

Evaluación comparativa por citometría de flujo y recuento en placa, de la actividad antimicrobiana de goma arábica frente a microorganismos psicrótrofos

Boiero ML¹, Breser L², Gonzalez Estevez V¹, Bachetti R², Morgante C², Montenegro MA^{1,2}, Porporatto C²

1: Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional de Villa María. Villa María, Argentina.

2: CIT VM (CONICET-UNVM). Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional de Villa María.

lboiero@frvm.utn.edu.ar

Resumen: Una de las estrategias más aplicadas para la conservación de productos lácteos, es la refrigeración. Si bien el almacenamiento de leche a bajas temperaturas permite prolongar su vida útil, también favorece el desarrollo selectivo de microorganismos psicrótrofos (bacterias que crecen próximo a 0 °C) que producen enzimas hidrolíticas termorresistentes. Esto conduce a la pérdida de la calidad nutricional y organoléptica de la leche. La tendencia actual consiste en aplicar preservantes de origen natural, como una alternativa segura y saludable a los conservantes químicos. Goma arábica (GA) es un biopolímero comestible obtenido del exudado de árboles *Acacia Senegal* y *Seyal*. Ésta se emplea comúnmente como agente espesante, estabilizante, emulsionante, en diversas industrias. Sin embargo, numerosos estudios indican que adicionalmente posee propiedades biológicas como antioxidante, contribución positiva sobre diferentes enfermedades, y actividad antimicrobiana. Es por ello que el objetivo del trabajo, fue evaluar la actividad antimicrobiana (AAM) de GA frente al desarrollo de microorganismos psicrótrofos aislados de leche cruda, almacenada a temperatura de refrigeración (4 °C), a través de la técnica de recuento en placa y comparar con la determinación de viabilidad por citometría de flujo (CMF).

Los resultados obtenidos demostraron una relación entre los métodos de recuentos utilizados, indicando que GA, presenta AAM de sobre un microorganismo capaz de desarrollarse en leche, principalmente a altas concentraciones, aportando un efecto benéfico adicional a sus usos tecnológicos.

Palabras claves: Citometría de flujo, actividad antimicrobiana, goma arábica, viabilidad.

Abstract: One of the most used strategies for the conservation of dairy products is cooling. While milk storage at low temperatures can prolong its shelf life, also favors the selective development of psychrotrophic microorganisms (bacteria that grow close to 0 °C) that produce heat resistant hydrolytic enzymes. This leads to the loss of nutritional and organoleptic quality of milk. Currently, there is a tendency to use natural preservatives, since they are safe and healthy alternatives to chemical preservatives. Gum arabic (GA) is an edible biopolymer exudate obtained from *Acacia Senegal* and *A. Seyal* trees. This is commonly used as a thickener, stabilizer and emulsifier, in various industries. However, numerous studies indicate that it has biological properties acting as antioxidant, antimicrobial, and contributing in a positive way against various diseases. Because of the above mentioned, the aim of this research was evaluate the antimicrobial activity (AAM) of GA against psychrotrophic microorganisms which were isolated from raw milk stored at refrigeration temperature (4 °C) using the plate count technique and compared to the viability determination by flow cytometry (CMF).

The results showed a relationship between counting methods used, indicating that GA presents AAM over a microorganism able to develop in milk mainly at high concentrations, providing an additional beneficial effect to its technological applications.

Key words: Flow Citometry, antimicrobial activity, gum arabic, viability.

INTRODUCCIÓN

La leche es una matriz compleja, con un alto contenido de nutrientes, lo que favorece el desarrollo microbiano. El uso de la refrigeración a baja temperatura, es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda y los productos lácteos de la descomposición, y mantener la calidad de los mismos. Sin embargo, esto trae

como consecuencia la selección de microorganismos (m.o.) psicrótrofos, que son aquellos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C, y representan menos del 10% de la flora inicial de leche cruda. Sin embargo, éstos pueden convertirse en flora predominante al permanecer, de uno a tres días bajo condiciones de refrigeración. *Pseudomonas* spp. generalmente, representa entre el 10-15% de la flora psicrótrófa en leche cruda, siendo *P. fluorescence* la especie predominante (Thomas 1973, Sørhaug 1997).

