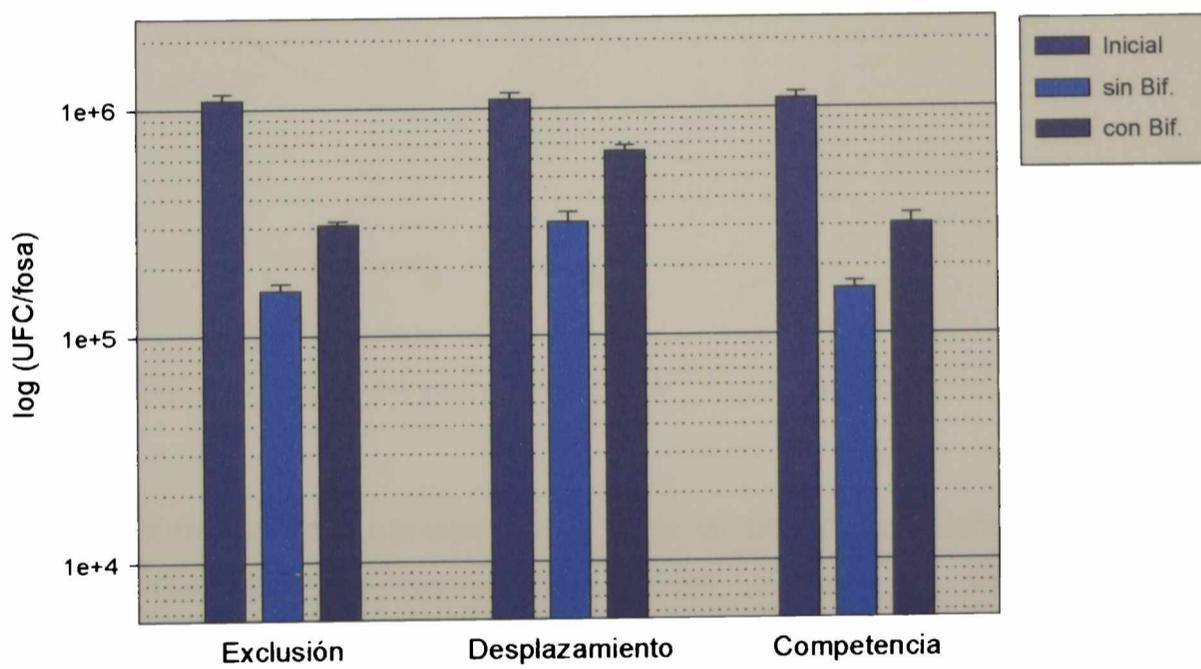
■ sin Bif.  
■ con Bif.

**b) Efecto de tratamientos térmicos.** Cuando *Bifidobacterium bifidum* 537 fue sometida a un ciclo de congelación descongelación resultó incapaz de evitar la asociación de *S. enterica* a células Caco-2. Más aún, la adhesión de este patógeno fue incrementada por la presencia de las bifidobacterias. Estos resultados fueron obtenidos para dos concentraciones de patógeno (Figura 13).

La asociación de *S. enterica* coincubada con bifidobacterias fue estadísticamente igual a la obtenida preincubando las monocapas con bifidobacterias ( $P > 0.1$ ), lo que indica que las cepas de este estudio son incapaces de competir y de excluir a los patógenos (Figura 14). La cepa probiótica tampoco fue capaz de desplazar a *S. enterica* adherida a Caco-2.



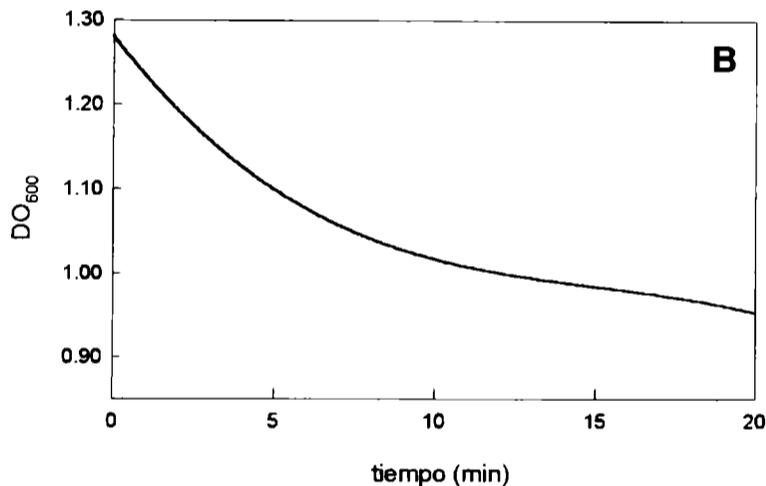
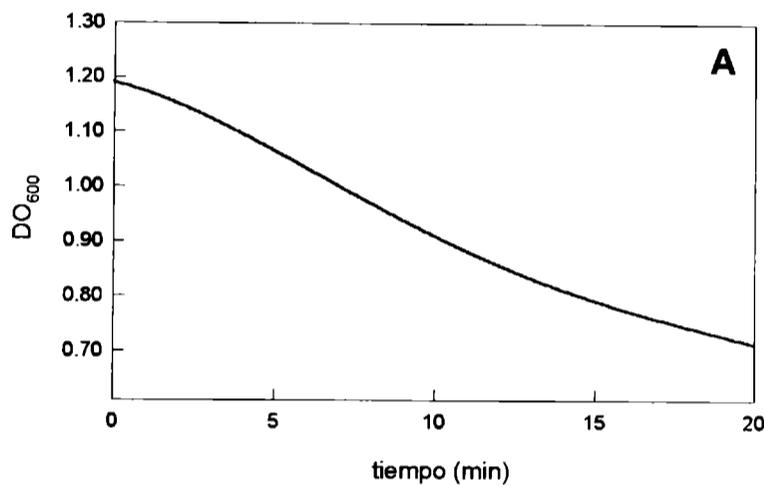
**Figura 13.** Asociación de *S. enterica* a monocapas de Caco-2 y competencia por asociación celular con *Bif. bifidum* CIDCA 537 sometida a un ciclo de congelación/descongelación. Las barras indican desviación estándar.



**Figura 14.** Asociación de *S. enterica* a monocapas de Caco-2 y competencia por asociación celular con *Bif. bifidum* CIDCA 537 sometida a un ciclo de congelación/descongelación. Las barras indican desviación estándar.

Nuevamente, para explicar el diferente comportamiento de la cepa 537 fresca y congelada/descongelada frente *S. enterica*, se puede hacer referencia a los ensayos de coagregación. Mientras que las bacterias frescas

en una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml no coagregaron con *S. enterica* (Figura 15A), las bacterias sometidas a un ciclo de congelación/descongelación interaccionaron con las bacterias patógenas (Figura 15B).



**Figura 15.** Ensayos de coagregación de *S. enterica* con suspensiones frescas de *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 537 (A) y suspensiones sometidas a un ciclo congelación /descongelación (B)

línea punteada: *Bif. bifidum* CIDCA 537+ *S. enterica*.  
línea continua: *Bif. bifidum* CIDCA 537 solo.

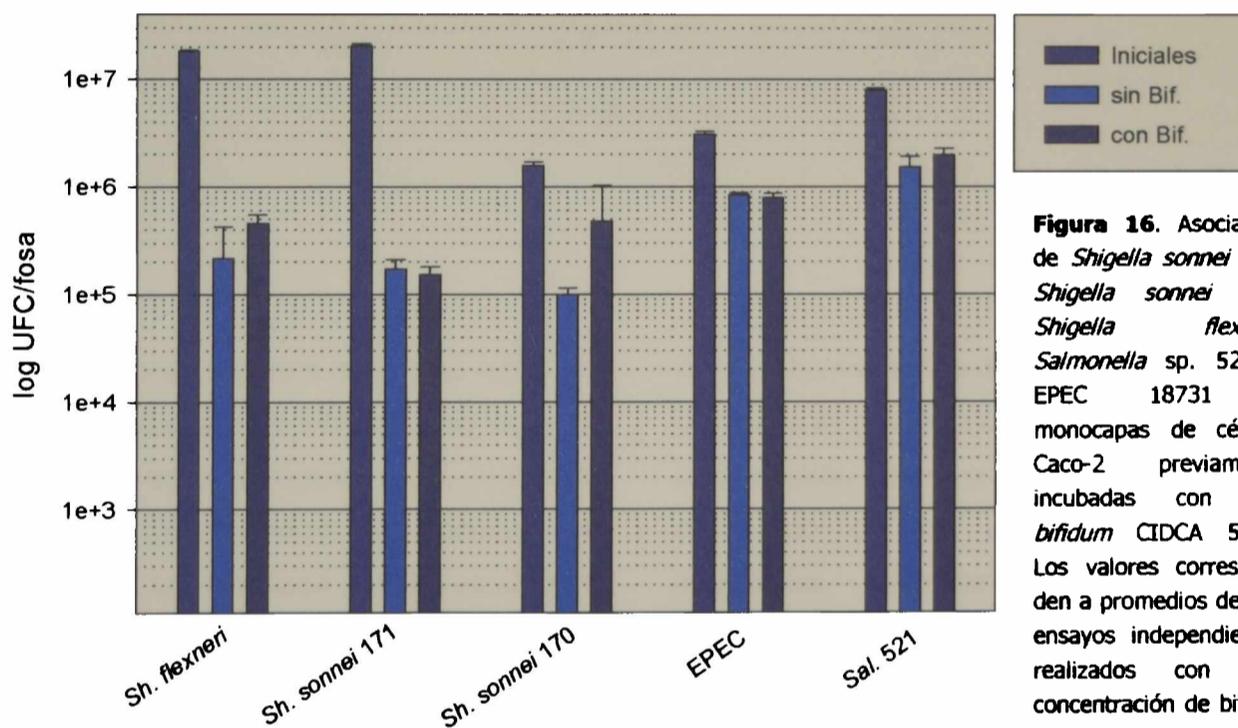
El tratamiento térmico aplicado a la cepa CIDCA 537 podría haber originado una modificación en las propiedades superficiales de tal manera que la interacción con los patógenos fuera estimulada. La liberación de factores promotores de coagregación originados por la lisis no puede ser descartada<sup>311</sup>. Los resultados de los ensayos de adhesión tanto como los de coagregación con bacterias sometidas

a un ciclo de congelación/descongelación avalan esta hipótesis. El efecto causado por los tratamientos térmicos en la superficie de las bifidobacterias debe ser considerado cuando al diseñar el proceso tecnológico para obtener una preparación probiótica y en la forma en que los productos se presentan en el mercado.

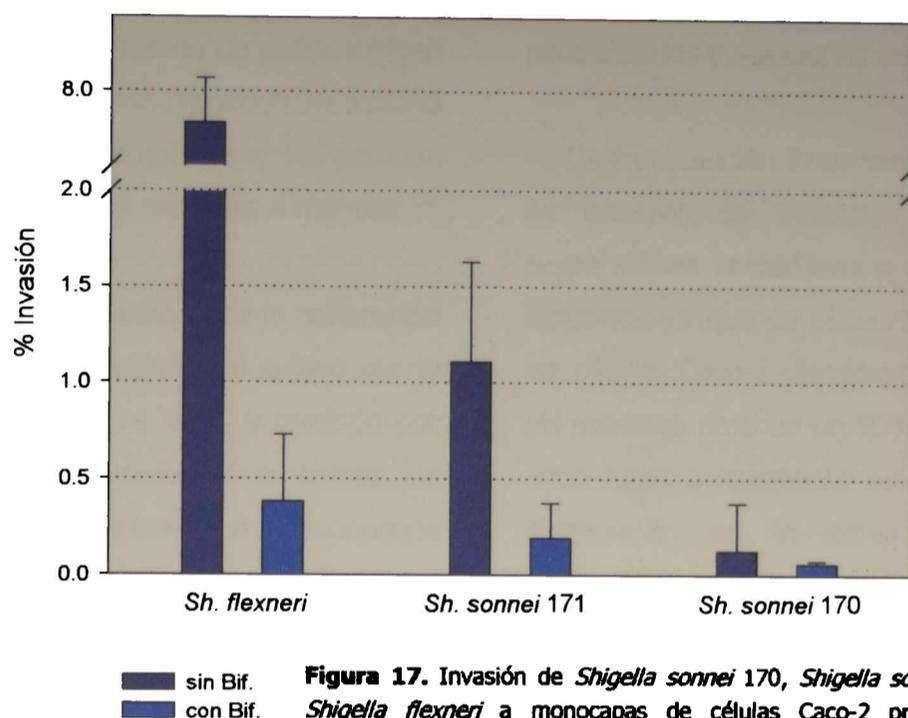
**Estudio de la exclusión con otras cepas patógenas.**

Los ensayos de exclusión con *Bif. bifidum* 5310 también fueron realizados con las cepas *Shigella sonnei* 170, *Shigella sonnei* 171, *Shigella flexneri*, *Salmonella* sp. 521 y EPEC 18731. El estudio se realizó con una relación probiótico/patógeno de 10 (Figura 16). En estas condiciones, tampoco se observó protección contra la asociación de

patógenos por parte de las bifidobacterias. Sin embargo, para las cepas en las cuales se pudo evaluar el efecto en la invasión, se observó que *Shigella sonnei* 171 y *Shigella flexneri* mostraron una menor invasión en presencia de bifidobacterias con respecto a los controles sin bifidobacterias (Figura 17). Estudios de coagregación indican que estas cepas coagregan con *Bif. bifidum* CIDCA 5310, aunque no de manera muy marcada.



**Figura 16.** Asociación de *Shigella sonnei* 170, *Shigella sonnei* 171, *Shigella flexneri*, *Salmonella* sp. 521 y EPEC 18731 a monocapas de células Caco-2 previamente incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con una concentración de bifidobacterias de  $1 \times 10^7$  UFC/fosa. Las barras indican el desvío estándar.



**Figura 17.** Invasión de *Shigella sonnei* 170, *Shigella sonnei* 171 y *Shigella flexneri* a monocapas de células Caco-2 previamente incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 5310. Los valores corresponden a promedios de dos ensayos independientes realizados con una concentración de bifidobacterias de  $1 \times 10^7$  UFC/fosa. Las barras indican el desvío estándar.

Existen evidencias experimentales que cepas de lactobacilos son capaces de inhibir la asociación o adherencia de enteropatógenos, sin embargo parece que este mecanismo no está operando en *Bifidobacterium*. La inhibición de la asociación celular de *E. coli* enterotoxigénica por *Lb. acidophilus* LB y la inhibición de la asociación e invasión a Caco-2 por patógenos enterovirulentos obtenida con la cepa *Lb. johnsonii* LA1 es comparable a la inhibición con lectinas y complejos de hidratos de carbono<sup>80,303</sup>. Reid y col.<sup>346</sup> explican el efecto inhibitorio de lactobacilos como un apantallamiento estérico de los receptores para patógenos. El mecanismo de exclusión competitiva de patógenos por *Lb. johnsonii* La1 estudiado por Bernet y col.<sup>21</sup> también sería un resultado de un

bloqueo no específico de los sitios receptores para patógeno ya que esta cepa puede proteger frente a la invasión de un gran número de patógenos, cada uno de los cuales posee receptores intestinales diferentes y han desarrollado diferentes vías de invasión. Hudault y col.<sup>197</sup> hallaron que el mecanismo de acción antagonista de *Lb. casei* GG es efectivo en condiciones ácidas probablemente debido a la producción de ácido láctico y/o a una sustancia activa a bajo pH. Un tratamiento con un cultivo de *Salmonella typhimurium* con *Lb. casei* GG o un sobrenadante de esta cepa, produce una disminución en las propiedades invasivas de la primera, que no es evidente a pH neutro. Silva y col.<sup>397</sup> han descrito una sustancia antimicrobiana secretada (ácido

piroglutámico?) por esta misma cepa cuya actividad se observa a pH 3 a 5. Sin embargo, Craven y Williams<sup>78</sup> encontraron que cepas de lactobacilos aisladas de intestino de pollos inhiben la adherencia de *Salmonella typhimurium* 3333/O por un bloqueo de los receptores y no por una competencia por receptores sensibles a manosa.

Chauvière y col.<sup>59</sup> publicaron que la adherencia de estas bacterias a monocapas en cultivo puede ser inhibida por lactobacilos vivos y también por células inactivadas térmicamente a través de enmascaramiento de receptores en la monocapa ya que *Lactobacillus* no expresa CFA/I o CFA/II.

*Lactobacillus* también inhibe la adherencia de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* a epitelio urinario en un 30%<sup>57</sup> y estos autores también lo adjudican a un mecanismo de bloqueo estérico. Coconnier y col.<sup>65,66</sup> publicaron ensayos que demuestran inhibición de la adhesión de bacterias enteropatógenas (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia pseudotuberculosis*) a células Caco-2 y HT29-MTX por *Lb. acidophilus* LB. La misma cepa fue utilizada para inhibir la adhesión de cepas de *E. coli* a Caco-2 por exclusión competitiva<sup>59</sup>.

