

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 24/10/2024

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

ALEIXER IRIRA AVIRAMA, con C.C. No. 1.084.869.651,

, con C.C. No.

, con C.C. No.

, con C.C. No.

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o

titulado Viabilidad celular de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) aisladas de café y leche materna, frente a condiciones digestivas gastrointestinales.

presentado y aprobado en el año 2024 como requisito para optar al título de BIÓLOGO;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:



EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Viabilidad celular de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) aisladas de café y leche materna, frente a condiciones digestivas gastrointestinales.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
IRIRA AVIRAMA	ALEIXER

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
AMOROCHO CRUZ	CLAUDIA MILENA
ORDOÑEZ LOZANO	KEVY SANDRITH

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: BIÓLOGO

FACULTAD: CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PROGRAMA O POSGRADO: BIOLOGÍA APLICADA

CIUDAD: NEIVA **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2024 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 69

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una **X**):

Vigilada Mineducación
La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

Diagramas_X_ Fotografías_X_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_X_ Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_X_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: NO

MATERIAL ANEXO: NO

PREMIO O DISTINCIÓN *(En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):* **MERITORIA**

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Viabilidad celular	Cell viability	6. Pancreatina	Pancreatin
2. Actividad antimicrobiana	Antimicrobial activity	7. Amilasa salival	Salivary amylase
3. Probióticos	Probiotics	8. Bacterias ácido-lácticas	Lactic acid bacteria
4. Condiciones gastrointestinales	Gastrointestinal conditions	9. _____	_____
5. Pepsina	Pepsin	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen al grupo de bacterias Gram-positivas con capacidad de fermentar azúcares y producir ácido láctico como principal producto metabólico. Estas bacterias se encuentran en una amplia variedad de ambientes, incluyendo el tracto gastrointestinal humano y en algunos alimentos como el café y la leche materna, algunas de ellas probióticas. La viabilidad celular de estas bacterias puede verse afectada por las condiciones del ambiente gastrointestinal, lo que puede afectar su capacidad para colonizar y conferir beneficios a la salud del huésped. En este estudio, se investigó la viabilidad celular de las BAL (L, D, JC y EJF) aisladas de café y leche materna frente a las condiciones digestivas gastrointestinales y se evaluó la cinética de crecimiento, la actividad antimicrobiana y la sensibilidad a antibióticos de la cepa BAL EJF. En el análisis de viabilidad celular, las BAL fueron expuestas a las enzimas de amilasa salival, pepsina y pancreatina en diferentes tiempos. Se encontró que la enzima amilasa salival no muestra incidencia significativa en la tasa de supervivencia y viabilidad de las BAL. Las cepas BAL L y D aisladas de café en los tiempos de exposición a la enzima pepsina (pH 2) simulando la condición gástrica, permanecen viables en este estado. En la exposición a la enzima pancreatina (pH 8) simulando la condición intestinal, las cepas BAL L, D y JC se mantuvieron viables en todos los tiempos de exposición, manteniendo una cantidad mayor a 10⁶ Log UFC/ml.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Lactic acid bacteria (LAB) belong to the group of Gram-positive bacteria with the ability to ferment sugars and produce lactic acid as the main metabolic product. These bacteria are found in a wide variety of environments, including the human gastrointestinal tract and in some foods such as coffee and breast milk, some of them being probiotics. The cell viability of these bacteria can be affected by the conditions of the gastrointestinal environment, which may affect their ability to colonize and confer health benefits to the host. In this study, the cell viability of LAB (L, D, JC and EJJ) isolated from coffee and breast milk was investigated against gastrointestinal digestive conditions and the growth kinetics, antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of the LAB strain EJJ were evaluated. In the cell viability analysis, LAB were exposed to salivary amylase, pepsin and pancreatin enzymes at different times. It was found that the salivary amylase enzyme does not show significant incidence in the survival rate and viability of the LAB. The LAB L and D strains isolated from coffee in the times of exposure to the enzyme pepsin (pH 2) simulating the gastric condition, remain viable in this state. In the exposure to the enzyme pancreatin (pH 8) simulating the intestinal condition, the LAB L, D and JC strains remained viable at all exposure times, maintaining a quantity greater than 10⁶ Log CFU/ml.

APROBACION DE LA TESIS


Nombre Presidente Jurado: **Edgar Andrés Bernal Castro**

Firma:



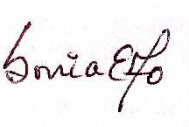
Nombre Jurado: **Wilson Rodrigo Cruz Flor**

Firma:



Nombre Jurado: **Sonia Echeverry Fernández**

Firma:





Viabilidad celular de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) aisladas de café y leche materna, frente a condiciones digestivas gastrointestinales.

Aleixer Irira Avirama

Universidad Surcolombiana.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Programa de Biología Aplicada.
Neiva, Colombia.
2024

Viabilidad celular de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) aisladas de café y leche materna, frente a condiciones digestivas gastrointestinales.

Aleixer Irira Avirama

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Biólogo.

Director (a):

Ph.D. Claudia Milena Amorocho Cruz

Codirector (a):

Ingeniera Agrícola Kevy Sandrith Ordoñez Lozano

Línea de Investigación:

Microbiología

Grupo de Investigación:

Semillero de investigación CIAG

Universidad Surcolombiana.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Programa de Biología Aplicada.

Neiva, Colombia.

2024

Declaración de obra original

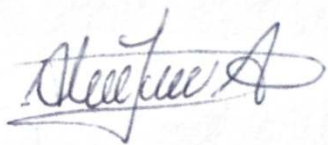
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 014 de 2018 del Consejo Académico de la Universidad Surcolombiana. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Aleixir Irida Avirama

Fecha 06/08/2024

Viabilidad celular de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) aisladas de café y leche materna, frente a condiciones digestivas gastrointestinales.

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo importante de bacterias Gram-positivas con la capacidad de fermentar azúcares y producir ácido láctico como el principal producto metabólico. Estas bacterias se encuentran en una amplia variedad de ambientes, incluyendo el tracto gastrointestinal humano y en algunos alimentos como el café y la leche materna, algunas de ellas probióticas. La viabilidad celular de estas bacterias puede verse afectada por las condiciones del ambiente gastrointestinal, lo que puede afectar su capacidad para colonizar y conferir beneficios a la salud del huésped. En este estudio, se investigó la viabilidad celular de las BAL (L, D, JC y EJJ) aisladas de café y leche materna frente a las condiciones digestivas gastrointestinales y se evaluó la cinética de crecimiento, la actividad antimicrobiana y la sensibilidad a antibióticos de la cepa BAL EJJ. En el análisis de viabilidad celular, las BAL fueron expuestas a las enzimas de amilasa salival, pepsina y pancreatina en diferentes tiempos. Se encontró que la enzima amilasa salival no muestra incidencia significativa en la tasa de supervivencia y viabilidad de las BAL manteniendo el orden de hasta 10^{10} Log UFC/ml. Las cepas BAL L y D aisladas de café en los tiempos 0, 5, 40 y 180 minutos de exposición a la enzima pepsina (pH 2) simulando la condición gástrica fue de hasta 10^8 Log UFC/ml, permaneciendo viables en este estado. En la exposición a la enzima pancreatina (pH 8) simulando la condición intestinal, las cepas BAL L, D y JC se mantuvieron viables en todos los tiempos de exposición (0, 240 y 360), manteniendo una cantidad mayor a 10^6 Log UFC/ml.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, probióticos, viabilidad celular, condiciones gastrointestinales, pepsina, pancreatina, amilasa salival, bacterias ácido-lácticas.

**Cell viability of Lactic Acid Bacteria (BAL) isolated from coffee and breast milk,
against gastrointestinal digestive conditions.**

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are a major group of Gram-positive bacteria with the ability to ferment sugars and produce lactic acid as the main metabolic product. These bacteria are found in a wide variety of environments, including the human gastrointestinal tract and in some foods such as coffee and breast milk, some of them being probiotics. The cell viability of these bacteria can be affected by the conditions of the gastrointestinal environment, which may affect their ability to colonize and confer health benefits to the host. In this study, the cell viability of LAB (L, D, JC and EJF) isolated from coffee and breast milk was investigated against gastrointestinal digestive conditions and the growth kinetics, antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of the LAB strain EJF were evaluated. In the cell viability analysis, LAB were exposed to salivary amylase, pepsin and pancreatin enzymes at different times. It was found that the salivary amylase enzyme did not show significant incidence in the survival rate and viability of the BAL maintaining the order of up to 10^{10} Log CFU/ml. The BAL L and D strains isolated from coffee at times 0, 5, 40 and 180 minutes of exposure to the pepsin enzyme (pH 2) simulating the gastric condition was up to 10^8 Log CFU/ml, remaining viable in this state. In the exposure to the pancreatin enzyme (pH 8) simulating the intestinal condition, the BAL L, D and JC strains remained viable at all exposure times (0, 240 and 360), maintaining a quantity greater than 10^6 Log CFU/ml.

Keywords: Antimicrobial activity, probiotics, cell viability, gastrointestinal conditions, pepsin, pancreatin, salivary amylase, Lactic acid bacteria.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas.....	10
1. Introducción	11
2. Justificación.....	12
3. Antecedentes	13
4. Planteamiento del problema	18
5. Objetivo general.....	20
6. Metodología.....	21
7. Resultados y discusión	29
8. Impactos del proyecto y limitaciones al estudio.	53
9. Conclusiones	53
10. Recomendaciones	544
11. Bibliografía	555

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Metodología para cinética de crecimiento BAL EJJ.	21
Figura 2: Ilustración método discos BAL EJJ	23
Figura 3: Metodología método de pocillos BAL EJJ.	24
Figura 4: Procedimiento viabilidad celular condiciones gastrointestinales	25
Figura 5: Metodología sensibilidad a antibióticos BAL EJJ	26
Figura 6: Cinética de crecimiento BAL EJJ.	32
Figura 7: Cepas patógenas de referencia.	34
Figura 8: Antibióticos para uso de control positivo.	35
Figura 9: Cepa BAL EJJ frente a cepas patógenas método de discos	37
Figura 10: Diagrama de cajas y bigotes comparación de medias prueba t-student (software STARGRAPHICS centurión).	37
Figura 11: Cepa BAL EJJ frente a cepas patógenas método de pocillos.	38
Figura 12: Placa con tratamientos para sensibilidad antibióticos BAL EJJ.	40
Figura 13: Colecta de saliva mujer pH≈6.	41
Figura 14: Prueba viabilidad celular de BAL a enzimas salivales.	42
Figura 15: Viabilidad celular BAL frente a enzimas salivales de mujer (pH 6).	42
Figura 16: Viabilidad celular BAL frente a enzimas salivales de hombre (pH 7).	43
Figura 17: Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con saliva.	44
Figura 18: Alistamiento y preparación de las enzimas digestivas para pruebas de viabilidad celular gastrointestinal.	45
Figura 19: Desarrollo de ensayos in vitro de viabilidad celular BAL frente a condiciones gastrointestinales.	45
Figura 20: Viabilidad celular BAL simulando condiciones gástricas pH 2 y enzima pepsina.	46
Figura 21: Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con pepsina.	47
Figura 22: Viabilidad celular BAL simulando condiciones intestinales pH 8 y enzima pancreatina (Sigma).	49
Figura 23: Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con pancreatina.	49

Lista de tablas**Pág.**

Tabla 1:	Descripción de las cepas BAL en comparación con Ordoñez-Lozano y Amorocho-Cruz (2021)	29
Tabla 2:	Descripción cepa BAL EJJ.	31
Tabla 3:	Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de discos.	35

1. Introducción

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) pertenecen al grupo de bacterias Gram-positivas, caracterizadas por ser catalasa negativas, inmóviles y no formadoras de esporas, las cuales como principal producto metabólico sintetizan ácido láctico junto con dióxido de carbono y etanol/acetato (Punia Bangar et al., 2022). Han sido usadas ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades como cultivos iniciadores en la fabricación de alimentos fermentados como el yogurt, queso, mantequilla y carnes maduras principalmente, destacando que ciertas especies de estas bacterias han sido catalogadas como probióticas, ya que al ser microorganismos vivos que al administrarse a un huésped en cantidades adecuadas le confieren beneficios a la salud (Vera-Peña et al., 2019). También es importante mencionar que una de las características para considerarlas de uso potencial en probióticos es la actividad antimicrobiana y el no generar resistencia a antibióticos (Byakika et al., 2019; Cervantes-Elizarrarás et al., 2019).