Los m.o. psicrótrofos, además de su alta velocidad de crecimiento a bajas temperaturas, son sensibles a tratamientos térmicos, tales como pasteurización o tratamiento a ultra alta temperatura (UHT), resultando eliminados, pero las enzimas hidrolíticas producidas por éstos permanecen, ya que son termoresistentes. Entre dichas enzimas extracelulares liberadas, se encuentran: *proteasas*, *lipasas* y *fosfolipasas* (Braun *et al.* 1999, Chena *et al.* 2003, Matta y Punj 1999). La acción de todas estas enzimas, afectan la composición química y nutricional de la leche, generan disminución en los rendimientos para la elaboración de queso y otros productos lácteos. Además, los productos de degradación, producen efectos indeseables en el sabor y aroma, disminuyendo la calidad e inocuidad de la leche. Todas las razones anteriormente mencionadas, indican la relevancia de la detección y control de m.o. psicrótrofos y sus enzimas resistentes al calor, cobrando gran importancia y siendo ésta, una de las principales preocupaciones en la industria láctea.

Un método alternativo para reducir las posibilidades de contaminación microbiana y oxidación química, manteniendo la calidad de la leche, es la adición de compuestos naturales. Existen numerosos estudios, que demuestran el efecto benéfico de la adición de compuestos con capacidad antimicrobiana (Kuetea *et al.* 2010, Tajkarimi *et al.* 2010, Da Silva *et al.* 2012). La tendencia actual consiste en aplicar preservantes de origen natural, como una alternativa segura y saludable a los conservantes químicos. En tal sentido, goma arábiga (GA) es un biopolímero comestible obtenido del exudado de árboles *Acacia Senegal* y *Seyal*, compuesto por una elevada proporción de carbohidratos (97%) y una pequeña de proteínas (1-3%). Éste se emplea comúnmente en la industria alimentaria como agente espesante, estabilizante, emulsionante. Sin embargo, numerosos estudios indican que adicionalmente posee propiedades biológicas como antioxidante, contribución positiva sobre diferentes enfermedades, y actividad antimicrobiana (AAM) (Boiero *et al.* 2014, Trommer y Neubert 2005, Glover *et al.* 2009, Ali y Al Moundhri 2006).

Pocos estudios han sido realizados sobre la AAM de GA, informando principalmente que presenta actividad inhibitoria del crecimiento de ciertas especies patógenas periodontal (agente causal de caries o implicado en la placa bacteriana), tales como *Prophyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Clark *et al.* 1993). Estos resultados sugieren, que GA podría inhibir la formación de placa bacteriana y junto con su efecto mejorador de la remineralización dental, lo que indicaría que GA puede actuar como un potencial agente preventivo en la formación de caries (Onishi *et al.* 2008). Otro estudio sobre el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de diferentes especies de acacia incluida *Acacia senegal*, reveló que los extractos metanólicos de las especies *A. catechu* y *A. nilotica*, mostraron la máxima actividad antimicrobiana. En cuanto a *Acacia senegal*, empleando la corteza, determinaron que el extracto en hexano, presentó AAM frente a *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, mientras que el extracto metanólico presentó AAM frente a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, y los hongos *Cándida albicans* (levadura) y *Aspergillus niger* (Saini *et al.* 2008). Sin embargo, no se han realizados estudios de AAM frente a microorganismos capaces de desarrollarse en alimentos, en particular m.o. psicrótrofos que crecen en productos lácteos almacenados a bajas temperaturas.