Lehto y Salminen<sup>245</sup> hallaron que para *S. typhimurium*, la adherencia no fue significativamente disminuida por una incubación previa con *Lactobacillus* GG entre  $1 \times 10^7$  UFC a  $1 \times 10^8$  UFC. Es decir, no observaron exclusión competitiva entre estas cepas. Por lo tanto se asume que *Lactobacillus* GG es incapaz de bloquear los sitios de unión de *S. typhimurium* ya sea en forma específica o por enmascaramiento estérico de los receptores. Estos autores adjudican

la inhibición de la adherencia solamente a un efecto del pH con conclusión de ensayos realizados con sobrenadantes de cultivos, sobrenadantes neutralizados y soluciones ácidas.

Una precaución importante a tener en cuenta en ensayos de inhibición es el pH de las suspensiones bacterianas o de los sobrenadantes utilizados ya que se observó que la viabilidad de las células Caco-2 disminuye significativamente a pH menores de 5 en un 90%<sup>245</sup>. Por lo tanto esto daría lugar a resultados erróneos al asignar una disminución en la adherencia por exclusión competitiva cuando en realidad se debería a una modificación de la estructura polarizada de las Caco-2 por efecto del pH. Una estrategia para estudiar adhesión en estas condiciones sería utilizar células intestinales fijadas.

Craven y Williams<sup>78</sup> observaron que la presencia de una cepa de *Lb. salivarius* sobre mucus cecal inmovilizado es indiferente para la adherencia de *S. typhimurium* 3333/O; y que una especie no identificada de *Lactobacillus* aislada de contenido intestinal de pollos, no solamente fue incapaz de inhibir la adherencia del *S. typhimurium* 3333/O, sino que su adherencia a mucus cecal inmovilizado fue incrementada en un 50%. Sin embargo, las otras cepas ensayadas de *Lb. salivarius* y *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) lograron inhibir la adherencia en un 25 a 30%. De la misma manera, cepas de *Lactobacillus acidophilus* inhibieron la adherencia a células epiteliales intestinales de pollo de *Salmonella pullorum* y *S. typhimurium* pero no de *S. enteritidis*<sup>213</sup>; pero su mecanismo sigue siendo una incógnita.

Algunas cepas de lactobacilos son también capaces de excluir competitivamente a patógenos genitourinarios mediante coagregación, un proceso que asociado a la producción de compuestos antimicrobianos, como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y posiblemente biosurfactantes<sup>448</sup>, podría resultar en la inhibición del crecimiento de los patógenos. Esta coagregación podría ser eficaz en la formación de un biofilm que contribuya a la exclusión de patógenos de la mucosa intestinal. Nuestros estudios indican que las bifidobacterias utilizarían esta estrategia para retener los patógenos evitando que invadan la mucosa subyacente.

Con respecto a las bifidobacterias, hace algunos años, Mizutani y Mitsuoka<sup>288</sup> observaron que la administración oral de cepas de bifidobacterias disminuía la población de *E. coli* en la flora bacteriana de ratones gnotobióticos. Recientemente, Fujiwara y col.<sup>134</sup> confirmaron ese hallazgo utilizando la cepa *Bifidobacterium* BL2928 en el mismo sistema. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de una exclusión competitiva entre bifidobacterias y *E. coli* en la flora intestinal. Estos autores describen un mecanismo de exclusión a través de la liberación de un componente proteico

que interfiere con la adhesión de enteropatógenos a GA1 (asialo-gangliotetraosil ceramida) presente en el borde apical de las células intestinales. Es posible que las bifidobacterias establezcan interacciones hidrofóbicas con GA1 y que la inhibición de los sitios de unión de *E. coli* sea debido al enmascaramiento estérico más que por unión a las mismas regiones específicas en el receptor GA1.

Faure y col.<sup>119</sup> reportaron que *Bif. longum* confiere una resistencia casi completa a la colonización de *E. coli* en ratas gnotobióticas. Yamazaki y col.<sup>464</sup> reportaron similares efectos protectores en *Bif. longum* en ratones gnotobióticos. Se han postulado varios mecanismos de protección<sup>339</sup>, aunque el mecanismo exacto no ha sido todavía elucidado. Bernet y col.<sup>20</sup> han reportado exclusión competitiva entre bifidobacterias y enteropatógenos sobre Caco-2, pero no describen el mecanismo.

Otras enterobacterias como *Shigella flexneri*, se asocian a células Hela en un 12-13%, pero cuando *Bif. infantis* se incubaba conjuntamente con esta, la asociación se redujo a un 2-3% reflejando una clara inhibición<sup>300</sup>.

### **3) Determinación del efecto citopático o daño celular.**

#### **Microscopía electrónica de barrido**

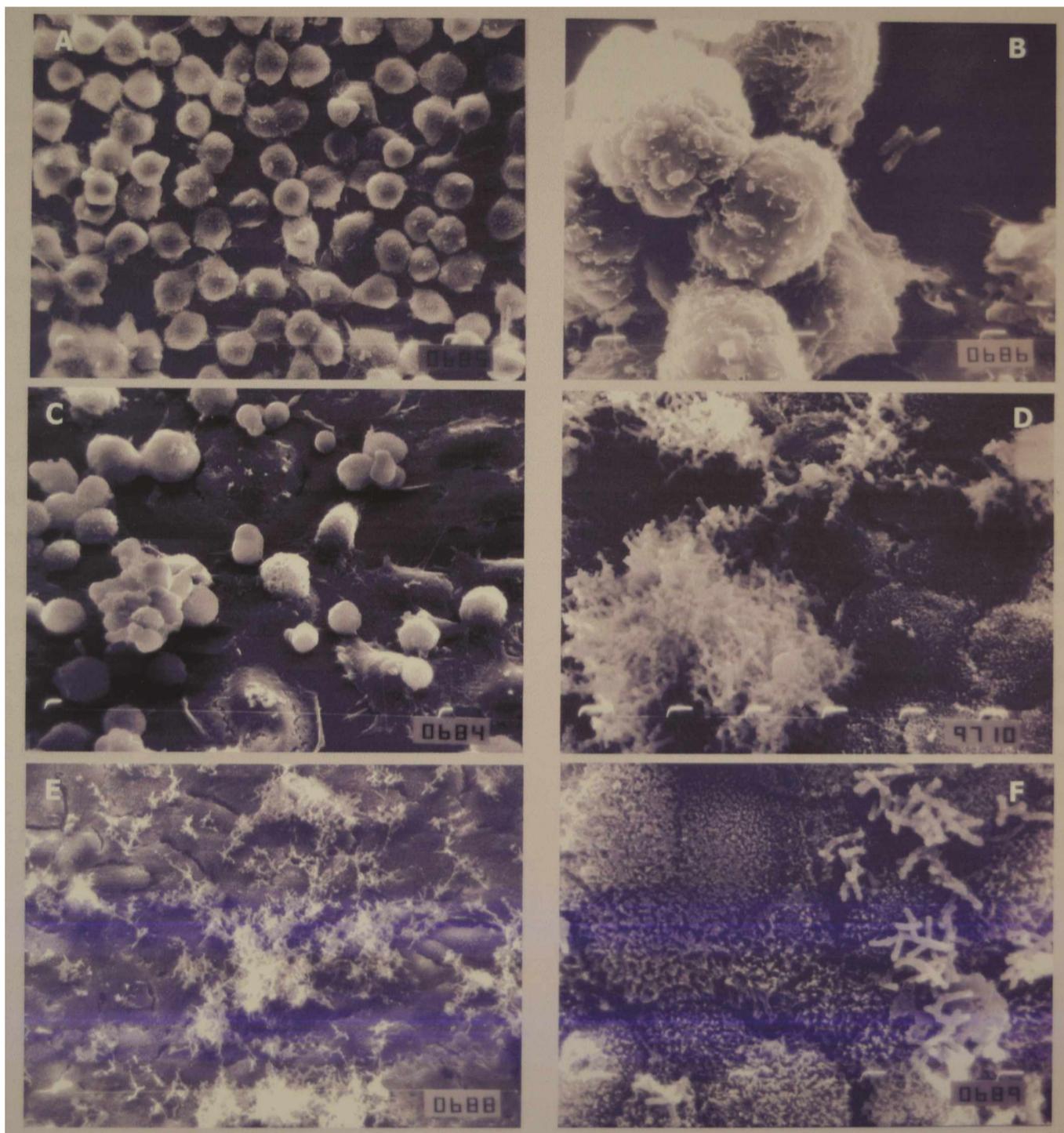
La evaluación del daño celular en el modelo de monocapas en cultivo fue realizada por microscopía electrónica de barrido (Figura 18). Una incubación con *Salmonella enterica* produjo una notable alteración estructural de la monocapa subyacente. Las células Caco-2 se presentaron

redondeadas, perdiendo sus uniones intercelulares y en algunos casos también la adhesión al soporte plástico (Figura 18A). Desapareció la diferenciación apical y no se distinguieron las microvellosidades superficiales. Zafriri y col.<sup>468</sup> realizaron observaciones similares en donde células epiteliales en

cultivo se "redondeaban" al estar en contacto con bacterias adherentes. Este efecto citopático es específicamente inducido por una enterotoxina termolábil.

Cuando las monocapas son incubadas con bacterias probióticas (*Bif. bifidum* 537 o *Bif.*

*bifidum* 5310) y posteriormente con *Salmonella enterica* no se observaron tales anomalías estructurales. La integridad estructural de las células Caco-2 se encontró intacta (Figura 18B), inclusive a nivel de las microvellosidades del polo apical (Figure 18C).



**Figura 18.** Micrografías electrónicas de barrido correspondientes a monocapas de Caco-2 utilizadas para los ensayos de exclusión. (A) y (B) Caco-2 incubadas solamente con *S. enterica* ( $\times 1000$ ); (C) Monocapas incubadas solamente con *Bif. bifidum* CIDCA 537 ( $\times 3500$ ); (D) Monocapas incubadas solamente con *Bif. bifidum* CIDCA 5310; (E) Monocapas incubadas con *Bif. bifidum* CIDCA 537 y posteriormente con *S. enterica* ( $\times 2000$ )

Es claro que las bifidobacterias se unen al borde apical de las Caco-2 sin producir daño y evitan además el daño celular producido por las bacterias enteropatógenas, aunque el mecanismo no se encuentra claro. La distribución de bifidobacterias sobre Caco-2 no fue homogénea, quedando inclusive algunas células epiteliales sin bifidobacterias adheridas. Sin embargo, aquellas

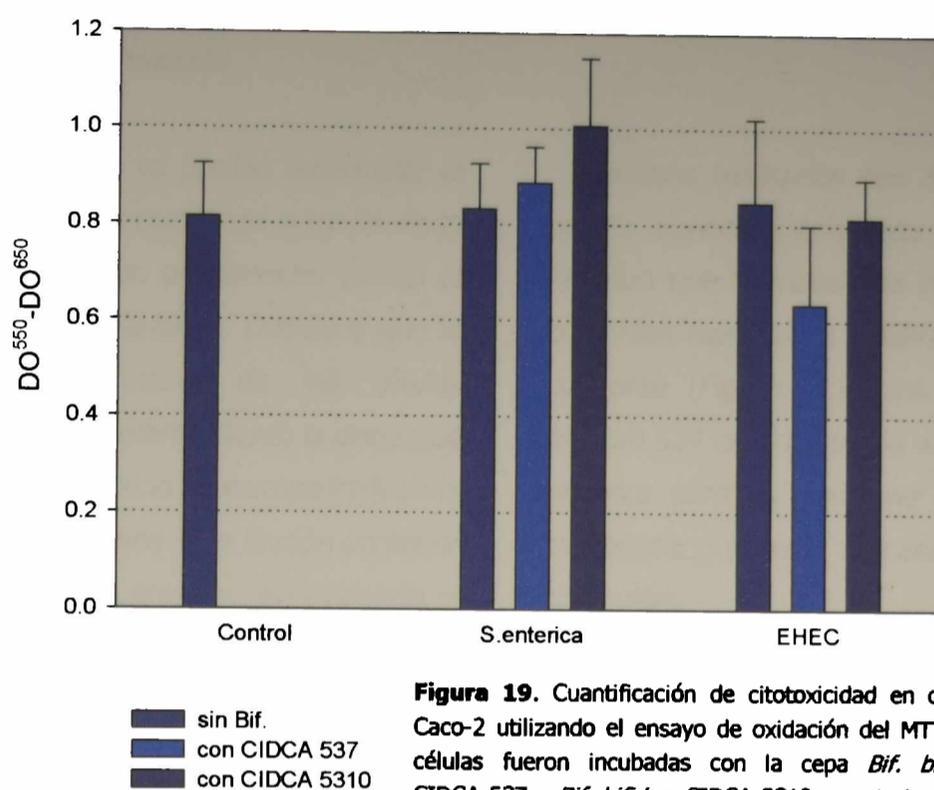
#### ***Cuantificación de citotoxicidad celular por medida de actividad mitocondrial (MTT)***

Con el objeto de cuantificar el grado de daño celular causado por las bacterias patógenas sobre la monocapa en cultivo, se utilizó el ensayo basado en la oxidación de las sales de tetrazolio por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células eucarióticas. Debido a que la oxidación del reactivo no es específica y puede ser lograda también a través de otras enzimas incluyendo las procarióticas, se tuvo especial precaución en incluir controles compuestos únicamente por bacterias. Las medidas de absorbancia se realizaron a 550nm con referencia a 650nm de acuerdo al espectro que ofrecen las sales oxidadas.

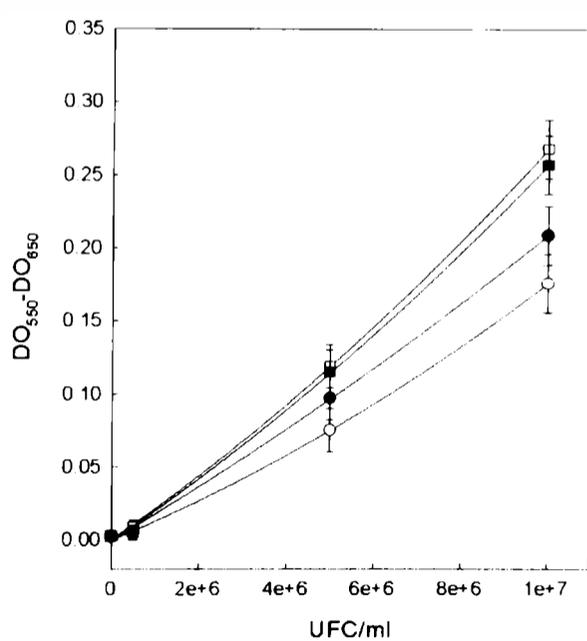
La actividad enzimática observada en las células Caco-2 incubadas con *S. enterica* o EHEC

células sobre las que no se adhirieron las bifidobacterias, no resultaron alteradas cuando la monocapa fue incubada con *S. enterica*. Se podría especular en la participación de un "efecto a distancia" en la protección que involucraría cierta comunicación entre las células eucarióticas, aunque no se tienen evidencias más firmes para asegurarlo.

no fue significativamente diferente de la obtenida para los controles sin patógenos (Figura 20). Por otro lado, se observó mayor actividad enzimática en las células incubadas con bifidobacterias ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) previamente a la incubación con los patógenos. Las curvas obtenidas incubando el cromógeno con bacterias de las cepas 537 o 5310 muestra que las medidas de absorbancia aumentan con la concentración bacteriana (Figura 21) indicando que las bacterias son capaces de oxidar el reactivo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en estudios de competencia utilizando mayores cantidades de bacterias que las utilizadas en este ensayo, podrían dar lugar a conclusiones erróneas. En consecuencia, el ensayo propuesto no permite cuantificar el efecto citopático observado por MEB.



**Figura 19.** Cuantificación de citotoxicidad en células Caco-2 utilizando el ensayo de oxidación del MTT. Las células fueron incubadas con la cepa *Bif. bifidum* CIDCA 537 o *Bif. bifidum* CIDCA 5310 y posteriormente con los patógenos en ensayos independientes. Se utilizaron células Caco-2 de pasaje 40 y 21 días de diferenciación. La concentración de bifidobacterias fue en ambos casos  $1 \times 10^7$  UFC/fosa y la de patógenos de  $1 \times 10^6$  UFC/fosa. Como control se utilizaron fosas de células sin bacterias.