Estas características evaluadas en diferentes estudios como el de Ordoñez-Lozano & Amorocho-Cruz (2023), donde se evidencia sensibilidad de las BAL a los antibióticos y como estas cepas destacan por su actividad antimicrobiana inhibiendo *E. coli* ATCC 25922. Por su parte Cortes-Gaona & Amorocho-Cruz (2018), evidenciaron el efecto inhibitorio de los antibióticos Penicilina G Benzatínica y Ceftriaxona en el crecimiento de las BAL evaluadas y estas BAL usadas en presencia de las células, sus componentes, exclusión competitiva de nutrientes o presencia de ácido láctico lograron inhibir el crecimiento del patógeno *Shigella sonnei* ATCC 25931. Jiménez-Espinosa & Amorocho-Cruz (2020), concluyen que las cepas BAL inhiben el crecimiento del patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977.

Lo mencionado con anterioridad son indicadores para verificar la viabilidad celular de las BAL con potencial probiótico para garantizar que sean efectivas en la prevención de enfermedades de transmisión alimentaria y mejorar la salud del consumidor (Abiola et al., 2022). Además, estas bacterias se han relacionado con beneficios para la salud, como la mejora de la digestión, el aumento de la absorción de nutrientes y la reducción de la inflamación intestinal (Diez-Gutiérrez et al., 2020). Actualmente se ha demostrado la importancia de evaluar la supervivencia de las cepas de BAL aisladas de productos propios de la región huilense bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

En diversas investigaciones se han utilizado modelos de simulación gastrointestinal para evaluar la supervivencia de diferentes cepas de BAL y han encontrado resultados variables (Amorocho-Cruz, 2011; Zommiti et al., 2020; Sánchez Jiménez & Hidalgo Almeida, 2020; Gómez Rodríguez, 2022), lo que destaca la necesidad de continuar investigando la supervivencia y la adaptabilidad de estas bacterias en diferentes condiciones. Por ende, la investigación tiene como objetivo analizar la viabilidad celular de las cepas BAL D y L aisladas de café, JC y EJJF aislada de leche materna, bajo condiciones gastrointestinales simuladas, ya que la exposición a enzimas como la pepsina y la pancreatina en diferentes tiempos de exposición se considera un factor importante para evaluar la supervivencia y la adaptabilidad de las cepas de BAL.

2. Justificación

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han surgido como un foco fundamental en la investigación y las aplicaciones en múltiples dominios científicos y relacionados con la salud (Medina et al., 2014). Sus diversos beneficios abarcan varios campos, lo que hace que la investigación de la viabilidad de las BAL y las potenciales aplicaciones estén altamente reconocidas, destacando su estudio como probióticos, con impactos positivos en la salud humana (Fajardo-Argoti et al., 2021). La exploración de la viabilidad y adaptabilidad de las BAL en condiciones gastrointestinales simuladas es esencial para corroborar su estado probiótico.

Estos microorganismos exhiben propiedades que pueden influir positivamente en la salud intestinal y el bienestar general, por lo cual se eligen para este estudio debido a su capacidad demostrada a lo largo del tiempo para estimular una variedad de efectos metabólicos beneficiosos en el tracto gastrointestinal (Medina et al., 2014). Su presencia en el intestino se ha relacionado con la estimulación del sistema inmunitario, la supresión de patógenos, la reducción de la absorción de toxinas y un efecto hipocolesterolémico (Byakika et al., 2019). Además, se producen compuestos como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, ácido fenilacético, agentes antifúngicos y bacteriocinas (Heredia-

Castro et al., 2017). Estas propiedades los posicionan como posibles alternativas naturales a los conservantes químicos, protegiendo de manera efectiva los alimentos de microorganismos dañinos que pueden poner en peligro la salud humana.

La importancia de la evaluación de viabilidad de BAL se extiende más allá de los probióticos, y abarca campos como la tecnología alimentaria, la biotecnología y la medicina principalmente. Algunos procesos de fermentación impulsados por las BAL contribuyen a la conservación de los alimentos, el desarrollo del sabor y la mejora de la textura (Benavides, 2019; Ferrari et al., 2020). Además, sus capacidades enzimáticas encuentran uso en la producción de compuestos bioactivos y metabolitos beneficiosos (López-Mendoza et al., 2023) que, al comprender su comportamiento en condiciones variables, incluidos los entornos ácidos, se puede aprovechar su potencial de manera efectiva y, para establecer su eficacia como probióticos, es necesario realizar pruebas exhaustivas en condiciones que simulen el tracto digestivo.

Por ende, la investigación sobre la viabilidad de las BAL se alinea con sus contribuciones fundamentales a las aplicaciones científicas y de salud. El énfasis en los probióticos subraya su potencial para revolucionar la salud intestinal, mientras que sus aplicaciones más amplias en alimentos, biotecnología y medicina prometen innovaciones que podrían beneficiar a varios sectores. Por lo tanto, profundizar en la viabilidad de las BAL y comprender su comportamiento tiene implicaciones de gran alcance que justifican esfuerzos de investigación rigurosos.

3. Antecedentes

Debido a esta problemática, se busca desde diversos campos de investigación la manera de mitigar y reducir el impacto de las ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos), es

en este punto donde toman relevancia los probióticos por sus características y atributos reflejados en la mejoría de la salud del consumidor (Amorocho-Cruz, 2011). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, 2001) y Marguet et al. (2017), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas como parte de los alimentos, modifican la comunidad microbiana relacionada y confieren un beneficio para la salud del huésped a través de una mejor respuesta del hospedador a las enfermedades. Estos microorganismos pueden incluir bacterias, levaduras y otros microorganismos que se hallan de manera natural en el tracto gastrointestinal y en algunos alimentos fermentados (NIH, 2022). Los beneficios incluyen, inhibición de patógenos en el tracto gastrointestinal, reducción del colesterol sérico, prevención de cáncer de colon, producción de antioxidantes, prevención de diarrea asociada a antibióticos, mejora la tolerancia a la lactosa, tratamiento de colitis ulcerosa, tratamiento de *Helicobacter pylori* y prevención de infecciones urogenitales entre otros (Byakika et al., 2019; Kechagia et al., 2013; Kumar et al., 2010).

El establecimiento de las directrices para la evaluación y declaración de probióticos para uso alimentario por parte del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS (2001), facilitan una metodología para evaluar las propiedades de los alimentos probióticos de forma sistemática que se resumen en tres componentes, determinar su supervivencia en el tracto gastrointestinal, seguridad para uso humano o animal, y establecimiento de la actividad/beneficio del probiótico.

Es necesario, identificar las cepas por métodos fenotípicos y genotípicos, ya que esta caracterización de los productos probióticos a nivel de género, especie y cepa es fundamental para garantizar que se trata de un microorganismo inocuo y debe ser aún más estricto para las cepas especies como, por ejemplo, bacilos, enterococos y *E. coli*, con un historial conocido de patogenicidad (Amorocho-Cruz, 2011; Kechagia et al., 2013; Byakika et al., 2019). Posteriormente es necesario realizar estudios *in vitro* para seleccionar los probióticos. El primero es evaluar la actividad antimicrobiana, los microorganismos ejercen su efecto probiótico a través de la inhibición de patógenos utilizando ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, alcoholes y bacteriocinas, entre otros (Leal & Amorocho, 2017; Salazar et al., 2017). La acción antimicrobiana también puede ser por desplazamiento o competencia con el patógeno por nutrientes o sitios de unión en el epitelio e inhibición de la adherencia de los patógenos a la mucosa (Amorocho-Cruz, 2011; Collado et al., 2007). Sin embargo, cabe recalcar que, en esta fase temprana de la

evaluación, la producción *in vitro* de compuestos antimicrobianos no garantiza necesariamente la aplicación *in vivo*, debido a que no es claro si el microorganismo en condiciones *in vivo*, teniendo en cuenta la competencia y demás factores que afectan la supervivencia del mismo, producirá bacteriocinas suficientes para generar una inhibición considerable del patógeno (Byakika *et al.*, 2019).

La saliva, una secreción originada en las glándulas salivales, siendo un componente crucial del proceso digestivo, donde se produce una tasa diaria que oscila entre 500 y 700 ml compuesta por diferentes enzimas salivales y la mayor secreción se produce antes, durante y después de las comidas, alcanzando su punto máximo alrededor del mediodía y disminuye significativamente durante el sueño nocturno (Pérez & Montaña, 2016). El pH de la saliva se encuentra dentro del rango fisiológico de 6,5 a 7,4 (Pedersen *et al.*, 2002). Cumple un papel fundamental en la digestión de carbohidratos, iniciando el proceso dentro de la cavidad oral y contribuyendo significativamente a la eficiencia digestiva general. La saliva siendo parte de la predigestión y de la formación del bolo alimenticio tiene influencia por las proteínas presentes en ella, a lo cual García *et al.* (2012), mencionan que se identificaron 309 proteínas en la saliva y más del 95% pertenece a las principales familias de proteínas: prolina, alfa-amilasa salival, mucinas, aglutininas, cistatinas, histatinas y estaterinas.

Las enzimas son moléculas que interviene en las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula y en la saliva existe una denominada alfa amilasa (α -amilasa), encargada de desdoblar o romper el almidón y a otros polisacáridos, hasta producir moléculas más pequeñas como la glucosa. Enzima que al estar presente en la saliva se le denomina “ α -amilasa salival” o “ptialina” (Pérez & Montaña, 2016).

Según Amorocho-Cruz (2011) y Klaenhammer & Kullen (1999), también es importante evaluar la supervivencia de los probióticos frente a las condiciones gastrointestinales, tales como el pH, la presencia de sales biliares y enzimas digestivas, para asegurar que estos microorganismos lleguen al intestino en una cantidad suficiente para ejercer su función probiótica de manera efectiva. En la revisión de Byakika *et al.* (2019), sugieren que el efecto benéfico de un probiótico para su huésped está relacionado con su concentración en el intestino y su valor debe ser de al menos 10^7 Log UFC/ml de contenido fecal. Así mismo, Huang *et al.* (2017), relaciona que la dosis mínima recomendada es de 10^7 células probióticas vivas por gramo o mililitro de producto al momento de su consumo y adicionalmente, Colombia establece en el artículo 22 de la

resolución 333 de 2011 un número mayor o igual de 10^6 UFC de bacterias viables de origen probiótico por gramo de producto terminado hasta el final de su vida útil (Ministerio de la Protección Social, 2011).

Sin embargo, muchos de los métodos *in vivo* empleados para evaluar dicha característica presentan problemas de ética y seguridad por lo que se opta en primera instancia, en simular las condiciones gastrointestinales (*in vitro*), desde la ingesta de alimentos exponiendo los microorganismos a diferentes niveles de pH, evaluando los efectos de las enzimas como la amilasa salival, pepsina y pancreatina, determinando la viabilidad celular por tinción de células con fluorescencia y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placa (Amorocho-Cruz, 2011; Castillo-Escandón et al., 2019).

Algunos de estos ensayos *in vitro* como los realizados por Afzaal et al. (2019); Amorocho-Cruz (2011) y Zeashan et al. (2020), separan los tratamientos enzimáticos gracias a que de esta manera, es posible comparar directamente la supervivencia de los probióticos en ambas condiciones y obtener información clara sobre cómo responden, no obstante, *in vivo* la ruta del probiótico por el tracto gastrointestinal humano es secuencial y directa por lo que según Byakika et al. (2019), sería más realista estudiar la supervivencia de las cepas candidatas en condiciones sucesivas de estrés enzimático y pH permitiendo obtener más información sobre cómo las bacterias pueden adaptarse a lo largo del trayecto.