La metodología clásica de recuento en placa, empleada para determinar la comunidad bacteriana de alimentos, es generalmente lenta (resultados están disponibles en más de 48/72 horas), tediosa, y permite identificar parcialmente la microflora bacteriana. Los recuentos de bacterias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de un agar nutritivo, previamente inoculadas con cantidades conocidas del alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan, erróneamente, recuentos totales en placa, cuando en realidad únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en las condiciones ambientales elegidas. En efecto, es posible obtener una amplia variedad de condiciones cambiando la composición del medio sólido de cultivo, los gases del ambiente, el tiempo y la temperatura de incubación. Tal es así, que la incubación a temperaturas entre 0 y 7 °C favorece el crecimiento de bacterias psicrotróficas (ICMSF, 1980). Por otra parte muchos m.o., entre ellos patógenos, de origen alimentario son capaces de adquirir un estado viable no cultivable (VBNC) en condiciones de estrés (McDougald *et al.* 1998). En el mismo, las células son viables (capacidad infectiva), pero han perdido su capacidad de formar

colonias en medios de cultivo bajo condiciones de análisis, por lo cual no pueden ser detectadas por métodos culturales. Con el motivo de sortear dichos inconvenientes y evitar una subestimación en el recuento de VBNC, es que se han desarrollado numerosas técnicas de recuento microbiano. Entre ellos se destacan métodos moleculares basados en análisis directo de ADN o ARN (sin enriquecimiento microbiano), tales como FISH, electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) (Amann *et al.* 1995, Ercolini *et al.* 2003, Randazzo *et al.* 2002).

En la actualidad, la industria láctea requiere un sistema basado en un único instrumento que permita analizar células microbiana y somáticas, incluyendo la detección, enumeración y diferenciación de contaminante microbianos. La citometría de flujo (CMF), es una técnica que ofrece la posibilidad de análisis rápidos, confiables, y empleando sólo único instrumento (Gunasekera *et al.* 2003).

La CMF es una técnica analítica cuantitativa que caracteriza poblaciones celulares a nivel de una simple célula, a medida que son iluminadas por un rayo láser. La intensidad de la señal óptica de fluorescencia generada es correlacionada a parámetros celulares estructural y/o funcional. La característica clave de CMF es la capacidad de medir un gran número de partículas (incluso más de 100.000 células por segundo). Esto permite separar partículas o células en poblaciones o incluso detectar células minoritarias o raras en muestras, basadas en diferencias estadísticas en cualquiera de las variables que pueden ser medidas al mismo tiempo.

La técnica de CMF permite evaluar la viabilidad Celular, empleando diferentes pigmentos fluorescentes, analizando diferentes propiedades celulares, tales como actividad metabólica, potencial de membrana, integridad o biosíntesis de macromoléculas, llevando a una más profunda caracterización de poblaciones celulares. Específicamente, la integridad de membrana, es la prueba más definitiva de viabilidad celular, e indica que las células pueden potencialmente generar gradiente, y por lo tanto, mostrar actividad metabólica pero sin garantizar la replicación celular. Aquellas células con membranas dañadas o comprometidas, no pueden mantener o generar el gradiente electroquímico y por ende el potencial de membrana, por lo que se consideran muertas. La evaluación de la integridad de membrana es más aplicable para la detección de células latentes y heridas.

La Integridad de membrana puede ser determinada por el método de exclusión de pigmentos. Las células que poseen membranas intactas son permeables a pigmentos cargados como SYTO 9, SYTOX, y cianinas (TOPRO, TOTO). El fluorocromo es capaz de ingresar en todas las células y emitir fluorescencia verde, siendo utilizado como un evaluador de recuento total de células. Sólo si la célula pierde su integridad de membrana, el pigmento Ioduro de Propidio (IP) puede entrar en la célula, emitiendo fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos. Las propiedades de emisión de la mezcla de tinción de unido a los ácidos nucleicos del ADN de la célula, cambian debido al desplazamiento de un colorante por el otro, y por la desactivación de fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (Vives-Rego *et al.* 2000).