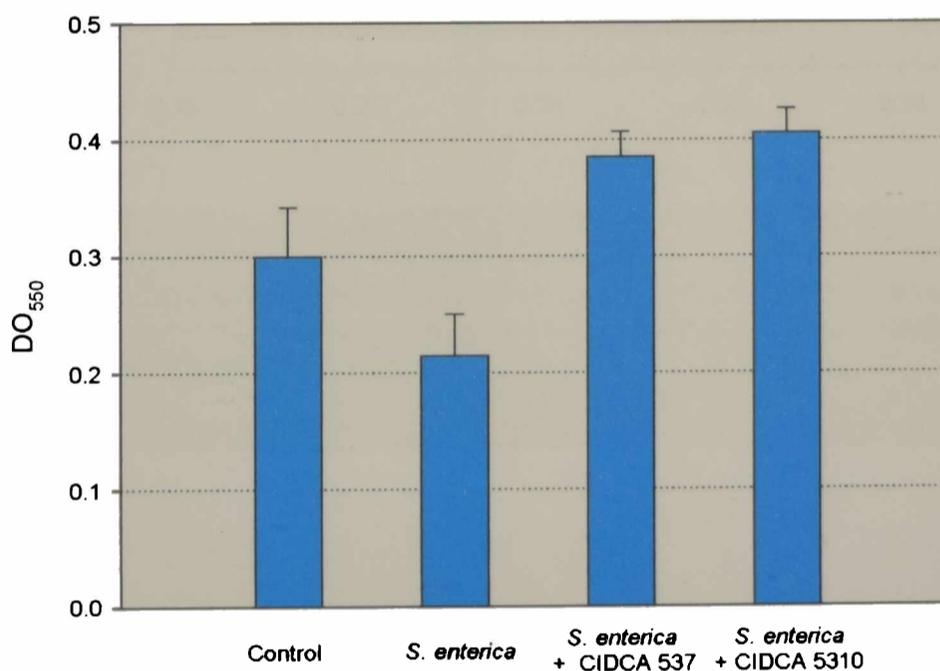


**Figura 20.** Ensayo de oxidación de MTT realizado con bacterias patógenas y bifidobacterias. Los ensayos realizados con diluciones de una suspensión de bifidobacterias solas ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) corresponden a: (●) *Bif. bifidum* 537; (■) *Bif. bifidum* 5310. Los ensayos realizados con una suspensión mixta de bifidobacterias ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) y *S. enterica* ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) corresponden a (○) *Bif. bifidum* 537 + *S. enterica*; (□) *Bif. bifidum* 5310 + *S. enterica*.

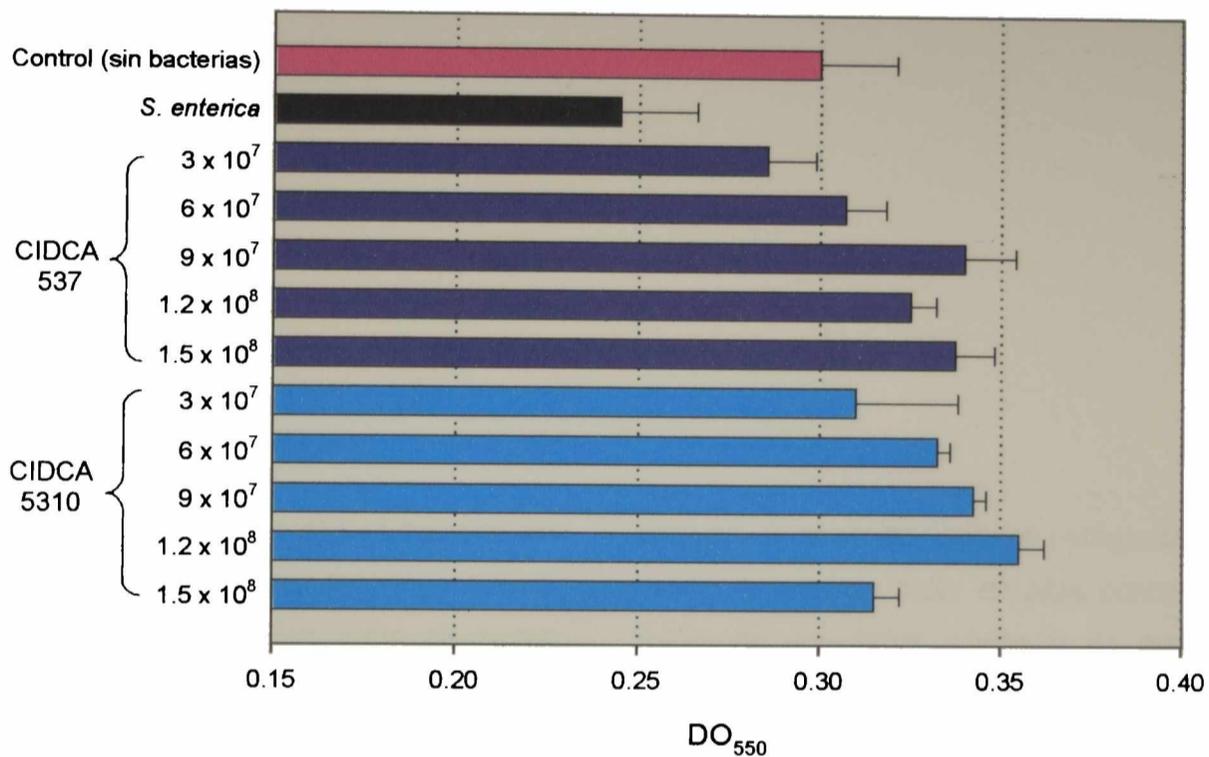
**Cuantificación de desprendimiento celular por tinción con cristal violeta**

Mediante esta técnica es posible determinar el grado de alteración de la monocapa a través de la tinción de las células que permanecen unidas al soporte luego de varios lavados. Debido a que la alteración de la estructura de las células intestinales produce su levantamiento o despegue de la placa de cultivo, sólo la monocapa inalterada resistirá lavados exhaustivos. Una tinción posterior con cristal violeta pondrá entonces en evidencia el daño ocasionado por los enteropatógenos.

Ensayos realizados con *S. enterica* mostraron que la monocapa debilitada se despegó con más facilidad que la monocapa intacta. Las fosas que contenían monocapas debilitadas captaron menos colorante (Figura 21). Una incubación con *Bif. bifidum* 537 o 5310 previa a la incubación con *S. enterica* permitió preservar la estructura de la monocapa y de esta manera resistió los lavados con buffer.



**Figura 21.** Ensayo de citotoxicidad revelado con cristal violeta. Los valores corresponden a triplicados en un mismo pasaje celular. Control: monocapa de Caco-2 sin incubar con ninguna bacteria.



**Figura 22.** Ensayo de citotoxicidad revelado con cristal violeta. Los valores corresponden a duplicados en un mismo pasaje celular. Control: monocapa de Caco-2 sin incubar con ninguna bacteria. Se utilizaron cantidades crecientes de bifidobacterias (*Bif. bifidum* 537; *Bif. bifidum* 5310).

Cantidades crecientes de bifidobacterias mostraron que el efecto de protección se extiende sólo hasta  $1.2 \times 10^8$  UFC/fosa ya que probablemente cantidades mayores resultarían nocivas para las monocapas (Figura 22).

Los resultados obtenidos estarían indicando que en estudios de protección del efecto tóxico de bacterias patógenas a Caco-2 donde están involucradas las bifidobacterias, los ensayos de elección podrían ser la tinción con cristal violeta y la microscopía electrónica.

### **Conclusiones**

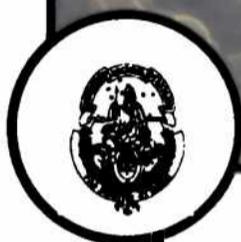
● El modelo experimental *in vitro* compuesto por monocapas de células epiteliales de la línea Caco-2 permitió estudiar la interacción entre diferentes bacterias patógenas y las bifidobacterias.

● Las bifidobacterias estudiadas no lograron evitar la asociación de *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, y *Shigella sonnei* a las células Caco-2; más aún, altas concentraciones de bifidobacterias incrementaron la asociación de estos patógenos a las células epiteliales. Sin embargo, las bifidobacterias disminuyeron el nivel de invasión de los patógenos a estas células.

● Fue posible determinar que en bajas concentraciones, las bifidobacterias no son

capaces de coagregar con los patógenos mientras que sí lo pueden hacer en altas concentraciones formando agregados mixtos y de esta manera ofrecer una posible explicación a la protección contra la invasión a células epiteliales enfrentadas con microorganismos patógenos.

● Los estudios del efecto citopático indicaron que las bifidobacterias tendrían un efecto protector de la estructura del enterocito frente a la incubación con enteropatógenos.



# **DISCUSIÓN GENERAL**

## DISCUSIÓN GENERAL

Los probióticos cuentan con una larga historia. Los primeros registros de consumo de leches fermentadas datan de tiempos pre-bíblicos, pero el concepto de probiótico nació a principios del siglo pasado con los trabajos de Metchnikoff. Desde ese momento, se ha logrado un gran avance en cuanto a evidencias científicas acerca de su utilización en la dieta y sus mecanismos de acción.

En general, los efectos exhibidos por una cepa probiótica difieren de los de otras cepas, inclusive del mismo género y especie. Este carácter cepa-dependiente del efecto probiótico justifica los esfuerzos para identificar la mejor cepa o la combinación de cepas para determinados objetivos. En consecuencia, la selección de una cepa bacteriana implica contar con una metodología apropiada que permita determinar ciertas características deseables. Entre estas

características se encuentran la capacidad adherente y el antagonismo con patógenos.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis relacionados al estudio de la superficie de *Bifidobacterium*, revelaron que determinadas propiedades superficiales se encuentran relacionadas; y por lo tanto, mediante experimentos sencillos es posible seleccionar ciertas cepas cuando se cuenta con un gran número de candidatos.

Las bifidobacterias se pudieron agrupar en dos categorías de acuerdo a su hidrofobicidad superficial. Aquellas con superficie hidrofóbica mostraron mayor tendencia a adherirse, tanto a sustratos inertes como biológicos, incluyendo eritrocitos y células epiteliales en cultivo. En principio, los determinantes de estas propiedades serían factores proteicos e hidratos de carbono.

## Discusión General

Estos últimos podrían estar formando parte de glicoproteínas, ácidos lipoteicoicos o actuar como entidades independientes. El medio de cultivo no afectó sensiblemente estas propiedades.

Se exploró con mayor detalle la composición proteica de la superficie, señalando que los grupos proteicos superficiales no formarían parte de estructuras tipo capa S, descritas para *Lactobacillus*. Un candidato interesante lo constituyen los ácidos lipoteicoicos de superficie. Actualmente, se están desarrollando en nuestro laboratorio estudios de composición lipídica de superficie y su relación con la hidrofobicidad, potencial zeta y adherencia.

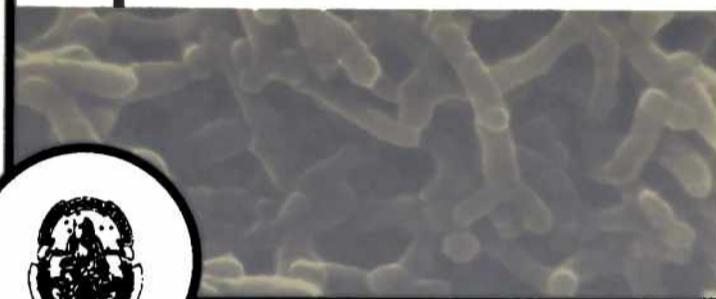
El antagonismo con patógenos fue explorado en un ensayo *in vitro* constituido por un modelo comúnmente usado para obtener información acerca de los eventos de adherencia e interacción entre microorganismos sobre monocapas de células epiteliales en cultivo.

Las bifidobacterias estudiadas no lograron impedir la asociación de bacterias patógenas a las monocapas de células Caco-2. Sin embargo, fueron efectivas al reducir sensiblemente la invasión de estos enteropatógenos a las células epiteliales. Estudios de coagregación indicaron que las bifidobacterias coagregan con los microorganismos patógenos seleccionados para este ensayo. Estas

observaciones revelan una estrategia para la utilización de probióticos que presenten estas características: el secuestro de patógenos por la formación de agregados mixtos. Por otro lado, se observó un efecto citoprotector de las bifidobacterias en este modelo, reduciendo el efecto nocivo ejercido por *Salmonella enterica* en las células Caco-2. El mecanismo por el cual se logra la protección queda todavía por determinar.

Para observar los efectos probióticos asignados a estas cepas se deben llevar a cabo ensayos *in vivo* con evaluaciones clínicas diseñadas adecuadamente. De todas maneras, regulaciones actuales establecen determinados niveles mínimos en la ingesta de microorganismos y en el contenido de los mismos en productos probióticos. Esto implica contar con herramientas adecuadas para la cuantificación de los microorganismos utilizados como probióticos.

Los resultados presentados en relación al desarrollo de un ensayo para la medida cuantitativa de *Bifidobacterium*, lo presentan como una herramienta útil para este propósito. A través de una combinación del método del Número Más Probable y de la determinación de actividad fosfocetolasa fue posible determinar específicamente bacterias de este género en productos o cultivos polimicrobianos.



# APÉNDICES

## APÉNDICE I

### Medios de cultivo

#### **TPY (triptone-phytone-yeast extract).**

Este medio, cuya composición se muestra en la Tabla 1, se prepara disolviendo en primer término los primeros cinco componentes en la mitad del volumen final de medio. El Tween 80 se disuelve en 30 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada en caliente y una vez disuelto se agrega al medio ya preparado. En la otra mitad del volumen final, se agregan las sales de Mg, Zn y Ca en ese orden partiendo de soluciones 100 x. Finalmente se mezclan ambos volúmenes y se lleva a pH antes de llevar al volumen final. Una vez preparado el medio, se autoclava durante 15 minutos a 1 atmósfera de sobrepresión. Finalmente, se suplementa con 0.05% de cisteína (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) en el momento de hacer el inóculo. La forma de preparación fue optimizada en nuestro laboratorio a fin de evitar la precipitación de sales. En caso de utilizar medio sólido, se agrega 1.2% de agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) al caldo TPY antes de autoclavar.

<b>Componente</b>	<b>g/l</b>
<i>triptona (Difco)</i>	10
<i>peptona de soja (Merck)</i>	5
<i>glucosa (Merck)</i>	5
<i>extracto de levadura (Difco)</i>	2.5
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)</i>	2
<i>CaCl<sub>2</sub> (Mallinckrodt)</i>	0.15
<i>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt)</i>	0.5
<i>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt)</i>	0.25
<i>Tween 80 (Merck)</i>	1
<b>pH 7</b>	

#### **MRS (de Man, Ragosa & Sharpe)<sup>87</sup>.**

Este medio se compró en Difco y viene formulado. Se disuelven 55 g de medio en polvo por cada litro de agua bidestilada. Luego de autoclavar durante 15 minutos a 1 atmósfera de sobrepresión se suplementa con cisteína 0.05% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) en el momento de hacer la inoculación.

En caso de necesitar medio sólido, se agrega agar al 1.2% al caldo MRS antes de autoclavar.

<b>Componente</b>	<b>g/l</b>
<i>peptona</i>	10
<i>extracto de carne</i>	10
<i>dextrosa</i>	20
<i>extracto de levadura</i>	5
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	2
<i>citrato de NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i>	2
<i>acetato de Na</i>	5
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	0.1
<i>MnSO<sub>4</sub></i>	0.05
<i>Tween 80</i>	1
<b>pH 7.2</b>	

\* **Composición de medios de cultivo especiales**

En el Capítulo II se trabajó con los siguientes medios

	<b>MRS</b>	<b>TPY</b>	<b>TPY G</b>	<b>TPY S/P</b>	<b>TPYE</b>
<i>peptona</i>	10	-	-	-	-
<i>triptona</i>	-	10	10	10	10
<i>extracto de carne</i>	10	-	-	-	10
<i>peptona de soja</i>	-	5	5	-	-
<i>dextrosa</i>	20	5	20	5	5
<i>extracto de levadura</i>	5	2.5	2.5	2.5	2.5
$K_2HPO_4$	2	2	2	2	2
<i>citrato de <math>NH_4^+</math></i>	2	-	-	-	-
<i>acetato de Na</i>	5	-	-	-	-
$MgSO_4$	0.1	-	-	-	-
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0.5	0.5	0.5	0.5
$MnSO_4$	0.05	-	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0.25	0.25	0.25	0.25
$CaCl_2$	-	0.15	0.15	0.15	0.15
<i>Tween 80</i>	1	1	1	1	1

**Conservación de las cepas**

Las cepas fueron aisladas como se describió en Pérez y col<sup>327</sup>. Las cepas se mantienen como stock liofilizado y como stock congelado en glicerol. Las cepas se liofilizaron de la siguiente manera: se prepararon cultivos de cada una de las cepas, se centrifugaron a 1000 *g* por 5 min y se resuspendieron en 1 ml de leche descremada 20% (Difco Laboratories, Detroit, MI) esterilizada por

tindalización (3 veces 30 min a vapor fuente). Se colocaron 0.2 ml de cada suspensión en ampollas para liofilización esterilizadas por calor seco (2 horas 150 °C), tapadas con algodón. Luego de cargar las ampollas se liofilizan y se sellan con calor. Si no se pudieran procesar el mismo día, se guardan en jarra gaseada con  $N_2$ .