Los microorganismos probióticos más comunes son las bifidobacterias y las BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* (Amorocho-Cruz, 2011). Otros organismos probióticos menos comunes pertenecen a los géneros bacterianos *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Escherichia*, y levaduras del género *Saccharomyces* (Byakika et al., 2019). A la par con la búsqueda de microorganismos con propiedades probióticas, las BAL se han utilizado ampliamente en la industria alimenticia por sus propiedades como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados contribuyendo a mejorar características de textura, sabor ácido, restringiendo el desarrollo de organismos patógenos, gelificación de la leche y descenso del contenido de lactosa (Ordoñez-Lozano & Amorocho-Cruz, 2023; Vera-Peña et al., 2019; Gómez Rodríguez, 2022). Estas son bacterias pertenecientes al grupo de bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, sin motilidad, microaerófilos y anaerobios facultativos, con forma de coco o bacilos, catalasa negativa, con extensión variable y un grosor de 0.5 – 0.8 μm aproximadamente (Heredia-Castro et al., 2017; Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, 2021). Según la fermentación de la lactosa, las BAL se pueden clasificar en

homofermentativas (sintetiza ácido láctico) y heterofermentativas (ácido láctico y otras sustancias) (Huertas & Adolfo, 2010; Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, 2021). Según Ordoñez-Lozano y Amorocho-Cruz (2023), ciertos compuestos orgánicos producidos por las BAL, como el ácido láctico, el ácido fenilacético y las bacteriocinas, actúan como conservantes alimentarios naturales, protegiendo los alimentos contra microorganismos patógenos que pueden representar una amenaza para la salud humana.

Actualmente, trabajos que evaluaron la actividad antimicrobiana que presentan estas BAL como *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp y *Streptococcus thermophilus* en condiciones *in vitro*, han encontrado efectividad en el control de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Escorza Mistrán, 2018; Leal & Amorocho, 2017). Adicionalmente trabajos realizados por Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, (2021); Jiménez-Espinosa & Amorocho-Cruz (2020) y Ordoñez-Lozano & Amorocho-Cruz (2023), con 4 cepas BAL aisladas de café (Ladino, 2017) y leche materna (productos del Huila) han confirmado la acción antimicrobiana que estas BAL tienen frente a diferentes patógenos como lo son *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 y *Escherichia coli* ATCC 25922, por tanto, el uso de estas BAL plantean una posible alternativa a considerar para el tratamiento de infecciones bacterianas y la reducción del riesgo de resistencia a los antibióticos.

De hecho, en relación con la resistencia a los antibióticos, se sabe que el uso excesivo y descontrolado de antibióticos en medicina y en la producción animal ha llevado a un aumento en la resistencia bacteriana a estos medicamentos, lo que representa un problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2021). Además, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud. Se estima que para 2019 al menos 700.000 personas fallecieron por enfermedades farmacorresistentes, y que para 2030, la resistencia a los antimicrobianos podría sumir en la pobreza extrema a hasta 24 millones de personas (WHO, 2019).

Es por eso que una de las principales prioridades en la investigación de nuevos probióticos es encontrar alternativas a los antibióticos convencionales. Las cepas BAL podrían ser utilizadas para tratar infecciones bacterianas resistentes, lo que reduciría la presión selectiva sobre los antibióticos y disminuiría el riesgo de resistencia (Collado et al., 2008).

4. Planteamiento del problema

Una de las grandes problemáticas en la salud a nivel mundial según La Organización Mundial de la Salud (OMS), son las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), donde se estima que, en el mundo, la ocurrencia anual de diarrea es de 1.500 millones de casos, y además informa que 3 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente a causa de las ETA (Instituto Nacional de Salud, 2017). El Ministerio de Salud (2021), define las ETA como el proceso causado por la ingesta de alimentos y/o agua contaminados con microorganismos patógenos, que producen infecciones o intoxicaciones causadas por toxinas producto del metabolismo de bacterias o mohos presentes en el alimento (González González & González Carroza, 2019). Además, el Instituto Nacional de Salud (2017), menciona que, en Colombia, la mayoría de los brotes de ETA se deben a la presencia de agentes patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp, entre otros.

La introducción de los antibióticos ha sido una de las mediaciones más importantes para el control de enfermedades producidas por patógenos bacterianos (Alós, 2015). Sin embargo, el uso excesivo e inapropiado de dichas terapias con antibióticos ha generado que los microorganismos patógenos desarrollen resistencia a estos medicamentos, lo que representa una amenaza para la salud pública puesto que las bacterias estarían sobreviviendo a concentraciones de antibiótico que inhiben a otras bacterias, llevando a un aumento de la morbilidad, mortalidad y costos de tratamiento (Alós, 2015; Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, 2021; González Mendoza et al., 2019; Rocha et al., 2015).

Situaciones como estas, nos motivan a explorar nuevas opciones para encontrar tratamientos terapéuticos efectivos que puedan combatir dicha resistencia. Estudios anteriores realizados en condiciones *in vitro* con 3 cepas BAL, aisladas de café y leche materna (L, D y JC) han confirmado la acción antimicrobiana que estas BAL tienen frente a diferentes patógenos como lo son *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* (Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, 2021; Jiménez-Espinosa & Amorocho-Cruz, 2020; Ordoñez-Lozano & Amorocho-Cruz, 2023). Así mismo, estas BAL son sensibles a Penicilina, Ceftriaxona y Ciprofloxacino lo que garantiza la no transferencia de genes de resistencia a patógenos (Amorocho-Cruz, 2011; Jiménez-Espinosa & Amorocho-Cruz, 2020). Estas características son importantes para garantizar que los microorganismos utilizados en los productos probióticos tengan el potencial de suministrar

beneficios a la salud del huésped (Marguet et al., 2017). Sin embargo, existen otras variables como la acción de enzimas predigestivas como la saliva, digestivas como pepsina y pancreatina, además de movimientos peristálticos y la dosis mínima de BAL para la colonización en microvellosidades del epitelio intestinal, características que pueden afectar la sostenibilidad celular de estas BAL y que aún se desconoce (Amorocho-Cruz, 2011). Es por esto que se plantea analizar la viabilidad celular de las cepas BAL D, L, JC y EJF simulando condiciones digestivas y gastrointestinales con enzimas amilasa salival (pH 6), pepsina (pH 2) y pancreatina (pH 8) en diferentes tiempos de exposición con el fin de determinar la resistencia a la digestión como característica probiótica.

5. Objetivo general

Analizar la viabilidad celular de las cepas BAL simulando condiciones gastrointestinales con enzimas amilasa salival (pH 6), pepsina (pH 2) y pancreatina (pH 8) en diferentes tiempos de exposición.

a. Objetivos específicos

- Examinar la incidencia de la amilasa salival en la estabilidad de las BAL D, L, JC y EJJ en las tasas de supervivencia en diferentes intervalos de tiempo
- Determinar la cantidad de UFC de las cepas BAL en diferentes tiempos de exposición a la enzima pepsina simulando la condición gástrica.
- Evaluar la variación en la cantidad de UFC de las cepas BAL a lo largo del tiempo tras la exposición a la pancreatina.
- Comparar la supervivencia de las cepas BAL por tiempo de exposición a las enzimas pepsina, pancreatina y amilasa salival para determinar la resistencia a la digestión como característica probiótica.

6. Metodología.

a. Activación cepas BAL

Se inició el procedimiento con la activación de las cepas BAL (JC, L, D y EJJ), tomadas de la colección del laboratorio de Microbiología de alimentos (Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana) de investigaciones previas, que se encuentran conservadas a -20°C, de las cuales D y L son aisladas de fermentación de café, mientras que JC y EJJ son aisladas de leche materna.

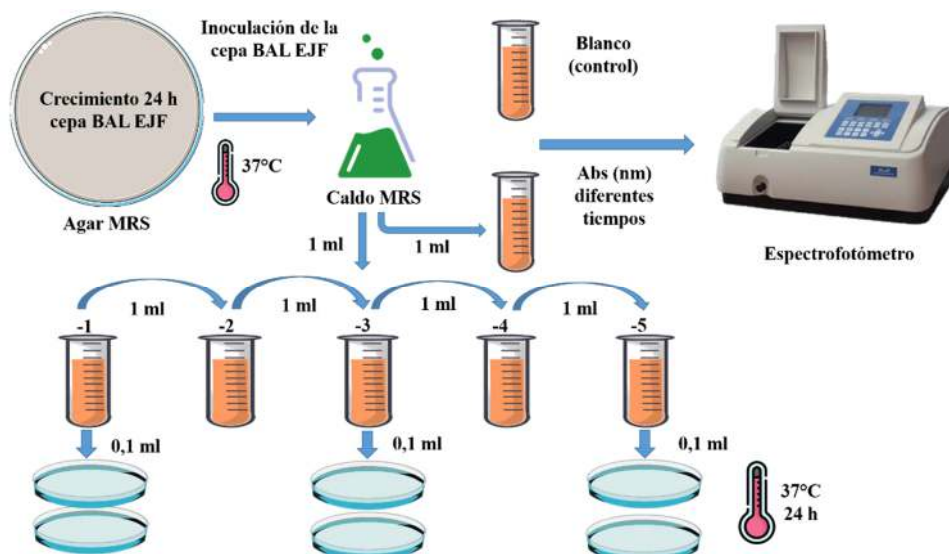
Se tomó una porción de los viales donde están los microorganismos para realizar siembra en superficie en medio de agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Conda, España) e incubarlas (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h. Después, se realizó triple estría con un asa de platino en medio de agar MRS para el aislamiento de colonias y así realizar resiembra en superficie con MRS y llevarlas a incubar por 24 horas.

b. Cinética de crecimiento de BAL EJJ

Para determinar la cinética de crecimiento de la BAL EJJ, se hizo la inoculación en caldo MRS, se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.

Figura 1.

Metodología para cinética de crecimiento BAL EJJ



Se tomaron dos muestras en los tiempos 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 24, 30, 38 y 48 horas, una de ellas para la absorbancia que fue medida en el espectrofotómetro a 600 nm (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/ VIS, Reino Unido), teniendo en cuenta el Blanco, que fue el caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS Broth, Oxoid, Inglaterra) sin inóculo, esto para ajustarlo a 0 nm, y con la restante se hicieron diluciones seriadas, para sembrar en placas con agar MRS, se incubaron a 37°C por 24 horas. En todos los casos la siembra se hizo en superficie por duplicado. Cada medición se determinó por conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml) (Figura 1).

c. Actividad antimicrobiana de BAL EJF

c.1. Cepas bacterianas patógenas

Del banco de conservación del laboratorio de microbiología, se extrajo una porción de los crioviales con líquido hidratante junto con una crioperla, los patógenos de referencia *Shigella sonnei* ATCC 25931 y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977, para realizar triple estría con un asa de platino en medio P.C.A (Plate Count Agar, Conda, España), para el aislamiento de colonias; las placas se incubaron (Heratherm, IMH 60- S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h.

c.2. Orden de crecimiento de los patógenos

Del crecimiento en placa de triple estría, se tomó una colonia, se extendió en superficie en una placa de medio P.C.A (Plate Count Agar, Conda, España), se incubó (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h.

Transcurridas las 24 h se tomó una porción del crecimiento en placa y se depositó en 9 ml de agua de peptona (Merck, Alemania) hasta una escala McFarland de 0.5, se realizaron diluciones seriadas con volúmenes de 1000 µl, se inóculo 100 µl en cada una de las placas con medio P.C.A y se extendió en superficie (por duplicado), las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Se realizó conteo a las 24 y 48 h. Este procedimiento se hizo con cada una de las cepas bacterianas patógenas.

El recuento de las colonias en placa para las diluciones empleadas se registró y mediante la Ecuación (1) se determinó el orden de crecimiento del patógeno.