De todo lo anteriormente expuesto, se desprende el **objetivo** del trabajo que fue evaluar la AAM de GA frente al desarrollo de microorganismos psicrótrofos aislados de leche cruda, almacenada a temperatura de refrigeración (4 °C), a través de la técnica de recuento en placa y comparar con la determinación de viabilidad por CMF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias de leche cruda

Con el objetivo de evaluar la AAM de GA frente a m.o psicrótrofos, se realizó el aislamiento e identificación de m.o. capaces de crecer en leche cruda. Para ello, se realizó la siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de leche cruda, en medios de cultivos selectivos incubados a 4 °C durante 7 días. Fueron seleccionadas las colonias de interés, para su posterior caracterización e identificación por métodos convencionales y genotípicos.

Identificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa:

Mediante secuenciación del gen *16S ARNr*, empleando los cebadores universales 27f y 1492R. Se analizaron las secuencias obtenidas y se cotejaron con bases de datos (RDP, BLAST).

Preparación de Muestras

A partir de un inóculo overnight de la cepa aislada, se preparó las muestras en Caldo nutritivo (CN), con y sin adición de GA (0, 20, 75, 200 y 400 μ M), empleando una concentración inicial de D.O_{600nm} de 0,002, correspondiente a 10^6 UFC/ml. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C durante 7 días.

Recuento bacteriano

Se realizó el recuento de microorganismos en placa, a través de la técnica de siembra en profundidad (ICMSF, 1980). Se empleó agar de recuento total (PCA), y las placas que fueron incubadas 48 h a 37 °C. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada microorganismo. Las siembras fueron realizadas en cabina de seguridad microbiológica (Biohazard, BIO-II-A). Los resultados se expresan como UFC/ml.

Viabilidad por Citometría de Flujo

El ensayo fue realizado empleando un Citómetro de flujo ACCURI C6 (BD Biosciences), equipado con un láser rojo (640 nm) y otro azul (488 nm). La velocidad de flujo fue ajustada a 1500 eventos/segundos, y fueron adquiridos hasta 100.000 eventos por muestra.

Se realizó tinción doble (IP+Syto 9) para discriminar células con membrana intactas (viables) de aquellas con membrana permeabilizada (células muertas), empleando un kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, Life technology, Eugene, OR, USA), realizando una dilución 1µl de cada colorante en 100 µl de buffer fosfato (PBS). El cultivo bacteriano incubado 48 h a 4 °C (fase exponencial) fue teñido con 1µl Syto 9 + 5 µl de IP en un volumen final de 1000 µl. Para descartar interferencias con pequeñas partículas y restos de interferencias se realizan controles, considerando un control para tinción de IP (células muertas) que fue realizado sometiendo el cultivo celular a 90 °C por 10 min previo a la tinción, y un control positivo de células 100 % vivas. La fluorescencia verde de las células teñidas con Syto 9 fueron recolectadas en el canal FL1 (530/30nm) y la fluorescencia roja de la células teñidas con IP fueron recolectadas en el canal FL3 (670 nm). Los datos fueron analizados con el Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de m.o. de leche

De los m.o. que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C, fueron aisladas y purificadas las cepas de interés, que luego fueron caracterizadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, y pruebas bioquímicas. De ellos, fue seleccionado un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativos. La identificación filogenética de género y especie más relacionada, empleando la base de datos RDP, se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Identificación de aislamiento de leche cruda

Longitud secuencia (pb)	Identificación	Especie más relacionada (N° de acceso)	Identidad (%)
1340	<i>Enterococcus</i> spp. (EC)	<i>Enterococcus faecium</i> (ATTC-27273, EU547780)	99,3