### ***Generación de condiciones anaeróbicas***

La atmósfera anaeróbica se genera colocando en una jarra de anaerobiosis (Oxoid, Unipath Ltd., Hampshire, Inglaterra) un soporte conteniendo un ovillo de lana de hierro (Virulana®, Mortimer, Argentina) previamente embebido en una solución que contiene 0.05% CuSO<sub>4</sub> (Mallinckrodt Chemical Works, NY), 0.25% Tween 80 y 0.05% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck Química Argentina, Bs. As., Argentina), pH 2. Dentro de la jarra también se coloca un tubo de ensayo conteniendo 1 g de KHCO<sub>3</sub> y 1 g de ácido cítrico (Laboratorios Ciccarelli, Santa Fe, Argentina) al cual se agregan unos mililitros de agua destilada

inmediatamente antes de cerrar la jarra. Este dispositivo para generar anaerobiosis se fundamenta en la reacción de oxidorreducción en la que en medio ácido, el Fe<sup>0</sup> se oxida a Fe<sup>+3</sup> mientras el O<sub>2</sub> se reduce a H<sub>2</sub>O. Por otra parte el ácido cítrico establece las condiciones para que el CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> origine suficiente CO<sub>2</sub> para generar la atmósfera deseada. En todos los casos se testearon las condiciones de anaerobiosis con un indicador de anaerobiosis adecuado (Oxoid, Unipath Ltd., Hampshire, Inglaterra).

### ***Preparación del colorante Cristal Violeta (CV)***

El colorante CV se prepara disolviendo 1 g de cristal violeta (Merck, Darmstadt, Alemania) en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se filtra y se realiza una dilución en H<sub>2</sub>O destilada para obtener una solución de trabajo al 0.1% final.

### ***Medio de cultivo para células Caco-2***

#### ***RPMI-1640***

Cada frasco se disuelve en un 10% del volumen final requerido (1 litro) de agua bidestilada estéril hasta que el polvo se halla disuelto. Luego se adicionan 2.2 g de NaHCO<sub>3</sub> y se lleva a pH 7.2-7.4 con NaOH 2N. Se esteriliza por filtración con membrana de 0.22 μm (Millipore Co., Bedford, MA). Posteriormente se le adiciona asepticamente 20% de suero fetal bovino estéril (Gen S. A.,

Buenos Aires, Argentina) inactivado térmicamente a 56 °C durante 30 minutos\* y una solución de antibióticos AGP 50x (Penicilina 312 mg; Estreptomicina 500 mg; piruvato sódico 270 mg; glutamina 1.46g; agua bidestilada 100 ml). Como antimicótico se empleó fungizona 2.5 μg/ml.

\* La inactivación del suero tiene como objeto eliminar factores termolábiles del sistema de complemento que podrían originar lisis de las células eucarióticas.

### ***Cultivo de las células intestinales de la línea Caco-2***

Las células Caco-2 se mantienen almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en viales de 1 ml de medio RPMI-1640 con 20% de suero adicionado de 5% de dimetilsulfóxido (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se amplifican de la siguiente manera: se descongela un vial a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se cultiva en una botella de  $25\text{ cm}^2$  (Corning Costar Co., Cambridge, MA) con 5 ml de medio RPMI-1640 con 20% de suero fetal bovino inactivado, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una estufa de atmósfera controlada (5%  $\text{CO}_2$ -95% aire) cambiándoles el medio cada 2 días. A los 4-5 días se tiene una monocapa confluyente y se replica a una botella de  $75\text{ cm}^2$ .

Para repicar una monocapa, se observa previamente al microscopio invertido (Wuzhou Optical Instrument Factory) la botella que se va a subcultivar con el objeto de evidenciar si la monocapa es continua y uniforme. Si esta es la situación, se descarta el medio ya agotado y se lava 2 veces con 10 ml de solución GKN (NaCl 800 mg; KCl 40 mg; glucosa 200 mg;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  69 mg;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  157 mg; agua bidestilada 100 ml; pH 7.2-7.4). Se colocan 0.6 ml de solución de tripsina 10x (tripsina 0.075g; NaCl 0.8 g; KCl 0.04 g; glucosa 0.1 g;  $\text{NaHCO}_3$  0.058; EDTA 0.02 g; agua bidestilada 100 ml; rojo de fenol 0.5 mg) con 5.4 ml de solución GKN y se lleva a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos en estufa. Cuando se observen los primeros indicios de desprendimiento celular se raspan con scraper las células que quedan adheridas más firmemente. Luego de transcurridos los 3 minutos, se diluye el material con 10 ml de medio RPMI-1640 adicionado de 20% de suero

fetal bovino para inactivar a la enzima. Se pipetea suavemente, sin hacer espuma para disgregar conglomerados celulares y homogeneizar. Posteriormente se traspasa todo el volumen a una botella de  $75\text{ cm}^2$  (amplificación 1:3). Se incuba en las condiciones mencionadas anteriormente y se les cambia el medio cada dos días.

Las monocapas de células Caco-2 que van a ser utilizadas para los ensayos de adherencia o competencia, se preparan en placas de cultivo de células de 24 fosas o de 6 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA). En el caso de las placas de 24 fosas, se colocan 0.5 ml de una suspensión obtenida por tripsinación de una botella de  $75\text{ cm}^2$  en cada fosa, de manera que se siembren  $2 \times 10^5$  células/fosa. Las placas se incuban por 21 días y el medio se cambia cada 2 días. En el caso de placas de 6 fosas, se colocan 2 ml de la suspensión.

Para algunos ensayos, las placas se preparan colocando en cada fosa un vidrio de 12 mm de diámetro (Assitent, Alemania) sobre el cual se desarrollará la monocapa. Sobre estos vidrios se realizan los ensayos de adherencia que posteriormente se procesen por microscopía óptica. Los vidrios son lavados con agua y detergente no iónico (Extran MA02 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) y luego de un enjuague exhaustivo, con agua primero y con agua destilada después, se escurren y se colocan en cajas de Petri para esterilizarlos en autoclave.

## **Electroforesis de proteínas**

Las composiciones de las soluciones empleadas para realizar las corridas electroforéticas desnaturizantes son las siguientes:

Solución de acrilamida-bisacrilamida 30.8%	
acrilamida	30 g
bisacrilamida	0.8 g

Disolver en 80 ml de agua bidestilada, filtrar y llevar a 100 ml. Guardar en frasco color caramelo.

Buffer de electrodo o corrida 5x	
glicina	72 g
Tris base	15 g
SDS	5 g

Disolver en agua bidestilada, llevar a pH 8.3 con HCl 1N. El volumen final es de 1 litro. Luego llevar a 5 litros para usar.

Buffer del gel separador 4x	
Tris base	18.2 g
SDS	0.6 g
Temed	0.6 ml

Disolver en agua bidestilada. Llevar a pH 8.8 con HCl 1N. El volumen final es de 100 ml.

Buffer de stacking 4x	
Tris base	6.05 g
SDS	0.2 g
Temed	0.2 ml

Disolver en agua bidestilada. Llevar a pH 6.8 con HCl 1N. El volumen final es de 100 ml.

Buffer de muestra 4x	
Buffer stacking	4 ml
sacarosa	20%
azul de bromofenol	0.2 mg
$\beta$ -mercaptoetanol	5%

Se prepara una solución de sacarosa 40% de la que se toman 4 ml para preparar el buffer

Persulfato de amonio	12 mg/ml
----------------------	----------

Conservar congelado a -80°C

Colorante	
Coomasie R	1.92 g
metanol	400 ml
agua bidestilada	400 ml
ácido acético	160 ml

Decolorante	
etanol	250 ml
ácido acético	100 ml
agua destilada	650 ml

Marcadores de peso molecular  
Se utilizó un kit de calibración de bajo peso molecular (Pharmacia, LKB Biotechnology Inc., Piscotawog, NJ) compuesto por las siguientes proteínas: fosforilasa b (94 KDa), seroalbúmina bovina (67 KDa), ovoalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (30 KDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1KDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.4 KDa).

Preparación del gel separador	
buffer separador	1.5 ml
agua bidestilada	1.58 ml

## Apéndices

acril-bis	2.92 ml
persulfato	50 $\mu$ l

### Preparación del gel apilador

buffer stacking	1.25 ml
agua bidestilada	3.00 ml
acril-bis	0.65 ml
persulfato	100 $\mu$ l

### Condiciones de corrida

Las corridas electroforéticas se realizaron a temperatura ambiente con una corriente constante de 20 mA por placa hasta que las muestras entren al gel y luego se sube la corriente a 30 mA por

placa hasta el final de la corrida. Puede darse el caso que hacia el final de la corrida, esta se limite por voltaje. En este caso se fija un máximo de 220 V para ambas placas.

### Coloración-decoloración de geles

Una vez terminada la corrida, se retiran los geles de las placas y se lava con agua destilada. Luego se sumergen en la solución colorante durante toda la noche. Luego se escurren y se sumergen en la solución decolorante hasta que no presente coloración de fondo y se observen bandas nítidas. Se escurren y se conservan en agua destilada con unos ml de ácido acético para evitar el crecimiento de hongos.

## APENDICE II

**Tabla 4.** Número Más Probable por g o ml de muestra utilizando series de 3 tubos inoculados con 0.1, 0.01 y 0.001 ml de g o muestra

<i>Tubos positivos</i>				<i>Tubos positivos</i>			
<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>	<b>NMP</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>	<b>NMP</b>
0	0	0		2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	

**Tabla 5.** Número Más Probable por 100 g o ml utilizando series de 5 tubos inoculados con 3 diluciones en series geométricas

<i>Tubos positivos</i>				<i>Tubos positivos</i>				<i>Tubos positivos</i>			
1	0.1	0.01	NMP	1	0.1	0.01	NMP	1	0.1	0.01	NMP
0	0	0		1	0	0	2.0	2	0	0	4.5
0	0	1	1.8	1	0	1	4.0	2	0	1	6.8
0	0	2	3.6	1	0	2	6.0	2	0	2	9.1
0	0	3	5.4	1	0	3	8.0	2	0	3	12
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16
0	1	0	1.8	1	1	0	4.0	2	1	0	6.8
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32

<i>Tubos positivos</i>				<i>Tubos positivos</i>				<i>Tubos positivos</i>			
1	0.1	0.01	NMP	1	0.1	0.01	NMP	1	0.1	0.01	NMP
3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
3	1	1	12	4	1	1	21	5	1	1	46
3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	

## APENDICE III

### ***Tipificación de cepas patógenas por pruebas bioquímicas***

Se realizó una tipificación en base a las pruebas bioquímicas que establece el Manual Bergey (1986). Además, para algunas cepas se realizó una tipificación mediante el sistema EM Ident E<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Alemania).

Según el Manual Bergey, las pruebas bioquímicas necesarias para establecer diferencias entre los géneros de las enterobacterias a utilizar son:

- Prueba del TSI (three sugars and iron)
- Prueba del Citrato
- Prueba del Indol
- Prueba del Rojo de Metilo
- Prueba de Voges Proskauer
- Prueba de la Oxidasa

**1) Prueba del TSI:** Este ensayo permite determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar la glucosa y/o lactosa con producción de acidez o acidez con gas y la producción de SH<sub>2</sub>.

El medio contiene extracto de carne 0.3%, extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 2%, lactosa 1%, sacarosa 1%, glucosa 0.1%, citrato ferroso 0.03%, ClNa 0.5%, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 0.5%, rojo de fenol 2mg%, agar 1.2%, pH 7.4. De un cultivo abundante y fresco, se inocula por punción con ansa recta y luego se efectúa una estría en la superficie del medio.

Los microorganismos que utilizan lactosa y/o sacarosa producen acidez suficiente en todo el medio de cultivo. Los microorganismos que solo utilizan glucosa producirán una menor acidez que no alcanzará a neutralizar los productos alcalinos de la descarboxilación oxidativa de las peptonas que se producen en la superficie del medio (en presencia de oxígeno). El medio posee tiosulfato como fuente de azufre y una sal ferrosa como indicador de la producción de SH<sub>2</sub>.

Los resultados posibles son: color amarillo por producción de acidez y color rojo en caso de quedar el medio alcalino. Si el medio está amarillo en profundidad y en superficie, el microorganismo es fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa. Si está rojo en superficie y amarillo en profundidad, el microorganismo solo fermenta glucosa. Si queda todo rojo o rojo en superficie y sin cambio en profundidad, el microorganismo es no fermentador de ninguno de los tres azúcares. Si el agar se rompe o se desplaza, se debe a producción de gas por el microorganismo. Si el medio se ennegrece, es por producción de SH<sub>2</sub>.

**2) Prueba del Citrato:** La prueba se fundamenta en la determinación de la capacidad de un microorganismo de utilizar citrato como única fuente de carbono. Los microorganismos que utilizan citrato como única fuente de carbono también utilizan sales de amonio como única

## Apéndices

fuentes de nitrógeno, produciendo un viraje del indicador por alcalinización del medio.

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas, se siembra realizando estrías con ansa recta en medio Simmons en pico de flauta ( $\text{SO}_4\text{Mg}$  0.02%,  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  0.1%,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0.1%, citrato de Na 0.2%,  $\text{ClNa}$  0.5%, agar 1.5%, azul de bromotimol 8mg%). Se incuba a 37 °C por 24 hs o más.

El medio sin inocular es color verde, una prueba positiva muestra crecimiento con viraje del indicador a azul, una prueba negativa muestra crecimiento pero sin viraje del indicador.

**3) Prueba del Indol:** El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar el indol a partir de la molécula de triptofano. El indol producido se detecta por un reactivo con el que produce un compuesto de condensación de color rojo-violáceo.

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 hs, con ansa en anillo, se siembra en caldo tripton (peptona de caseína 1%,  $\text{ClNa}$  0.5%, pH 7.3). Luego de 24 hs de incubación, se retira una alícuota en forma aséptica y se le agregan 5 gotas de reactivo Kovacs o Erlich (*p*-dimetilamino-benzaldehído en alcohol metílico 0.5%). Se agita suavemente y se interpreta.

Una reacción positiva se verifica por la aparición de un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica. En una reacción negativa no se produce color en la capa alcohólica y ésta toma la coloración del reactivo (amarillo).

**4) Prueba del Rojo de Metilo:** La prueba se basa en comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales +ácidos de fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Se emplea el rojo de metilo como indicador de pH.

A partir de un cultivo puro de 24hs se siembra con ansa en anillo en medio Clark y Lubs (peptona de caseína 0.7%, glucosa 0.5%,  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0.5%, rojo de metilo 0.04%). Luego de 24 hs de incubación a 37 °C se hace una lectura inicial que se confirma a las 48 hs.

La prueba se considera positiva con un color rojo estable en la superficie del medio (pH 4.4). La prueba es negativa si el color es amarillo (pH 6.0) en la superficie.

**5) Prueba de Voges Proskauer:** En este ensayo se evalúa la capacidad de algunos microorganismos de degradar la glucosa dando un compuesto final neutro (2,3-butilenglicol). Se pone de manifiesto por la presencia de un precursor de éste, el acetilmetilcarbinol o acetoína. La acetoína se oxida a diacetilo en presencia de  $\text{O}_2$  en medio alcalino. Este diacetilo reacciona con la guanidina presente en el medio dando un compuesto de condensación de color rojo rosado. Se utiliza el  $\alpha$ -naftol como catalizador de la oxidación.

La siembra se realiza de la misma manera que para la prueba del Rojo de Metilo en medio de Clark y Lubs. Luego de 24 hs de incubación se retira una alícuota del cultivo y se le agregan 0.6

## Apéndices

ml de solución de  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -naftol 5% en etanol) y luego 0.2 ml de NaOH 40%. Agitar.

Un resultado positivo se verifica por un color rojo rosado en la superficie del medio y negativo si el color es amarillo. Puede formarse un color cobrizo debido a los reactivos al mezclarse, pero aún así la reacción es negativa.

**6) Prueba de la oxidasa:** El objetivo es determinar la presencia de la enzima citocromo oxidasa. Esta enzima se encuentra en bacterias aerobias o anaerobias facultativas formando parte de la cadena respiratoria. Actúa activando la

oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez es aceptor de hidrógeno final, produciendo agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

En un tubo de hemólisis se prepara una suspensión densa del microorganismo es estudio, en 0.2 ml aproximadamente de agua destilada. Se coloca un disco de oxalato de *p*-amino-dimetilanilina (Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina); rápidamente se produce un color rosado que se intensifica al fucsia cuando la reacción es positiva. La reacción ocurre en forma inmediata. Una reacción lenta (más de 2 min) debe considerarse negativa.

### **Tipificación según el sistema EM Ident E®**

**Principio.** La identificación con EM Ident E® consiste en 21 reacciones bioquímicas, las cuales se evalúan e interpretan después de incubar durante 18-24 hs a 35-37°C. La interpretación manual puede hacerse determinando un código numérico de 7 dígitos, el cual se busca en el correspondiente libro de códigos de referencia del EM Ident E®.