Ecuación 1

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{NC}{Vol * ND}$$

Nota. Donde, **NC**: número de colonias de crecimiento en placa. **Vol.:** volumen de siembra (0.1 ml) y **ND**: dilución de conteo de colonias.

c.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL EJF frente a patógenos

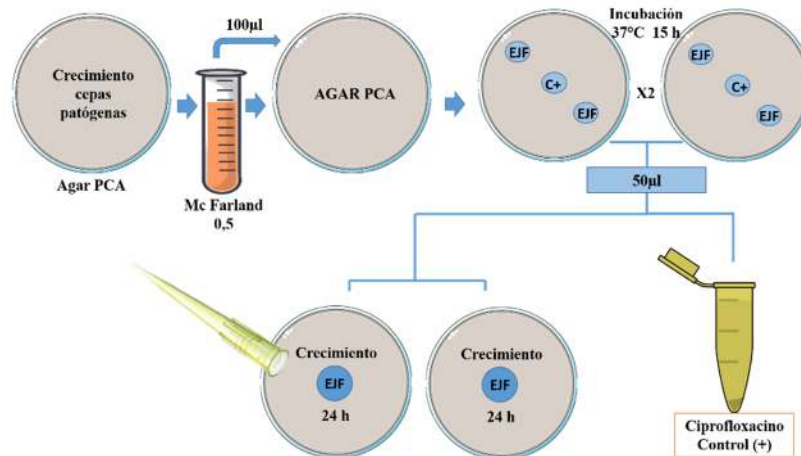
Se evaluó la actividad antimicrobiana de las BAL en presencia y ausencia de células BAL frente a las cepas patógenas. Para ambas metodologías se consideró inhibición cuando la medida del halo es mayor a 2 mm (Martínez-Vázquez et al., 2021).

c.3.1. Método de discos

La actividad antimicrobiana en presencia de células BAL se determinó mediante la técnica de difusión de discos. El cultivo bacteriano patógeno se inoculó y fue ajustado a 0.5 escala McFarland en medio de agar PCA. Por otro lado, en las placas de agar MRS con crecimiento de cada cepa ácido-láctica se cortaron discos de 7 mm de diámetro usando un sacabocados estéril (Amorcho-Cruz, 2011) y un pocillo para el control positivo, fue con 50µl del antibiótico Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia). Las placas se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h. La franja de inhibición por las BAL fue medida con una regla (mm) (Figura 2).

Figura 2.

Ilustración método discos BAL EJF

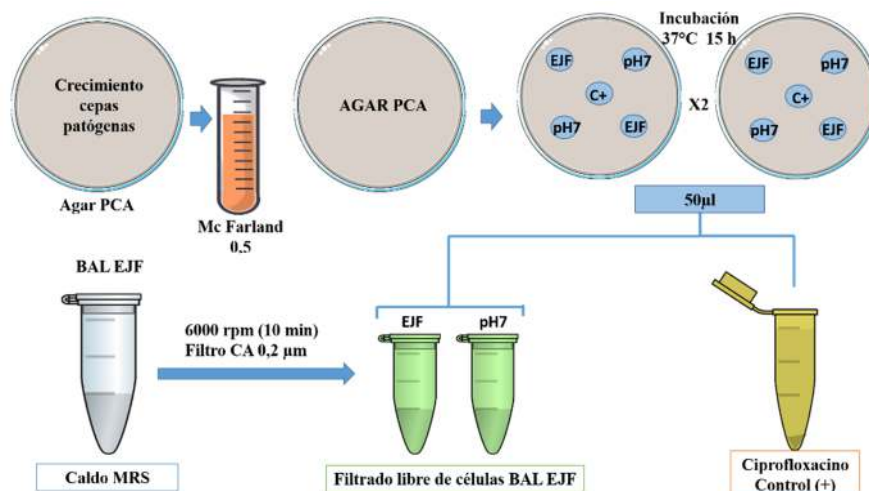


c.3.2. Método de pocillos

Mediante la técnica de difusión de pocillos, se evaluó el comportamiento de la BAL EJP frente a los patógenos en ausencia de células. Para el filtrado de células de las BAL, se obtuvo una porción de ellas (MRS), se depositaron en tubos con caldo MRS y se incubaron (Heratherm, IMH 60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37° C durante 24 h. Luego se pasó en tubos eppendorf, se adicionó el líquido con crecimiento de la BAL para llevarlo a centrifuga (Heraus- pico 17, Thermo Scientific, Alemania) a 6000 rpm durante 10 minutos, finalmente con ayuda de filtros de membrana de acetato de celulosa (CA) con porosidad de 0,2 µm (Sartorius stedim - Minisart, Alemania) se separó el sobrenadante para dejar la sustancia libre de células, ajustando uno de los filtrados a pH neutro (7), para la acción de las bacteriocinas (Figura 3).

Figura 3.

Metodología método de pocillos BAL EJP



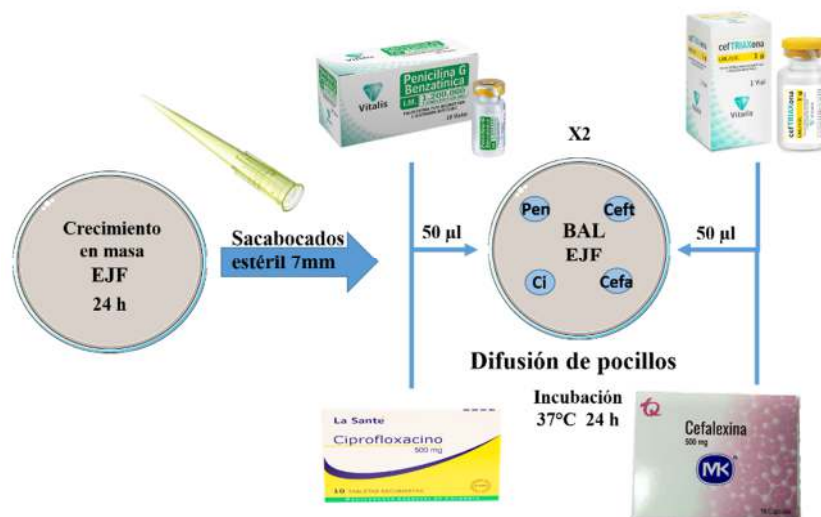
El cultivo bacteriano patógeno se inocula en medio de agar - P.C.A y se ajustó a 0.5 escala McFarland, se seccionaron 4 pocillos de 7 mm de diámetro en la placa del medio de cultivo inoculado usando un sacabocados estéril (Amorocho-Cruz, 2011), se adicionaron 50 µl en cada pocillo del sobrenadante libre de células y como control positivo se usó el antibiótico Ciprofloxacino (Bioquímico Pharma S.A, Colombia). Las placas se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24h. El halo de inhibición generado por las BAL fue medido con una regla (mm).

c.4. Antibiogramas

Se evaluó la cepa BAL E.J.F mediante la técnica de difusión de pocillos (Bauer, et al., 1966) con los antibióticos Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India), Ciprofloxacina (Bioquímico pharma S.A, Colombia) y Cefalexina (Tecnoquímicas S.A.) en medio de agar MRS, donde se sembró en masa la cepa láctica, seguidamente se cortaron 4 pocillos de 7 mm de diámetro en la placa del medio de cultivo inoculado usando un sacabocados estéril (Amorocho-Cruz, 2011). En cada pocillo se adicionaron 50 µl del respectivo antibiótico, este procedimiento se hizo por duplicado. Finalmente se incubaron (Heratherm, IMH60-S, Thermo Scientific, Alemania) a 37°C durante 24 h. La zona de inhibición generada por los antibióticos se midió con una regla (mm) (Figura 4).

Figura 4.

Metodología sensibilidad a antibióticos cepa BAL E.J.F

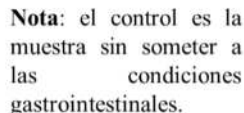


d. Viabilidad celular de BAL simulando condiciones digestivas “*in vitro*”

Para evaluar la viabilidad celular simulando condiciones digestivas, se empleó la metodología desarrollada por Amorcho-Cruz (2011). Las cuatro cepas BAL (L, D, JC y E.J.F) se inocularon en caldo MRS y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se tomaron 1 ml de cada cultivo en caldo MRS y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con la solución tampón PBS 1X para eliminar los restos de caldo MRS. Luego, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS 1X y se ajustaron a una concentración celular equivalente a la escala 2 de McFarland (10^8 UFC/ml). Antes de proceder con el ensayo de supervivencia a los jugos gástricos, se realizó el recuento de células viables en agar MRS a partir de la suspensión celular, considerando este recuento como el control inicial (Figura 5).

Figura 5.

Procedimiento evaluación viabilidad celular condiciones gastrointestinales



d.1. Colecta saliva

Existen varias técnicas para recolectar saliva humana, siendo el método más común el escupitajo debido a su sencillez y no ser invasivo. Se llevó a cabo un protocolo específico como se plantea en los estudios realizados por Hu et al. (2013); Liu et al. (2018); Mohd-Zubri et al., (2022) y Tian et al. (2023), con algunas modificaciones:

Se tomaron varios sorbos de agua alrededor de la boca durante al menos 30 segundos para obtener un estado bucal "neutral"; se escupió la saliva en un tubo de ensayo durante 2 o 2,5 minutos con una frecuencia determinada de 30 segundos y los primeros 30 segundos se descartaron, este paso se realizó por duplicado. La saliva recolectada se centrifugo inmediatamente a 5000 rpm durante 10 minutos para sedimentar las células y el sobrenadante se almaceno a -20 °C.

d.2. BAL sometidas a enzimas salivales

Se tomó 2 ml de la suspensión de células de BAL en PBS 1X, previamente preparada, y se mezcló con 1 ml de la suspensión salival (pH 6) y para el control se reemplazó la saliva por PBS 1X. La mezcla se agitó en vortex y posteriormente se incubó a 37 °C en los tiempos 0, 17 y 33 segundos (Helkimo et al., 1978) Luego, cada una de las muestras se centrifugaron, se retiró el sobrenadante para eliminar las enzimas presentes en la saliva y se suspendió en PBS 1X. En cada uno de estos tiempos se tomó 1 ml del medio para hacer dilución seriada hasta 10^{-7} . Seguido a esto se sembraron alícuotas de 0,1 ml en cada placa con agar MRS, se llevaron a incubar a 37°C durante 24 y 48 horas. Este

ensayo se hizo por duplicado y para determinar las BAL viables se hizo un conteo en placa de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

d.3. Preparación de los jugos gástricos y pancreáticos

Las enzimas pepsina y pancreatina son extraídas de cerdo (Sigma). Para la preparación de las soluciones enzimáticas, se diluyó cada una de las enzimas en suero salino al 0.5% w/vol. La pepsina se preparó en una relación de 3 g/L y la pancreatina en una relación de 1 g/L. El pH de la solución de pepsina se ajustó a 2 utilizando HCl 0.5 N, mientras que el pH de la solución de pancreatina se ajustó a 8 con NaOH 1N. Para la determinación de la supervivencia "*in vitro*" al tránsito gastrointestinal, se tomaron 0.2 ml de la suspensión de células de BAL en PBS 1X y se mezclaron con 1 ml de la solución de pepsina (pH 2) o de pancreatina (pH 8). La mezcla se agitó en un vortex y posteriormente se incubó a 37°C durante los tiempos establecidos para cada estudio. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml en los tiempos de 0, 5, 40 y 180 minutos para el tratamiento con pepsina, y en los tiempos de 0, 240 y 360 minutos para el tratamiento con pancreatina. Cada muestra obtenida se centrifugó, se eliminó el sobrenadante para retirar los jugos digestivos y se resuspendió en PBS 1X. Este procedimiento se realizó siguiendo el modelo de digestión humana, en el cual el tránsito en el estómago tiene una duración de aproximadamente 3 horas y el tránsito intestinal de aproximadamente 6 horas (Amorocho, 2011). La viabilidad de las BAL se determinó mediante recuento en placa. En cada uno de estos tiempos se tomó 1 ml del medio para hacer dilución seriada hasta 10⁻⁷. Seguido a esto se sembraron alícuotas de 0,1 ml en cada placa con agar MRS, se llevaron a incubar a 37°C durante 24 y 48 horas. Cada ensayo se realizó por duplicado y para determinar las BAL viables se hizo conteo en placa de las UFC/ml, se calculó el porcentaje de supervivencia con la siguiente ecuación (Ecuación 2):

Ecuación 2.

$$\% = \frac{(\text{Log UFC N1})}{(\text{Log UFC N0})} \times 100$$

Donde **N1** representa el total de células viables después de los tratamientos y **N0** representa el número inicial de BAL inoculadas (Ordoñez-Lozano & Amorocho-Cruz, 2023).

e. Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel del 95,0% de confianza en el software STATGRAPHICS Centurion XVI.I, para observar si existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición a las enzimas presentes en la amilasa salival (pH 6), la pepsina (pH 2) y la pancreatina (pH 8).