Según la utilidad Classifier de RDP, la cepa aislada seleccionada pertenece al dominio Bacteria, phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia Enterococcaceae, género Enterococcus. Ésta fue identificada como la *Enterococcus* spp., siendo la especie más relacionada *Enterococcus faecium* (N° de acceso: ATTC-27273, EU547780), con una similitud de 99,3%. Los enterococos forman parte de la flora intestinal normal de humanos y animales, por lo que su presencia en leche es indicativo de contaminación fecal y reflejo de condiciones higiénico inadecuadas (Franz *et al.* 1999, Faría Reyes *et al.* 2002). Los antibióticos son utilizados en los animales para prevenir y tratar las infecciones; pero también se utilizan con frecuencia en dosis subterapéuticas para promover el crecimiento. Muchos de estos antibióticos, pueden inducir la selección y amplificación de patógenos resistentes y dentro de ellos, se incluyen a bacterias como los enterococos. Estos microorganismos potencialmente resistentes pueden transmitirse a los seres humanos a través de las cadenas alimenticias y podrían causar enfermedades en las circunstancias apropiadas (Collignon 1999).

Recuento bacteriano

En la **Figura 1**, se muestra la curva de crecimiento de EC en CN, con y sin la adición de GA, almacenado a 4 °C durante 168 h. Allí puede observarse una disminución estadísticamente significativa de la velocidad de

crecimiento de EC con la adición de GA en la concentración de 400 μM , ejerciendo una reducción de 0,12 logaritmos respecto del control sin GA

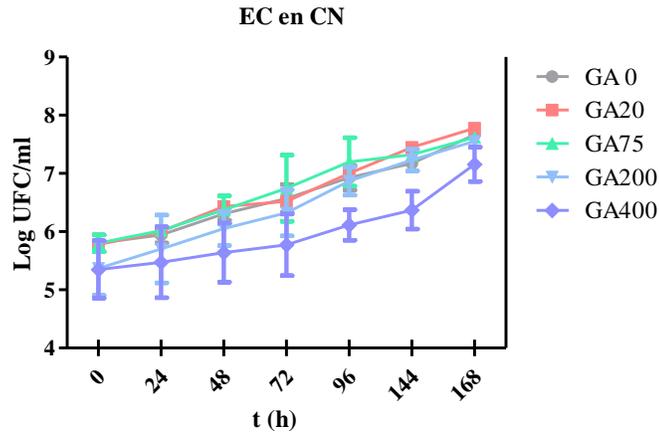


Figura 1. Curvas de crecimiento de EC en CN a 4° C con y sin adición de GA

Viabilidad por Citometría de Flujo

Como ha sido mencionado anteriormente, para descartar interferencias en las mediciones se realizan controles, **Figura 2**. En la Figura 2 a), se observa un control de células sin tinción, para determinar la autofluorescencia del cultivo bacteriano, mientras que en la Figura 2 b) se muestra el control positivo de células 100 % vivas, teñidas con el colorante Syto 9 que es permeable a todas las membranas. En la Figura 2 c) se muestra el control de células muertas, que fue realizado sometiendo el cultivo celular a un tratamiento térmico previo a la tinción, lo que provocó la pérdida de la integridad de membrana, permitiendo el ingreso del colorante IP que se une a los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja.

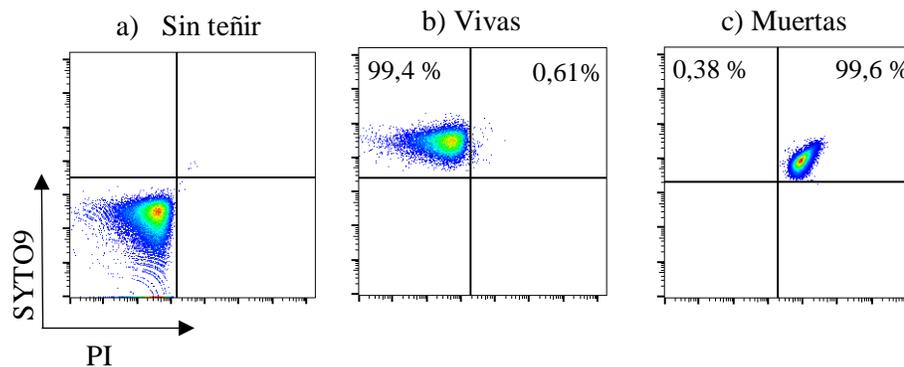


Figura 2. Controles del cultivo bacteriano de EC, a) células sin tinción, b) control de células teñidas con Syto9 y c) control de células teñidas con IP.