**Preparación del inóculo.** De un cultivo Gram negativo, oxidasa negativo puro en agar (preferencialmente de medio no selectivo) se toma una colonia bien aislada y se suspende en 3-5 ml de solución fisiológica estéril (0.85% NaCl). Se ajusta la turbidez a un patrón de McFarland de 0.5 (BioMérieux, Francia) correspondiente a  $10^8$  UFC/ml.

**Inoculación.** Se sacan la placas de microtitulación del sobre de aluminio y se marca por un lado. Se inoculan 2 filas para cada identificación bacteriana, pipeteando 100  $\mu$ l de la respectiva suspensión en cada uno de las 24 fosas. A continuación se colocan 50  $\mu$ l de aceite mineral estéril en cada una de las fosas correspondientes a la prueba de producción de SH<sub>2</sub>.

**Incubación.** Luego de inocular las fosas, se sella la placa con las tiras adhesivas perforadas suministradas por el fabricante y se incuba 18-24 hs a 35-37 °C. Es importante verificar el crecimiento de las fosas control (CS). En caso de crecimiento negativo, se incuba otras 18-24 hs.

**Lectura e interpretación.** Se retira la tira adhesiva de la placa y se colocan 50  $\mu$ l del reactivo

TDA (triptofano deaminasa) y del reactivo spot-indol en las fosas que corresponda. Se esperan como mínimo 2 min (máximo 30 min) para permitir el desarrollo completo del color antes de iniciar la lectura. Se lee la placa con ayuda de una fuente de

luz. Se marcan las reacciones positivas en una hoja de evaluación. La evaluación de las reacciones positivas y negativas se efectúa de acuerdo a la Tabla 6.

**Tabla 6.** Esquema para la evaluación visual de EM Ident E®

<b>Reacción</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
TDA	rojo-pardo	amarillo-pardo claro
H <sub>2</sub> S	precipitado negro	sin precipitado
ESC	pardo oscuro a negro	crema
H <sub>2</sub> S/ESC cont.	Control para las pruebas anteriores	
IND	azul	rojo, rosado
URE	azul-verde	amarillo-verde
LDC	azul-verde	amarillo-verde
ODC	azul-verde	amarillo-verde
ADH	azul-verde	amarillo-verde
GLU	amarillo-verde	azul-verde
CIT	azul-verde	amarillo-verde
MAL	azul-verde	amarillo-verde
VP	azul-verde	amarillo-verde
DEC cont., GLU	Control negativo para las pruebas anteriores. En caso de que DEC control sea amarillo, color verde se considera positivo. En caso de que DEC sea verde, color azul-verde o azul se considera siempre positivo. Un color igual al control se considera negativo	
RHA	amarillo-verde	azul-verde
SUC	amarillo-verde	azul-verde
ADO	amarillo-verde	azul-verde
INO	amarillo-verde	azul-verde
XYL	amarillo-verde	azul-verde
SORB	amarillo-verde	azul-verde
S cont.	Control negativo para las pruebas anteriores	
ONPG	amarillo	inoloro
ONPX	amarillo	inoloro
PGUR	amarillo	inoloro
CS cont.	Control negativo para las pruebas anteriores	

Abreviaturas: TDA, triptofano deaminasa; ESC, esculina; IND, indol; URE, urea; LDC, lisina decarboxilasa; ODC, ornitina decarboxilasa; ADH, arginina dehidrolasa; DEC-cont., control decarboxilasa; GLU, glucosa; CIT, citrato; MAL, malonato; VP, Voges-Proskauer; S-cont., control azúcares; RHA, ramnosa; SUC, sacarosa; ADO, adonitol; INO, inositol; XYL, xilosa; SORB, sorbitol; ONPG, o-nitrofenil-β-galactosidasa; ONPX, o-nitrofenil-xilopiranososa; PGUR, p-nitrofenil-β-glucuronidasa; CS, control de sustratos cromogénicos.

A partir de los resultados se obtiene un código de 7 dígitos, agrupando los resultados en temas y asignando un valor a cada reacción positiva de acuerdo al manual. Los resultados negativos se cuentan siempre como 0. Luego se suman los valores de cada tema de reacciones para obtener cada uno de los dígitos. Finalmente se busca el código resultante en el libro de códigos de referencia.

**NOTA:** Debido a que para algunas cepas sólo se pudo tipificar hasta el nivel de género, se realizó una tipificación posterior por serología para conocer la especie. Dicha tipificación fue gentilmente realizada por el Dr H. Lopardo en el Hospital Garrahan.

### Resultados de la tipificación

Para las cepas de enteropatógenos obtenidas del Hospital Garrahan se realizaron tipificaciones en base a pruebas bioquímicas a partir de cultivos puros. Los resultados obtenidos se volcaron en la Tabla 7. Debido a que para algunas cepas sólo se pudo tipificar hasta el nivel de género (muestras 4

a 7), se realizó una tipificación posterior por serología (por aglutinación con antisueros somáticos y flagelares) para conocer la especie. Dicha tipificación fue gentilmente realizada por el Dr H. Lopardo en el Hospital Garrahan. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

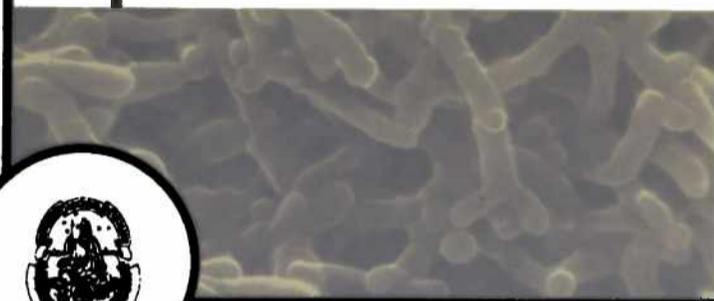
**Tabla 7.** Resultados de las pruebas bioquímicas realizados sobre las bacterias entéricas.

<b>Muestra</b>	<b>TSI</b>	<b>Citrato</b>	<b>Indol</b>	<b>RM</b>	<b>VP</b>	<b>Ox</b>	<b>Identificación</b>
1	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> con gas	-	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
2	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	-	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
3	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	-	+	+	-	-	<i>Escherichia coli</i>
4	H <sup>+</sup> /OH <sup>-</sup> con SH <sub>2</sub>	+	-	+	-	-	<i>Salmonella sp.</i>
5	H <sup>+</sup> /OH <sup>-</sup> con SH <sub>2</sub>	+	-	+	-	-	<i>Salmonella sp.</i>
6	H <sup>+</sup> /OH <sup>-</sup>	-	-	+	-	-	<i>Shigella sp.</i>
7	H <sup>+</sup> /OH <sup>-</sup>	-	-	+	-	-	<i>Shigella sp.</i>

RM: Prueba del Rojo de Metilo; VP: Prueba de Voges Proskauer; Ox: Prueba de la Oxidasa

**Tabla 8.** Resultados de la tipificación por aglutinación con antisueros somáticos y flagelares de las bacterias entéricas obtenidas del Hospital Garrahan.

<b>Muestra</b>	<b>Identificación y denominación</b>
1	<i>Escherichia coli</i> EHEC 18773
2	<i>Escherichia coli</i> EPEC 18731
3	<i>Escherichia coli</i> EIEC 173
4	<i>Salmonella enterica</i> var. <i>infantis</i>
5	<i>Salmonella</i> sp. 521
6	<i>Shigella sonnei</i> 170
7	<i>Shigella sonnei</i> 171



# REFERENCIAS

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Abbad Andaloussi S., Talbaoui H., Marczak R. and Bonlay R. 1995. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 995
- <sup>2</sup> Adlerberth I., Ahmé S., Johansson M.-L., Molin G., Hanson L. Å. and Wold A. E. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2244
- <sup>3</sup> Alm L. 1982. *J. Dairy Sci.* **65**: 353
- <sup>4</sup> Anand S. K., Srinivasan R. A. and Rao L. K. 1985. *Cultured Dairy Prod. J.* **2**: 21
- <sup>5</sup> Andersson A., Granum P. E. and Rønner U. 1998. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 93
- <sup>6</sup> Archibald A. R. 1974. *Adv. Microbial Physiol.* **11**: 53
- <sup>7</sup> Argenzio R. A. and Meuten D. J. 1991. *Dig. Dis. Sci.* **36**: 1459
- <sup>8</sup> Anón. 1994. Chr. Hansen's Laboratorium, Denmark
- <sup>9</sup> Ayebo A. D., Agelo I. A. and Shahani K. M. 1980. *Milchwissenschaft* **35**: 730
- <sup>10</sup> Bahaka D., Neut C., Khattabi A., Monget D. and Gavini F. 1993. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 439
- <sup>11</sup> Barefoot S. F. and Klaenhammer T. R. 1983. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808
- <sup>12</sup> Barrow P. A., Brooker B. E., Fuller R. and Newport M. J. 1980. *J. Appl. Bacteriol.* **48**: 147
- <sup>13</sup> Baselsky V. S. and Parker C. D. 1978. *Infect. Immun.* **21**: 518
- <sup>14</sup> Beachey E. H. 1980. Bacterial adherence. Receptors and recognition. Vol 6. Chapman & Hall, Londres
- <sup>15</sup> Beachey E. H., Chiang T. M., Ofek I. and Kang A. H. 1977. *Infect. Immun.* **16**: 649
- <sup>16</sup> Beachey E. H. and Ofek I. 1976. *J. Exp. Med.* **143**: 759

## Referencias

- <sup>17</sup> Berg R. D. 1996. *Trends Microbiol.* **11**: 430
- <sup>18</sup> Berg R. D. and Itoh, K. 1996. *Microecol. Ther.* **16**: 131
- <sup>19</sup> Berkley R. C. W., Lynch J. M., Melling P. R., Rutter P. R. and Vincent B. 1980. Microbial adhesion to surfaces. Chichester, Ellis Horwood
- <sup>20</sup> Bernet M. F., Brassart D., Neeser J. R. and Servin A. L. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4121
- <sup>21</sup> Bernet M. F., Brassart D., Neeser J. R. and Servin A. L. 1994. *Gut* **35**: 483
- <sup>22</sup> Bernet-Camard M. F., Liévin V., Brassart D., Neeser J. R., Servin A. L. and Hudault S. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2747
- <sup>23</sup> Bettelheim F., Hashimoto Y. and Pigman W. 1962. *Biochim. Biophys. Acta* **63**: 235
- <sup>24</sup> Beyron R. J. and Bond J. S. 1989. Proteolytic enzymes: A practical approach. Oxford University Press, Nueva York.
- <sup>25</sup> Biavati B. and Mattarelli P. 1991. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 163
- <sup>26</sup> Biavati, B., Sozzi T., Mattarelli P. and Trovatelli C. D. 1992. *Microbiologica* **15**: 197
- <sup>27</sup> Bibiloni R., Sarmiento P. L. and De Antoni G. L. 1998. *Scanning* **20**: 242
- <sup>28</sup> Bielecka M., Biedrzycka E., Biedrzycka E., Smoragiewicz W. and Smieszek M. 1998. *Int. J. Food Microbiol.* **45**: 151
- <sup>29</sup> Bisno A. L. 1995. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **16**: 648
- <sup>30</sup> Blanchette L., Roy D. and Gauthier S. E. 1995. *J. Dairy Sci.* **78**: 1421
- <sup>31</sup> Blaser M. J. 1993. *Trends Microbiol.* **1**: 255
- <sup>32</sup> Blomberg L., Henriksson A. and Conway P. L. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 34
- <sup>33</sup> Blum S., Delneste Y., Alvarez S., Haller D., Pérez P. F., Bode C., Hammes W. P., Pfeifer A. M. A. and Schiffrin E. J. 1999. *Int. Dairy J.* **8**: 63
- <sup>34</sup> Bond J. H., Beggs W. H. and Levitt M. D. 1978. *Gastroenterology* **75**: 419
- <sup>35</sup> Boot H. J., Kolen C. P. A. M. Van Noort J. M. and Pouwels P. H. 1993. *J. Bacteriol.* **175**: 6089
- <sup>36</sup> Boucaud-Maitre Y., Gacon P. H., Ferrini M. and Rochaud O. 1989. *Méd. Mal. Infect.* **19**: 105
- <sup>37</sup> Bouchara J. P., Tronchin G., Annaix V., Robert R. and Senet J. M. 1990. *L Infect. Immun.* **58**: 48
- <sup>38</sup> Bouhnik Y. 1993. *Lait* **73**: 241
- <sup>39</sup> Bouhnik Y., Pochart P., Marteau P., Arlet G., Goderel I. and Rambaud J. C. 1992. *Gastroenterology* **102**: 875
- <sup>40</sup> Bourne K. A., Beebe J. L., Lue Y. A. and Ellner P. D. 1978. *Yale J. Biol. Med.* **51**: 505
- <sup>41</sup> Bowden T. A., Mansberger A. R. and Lykins L. E. 1981. *Am. Surg.* **47**: 173
- <sup>42</sup> Bradford L. 1976. *Anal. Biochem* **72**: 248
- <sup>43</sup> Brinton C. C. Jr. 1959. *Nature* **183**: 782
- <sup>44</sup> Brook I. and Frazier E. H. 1993. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 476
- <sup>45</sup> Brook I. and Myhal M. L. 1991. *Infect. Immun.* **59**: 742
- <sup>46</sup> Brooker B. E. and Fuller R. 1975. *J. Ultrastruct. Res.* **52**: 21

## Referencias

- 47 Busscher H. J. and Weerkamp A. H. 1987. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 165
- 48 Bustos D., Pons S., Pernas J. C., González H., Caldarini M. I., Ogwa K. and De Paula J. A. 1994. *Dig. Dis. Sci.* **39**: 2315
- 49 Caliochia M. L., Wang C. I. E., Nomura T., Yotsuzuka F. and Osato D. W. 1993. *J. Food Prot.* **56**: 954
- 50 Callegari M. L., Riboli B., Sanders J. W., Cocconcelli P. S., Kok J., Venema G., Morelli L. 1998. *Microbiol.* **177**: 1554
- 51 Calleja G. B. 1984. *Microbial Aggregation*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- 52 Cammarota M. C. and Sant'Anna G. L. 1998. *Biotechnol. Lett.* **20**: 1
- 53 Carvalho M. G. S. and Teixeira L. M. 1995. *Curr. Microbiol.* **30**: 265
- 54 Cassels F. J. and London J. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 4019
- 55 Castigliuolo I., LeMont J. T., Letourneau R. et al. 1994. *Gastroenterology* **107**: 657
- 56 Chan R. C. Y., Bruce A. W. and Reid G. 1984. *J. Urol.* **131**: 596
- 57 Chan R. C. Y., Reid G., Irvin R. T., Bruce A. W. and Costerton J. W. 1985. *Infect. Immun.* **47**: 84
- 58 Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L. and Collins J. K. 1997. *Int. J. Food Microbiol.* **35**: 1
- 59 Chauvière G., Coconnier M. H., Kernéis S., Darfeuille-Michaud A., Joly B. and Servin A. L. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 213
- 60 Chauvière G., Coconnier M. H., Kernéis S., Fourniat J. and Servin A. L. 1992. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1689
- 61 Chevalier P., Roy D. and Ward P. 1989. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 619
- 62 Christensen G. D., Baldassarri L. and Simpson W. A. 1995. *En R. J. Doyle and I. Ofek (eds.) Methods in Enzymology Vol 253*, pág 477. Academic Press Inc., San Diego.
- 63 Christensen G. D., Simpson W. A. and Beachey E. H. 1985. *Err. D. C. Savage and M. Fletcher (eds.) Bacterial adhesion, mechanisms and physiological significance*, pág 279. Plenum Publishing Corp., Nueva York
- 64 Chung H. S., Kim Y. B., Chun S. L. and Ji G. E. 1999. *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 25
- 65 Coconnier M. H., Bernet M. F., Kernéis S., Chauvière G., Fourniat J. and Servin A. L. 1993. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 299
- 66 Coconnier M. H., Bernet M. F., Chauvière G. and Servin A. L. 1993. *J. Diarrh. Dis. Res.* **11**: 235
- 67 Coconnier M. H., Klaenhammer T. R., Kernéis S., Bernet M. F. and Servin A. L. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2034
- 68 Colombel J. F., Cortot A., Neut C. and Romond C. 1987. *Lancet* **2**: 43
- 69 Conway P. L., Jouper-Jaan A. and Kjelleberg S. 1985. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 174, pág. 158
- 70 Conway P. L. and Kjelleberg S. 1989. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1175
- 71 Cook R. L., Harris R. J. and Reid G. 1988. *Curr. Microbiol.* **17**: 159
- 72 Costerton J. W., Cheng K.-J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M. and Marie T. J. 1987. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 435
- 73 Costerton J. W., Irvin R. T. and Cheng K.-J. 1981. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 299