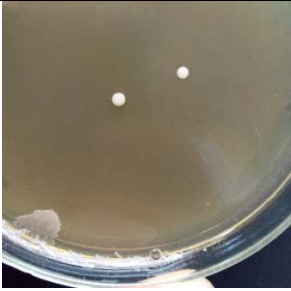
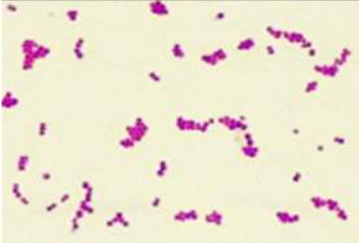
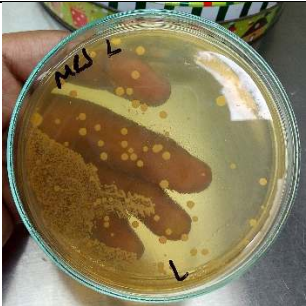
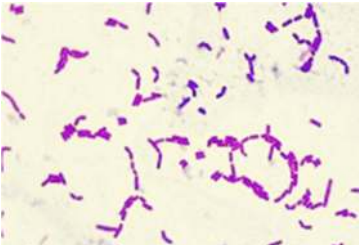

7. Resultados y discusión

a. Activación de cepas BAL

Se realizó la verificación de las tres cepas lácticas D, L y JC ya descritas por Ordoñez-Lozano y Amorocho-Cruz (2023), cuya característica microscópica principal es presentar una coloración violeta propia de las bacterias Gram-positivas (Tabla 1). Además, se realizó en esta investigación la caracterización de la cepa EJF proveniente de leche materna (Tabla 2). Esta caracterización es un indicativo de ciertos phyla bacterianos que nos brinda información clave para una aproximación a la identificación taxonómica y combinada con pruebas bioquímicas y moleculares, estas descripciones permiten una identificación precisa de las bacterias estudiadas (Mianzhi & Shah, 2017). También, las condiciones aerobias o la disponibilidad de oxígeno están directamente relacionadas con la actividad enzimática de las BAL, evitando la acumulación de sustancias tóxicas y aumentando su viabilidad (Folicaco Sandoval et al., 2018). Por esto, Landa-Salgado et al. (2019) recomiendan usar condiciones anaerobias para evitar inhibir el crecimiento de las BAL.

Tabla 1. Descripción de las cepas BAL en comparación con Ordoñez-Lozano y Amorocho-Cruz (2023).

Cepa	Caracterización	Descripción	Colonia
------	-----------------	-------------	---------

JC	Macroscópica	Colonias redondeadas, con borde entero, blanquecinas, opaca, cóncavas, aspecto húmedo-brillante, tamaño aproximado a 1 mm	
	Microscópica	Cocos uniformes en forma esférica con agrupaciones en racimos, diámetros que oscilan entre 0,9 y 1 μm , Gram-positivas (100X).	
L	Macroscópica	Colonias circulares, con bordes enteros redondeados, de color blanco cremoso, superficie cóncava, aspecto húmedo-brillante, con tamaño aproximado a 1,8 mm.	
	Microscópica	Bacilos alargados con extremos lisos redondeados, en forma empalizada, con medidas aproximadas a 2,5 μm de largo y 0,86 μm de ancho, Gram-positivas (100X).	
D	Macroscópica	Colonias de forma circulas de color blanquecino, borde entero con diámetro 4 mm.	

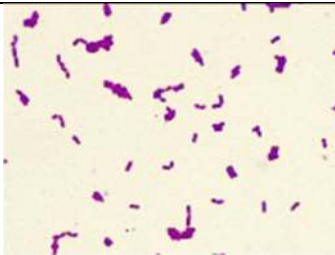

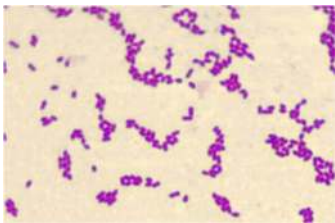
	Microscópica	Se observaron bacilos cortos con extremos lisos sin agrupación, identificando la bacteria como Gram-positiva (100X).	
--	---------------------	--	--

Tabla 2. Descripción cepa BAL EJF

Cepa	Caracterización	Descripción	Colonia
EJF	Macroscópica	Colonias medianas de 1,5 mm de forma circular puntiforme, con borde entero, sin transparencias, brillante de color blanquecino, de textura lisa con elevación semiconvexa y consistencia suave.	
	Microscópica	Se observaron bacilos cortos (cocobacilos) con extremos lisos redondeados de longitud promedio 1,002 μm , positiva a la prueba Gram, determinándola como bacteria Gram-positiva (100X).	

Estas bacterias no poseen actividad respiratoria debido a la falta de la enzima citocromo catalasa, la cual contiene un grupo hemina necesario para iniciar la cadena respiratoria con el oxígeno como receptor final de electrones (Parra Huertas, 2010). A pesar de su metabolismo anaerobio, son capaces de soportar la presencia de oxígeno y formar colonias en medios de cultivo sólidos en condiciones aeróbicas (Heredia-Castro et al., 2017). Para recrear un ambiente anaerobio, se emplearon cajas metálicas en las que se colocó una vela; al encenderla y sellar la caja, el oxígeno disponible era consumido, generando así la condición deseada. Las características morfológicas observadas en

estas bacterias son similares a las descritas por Ramírez-López & Vélez-Ruiz (2016), en cepas de *Lactobacillus*. Este hallazgo es corroborado por el estudio previo de Cortés-Gaona et al. (2021), en el cual se reporta que la cepa *L. acidophilus* 3 exhibe una morfología fenotípica semejante. No obstante, Mianzhi y Shah (2017) destacan que la morfología de las colonias no es un criterio confiable para la identificación precisa del género, sugiriendo así la realización de pruebas moleculares específicas en futuros estudios (Ordoñez-Lozano & Amorcho-Cruz, 2023).

b. Cinética de Crecimiento BAL EJF

La BAL EJF (Figura 6), presenta la fase de latencia hasta la hora 6, en la hora 9 inicia la fase exponencial, donde la cepa se ajusta a las condiciones de cultivo ideal y abundancia de nutrientes, hasta las 24 horas. Posteriormente se observa una fase estacionaria hasta las 48 horas, allí finalizó la toma de datos con un crecimiento de $1,33 \times 10^8$ UFC/ml como se muestra en la Figura 6. Para ambos casos de medición, Log UFC/ml y absorbancia (nm), se observaron las fases en las mismas horas. Se debe tener en cuenta que la curva de crecimiento por Absorbancia mide la turbidez del fluido a una longitud de onda, la longitud de onda sugerida para las BAL es de 600 nm (Marwah et al., 2023), por ende, tanto los microorganismos vivos como muertos fueron medidos en la espectrofotometría.

Figura 6.

Cinética de crecimiento BAL EJF



Nota. Las UFC/ml son las unidades formadoras de colonias por mililitro, Abs (nm) es la absorbancia medida en nanómetros.

La cepa BAL JC, aislada de leche materna humana tras un año y medio de lactancia, presenta una fase de latencia prolongada que se extiende hasta la hora 26, seguida de

una fase exponencial acelerada a partir de la hora 30. Este retraso en alcanzar la fase exponencial puede estar relacionado con su origen específico. Por ello, se sugiere la incubación en condiciones anaeróbicas para optimizar el crecimiento de estas cepas (Ordoñez-Lozano & Amoroch-Cruz, 2023). Siguiendo esta recomendación, la cepa BAL EJJ muestra un patrón de crecimiento que coincide con los hallazgos de Ramírez-López & Vélez-Ruiz (2016) en sus estudios sobre aislados de queso fresco artesanal, logrando un crecimiento de $9,4 \times 10^8$ UFC/ml de la cepa *Lactobacillus plantarum*.

En paralelo, se han definido las fases de crecimiento para *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 de manera más específica para cultivos a 37 °C, la fase exponencial se observó entre la hora 2 y 5, la fase estacionaria temprana entre las 7 y 9 horas, y la fase estacionaria tardía a partir de las 9-10 horas (Hernández et al., 2019). La variabilidad en el tiempo de adaptación de diferentes cepas a las condiciones de cultivo es evidente.

Además, Rezvani et al. (2017), llevó a cabo un estudio en el que se analizaron cinco especies distintas de *Lactobacillus* para evaluar su crecimiento celular durante un periodo de incubación de 50 horas. Se empleó suero desproteinizado como fuente de carbono en un cultivo discontinuo sumergido. En la mayoría de las cepas estudiadas, se observó una fase de retraso de aproximadamente 6 horas, seguida por una fase de crecimiento exponencial que se prolonga entre 25 y 45 horas, dependiendo de la cepa en cuestión. Esta variabilidad sugiere que la interpretación de las fases de crecimiento debe considerar la capacidad de adaptación de cada cepa a nuevas condiciones ambientales.

Estas observaciones reflejan que la capacidad de adaptación de cada cepa y las condiciones específicas del medio de cultivo son determinantes en la dinámica de las fases de crecimiento. La variabilidad observada entre las diferentes cepas y especies, en cuanto a la duración de las fases de latencia y crecimiento exponencial, subraya la importancia de adaptar los modelos de crecimiento a las características particulares de cada cepa.

c. Actividad Antimicrobiana BAL EJJ

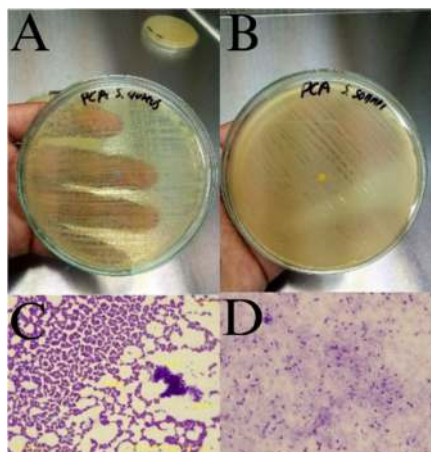
c.1. Cepas bacterianas patógenas

Las colonias aisladas de *S. aureus* ATCC BAA-977 se caracterizaron por su forma circular con bordes enteros, de superficie lisa, consistencia cremosa, opacos, amarillosas y con

diámetros de 1 a 2 mm de espesor. En la caracterización microscópica se observan cocos Gram-positivos, en pares, tétradas, formando cadenas cortas y con un tipo de arreglo de estafilococos (Figura 7A y 7C) (Jiménez-Espinosa & Amorocho-Cruz, 2020). Mientras que las colonias aisladas de *S. sonnei* ATTC 25931 presentan características macroscópicas en placa circulares con bordes irregulares, cóncavos, opacos, traslúcidas, blancuzcas, lechosas, lisas y con diámetros de 1 a 3 mm de espesor; en la identificación microscópica se observan bacilos, identificando la bacteria de tipo Gram-negativa (Figura 7B y 7D) (Cortés-Gaona & Amorocho-Cruz, 2021).

Figura 7.