Como se muestra en la **Figura 3**, la adición de concentraciones crecientes de GA causa un efecto antimicrobiano que se evidencia con el incremento en el porcentaje de células muertas, llegando hasta un 15,6 % de muerte con la adición de 400 μM de GA. El porcentaje de mortalidad muestra diferencias estadísticamente, con la adición de 200 y 400 μM de GA respecto del control de células muertas, teñidas con IP (Datos no mostrados, determinados con GraphPad Prism).

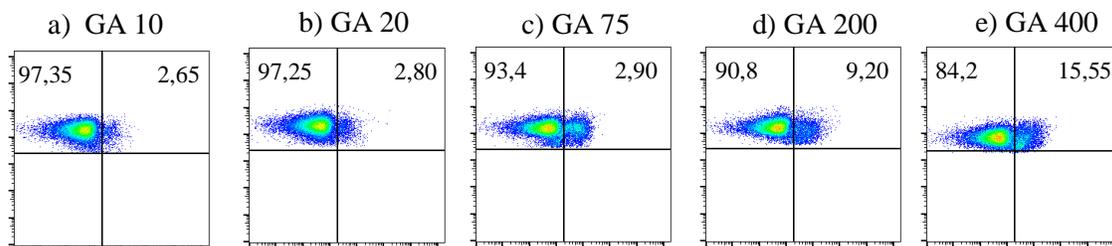


Figura 3. Cultivo de EC con adición de concentraciones crecientes de GA (expresados en μM): a) 10, b) 20, c) 75, d) 200, y e) 400.

Si bien el mecanismo de acción antimicrobiano que ejerce la GA no se conoce, diversos estudios sugieren que la AAM podría atribuirse a enzimas tales como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de la misma (Clark *et al.* 1993). Para algunas de estas enzimas se han demostrado sus propiedades antimicrobianas (Kirtikar *et al.* 1984). Similares resultados fueron obtenidos por Jepras *et al.* 1995, comparando de ambas técnicas, frente al desarrollo de *E. coli*.

Los resultados sugieren que existe una correlación entre ambos métodos de recuento, siendo mucho más sensible la CMF, la cual permite evaluar la AAM de GA aún a bajas concentraciones lo cual no es detectado por el método de recuento. De los mismos se deduce que el efecto antimicrobiano de GA aumenta con la concentración de la misma. Estos resultados implican un importante avance en la determinación de viabilidad bacteriana, ya que la técnica de CMF presenta las ventajas de permitir un análisis simultáneo de numerosas características de cada partícula que es analizada de manera individual (tamaño, complejidad, fluorescencia), de manera precisa, ya que puede analizar hasta 100.000 eventos por segundo, aportando información sobre las propiedades de cada partícula, en vez de un promedio de la población. Esto la convierte en una poderosa herramienta de análisis tanto cualitativo, como cuantitativo, pudiendo ser empleado en un amplio rango de aplicaciones, tales como análisis de agua (Ramalho *et al.* 2001), recuento de células sanguíneas (Veal *et al.* 2000), susceptibilidad a antibióticos (Walberg *et al.* 1997), viabilidad y vitalidad de bacteria y levaduras (Davey 2002), recuento de bacterias en leche cruda y procesada (Gunasekera *et al.* 2000). Además otra ventaja que presenta la CMF respecto de las técnicas moleculares o microbiología clásica, es que pueden realizarse de manera directa de la muestra, sin necesidad de extraer el ADN, o realizar diluciones previas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que GA además de los usos tecnológicos que poseen en la industria, presenta AAM de sobre un m.o. capaz de desarrollarse en leche, aportando un efecto benéfico adicional. Adicionalmente, se mostró que existe una relación entre los métodos de recuentos utilizados, presentando la CMF numerosas ventajas.