## Referencias

- <sup>74</sup> Cottin J., Robert R., Dalajarrige P. L., Loiseau O., Mahaza C., Carbonnelle B. and Senet J. M. 1991. *Res. Microbiol.* **142**: 499
- <sup>75</sup> Courtney H. S., Ofek I., Simpson W. A. and Beachey E. H. 1981. *Infect. Immun.* **32**: 625
- <sup>76</sup> Courtney H. S., Simpson W. A. and Beachey E. H. 1983. *J. Bacteriol.* **153**: 763
- <sup>77</sup> Coyette J. and Ghuyssen J. M. 1970. *Biochemistry* **9**: 2935
- <sup>78</sup> Craven S. E. and Williams D. D. 1997. *Avian Dis.* **41**: 548
- <sup>79</sup> Craven S. E. and Williams D. D. 1998. *J. Food Protect.* **61**: 265
- <sup>80</sup> Cravioto A., Tello A., Villajan H., Ruiz J., del Vedovo S. and Neeser J. R. 1991. *J. Infect. Dis.* **163**: 1247
- <sup>81</sup> Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. and Scardovi V. 1996. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 564
- <sup>82</sup> Crociani J., Grill J.-P., Huppert M. and Ballongue J. 1995. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 146
- <sup>83</sup> Cuperus P. L., Van der Mei H. C., Reid G., Bruce A. W., Khoury A. H., Rouxhet P. G. and Busscher H. J. 1993. *J. Colloid. Interface Sci.* **156**: 319
- <sup>84</sup> Dacie J. V.(Sir) and Lewis S. M. 1984. *Practical Haematology*. Sir J. V. Dacie and S. M. Lewis (eds.) Longman Group Ltd., Londres
- <sup>85</sup> Davidkova G., Popova P., Guencheva G., Bogdanov A., Pacelli E., Auteri A. and Mincheva V. 1992. *Int. J. Immunopharmac.* **14**: 1355
- <sup>86</sup> de Man P., Cedergren B., Enerback S., Larsson A. C., Leffler H., Lundell A. L., Nilson B. and Svanborg-Eden C. 1987. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 401
- <sup>87</sup> de Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E. 1960. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130
- <sup>88</sup> De Petrino S. F., De Jorrat M. E. B. B., Meson O. and Perdigón G. 1995. *Food Agric. Immunol.* **7**: 365
- <sup>89</sup> De Simone C., Ciardi A., Grassi A., Gardini L., Tzantzoglou S., Trinchieri V., Moretti S. and Jirillo E. 1992. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**: 331
- <sup>90</sup> de Urraza P. J., Gómez Zavaglia A., Lozano M. E., Romanovski V. and De Antoni G. L. 2000. *J. Dairy Res.* **67**: 381
- <sup>91</sup> de Valdéz G. F. and Giori G. S. 1987. *J. Food Prot.* **56**: 320
- <sup>92</sup> de Vries W. and Stouthamer A. H. 1967. *J. Bacteriol.* **93**: 574
- <sup>93</sup> de Vuyst L. and Vandamme E. J. 1994. *Err. L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria*, pág 91. Blackie Academic and Professional, Glasgow
- <sup>94</sup> Delneste Y., Donnet-Hughes A., Schiffrin E. J. 1998. *Nutr. Rev.* **56**: S93
- <sup>95</sup> Derjaguin B. V. and Landau L. 1941. *Acta Physicochim. (USSR)* **14**: 633
- <sup>96</sup> Digamon-Beltran M., Feigman T., Klein S. A., Gorbo P. N. and Cunha B. A. 1985. *South Med. J.* **78**: 1138
- <sup>97</sup> Dinakar P. and Mistry V. V. 1994. *J. Dairy Sci.* **77**: 2854
- <sup>98</sup> Dinjus U. y Hänel I. 1997. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **110**: 369
- <sup>99</sup> Dodd H. M. and Gasson M. J. 1994. *Err. M. J. Gasson and W. M. De Vos (eds.) Genetics and*

## Referencias

- biotechnology of lactic acid bacteria, pág 211. Blackie Academic and Professional, Glasgow
- <sup>100</sup> Downs F. and Pigman W. 1969. *Biochem.* **8**: 1760
- <sup>101</sup> Doyle R. J. and Rosenberg M. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity. American Society for Microbiology. Washington
- <sup>102</sup> Doyle R. J. and Rosenberg M. 1995. En R. J. Doyle and I. Ofek (eds.). Methods in Enzymology Vol. 253, pág 542. Academic Press Inc., San Diego.
- <sup>103</sup> Drasar B. S. and Roberts A. K. 1990. *Err.* M. J. Hill and P. D. Marsh (eds.) Human microbial ecology, pág 87. CRC Press, Boca Ratón
- <sup>104</sup> Driessen F. M. and De Boers R. 1989. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 367
- <sup>105</sup> Dubos y col. 1965. *J. Exp. Med.* **122**: 67
- <sup>106</sup> Duffy G. and Sheridan J. J. 1997. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 95
- <sup>107</sup> Duguid J. P., Darekar M. R. and Wheater D. W. F. 1976. *J. Med. Microbiol.* **9**: 270
- <sup>108</sup> Duguid J. P. and Old D. C. 1980. *Err.* E. H. Beachey (ed.). Bacterial adherence, receptors and recognition. Vol 6. Chapman & Hall, Londres
- <sup>109</sup> Duguid J. P., Smith I.W., Depmster G. and Edmunds P. N. 1955. *J. Pathol. Bacteriol.* **70**: 335
- <sup>110</sup> Duncan-Hewitt W. 1990. Nature of the hydrophobic effect. *Err.* Microbial cell surface hydrophobicity. Doyle R. J. and Rosemberg M. (eds.). pág 39. American Society of Microbiology, Washington
- <sup>111</sup> Edmur L. I., Saralkar C., McHugh J. G. and Chiu T. H. 1974. *J. Bacteriol.* **120**: 724
- <sup>112</sup> Ehrmann M., Ludwig W. and Schleifer K.-H, 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 143
- <sup>113</sup> Ellwood D. C., Melling J. and Rutler P. 1979. *Adhesion of microorganisms to surfaces.* Academic Press, Londres
- <sup>114</sup> Elo S., Saxelin M. and Salminen S. 1991. *Let. Appl. Microbiol.* **13**: 154
- <sup>115</sup> Engel J. 1992. *Biochemistry* **31**: 10643
- <sup>116</sup> Etienne L., Girardet J. M. and Linden G. 1994. *Lait* **74**: 313
- <sup>117</sup> Exterkate y col. (1971) citado en P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins. Baltimore
- <sup>118</sup> Falkow S., Isberg R. R. and Portony D. A. 1992. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**: 333
- <sup>119</sup> Faure J. C., Schellenberg D., Baxter A. and Wurzner H. P. 1982. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **52**: 225
- <sup>120</sup> Finegold S. M., Sutter V. L. and Maathisen G. E. 1983. *Err.* D. J. Hentges (ed.) Human Intestinal Microflora and Health Disease. Academic Press, Nueva York
- <sup>121</sup> Finlay B. B. and Falkow S. 1989. *Microbiol. Rev.* **53**: 210
- <sup>122</sup> Finlay B. B. and Falkow S. 1990. *J. Infect. Dis.* **162**: 1096
- <sup>123</sup> Finlay W. J. J., Logan N. A. and Sutherland A. D. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1811
- <sup>124</sup> Firon N., Ofek I. and Sharon N. 1983. *Carbohydr. Res.* **120**: 235
- <sup>125</sup> Firon N., Ofek I. and Sharon N. 1984. *Infect. Immun.* **43**: 1088

## Referencias

- <sup>126</sup> Fischetti V. 1991. *Sci. Am. Infect. Dis.* **162**: 1096
- <sup>127</sup> Fletcher M. 1990. *Methods Microbiol.* **22**: 251
- <sup>128</sup> Fontaine I. F., Aissi E. A. and Bouquelet S. J.-L. 1994. *Curr. Microbiol.* **28**: 325
- <sup>129</sup> Fornstedt N. and Porath J. 1975 *FEBS Lett.* **57**: 187
- <sup>130</sup> Foscher W., Bauer W. and Feigel M. 1987. *Eur. J. Biochem.* **165**: 647
- <sup>131</sup> Freter R. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. *Err.* R. Fuller (ed.) Probiotics: the scientific basis, pág 111. Chapman & Hall, Londres
- <sup>132</sup> Fröman G., Switalski L. M., Faris A., Wadström T. and Höök M. 1984. *J. Biol. Chem.* **23**: 14889
- <sup>133</sup> Fujimoto S., Umeda A., Takade A., Murata K and Amako K. 1989. *Infect. Immun.* **57**: 2563
- <sup>134</sup> Fujiwara S., Hirota T., Nakazato H., Mizutani T. and Mitsuoka T. 1991. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **44**: 261
- <sup>135</sup> Fuller R. 1973. *J. Appl. Bacteriol.* **36**: 131
- <sup>136</sup> Fuller R. 1975. *J. Gen. Microbiol.* **87**: 245
- <sup>137</sup> Fuller R. 1989. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365
- <sup>138</sup> Fuller R. 1992. *Err.* Fuller R. (ed.) Probiotics: The scientific basis, pág 1. Chapman & Hall, Londres.
- <sup>139</sup> Fuller R. 1997. Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall, Londres.
- <sup>140</sup> Fuller R. and Brooker B. E. 1980. *Err.* R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melling, P. R. Rutter and B. Vicent (eds.) Microbial adhesion to surfaces, pág 495. Ellis Horwood Ltd., Chichester
- <sup>141</sup> Gaastra W. and deGraaf F. W. 1982. *Microbiol. Rev.* **46**: 129
- <sup>142</sup> Garber N., Guempel U., Belz A., Gilboa-Garber N. and Doyle R. J. 1992. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**: 331
- <sup>143</sup> Garrote G. 2000. Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. Tesis doctoral, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- <sup>144</sup> Gasser F. 1994. *Bull. Inst. Pasteur* **92**: 45
- <sup>145</sup> Gavini F., Van Esbroeck M., Touzel J. P., Fourment A. and Goossens H. 1996. *Anaerobe* **2**: 191
- <sup>146</sup> Georg L. K., Robertstad G. W., Brinkman S. A. and Hacklin M. D. 1965. *J. Infect. Dis.* **115**: 88
- <sup>147</sup> Giannasca K. T., Giannasca P. J. and Neutra M. R. 1996. *Infect. Immun.* **64**: 135
- <sup>148</sup> Giannuzzi L., Contreras E. and Zaritzky N. 1999. *J. Food. Protect.* **62**: 356
- <sup>149</sup> Gibson A. M., Bratchell N. and Roberts T. A. 1988. *Int. J. Appl. Microbiol.* **6**: 155
- <sup>150</sup> Gibson G. R. and Robertfroid M. B. 1995. *J. Nutr.* **125**: 1401
- <sup>151</sup> Gibson G. R. and Wang X. 1994. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 412
- <sup>152</sup> Gilliland S. E. 1990. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 175
- <sup>153</sup> Gilliland S. E. and Lara R. C. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 898
- <sup>154</sup> Glatz J. F. C. and Veerkamp J. H. 1983. *Anal. Biochem.* **132**: 89

## Referencias

---

- 155 Glegg S. and Swenson D. L. 1994. *En* P. Klemm (ed.) *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines*. CRC Press, Boca Ratón, Florida
- 156 Goldin B. R. and Gorbach S. L. 1980. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 263
- 157 Goldin B. R. and Gorbach S. L. 1984. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**: 756
- 158 Goldin B. R. and Gorbach S. L. 1984b. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**: 689
- 159 Goldin B. R., Gualteri L. J. and Moore R. P. 1996. *Nutr. Cancer* **25**: 197
- 160 Gomes A. M. P. and Malcata F. X. 1998. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 839
- 161 Gómez E., Melgar M. M., Silva G. P. and Gil I. 1988. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 47
- 162 Gómez Zavaglia A., Abraham A., Giorgieri S. and De Antoni G. L. 1999. *J. Dairy Sci.* **82**: 870
- 163 Gómez Zavaglia A., Kociubinski G., Pérez P. F. and De Antoni G. L. 1998. *J. Food Prot.* **61**: 865
- 164 Gómez Zavaglia A., de Urraza P. J. and De Antoni G. L. 2000. *Anaerobe* **6**: 169
- 165 Gothier G. 1997. *Err.* R. Fuller (ed.) *Probiotics 2: applications and practical aspects*, pág 40. Chapman & Hall, Londres
- 166 Granato D., Perotti F., Masserey I., Rouvet M., Golliard M., Servin A. and Brassart D. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1071
- 167 Greene J. D. and Klaenhammer T. R. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4487
- 168 Grill J-P., Crociani J. and Ballongue J. 1995. *Curr. Microbiol.* **31**: 49
- 169 Guillard F., Appelbaum P. C. and Sparrow F. B. 1980. *Ann. Int. Med.* **92**: 635
- 170 Haines W. C. and Harmon L. G. 1973. *J. Appl. Microbiol.* **25**: 436
- 171 Halpern G. M., Vruwink K. G., Van der Water J., Keen C. L. and Gershwin M. E. 1991. *Int. J. Immunotherapy* **VII**: 205
- 172 Hamilton-Miller J. M. T., Shap P. and Smith C. T. 1996. *Br. Med. J.* **312**: 55
- 173 Handley P. S., Harty D. W. S., Wyatt J. E., Brown C. R., Doran J. P. and Gibbs A. C. C. 1987. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3207
- 174 Hansson G. C. y col. 1983. Abstr., Glucoconjugates pág. 631
- 175 Hata D., Yoshida A. and Ohkubo H. 1988. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**: 669
- 176 Hauri H. P., Sterchi E. E., Bienz D., Fransen J. A. and Marxer A. 1985. *J. Cell. Biology* **101**: 838
- 177 Havenaar R. and Huis in't Veld J. H. J. 1992. *En: Wood B. J. B. (ed.) The lactic acid bacteria. Vol 1. The lactic acid bacteria in health and disease*, pág 151. Elsevier Applied Science, Londres
- 178 Hayakawa K., Mizutani J., Wada K., Masai T., Yoshihara I. and Mitsuoka T. 1990. *Microb. Ecol. Health Dis.* **3**: 293
- 179 Hayatsu H. and Hayatsu T. 1993. *Cancer Lett.* **73**: 173
- 180 Hefel H. 1980. Citado por Fox S. M. 1988. *Vet. Med.* Agosto, 806
- 181 Hekmat S. and McMahon D. J. 1992. *J. Dairy Sci.* **75**: 1415
- 182 Henriksson A. and Conway P. L. 1992. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2657

## Referencias

- 183 Henriksson A. and Conway P. L. 1996. *Curr. Microbiol.* **33**: 31
- 184 Henriksson A., Szewzyk R. and Conway P. L. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 499
- 185 Hidaka H., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T. and Tashiro Y. 1986. *Bifidobact. Microflora* **5**: 37
- 186 Hidalgo I. J., Raub T. J. and Borchardt R. T. 1989. *Gastroenterology* **96**: 736
- 187 Higginbotham G. E., Bath D. L. and Butler L. J. 1993. *J. Dairy Sci.* **76**: 1484
- 188 Hill M. J. 1986. En: M. J. Hill (ed.) Factors affecting bacterial metabolism, pág 22. CRC Press, Boca Ratón
- 189 Hilton E., Isenberg H. D., Alpersetein P., France K. and Borenstein M. T. 1992. *Ann. Intern. Med.* **116**: 353
- 190 Holcomb J. E., Frank J. F. and McGregor J. U. 1991. *Cult. Dairy Prod. J.* **8**: 4
- 191 Holtug K., Clausen M. R., Hove H., Christiansen J. and Mortensen P. B. 1992. *Scand. J. Gastroenterol.* **27**: 545
- 192 Hosono A., Lee J., Ametani A., Natsume M., Hirayama M., Adachi T. and Kaminogawa S. 1997. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 312
- 193 Hosono A., Lee J., Ametani A., Natsume M., Hirayama M., Adachi T. and Kaminogawa S. 1998. *Biosci. Microflora* **17**: 97
- 194 Hove H. y Mortensen P. B. 1995a. *Dig. Dis. Sci.* **40**: 320
- 195 Hove H. y Mortensen P. B. 1995b. *Dig. Dis. Sci.* **40**: 1372
- 196 Hove H., Nordgaard-Andersen I. and Mortensen P. B. 1994. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**: 78
- 197 Hudault S., Liévin, Bernet-Camard M.-F. and Servin A. L. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 513
- 198 Hughes D. B. and Hoover D. G. 1995. *J. Dairy Sci.* **78**: 268
- 199 Husmark U. 1993. Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces. Ph D Thesis, Department of Food Science, Chalmers University of Technology and SIK. The Swedish Institute for Food Research. Göteborg, Sweden
- 200 Ingham S. C. 1999. *J. Food Prot.* **62**: 77
- 201 International Dairy Federation. 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bull. 306. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- 202 Ishibashi N. and Shimamura S. 1993. *Food Technol.* **47**: 126
- 203 Isogal H., Isogal E., Hirose K., Hayashi M., Namioka S., Kimura K., Fujii N. and Yoshimura F. 1992. *Bifidobacteria Microflora* **11**: 61
- 204 Ito M., Deguchi S. and Miyamon A. 1990. *Microb. Ecol. Health Dis.* **3**: 285
- 205 Itoh T., Fujimoto Y. and Kawai Y. 1995. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 137
- 206 Iwasaki H., Araki Y., Ito E., Nagaoka M. and Yokokura T. 1990. *J. Bacteriol.* **112**: 845
- 207 Jacques M. and Costerton W. 1987. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 23
- 208 Jay J. M. 1996. Modern food microbiology. Chapman & Hall, Nueva York,
- 209 Jenkinson H. F. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 133