Cepas patógenas de referencia



Nota. **A.** Cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 vista macroscópica en placa; **B.** Cepa bacteriana *Shigella Sonnei* ATTC 25931 vista macroscópica en placa; **C.** Cepa patógena *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-977 vista microscópica tinción Gram 100X; **D.** Cepa bacteriana *Shigella Sonnei* ATTC 25931 vista microscópica tinción Gram vista 100X

c.2. Antibióticos

En Colombia, los antibióticos de mayor consumo son los betalactámicos, destacando principalmente las penicilinas como la amoxicilina, ampicilina y dicloxacilina, y las cefalosporinas como la cefalexina, ceftriaxona y cefradina. Les siguen en uso las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina (Serna-Galvis et al., 2022). Los antibióticos seleccionados son de uso frecuente para tratamientos de enfermedades infecciosas de origen microbiano, como las causadas por *Staphylococcus aureus* y *Shigella Sonnei*, estos presentan una acción de inhibición efectiva contra las cepas patógenas trabajadas para la prueba de actividad antibacteriana (Figura 8).

Figura 8.

Antibióticos para uso de control positivo



Nota. **A.** Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India); **B.** Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), **C.** Cefalexina 500 mg (Medicamentos MK); **D.** Ciprofloxacino 500mg (Pharmetique LABS)

c.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de BAL EJF frente a patógenos

Los métodos empleados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de EJF frente a *S. aureus* y *S. sonnei* son discos (presencia de células BAL) y pocillos (ausencia de células BAL), en condiciones ácidas y neutras, esta última se ajustó a pH 7.

c.3.1 Método de discos

Dentro de las metodologías utilizadas, el método de difusión en disco, conocido también como prueba de Kirby-Bauer, es especialmente efectivo para microorganismos de crecimiento rápido. Este procedimiento implica la colocación de discos impregnados con antibióticos sobre placas de agar inoculadas con el microorganismo en cuestión (Vázquez-Portejo, 2022). Este método cualitativo permite clasificar al microorganismo como sensible o resistente, facilitando así la identificación de su respuesta al tratamiento antibiótico (Ordóñez-Lozano & Amorocho-Cruz, 2023).

Tabla 3. Zona de inhibición de las BAL con el método de difusión de discos.

BAL	EJF	C. Positivo	EJF	C. positivo
	<i>S. sonnei</i>		<i>S. aureus</i>	

Inhibición	Volumen 50 μ l			
(mm)	15,0 \pm 1,63	18,0 \pm 1,15	16,0 \pm 2,58	63,0 \pm 2,31
Zona (%)	72,73	100	16,07	100

Nota. La inhibición de la cepa EJF frente a las cepas patógenas se expresó en media \pm desviación estándar.

El halo formado por la inhibición de la BAL EJF frente a *S. sonnei* ATTC 25931 fue del 72,73% y el de *S. aureus* ATCC BAA-977 fue 16,07% frente al control positivo (Tabla 3), destacando la acción de inhibición de la BAL frente a *S. sonnei* ATTC 25931 (Figura 8), y se presentó una inhibición estadísticamente significativa en *S. sonnei* ATTC 25931 comparada con *S. aureus* ATCC BAA-977.

Figura 9.

Cepa BAL EJF frente a cepas patógenas método de discos

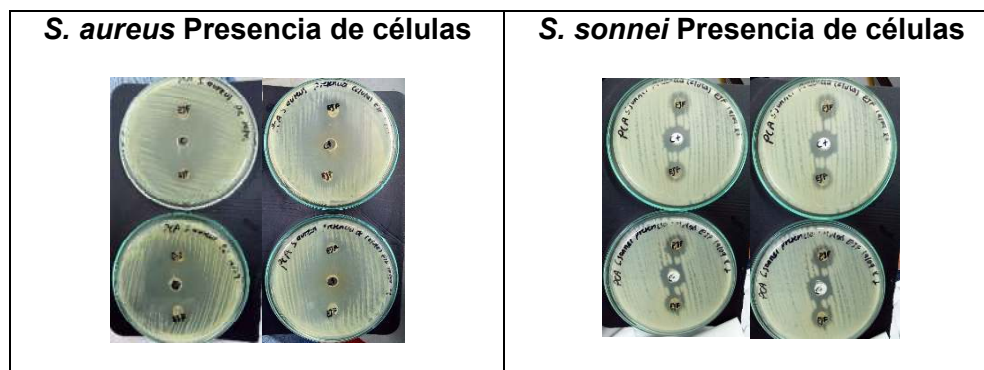
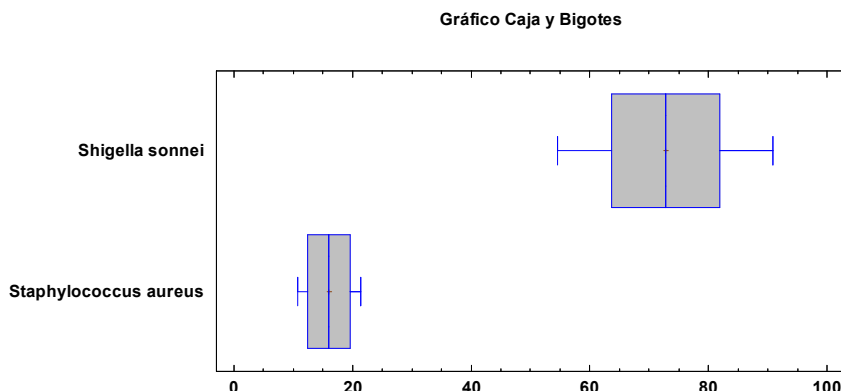


Figura 10.

Diagrama de cajas y bigotes comparación de medias prueba t-student (software STARGRAPHICS centurión)



El valor-p resultante de la prueba t-student para comparar dos muestras, data un valor <0.05 , lo que nos indica una diferencia estadísticamente significativa en los datos sobre el %IH con un nivel de confianza de 95,0% (Figura 10).

Los experimentos con la cepa BAL EJF revelaron un halo de inhibición de 72,73% frente a *S. sonnei* ATTC 25931 y de 16,07% contra *S. aureus* ATCC BAA-977, comparado con el control positivo. La prueba t-student arrojó un valor $p < 0.05$, indicando que la diferencia en la inhibición entre los dos patógenos es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados destacan mayor efectividad de la BAL EJF contra *S. sonnei* ATTC 25931 bacteria Gram-negativa, en comparación con *S. aureus* ATCC BAA-977 bacteria Gram-positiva. Estas diferencias pueden atribuirse a la estructura de la membrana del patógeno.

S. sonnei es un patógeno resistente a una amplia gama de antibióticos, incluidos ampicilina, varias cefalosporinas, gentamicina, tobramicina, amikacina, cotrimoxazol y ácido nalidíxico. Sin embargo, sigue siendo sensible a fluoroquinolonas como norfloxacin, ciprofloxacino y levofloxacino, y presenta un fenotipo de betalactamasa de espectro extendido CTX-M-15, susceptible a la inhibición por ácido clavulánico (González Donapetry et al., 2019).

La inhibición significativa observada para *S. sonnei* ATTC 25931 sugiere que la presencia de las células BAL EJF son efectivos contra esta cepa resistente. Las BAL son conocidas por producir ácidos orgánicos como el láctico y el acético, que disminuyen el pH y

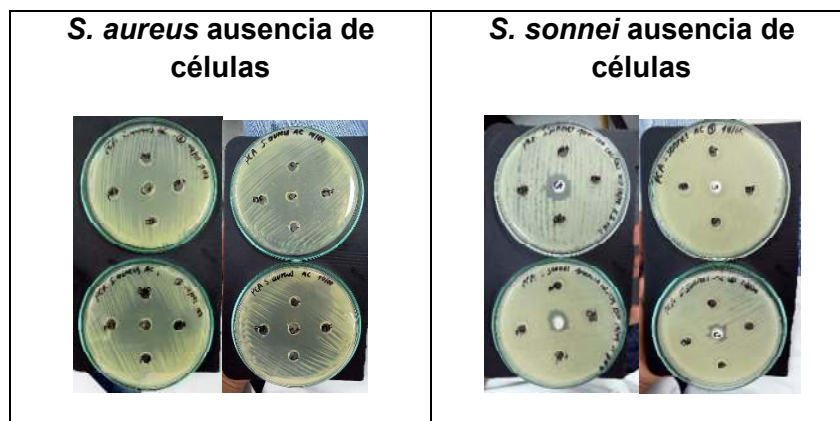
desestabilizan las membranas celulares de las bacterias patógenas, además de formar compuestos aromáticos como acetoina y diacetilo, que poseen propiedades antimicrobianas (Parra Huertas, 2010; Sharifi-Rad et al., 2020; Punia Bangar et al., 2022). El nivel de inhibición podría estar relacionado con la competencia celular y sus compuestos, los cuales son efectivos contra patógenos resistentes como *S. sonnei* ATTC 25931, actuando a través de mecanismos distintos a los antibióticos tradicionales.

En contraste, *S. aureus* ATCC BAA-977 mostró una inhibición del 16,07%. Esta diferencia en la efectividad puede deberse a la naturaleza específica de los compuestos producidos por la BAL EJJ, que parecen ser más efectivos contra bacterias Gram-negativas como *S. sonnei* ATTC 25931 que contra Gram-positivas como *S. aureus* ATCC BAA-977, reiterando el valor de la presencia de células para adherirse y establecerse en las células epiteliales del antro del estómago y así disputar con cepas patógenas Gram-negativas como *E. coli* o *H. pylori* (Leal & Amorocho Cruz, 2017).

c.3.2. Método de pocillos

Figura 11.

Cepa BAL EJJ frente a cepas patógenas método de pocillos



La cepa BAL EJJ no presenta halo de inhibición en ausencia de células BAL, mientras que el control positivo presenta inhibición de las cepas patógenas como se muestra en la Figura 11, se puede inferir entonces, que los productos metabolitos orgánicos de la cepa EJJ no presentan bioactivos y bacteriocinas de importancia para la inhibición del crecimiento bacteriano patógeno de las cepas de referencia *S. aureus* y *S. sonnei*.

Aunque las BAL producen bacteriocinas, conocidas por su capacidad para inhibir bacterias Gram-positivas (Sharifi-Rad et al., 2020), la menor inhibición observada en *S. aureus* sugiere que la cepa EJJ podría no estar produciendo bacteriocinas en cantidades suficientes o con la actividad específica necesaria para afectar significativamente a *S. aureus*.

En el método de pocillos en ausencia de células de BAL, no se observó halo de inhibición, por lo cual se infiere que los productos metabolitos extracelulares no poseen compuestos bioactivos suficientes para inhibir estos patógenos, corroborando la necesidad de la presencia activa de células BAL para la inhibición efectiva de patógenos.

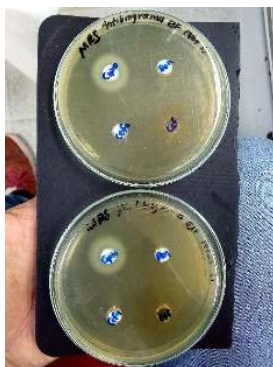
La eficacia antimicrobiana de las BAL se basa en varios factores. Los ácidos orgánicos, como el ácido láctico y acético, reducen el pH del medio, creando un ambiente hostil para los patógenos. Además, las BAL producen compuestos como el acetaldehído, que inhibe la división celular en *E. coli*, y el diacetilo, que tiene un amplio espectro antimicrobiano contra levaduras y bacterias (Parra Huertas, 2010). Otros compuestos, como el hidroperóxido, resultan de la acción metabólica de *Lactococcus* y contribuyen a la inhibición microbiana de microorganismos como *Pseudomona*, *Staphylococcus aureus* ssp, *Clostridium* (Martínez-Vázquez et al., 2020; Sharifi-Rad et al., 2020). Según Martínez-Vázquez et al., (2020), estas bacteriocinas producidas por las BAL tienen un amplio espectro antibacteriano, incluyendo la inhibición de bacterias Gram-positivas patógenas incluidas *Listeria sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp* y algunas Gram-negativas como *Shigella* y *Salmonella sp.*, y algunas cepas de *E. coli*. Sin embargo, la efectividad de estas sustancias puede variar según la cepa dentro de una misma especie o subespecie, puede existir diferencias en los tipos de compuestos sintetizados y, aunque se produzca el mismo compuesto, los niveles de producción pueden variar significativamente (Parra Huertas, 2010; Oliviera Rodi, 2018; Sharifi-Rad et al., 2020).

d. Sensibilidad antibióticos (antibiograma)

El antibiograma es una técnica que determina la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo específico, evaluando su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009). Se evaluó entonces la susceptibilidad de la BAL EJJ a 4 diferentes antibióticos (Figura 12).