Como conclusión se sugiere que un método de recuento independiente de cultivo como CMF, puede proveer una herramienta más precisa para el recuento microbiano en alimentos y para evaluar el efecto de compuestos Antimicrobianos sobre la viabilidad, con una medida inmediata y real.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali BH, Al Moundhr MS. 2006. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chemical Toxicology*, 44:1173-1183.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59:143-169.
- Braun P, Fehlhaber K, Klug C, Kopp K. 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiology*, 16:531-540.

- Boiero ML, Rodríguez-Estrada M, Mandrioli M, Vanden Braber N, García N, Borsarelli C, Montenegro M. 2014. Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *Journal of Dairy Science*, 97:5328- 5336.
- Chena L, Daniela RM, Coolbear T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. *International Dairy Journal*, 13:255-275.
- Clark DT, Gazi MI, Cox SW, Eley BM, Tinsley GF. 1993. The effects of Acacia arabica gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, 20:238-43.
- Collignon P. 1999. Vancomycin-Resistant Enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? *Medical Journal of Australia*, 171:144-146.
- Da Silva Malheiros P, Sant'Anna V, Utpott M, Brandelli A. 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*, 23:42-47.
- Davey HM. 2002. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods in Cell Science*, 24:91- 97.
- Ercolini D, Hill PJ, Dodd, CER. 2003. Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 69:3540-3548.
- Faría Reyes JF, Kutchynskaya VL, Izquierdo Córser P, García Urdaneta A, Cagnasso MA. 2002. Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Raw Milk. *Revista Científica*, 12: 29-35.
- Franz CMAP, Holzappel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47:1-24.
- Glover DA, Ushida K, Phillips AO, Riley SG. 2009. Acacia(sen) SUPERGUM™ (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids*, 23:2410-2415.
- Gunasekera TS, Veal DA, Attfield PV. 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology*, 85:269-279.
- Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. 2000. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1228-1232.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). 1980. *Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración*. 2^{da} Edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. ISBN: 84-200-0908-3.
- Kirtikar KR, Basu BD. 1984. *Indian medicinal plants*. (2nd ed.). Delhi, Periodical Expert Book Agency. 3, 1596-1598.
- Kuetea V, Alibert-Francob S, Eyong KO, Ngameni B, Folefoc GN, Nguemeving JR, Tangmouo JG, Fotso GW, Komguem J, Ouahouo BM, Bolla JM, Chevalier J, Ngadjuic BT, Nkengfack AE, Pagès JM. 2010. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37:156-61.
- Matta H, Punj V. 1999. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 52:59-62.
- McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaption or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol*, 25:1- 9.
- Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, Matsumura M, Sasaki Y, Ogasawara T, Ooshima T. 2008. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of oral biology*, 53:257-260.
- Jepras RI, Carter J, Pearson SC, Paul FE, Wilkinson MJ. 1995. Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 61:2696-2701.
- Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, De Vos WM, Vaughan EE. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 68:1882-1892.
- Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs PA. 2001. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *Journal of Microbiological Methods*, 44:97-103
- Saini M, Saini R, Roy S, Kumar A. 2008. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of *acacia* species (Mimosaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 2:378-386.

- Sørhaug T, Stepaniak L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8:35-41, y referencias allí citadas.
- Tajkarimi MM, Ibrahima SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21:1199-1218.
- Thomas, S.B., Thomas, B.F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Industries*, 38:61-70.
- Trommer H, Neubert RH. 2005. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics*, 298:153-163.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, 243:191-210
- Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von-caron G. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol*, 24:429-488.
- Walberg M, Gaustad P, Steen HB. 1997. Rapid discrimination of bacterial species with different ampicillin susceptibility levels by means of flow cytometry. *Cytometry*, 29:267-272.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen a CONICET, Inst. de investigación UNVM. y Secretaria de Ciencia y tecnología de la UTN, por el apoyo financiero.