## Referencias

---

- <sup>210</sup> Jepson M. A. and Clark M. A. 1998. *Trends Microbiol.* **6**: 359
- <sup>211</sup> Jiang T., Mustapha A. and Savaiano D. A. 1996. *J. Dairy Sci.* **79**: 750
- <sup>212</sup> Jiang T. and Savaiano D. A. 1997. *Dig. Dis. Sci.* **42**: 2370
- <sup>213</sup> Jin L. Z., Ho Y. W. Ali M. A., Abdulah N., Ong K. B., Jalaludin S. 1996. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 229
- <sup>214</sup> Jones G. W. and Rutter J. M. 1974. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 135
- <sup>215</sup> Kabir A. M., Alba Y., Takagi A., Kamiya S., Miwa T. and Koga Y. 1997. *Gut* **41**: 49
- <sup>216</sup> Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. and Arvilommi H. 1992. *Pediatr. Res.* **32**: 141
- <sup>217</sup> Kanasaki M., Brelheny S., Hillier A. and Jago G. 1975. *Austr. J. Dairy Techn.* **30**: 142
- <sup>218</sup> Kandler and Lauer. 1974. Citado en P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore.
- <sup>219</sup> Katsuji O., Michiyo O. and Tetsuo K. 1989. *Infect. Immun.* **57**: 1635
- <sup>220</sup> Kawase K., 1982. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* **31**: A241
- <sup>221</sup> Kawata T. 1981. *Electron Microscopy* **15**: 115
- <sup>222</sup> Kirjavainen P. V., Ouwehand A. C., Isolauri E. and Salminen S. J. 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 185
- <sup>223</sup> Kitajima H., Sumida Y., Tanaka R., Yuki N., Takayama H. and Fujimura M. 1997. *Arch. Dis. Child.* **76**: F101
- <sup>224</sup> Klaenhammer T. R., Ahn C., Fremaux C. and Milton K. 1992. *Err. R. James, C. Ladzuski and F. Pattus (eds.) Bacteriocins, microcins and lantibiotics*, pág 37. NATA Series H, Springer, Berlin
- <sup>225</sup> Klaver F. A. M., Kingma F. and Bolle A. C. 1990. *Voedings Middel Technologie* **23**: 13
- <sup>226</sup> Klee A. J. 2000. ICR most probable number calculator. Versión 4.04. Risk reduction laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. <http://www.epa.gov/nerlcwww/other.htm>
- <sup>227</sup> Kleinman H. K., McGarvey M. L., Liotta L. A., Robet P. G., Tryggvason K. and Martin G. R. 1982. *Biochemistry* **21**: 6188
- <sup>228</sup> Knox K. W. and Wicken A. J. 1973. *Bacteriol. Rev.* **37**: 215
- <sup>229</sup> Kociubinski G., Pérez P. and De Antoni G. L. 1996. *J. Food Protect.* **59**: 739
- <sup>230</sup> Kociubinski G., Pérez P. and De Antoni G. L. 1999. *J. Food Prot.* **62**:905-912
- <sup>231</sup> Kodooka Y., Fujiwara S. and Hirota T. 1991. *Milchwissenschaft* **46**: 626
- <sup>232</sup> Kohwi Y., Hashimoto Y. and Tamura Z. 1982. *Bifidobact. Microflora* **1**: 61
- <sup>233</sup> Kok R. G., de Waal A., Schut F., Weeling G. W., Weenk G. and Hellingwerf K. J. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3668
- <sup>234</sup> Kurmann J. A. and Rasic J. L: 1983. *Err. R. K. Robinson (ed.) Therapeutic properties of fermented milks.*
- <sup>235</sup> Laburthe M. and Amiranoff B. 1990. *Err. S. J. Schultz, M. Field and R. A. Fritzell (eds.) Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. vol. IV. pág 215. American Physiological Society, Bethesda*

## Referencias

---

- <sup>236</sup> Lachica R. V. 1990. Significance of hydrophobicity in the adhesiveness of pathogenic gram-negative bacteria. Microbial cell surface hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington
- <sup>237</sup> Laemmli U. K. 1970. *Nature* **227**: 680
- <sup>238</sup> Lai F. 2001. Invitation at the International Congress of Probiotics Medicine. Torrance, California.
- <sup>239</sup> Lambert P. A., Hancock I. and Braddley J. 1977. *Biochim. Biophys. Acta* **472**: 1
- <sup>240</sup> Langendijk P. S., Schut F., Jansen G. J., Raangs G. C., Kamphuis G. R., Wilkinson H. F. and Welling G. W. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3069
- <sup>241</sup> Lankaputhra W. E. V. and Shah N. P. 1998. *Biosc. Microflora* **17**: 105
- <sup>242</sup> Lark D. L., Normark S., Uhin B. E. and Wolf-Watz H. 1986. Protein-carbohydrate interactions in biological systems. The molecular biology of microbial pathogenicity. Academic Press, Londres
- <sup>243</sup> Law D. 1994. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 153
- <sup>244</sup> Lee Y. and Salminen S. 1995. *Trends Food Sci. Technol.* **6**: 241
- <sup>245</sup> Lehto E. M. and Salminen S. J. 1997. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**: 125
- <sup>246</sup> Lidebeck A., Overvik E., Rafter J., Nord C. E. and Gustafsson J.-A. 1992. *Microb. Ecol. Health Dis.* **5**: 59
- <sup>247</sup> Liescher S. 1961. *Z. Kinderheik* **85**: 265
- <sup>248</sup> Lilley D. M. and Stillwell R. H. 1965. *Science* **147**: 747
- <sup>249</sup> Lin J. H.-C. and Savage D. 1984. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 67
- <sup>250</sup> Lin J. H.-C. and Savage D. 1985. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1004
- <sup>251</sup> Link-Amster H., Rochat F., Saudan K. Y., Mignot O. and Aeschlimann J. M. 1994. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **10**: 55
- <sup>252</sup> Lipmann F. and Tuttle L. C. 1945. *J. Biol. Chem.* **159**: 21
- <sup>253</sup> Liu T., Gibbons R. J., Hay D. I. and Skobe Z. 1991. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**: 1
- <sup>254</sup> Lortal S., van Heijenoort J., Gruber K. and Sleyter U. B. 1992. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 611
- <sup>255</sup> Ludwicka A., Switalski L. M., Lundin A., Pulverer G. and Wadström T. 1985. *J. Microbiol. Methods* **4**: 169
- <sup>256</sup> Mac Faddin, J. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. William & Wilkins Co., Baltimore
- <sup>257</sup> Mafu A. A., Roy D., Goulet J. and Savoie L. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1969
- <sup>258</sup> Mangin I., Bourget N., Bouhnik Y., Bisetti N., Simonet J.-M. and Decaris B. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1451
- <sup>259</sup> Mann G. V. and Spoerry A. 1974. *Amer. J. Clin. Nutr.* **27**: 464
- <sup>260</sup> Mantere-Alhonen S., Noro K. and Sippola L. 1989. *Fin. J. Dairy Sci.* **XLVII**: 19
- <sup>261</sup> Manzella J. P. and Harootunian R. 1982. *J. Urol.* **128**: 110
- <sup>262</sup> Marshall K. 1976. *Interfaces in microbial ecology*. Harvard University Press, Cambridge

## Referencias

---

- 263 Maslov A. M., Zabodalova L. A., Yevstigneyeva I. N. and Rykunova I. P. 1990. XXIII IDF Congr. **1**: 187
- 264 Masuda K. and Kawata T. 1979. *Microbio. Immunol.* **23**: 941
- 265 Matsumoto H., Erickson R. H., Gum J. R., Yoshioka M., Gum E. and Kim Y. S. 1990. *Gastroenterology* **98**: 1199
- 266 Mayrand D. and Holt S. C. 1988. *Microbiol. Rev.* **52**: 134
- 267 Mayrand D., Mouton C. and Grenier D. 1991. *Err. S. Hamada, S. C. Holtland and J. R. McGhee (eds.). Periodontal disease. Pathogens and host immune responses.* Quintessence Books, Tokyo.
- 268 McCartney A. L., Wenzhi W. and Tannock G. W. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4608
- 269 McEldowney S. and Fletcher M. 1986. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 513
- 270 McGrady J. A., Butcher W. G., Brighton D. and Switalski L. M. 1995. *J. Dent. Res.* **74**: 649
- 271 McGroarty J. A., Lee V., Bruce A. W. and Reid G. 1992. *Microb. Ecol. Health Dis.* **5**: 309
- 272 Mehta A. M., Patel K. A. and Dave P. J. 1983. *Microbios.* **37**: 37
- 273 Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufman P., Dasen G., Wenger S. and Teuber M. 1997. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 57
- 274 MERCOSUR. 1997. Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad de leches fermentadas. Resolución n° 91/97. Recomendación n° 31/97. Montevideo, Uruguay.
- 275 Messner P., Bock K., Christian., Schultz G. and Sleytr U. B. 1990. *J. Bacteriol.* **172**: 2576
- 276 Metchnikoff E. 1907. *The Prolongation of Life.* E. P. Putman's Sons, New York.
- 277 Millsap K., Reid G., Van der Mei H. C. and Busscher H. J. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1867
- 278 Millsap K., Reid G., Van der Mei H. C. and Busscher H. J. 1997. *Biomaterials*
- 279 Millsap K., Reid G., Van der Mei H. C. and Busscher H. J. 1997. *Can. J. Microbiol.* **43**: 284
- 280 Minagawa K. 1970. *Acta Paediatr. Jpn.* **74**: 761
- 281 Miörner H., Johansson G. and Kronvall G. 1983. *Infect. Immun.* **39**: 336
- 282 Mital B. K. and Carg S. K. 1992. *Food Rev. Int.* **8**: 347
- 283 Mitsuoka T. 1982. *Bifid. Microflora* **1**: 3
- 284 Mitsuoka T. 1984. *Bifidobacteria Microflora* **1**: 3
- 285 Mitsuoka T. 1990. *Proc. XXIII Int. Dairy Congr.* **2**: 11
- 286 Mitsuoka T. 1992. *Err. B. J. B. Wood (ed.) The lactic acid bacteria,* pág 69. Elsevier Applied Science, Nueva York
- 287 Mitsuoka T. and Hayakawa K. 1972. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. I Abt. Orig. A.* **223**: 333
- 288 Mizutani T. and Mitsuoka T. 1979. *JNCI* **63**: 1365
- 289 Modler H. W. 1994. *Int. Dairy J.* **4**: 383
- 290 Modler H. W., McKellar R. C. and Yaguchi M. 1990. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **23**: 29
- 291 Modler H. W. and Villa-García L. 1993. *Cult. Dairy Prod. J.* **28**: 4

## Referencias

- 292 Morill J. L., Morrill J. M., Feyerherm A. M. and Laster J. F. 1995. *J. Dairy Sci.* **78**: 902
- 293 Morris J. G. 1979. *Err.* M. Shilo (ed.) Strategies of microbial life in extreme environments. Verlag Chemi, Berlín
- 294 Muñoa F. J. and Pares R. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1715
- 295 Murti T. W., Bouillanne C., Landon M. and Desmazeud M. J. 1992. *J. Food Sci.* **58**: 153
- 296 Nader de Macias M. E., Apella M. C., Romero N. C., González S. N. and Oliver G. 1992. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 407
- 297 Nagayama K., Oguchi T., Arita M. and Honda T. 1995. *Infect. Immun.* **63**: 1987
- 298 Naidu A. S., Bidlack W. R. and Clemens R. A. 1999. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**: 13
- 299 Nakasone N. and Iwanaga M. 1990. *Infect. Immun.* **58**: 61
- 300 Nakaya R. 1984. *Bifidobacteria Microflora* **3**: 3
- 301 Nassif X. and So M. 1995. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 372
- 302 Nebra Y. and Blanch A. R. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5173
- 303 Neeser J. R., Chambaz A., Golliard M., Link-Amster H., Fryder V. and Kolodziejczyk E. 1989. *Infect. Immun.* **57**: 3727
- 304 Neidhart F. C., Ingraham J. L. and Schaechter M. 1990. Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland
- 305 Newman J. 1995. *Sci. Am.* **273**: 58
- 306 Nicovskaya G. N. and Gordienko A. S. 1989. *Mikrobiologiya.* **58**: 448
- 307 Nishizawa Y. 1960. *Shonika Shinryo* **23**: 1213
- 308 Norris R., Flanders T., Tomarelli R. M. and György P. 1950. *J. Bacteriol.* **60**: 681
- 309 Ofek I., Beachey E. H., Jefferson W. and Campbell G. L. 1975. *J. Exp. Med.* **141**: 990
- 310 Ofek I. and Beachey E. H. 1978. *Infect. Immun.* **22**: 247
- 311 Ofek I. and Doyle R. J. 1994. *Err.* I. Ofek and R. J. Doyle (eds.) Bacterial adhesion to cells and tissues, pág 16. Chapman & Hall, New York
- 312 Ofek I., Mirelman D. and Sharon N. 1977. *Nature* **265**: 623
- 313 Okamura N., Nakaya R., Yokota H., Yanai N., Kawashima T. 1986. *Bifidobacteria Microflora* **5**: 51
- 314 Old D. C. 1985. *Err.* M. Sussman (ed.) The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press, Londres
- 315 Op den Camp H. J. M., Oosterhof A. and Veerkamp J. H. 1985. *Infect. Immun.* **47**: 332
- 316 Op den Camp H. J. M., Veerkamp J. H., Oosterhof A and Van Halbeek H. 1984. *Biochim. Biophys. Acta* **795**: 301
- 317 Orban J. I and Patterson J. A. 2000. *J. Microbiol. Methods* **40**: 221
- 318 Ou L-. T. and Marquis R. E. 1970. *J. Bacteriol.* **101**: 92
- 319 Ouwenhand A. C. and Conway P.L. 1996. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 311
- 320 Ouwehand A. C., Isolauri E., Kirjavainen P. V., Tölkö S. and Salminen S. J. 2000. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 10
- 321 Parker R. B. 1974. *Anim. Nutr. Health* **29**: 4

## Referencias

- 322 Payens W., Rethans E. J. M. and De Waard H. 1976. *Milchwissenschaft* **30**: 525
- 323 Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P. and Bellon-Fontaine M.-N. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1725
- 324 Perdigón G., Alvarez S., Nader de Macias M. E., Savoy de Giori G., Medici M. and Núñez de Kairuz M. 1991. *Milchwissenschaft* **46**: 411
- 325 Perdigón G., Alvarez S. and Pesce de Ruiz Holgado A. 1991. *J. Dairy Res.* **58**: 485
- 326 Perdigón G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G. and Gobbato N. 1995. *J. Dairy Sci.* **78**: 1597
- 327 Pérez P. F., Minnaard J., Disalvo E. A. and De Antoni G. L. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 21
- 328 Pigman W., Moschera J., Weiss M. and Tettamanti G. 1973. *Eur. J. Biochem.* **32**: 148
- 329 Pike R. N., Potempa J., McGraw W., Coetzer T. H. T. and Travis J. 1996. *J. Bacteriol.* **178**: 2876
- 330 Pimental G. C. and McClellan A. L. 1960. The hydrogen bond. W. H. Freeman, San Francisco
- 331 Pinto M., Robine-Leon S., Appay M. D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assman P., Haffen K., Fogh J. and Zweibaum A. 1983. *Biol. Cell.* **47**: 323
- 332 Pochart P., Marteau P., Bouhnik Y., Goderel I., Bourlioux P. and Rambaud J. C. 1992. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**: 78
- 333 Pool-Zobel B. L., Munzner R. and Holsapfel W. H. 1993. *Nutr. Cancer* **20**: 261
- 334 Pot B., Ludwig W., Kersters K. and Schleifer K. H. 1994. *En: L. De Vuyst and E. J. Vandamme (eds.). Bacteriocins of lactic acid bacteria*, pág 13. Blackie Academic and Professional. London.
- 335 Proulx M., Gauthier S. F. and Roy D. 1992. *Lait* **72**: 393
- 336 Quigley M. E. and Kelly S. M. 1995. *En: G. R. Gibson and G. T. MacFarlane (eds.) Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*. pág 175. CRC Press, Boca Ratón
- 337 Rada V. 1997. Detection of *Biotechnol. Technol.* **11**: 909
- 338 Rasic J. L. 1990. *IDF Bull* **252**: 24
- 339 Rasic J. L. 1983. *North. Eur. Dairy J.* **49**: 80
- 340 Rasic J. L. and Kurman J. 1983. Bifidobacteria and their role. Birkäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- 341 Read R. R. and Costerton J. W. 1987. *Can. J. Microbiol.* **33**: 1080
- 342 Reddy B. S. and Rivenson A. 1993. *Cancer Res.* **53**: 3914
- 343 Reddy G. V., Friend B. A., Shahani K. M. and Farmer R. E. 1983. *J. Food Protect.* **46**: 8
- 344 Reddy G. V. Shahani K. M. and Benerjee M. R. 1973. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**: 815
- 345 Reid G., Bruce A. W., McGroarty J. A., Cheng K.-J. and Costerton W. 1990. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 335
- 346 Reid G., Cook R. L. and Bruce W. A. 1987. *J. Urol.* **138**: 330
- 347 Reid G., Servin A. L., Bruce A. W. and Busscher H. J. 1993. *Microbios.* **75**: 57
- 348 Reid G. and Tieszer C. 1993. *Cells Mater.* **3**: 171

## Referencias

---

- 349 Resnick I. G. and Levin M. A. 1981. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 427
- 350 Reuter G. 1990. *Bifidobacteria Microflora* **9**: 107
- 351 Robinson J., Goodwin C. S., Cooper M., Burke V. and Mee B. J. 1990. *J. Med. Microbiol.* **33**: 277
- 352 Romond M. B., Ais A., Yazourh A. and Romond C. 1997. *Anaerobe* **3**: 137
- 353 Rönner U., Husmark U. and Henriksson A. 1990. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 550
- 354 Rosengarten R., Kirchoff H., Kerlen G. and Seack K.-H. 1988. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 275
- 355 Redondo-López V., Cook R. L. and Sobel J. D. 1990. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 856
- 356 Rowland I. R. 1995. *Err.* Gibson G. G. and Macfarlane G. T. (eds.) Human Colonic Bacteria. CRC Press, Boca Raton
- 357 Rowland I. R., Bearn C. A., Fischer R. and Pool-Zobel B. L. 1996. *Nutr. Cancer* **26**: 37
- 358 Rowland I. R. and Tanaka R. 1993. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 667
- 359 Rowland I. R., Rumney C. J., Coutts J. T. and Lievens L. C. 1998. *Carcinogenesis* **19**: 281
- 360 Roy D., Ward P. and Champagne G. 1996. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 11
- 361 Rumney C. J. and Rowland I. R. 1995. *Br. Nutr. Found. Bull.* **20**: 195
- 362 Saavedra J. M., Bauman N. A., Oung I., Preman J. A. and Yolken R. H. 1994. *Lancet* **344**: 1046
- 363 Salit I. E. and Gotschlich E. C. 1977. *J. Exp. Med.* **146**: 1169
- 364 Salminen S., Deighton M. 1992. *Dig. Dis.* **10**: 227
- 365 Salminen S., Isolauri E. and Onnela T. 1995. *Chemotherapy* **41**: 5
- 366 Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Err.* J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (eds.) Molecular Cloning: a laboratory manual, 2<sup>da</sup> Edición. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York
- 367 Sanders M. E. and Huis in't Veld J. 1999. *Antoine Leeuwenhoek* **76**: 293
- 368 Sansonetti P. J. 2001. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 3
- 369 Sapico F. L., Wideman P. A. and Finegold S. M. 1976. *Urology* **7**: 382
- 370 Sasmal D., Guhathakurta B., Ghosh A. N., Pal C. R. and Datta A. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 217
- 371 Sato J., Mochizuki K. and Homma N. 1982. *Bifidobacteria Microflora* **1**: 51
- 372 Satonaka K., Ohashi K., Nohmi T., Yamamoto T., Abe S., Uchida K. and Yamaguchi H. 1996. *Microbiol. Immunol.* **40**: 217
- 373 Savage D. C. 1972. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1372
- 374 Savage D. C. 1977. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 107
- 375 Savage D. C. 1984. *Microecol. Ther.* **14**: 169
- 376 Scardovi V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. pág. 1418-1434. *En* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore.
- 377 Scardovi V., Sgorbati B. and Zani G. 1971. *J. Bacteriol.* **106**: 1036

## Referencias

- 378 Scardovi V. and Trovatelli L. D. 1965. *Ann. Microbiol.* **15**: 19
- 379 Schiffrin E. J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J. M. and Donnet-Hughes A. 1995. *J. Dairy Sci.* **78**: 491
- 380 Schlessinger D. *Microbiology-1982*. American Society for Microbiology. Washington
- 381 Schneitz C., Nuotio L. and Lounatma K. 1993. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 290
- 382 Schramm M., Klybas V. and Racher E. 1958. *J. Biochem.* **233**: 1283
- 383 Schwan A., Sjolín S., Trottestam U. and Aronsson B. 1984. *Scand. J. Infect. Dis.* **16**: 211
- 384 Scrimshaw N. S. and Murray E. B. 1988. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**: 1083
- 385 Sekine K., Kawashima T. and Hashimoto Y. 1994. *Bifidobact. Microflora* **13**: 79
- 386 Sekine K., Ohta J., Onishi M., Tatsuki T., Shimokawa Y., Toida T., Kawashima T. and Hashimoto Y. 1995. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 148
- 387 Sekine K., Watanabe-Sekine E., Toida T., Kasashima T., Kataoka T. and Hashimoto Y. 1994. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **16**: 589
- 388 Sghir A., Chow J. M. and Mackie R. I. 1998. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 769
- 389 Sgorbati B. 1979. *Antoine Leeuwenhoek* **45**: 557
- 390 Sgorbati B., Biavati B. and Palenzona D. 1995. *En B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (eds.). The Lactic Acid Bacteria, Vol. 2. The Genera of the Lactic Acid Bacteria, Chapter 8.* Blackie Academic, London
- 391 Shah N. P. 2000. *J. Dairy Sci.* **83**: 894
- 392 Shah N. P., Lankaputhra W. E. V., Britz M. L. and Kyle W. S. A. 1995. *Int. Dairy J.* **5**: 515
- 393 Sharon N. 1984. En: E. C. Boedeker (ed.) *Attachment of microorganisms to the gut mucosa*. Vol 1. CRC Press, Boca Raton
- 394 Sherman L. and Savage D. 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 302
- 395 Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T., Araya T. and Tomita M. 1992. *J. Dairy Sci.* **75**: 3296
- 396 Shin H. S., Lee J. H., Pestka J. J. and Ustunol Z. 2000. *J. Food Prot.* **63**: 327
- 397 Silva M., Javobus N. V., Deneke C. and Gorbach S. L. 1987. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1231
- 398 Silvi S., Rumney C. J. and Rowland I. R. 1996. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 561
- 399 Simon K. and Fuller S. D. 1985. *Ann. Rev. Cell. Biology* **1**: 242
- 400 Simon G. L. and Gorbach S. L. 1986. *Dis. Dis. Sci.* **31**: 147S
- 401 Simon G. L. and Gorbach S. L. 1995. *En M. J. Blaser, P. D. Smith, I. J. Rardin, H. B. Greenberg and R. L. Guerrant (eds.) Infections of the gastrointestinal tract*, pág 53. Raven, New York.
- 402 Simpson W. A., Ofek I. and Beachey E. H. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**: 6092
- 403 Sjögren A., Wang D. N., Hovmöller S., Haapasalo M., Ranta H., Kerosuo E., Jousimies-Sommer H. and Lounatmaa K. 1988. *Mol. Microbiol.* **2**: 81
- 404 Sleytr U. B. and Messner P. 1983. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 311

## Referencias

---

- <sup>405</sup> Smoragiewicz W., Bielacka M., Babuchowski A., Boutard A. and Dubeau H. 1993. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1089
- <sup>406</sup> Sommer P., Gleyzal C., Guerret S., Etienne J. and Grimaud J.-A. 1992. *Infect. Immun.* **60**: 360
- <sup>407</sup> Sonak S. and Bhosle N. 1995. *Biofouling* **9**: 31
- <sup>408</sup> Song F., Matsuzaki G., Mitsuyama M. and Nomoto K. 1996. *J. Immunol.* **156**: 2979
- <sup>409</sup> Sonoike K., Mada M. and Mutai M. 1986. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **27**: 238
- <sup>410</sup> Sperti G. S. 1971. *Probiotics*. Avi Publishing Co., West Point, Connecticut.
- Shramm M., Kybas V. and Racher E. 1958. *J. Biochem.* **233**: 1283
- <sup>411</sup> Suegara N., Szylit O., Duval Y. and Raibaud P. 1982. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1196
- <sup>412</sup> Sunders D. R. and Sillery J. 1982. *Dig. Dis. Sci.* **27**: 33
- <sup>413</sup> Svanborg-Eden C., Freter R., Hagberg L., Hull R., Hull S., Leffler H. and Schoolnik G. 1982. *Nature* **298**: 560
- <sup>414</sup> Svozil B., Danek P., Kumprecht I. and Zobac P. 1987. *Zivocisna Vyroba* **32**: 265
- <sup>415</sup> Takahashi T., Nakagawa E., Nara T., Yajima T. and Kuwata T. 1998. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**: 10
- <sup>416</sup> Takahashi T., Oka T., Iwana H., Kuwata T. and Yamamoto Y. 1993. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1557
- <sup>417</sup> Tamime A. Y., Marshall V. M. E. and Robinson R. K. 1995. *J. Dairy Res.* **62**: 151
- <sup>418</sup> Tamime A. Y. and Robinson R. K. 1988. *J. Dairy Res.* **55**: 281
- <sup>419</sup> Tamura Z. 1983. *Bifidobacteria Microflora* **2**: 3
- <sup>420</sup> Tanaka R. and Mutai M. 1980. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 866
- <sup>421</sup> Tannock G. W. 1995. Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. Chapman & Hall, Londres
- <sup>422</sup> Tannock G. W., Szylit O., Duval Y. and Raibaud P. 1982. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1196
- <sup>423</sup> Teti G., Chiofalo M. S., Tomasello F., Fava C. and Mastroeni P. 1987a. *Infect. Immun.* **55**: 839
- <sup>424</sup> Teti G., Tomasello F., Chiofalo M. S., Orefici G. and Mastroeni P. 1987b. *Infect. Immun.* **55**: 3057
- <sup>425</sup> Thomson J. K., Collins M. A. and Mercer W. D. 1996. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 338
- <sup>426</sup> Tichaczek P. S., Nissen-Mayer J. I. F., Vogel R. F. and Hammes W. P. 1992. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 460
- <sup>427</sup> Timpl R., Rohde H., Robey P. G., Rennard S. I., Foidart J. M. and Martin G. R. 1979. *J. Biol. Chem.* **252**: 9933
- <sup>428</sup> Tissier H. 1900. Recherche sur la flore intestinale des nourrissons etat normal et pathologique. Ph. D. Thesis. University of Medicine, Paris.
- <sup>429</sup> Tissier H. 1905. *Bifidobacteria Microflora* **3**: 11
- <sup>430</sup> Toba T., Virkola R., Westerlund B., Bjorkmann B., Sillanpaa J., Vartio T., Kalkkinen N. and Korhonen T. K. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2467
- <sup>431</sup> Tojo M., Oikawa T., Morikawa T., Yamashita N., Iwata S., Satoh Y., Hanada J. and Tanaka R. 1987. *Acta Paediatr. Jpn.* **29**: 160

## Referencias

- 432 Tomoda T., Nakano Y. and Kageyema T. 1983. *Jpn. J. Med. Mycol.* **24**: 356-358
- 433 Tomoda T., Nakano Y. and Kageyema T. 1988. *Bifidobacteria Microflora* **7**: 71
- 434 Tomoyuki N., Kaneko K., Takahashi H. and Inoue S. 1996. *Brain Develop.* **18**: 160
- 435 Toumanen E. 1986. *Infect. Immun.* **54**: 905
- 436 Tsen H.-Y., Chen M.-L., Hsieh Y.-M., Sheu S.-J. and Chen Y.-L. 2000. *J. Food Protect.* **63**: 1496
- 437 Ueda K. 1986. *Bifid. Microflora* **5**: 67
- 438 Upreti G. C. and Hindsdill R. D. 1975. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 139
- 439 U.S. Pharmacopeia. 1980. 15<sup>th</sup> Ed. United States Pharmacopeia Convention Inc.
- 440 Vachon P. H. and Beaulieu J. F. 1992. *Gastroenterology* **103**: 414
- 441 Van Asten F. J. A. M., Hendriks H. G. C. J. M., Korinkx J. F. J. G., Van der Zeijst B. A. M. and Gastra W. 2000. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**: 175
- 442 Van der Mei H. C., Leonard A. J., Weerkamp A. H., Rouxhet P. G. and Busscher H. J. 1988. *Colloids Surf.* **32**: 297
- 443 Van der Mei H. C., Brokke P., Dankert J., Feijen J. Rouxhet P. G. and Busscher H. J. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2806
- 444 van't Veer P., Dekker J. M., Lamers J. W. J., Kok F. J., Schouten E. G., Brants H. A. M., Sturmans F. and Hermus R. J. J. 1989. *Cancer Res.* **49**: 4020
- 445 Veerkamp J. H., Hoelen G. E. J. M. and Op den Camp H. J. M. 1983. *Biochim. Biophys. Acta* **755**: 439
- 446 Vinderola C. G. and Reinheimer J. A. 1999. *Int. Dairy J.* **9**: 497
- 447 Vel W. A. C., Namavar F., Marian A., Verweij-Van Vught J. J., Pubben N. B. A. and Maclaren D. M. 1986. *J. Med. Microbiol.* **21**: 105
- 448 Velraeds M. C. M., van der Mei H. C., Reid G. and Busscher H. J. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1948
- 449 Vidgrén G., Palva I., Pakkanan R., Lounstmaa K. and Palva A. 1992. *J. Bacteriol.* **174**: 7419
- 450 von Hunger W. 1985. *Dt. Molkerei-Zeitung* **110**: 1178
- 451 Wadström T., Andersson K., Sydow M., Axelsson L., Lidergren S. and Gullmar B. 1987. *J. Appl. Microbiol.* **62**: 513
- 452 Wagner D., Warner T., Roberts L., Farmer J. and Balish E. 1997. *Infect. Immun.* **65**: 3345
- 453 Wang R.-F., Cao W.-W. and Carniglia C. E. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1242
- 454 Wibawan I. W. T. and Lämmle C. 1990. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2721
- 455 Wibawan I. W. T., Lämmle C. and Pasaribu F. H. 1992. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1237
- 456 Wiedmeier R. D. 1989. *Utah Beef Cattle Field Day* **9**: 17
- 457 Wiersma E. J., Fröman G., Johansson S. and Wadström T. 1987. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**: 365
- 458 Wijsman M. R., Hereijgers J. L. P. M. and de Groote J. M. F. H. 1989. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 395
- 459 Williams S. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, pág 943. Association of Official Analytical Chemists Inc. Arlington, Virginia

## Referencias

- <sup>460</sup> Wolin M. J. 1974. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**: 1320
- <sup>461</sup> Wolin M. J., Zhang Y., Bank S., Yerry S. and Miller T. L. 1998. *J. Nutr.* **128**: 91
- <sup>462</sup> Xu B., Wang Y. and Chen Y. 1994. *Wei Sheng Wu Hsueh Pao* **34**: 9-13
- <sup>463</sup> Yamamoto T., Morotomi M. and Tanaka R. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4076
- <sup>464</sup> Yamazaki S., Kamimura H., Momose H., Kawashima T. and Ueda K. 1982. *Bifidobacteria Microflora* **1**: 55
- <sup>465</sup> Yasui, H., Kiyoshima J. and Ushijima H. 1995. *J. Infect. Dis.* **172**: 493
- <sup>466</sup> Yasui H., Nagaoka N., Mike A., Hayakawa K. and Ohwaki M. 1992. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **5**: 155
- <sup>467</sup> Yasui, H. and Ohwaki M. 1991. *J. Dairy Sci.* **74**: 1187
- <sup>468</sup> Zafriri D., Oron Y., Eisenstein I. B. and Ofek I. 1987. *J. Clin. Invest.* **79**: 1210
- <sup>469</sup> Zilberberg A., Goldhar J. and Ofek I. 1983. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 225
- <sup>470</sup> Zubay, G. 1993. *Biochemistry*. Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, Iowa
- <sup>471</sup> Zwietering M. H., Jongenburger F. M., Roumbouts M. and van't Riet K. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1875