Figura 12.

Placa con tratamientos para sensibilidad antibióticos BAL EJJ



Para la prueba de sensibilidad de la bacteria BAL EJJ (Figura 11) a antibióticos comerciales de amplio espectro como Ceftriaxona (Nirlife-Aculife, India), Penicilina G. Benzatínica (Vitalis 1'200.000 U.I.), Cefalexina 500 mg (Medicamentos MK) y Ciprofloxacino 500 mg (Pharmetique LABS), se observó la inhibición del crecimiento bacteriano en toda la placa con cada uno de los tratamientos, por ende, se estableció que tiene una alta susceptibilidad a los antibióticos reprimiendo su crecimiento. Lo que garantiza la no transferencia horizontal de genes (Madrigal Mendoza 2016; Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009).

Según la FAO/OMS, los probióticos pueden, en teoría, ser responsables de 4 tipos de efectos secundarios: infecciones sistémicas, actividades metabólicas nocivas, estimulación inmune excesiva en individuos susceptibles y, finalmente, transferencia de genes (Sharifi-Rad et al., 2020). En la investigación de Madrigal Mendoza (2016), se identificó que de las 30 cepas BAL evaluadas para sensibilidad a los antibióticos, 14 mostraron un alto índice de resistencia múltiple a los antibióticos utilizados. De manera similar, Mayo Pérez (2019) observó la presencia de genes de resistencia en secuencias de inserción y plásmidos, lo cual indica una notable capacidad de transferencia genética. Destacando los resultados obtenidos para la BAL EJJ donde se inhibe completamente el crecimiento bacteriano por los antibióticos usados para la prueba.

En contraste, algunos géneros de BAL como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc* han demostrado resistencia a una amplia gama de antibióticos comunes, incluyendo aminoglucósidos (estreptomicina, gentamicina y kanamicina), β -lactámicos (ampicilina), macrólidos (eritromicina) y tetraciclina (Ojha et al.,

2023). Esta resistencia se debe a que estas bacterias a menudo portan plásmidos de diversos tamaños que contienen determinantes de resistencia, hallados en especies como *L. lactis* y en varias cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Sharifi-Rad et al., 2020; Madrigal Mendoza, 2016).

Además, se han catalogado numerosos genes atípicos en los *Lactobacillus* relacionados con la resistencia a antibióticos. Por ejemplo, se han detectado genes de resistencia al cloranfenicol en *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. plantarum*. También se ha informado sobre la presencia de genes de resistencia a la eritromicina, aunque los más comunes en los *Lactobacillus* son los genes de resistencia a la tetraciclina y en menor medida, se han encontrado genes de resistencia a los β -lactámicos y aminoglucósidos (Sharifi-Rad et al., 2020).

No obstante, en un entorno dinámico como el tracto gastrointestinal, la introducción de nuevos organismos como los probióticos puede eventualmente llevar a la adquisición o pérdida de funciones específicas. Afortunadamente, las observaciones globales sugieren que la recombinación entre especies disminuye de forma exponencial con la divergencia de secuencias dejando así una baja probabilidad de recombinación (Fina Martin et al., 2017).

e. Viabilidad celular de las BAL simulando las condiciones gastrointestinales

e.1. Colecta de saliva

Se colectó aproximadamente 6 ml de saliva proveniente de un hombre y una mujer (Figura 13). El pH fue de 7 para la saliva del hombre y 6 para la saliva de la mujer.

Figura 13.

Colecta de saliva mujer pH≈6

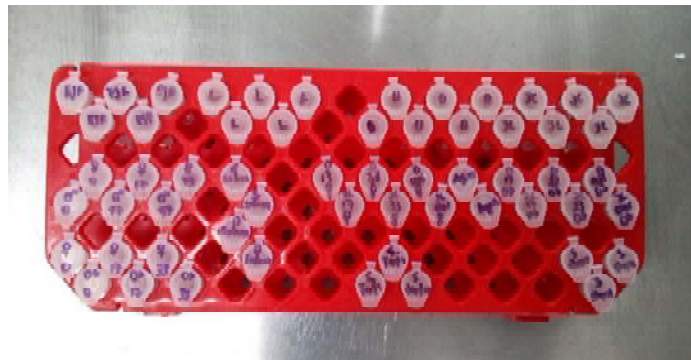


e.2. BAL sometidas a enzimas salivales

Las BAL L, D, JC y EJJ fueron preparadas y ajustadas a escala McFarland 2 (10^8 UFC/ml) como se observa en la Figura 14.

Figura 14.

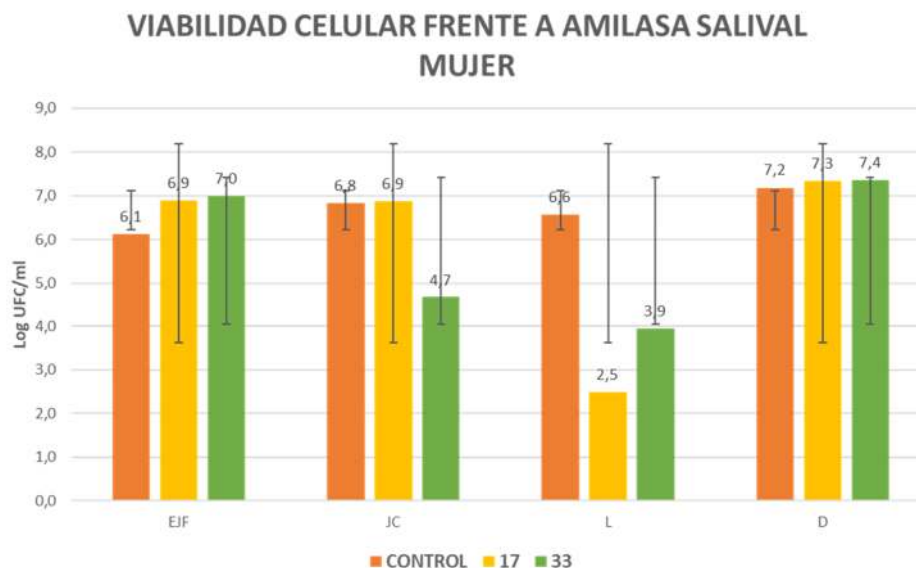
Prueba viabilidad celular de BAL a enzimas salivales



Nota. Tubos eppendorf de 2ml con BAL suspendidas en PBS 1X, saliva hombre y mujer

Figura 15.

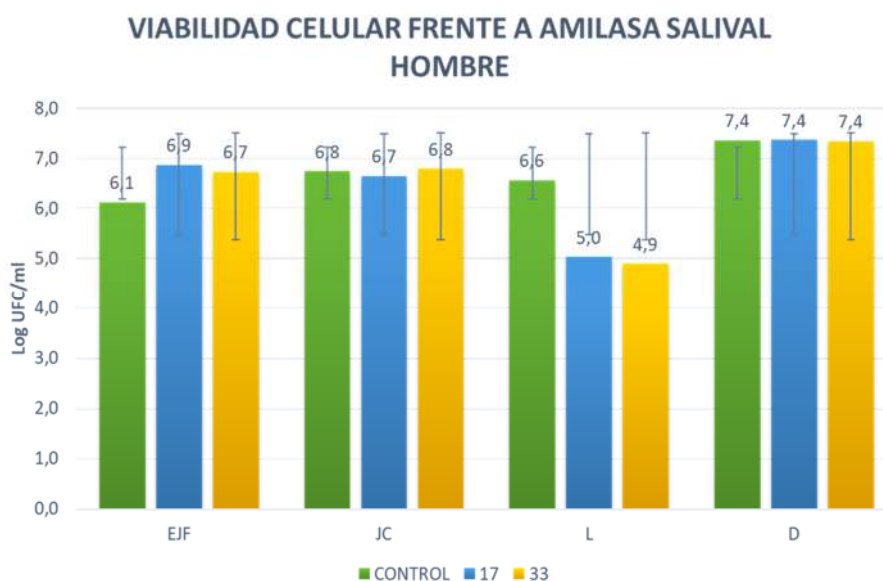
Viabilidad celular BAL frente a enzimas salivales de mujer (pH 6)



Las BAL se mantienen en los rangos de 10^5 y 10^{10} Log UFC/ml (Figura 15), al ser sometidas a las enzimas presentes en la saliva y un pH de 6 en los tiempos promedios estimados para un ciclo de masticación (Woda et al., 2006). Estas condiciones parecen no afectar de manera significativa la viabilidad de las BAL en el primer paso de la digestión, la deglución en la cavidad oral.

Figura 16.

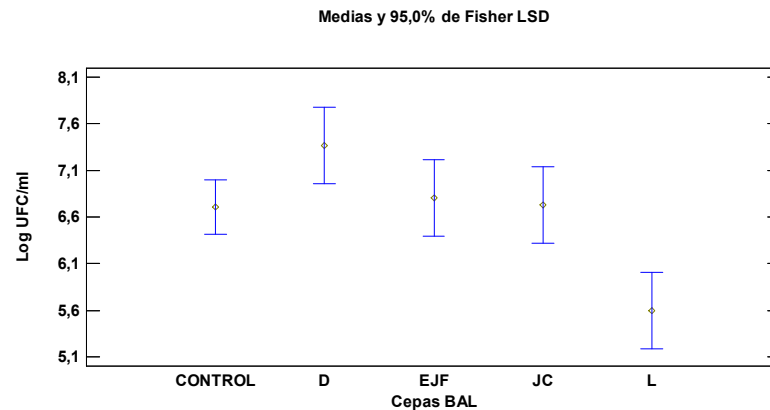
Viabilidad celular BAL frente a enzimas salivales de hombre (pH 7)



Para la prueba con saliva de hombre con un pH de 7, las BAL se mantuvieron en el mismo orden que el de la mujer, 10^5 y 10^{10} Log UFC/ml en los diferentes tiempos (Figura 16). La variación que se da en el pH de ambos no afecta significativamente la viabilidad de las BAL en este primer momento de la digestión.

Figura 17.

Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con saliva



Nota. Grafico generado en el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I

Las BAL mantienen su viabilidad en rangos de 10^5 a 10^{10} Log UFC/ml cuando se exponen a las enzimas de la saliva y a un pH de 6, durante el tiempo promedio estimado para un ciclo de masticación, según Woda et al. (2006). Esto indica que las condiciones presentes en la cavidad oral durante la deglución inicial no afectan significativamente la viabilidad de las BAL. Al realizar pruebas con saliva de hombres, con un pH de 7, se observó que las BAL se mantuvieron en un rango similar al de las mujeres, de 10^5 a 10^{10} Log UFC/ml en los diferentes intervalos de tiempo.

Sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa (p -valor <0.05), donde la cepa BAL L se ve afectada levemente por la exposición a las enzimas presentes en la saliva (Figura 17). Allí como menciona Han et al., (2021), la saliva, una secreción exocrina levemente ácida, contiene componentes como proteínas, mucinas, péptidos y enzimas, y posee un efecto antibacteriano. Sin embargo, su selectividad puede favorecer el crecimiento de microbiota no cariogénica. Estudios *in vitro* sobre múltiples cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium* (Tormo Carnicé, 2006; García-Ruiz et al., 2014) no han mostrado una pérdida significativa del recuento celular cuando se exponen

a la saliva, en comparación con el grupo de control, mismo caso que se observó en la reciente prueba. Cabe resaltar que es el primer estudio donde BAL de café se exponen a estas condiciones y ciertamente, la saliva representa una condición diferente a su origen y resulta interesante estos resultados frente a la inclusión de esta cepa BAL en productos probióticos. La diferencia en el comportamiento de viables entre L y D evidencian que cada cepa se comporta de manera distintiva frente a la amilasa salival.

e.3 Preparación de los jugos gástricos y pancreáticos

Para evaluar la viabilidad de las BAL simulando las condiciones gastrointestinales, se llevó a cabo la metodología establecida por Ordoñez-Lozano y Amorcho-Cruz (2023), la cual incluyó el alistamiento y la preparación de las enzimas digestivas, pepsina y pancreatina aisladas de cerdo (Sigma), para las pruebas de viabilidad celular gastrointestinal (Figura 18), así como el desarrollo de ensayos *in vitro* (Figura 19), que determinaron la viabilidad celular de las BAL frente a dichas condiciones en los intervalos de tiempo establecidos para el proceso de digestión.

Figura 18.

Alistamiento y preparación de las enzimas digestivas para pruebas de viabilidad celular gastrointestinal.



Figura 19.

Desarrollo de ensayos in vitro de viabilidad celular BAL frente a condiciones gastrointestinales

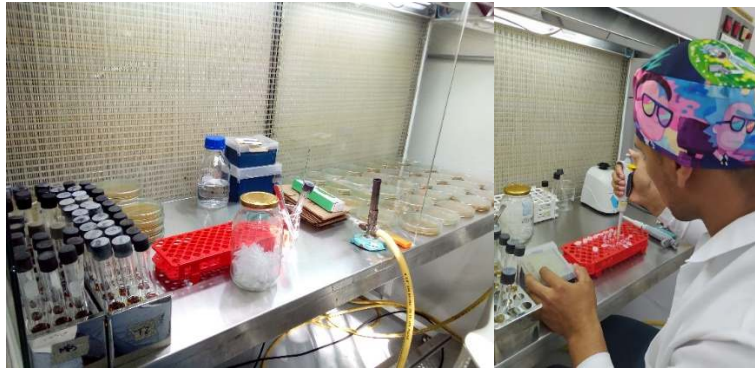
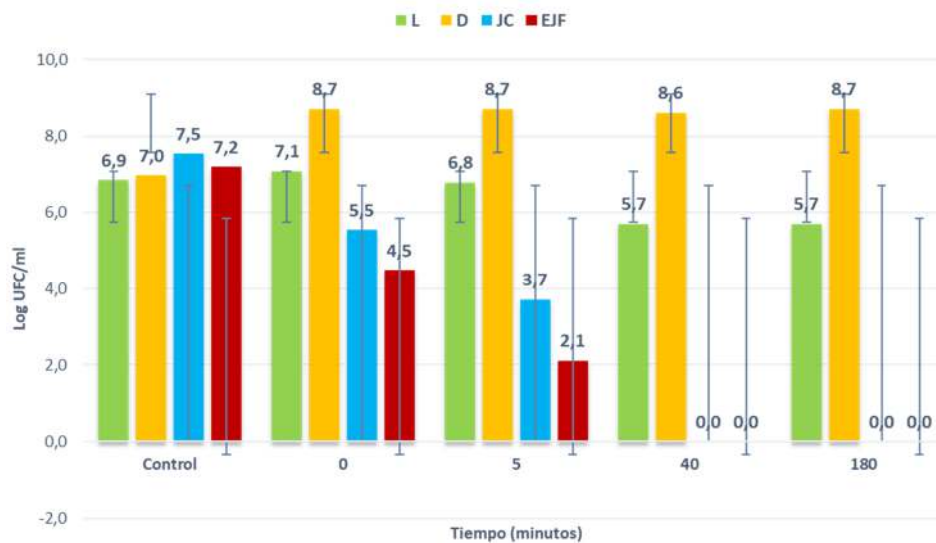


Figura 20.

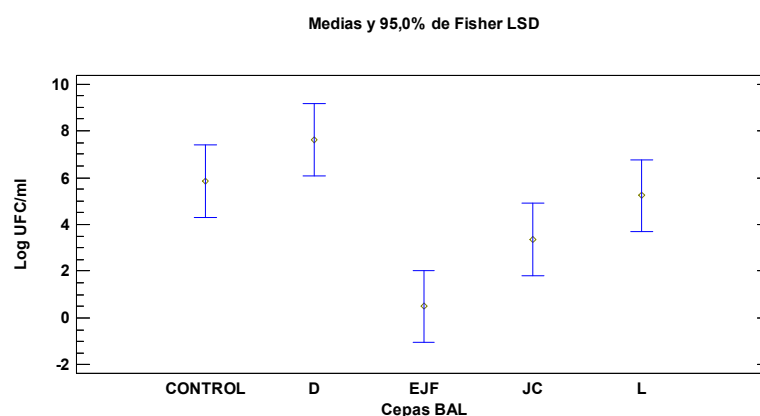
Viabilidad celular BAL simulando condiciones gástricas pH 2 y enzima pepsina



Los resultados obtenidos de la exposición de las BAL JC y EJJF, aisladas de leche materna, a la enzima pepsina a un pH de 2, muestran una marcada disminución en su viabilidad desde el minuto 0 de exposición. Comparado con el control, las BAL JC y EJJF redujeron su conteo de 10^5 y 10^4 Log UFC/ml en el minuto 0 de exposición a estas condiciones, descendiendo aún más a 10^3 y 10^2 Log UFC/ml en el minuto 5. Finalmente, después de 40 y 180 minutos, ambas cepas perdieron completamente su viabilidad, alcanzando un conteo de 0 Log UFC/ml. La diferencia estadísticamente significativa (p -valor < 0.05) entre la viabilidad de las BAL en presencia de pepsina a pH 2 resalta que la cepa EJJF es la más afectada por estas condiciones adversas (Figura 20 y 21).

Figura 21.

Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con pepsina



Nota. Grafico generado en el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I

En contraste, las BAL aisladas de la fermentación del café (cepas L y D) mostraron una notable resistencia bajo las mismas condiciones y periodos de exposición. La cepa BAL L mantuvo una viabilidad mínima de 10^5 Log UFC/ml, mientras que la cepa BAL D se destacó con una viabilidad de 10^8 Log UFC/ml en todos los tiempos evaluados, cumpliendo así con una de las características probióticas fundamentales.

Según Valencia-García et al. (2018), *L. plantarum* 60-1 es reconocida por su notable rendimiento de biomasa y una notable resistencia al estrés por pH, esta cepa puede mantener un gradiente de pH constante entre su citoplasma y el medio de cultivo en presencia de altas concentraciones de lactato. Este mecanismo le permite soportar condiciones ácidas y completar la fermentación (Changkun et al. 2017), lo que se alinea con la alta viabilidad observada en la cepa BAL D en el estudio actual.

En la revisión de Yao et al. (2020), resalta que el ambiente ácido puede ser considerablemente mortal para la mayoría de las bacterias, principalmente aquellas no resistentes al ácido, ya que provoca una disminución del pH citoplasmático y reduce la actividad de las enzimas glicolíticas, siendo la microencapsulación de estas una de las mejores opciones para mantener su viabilidad a través del tránsito gastrointestinal. Esto

es consistente con los resultados observados para las cepas BAL JC y EJJ, que mostraron una rápida disminución en la viabilidad bajo condiciones ácidas severas.

Adicionalmente, Cook et al. (2012) y Valencia-García et al. (2018), mencionan que la exposición prolongada a un ambiente ácido representa un desafío significativo para los probióticos, con algunas cepas de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium breve* perdiendo viabilidad en menos de una hora en jugo gástrico simulado. Este hallazgo apoya los resultados actuales, donde las cepas BAL JC y EJJ no pudieron sobrevivir más allá de 40 minutos en condiciones ácidas.

La cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 se observó durante 8 y 25 horas, obteniendo recuentos de viabilidad celular entre 10^8 y 10^9 Log UFC/ml en las condiciones de cultivo más severa con un pH de 4,5 (Hernández et al., 2019). En el mismo estudio este resultado se relacionó con un comportamiento similar a la cepa parental ATCC 55730 bajo condiciones más extremas (pH 2,7) durante una hora. Similitudes con los resultados obtenidos en este estudio donde las cepas aisladas de fermentación de café L y D mantiene su concentración celular en rangos de 10^5 y 10^8 Log UFC/ml en los diferentes tiempos de exposición a la enzima pepsina y pH 2.

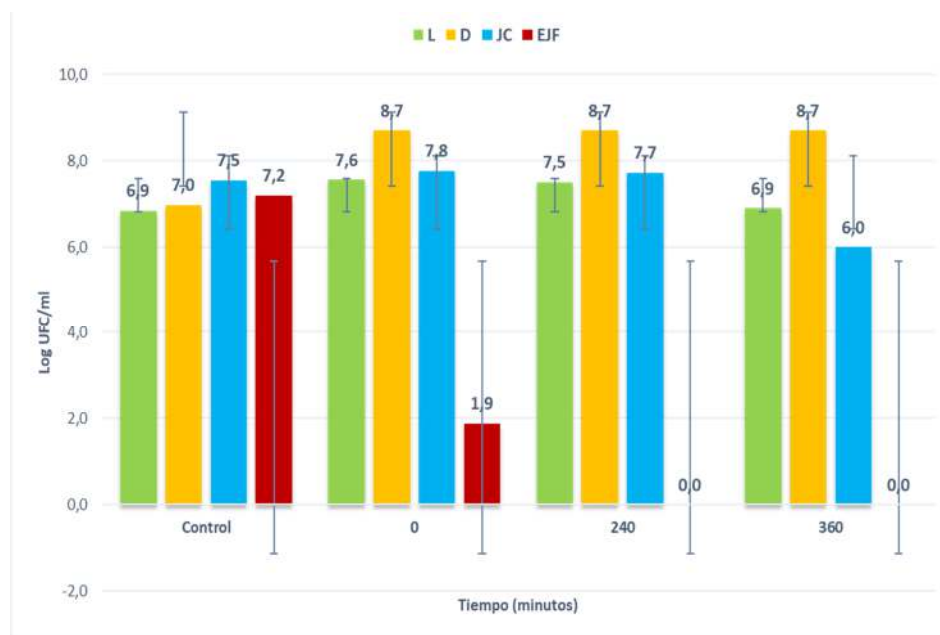
Por otro lado, estudios proteómicos han demostrado que el preacondicionamiento de cepas de *L. reuteri* (ATCC 23272) mediante la exposición a estrés de pH leve puede aumentar su capacidad de supervivencia ante choques de pH más severos, involucrando la sobreexpresión de proteínas clave relacionadas con el transporte, el metabolismo energético, la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos y la homeostasis del pH (Hernández et al., 2019). Donde Valencia-García et al. (2018), sugieren que *L. plantarum* 60-1 utiliza un mecanismo de protección conocido como F1-F0 ATPasa en condiciones ácidas, lo que podría explicar la alta viabilidad observada en la cepa BAL D. Este sistema enzimático ayuda a mantener la homeostasis del pH y la translocación de protones, protegiendo a la bacteria del estrés ácido (Inga Idrogo & Guevara Guerrero, 2024).

Además, otras condiciones adversas en el estómago, como la fuerza iónica, la actividad enzimática (pepsina) y la agitación mecánica o movimientos peristálticos, afectan significativamente la viabilidad de los probióticos (Han et al., 2021). Entonces, la capacidad de las BAL para mantener su viabilidad en condiciones ácidas varía significativamente entre cepas. Las cepas BAL JC y EJJ mostraron una baja resistencia en presencia de pepsina a pH 2, mientras que las cepas BAL L y D demostraron una

notable resistencia, con la cepa BAL D sobresaliendo particularmente. Estos hallazgos subrayan la importancia de seleccionar cepas probióticas con mecanismos efectivos de resistencia al estrés ácido para aplicaciones probióticas exitosas.

Figura 22.

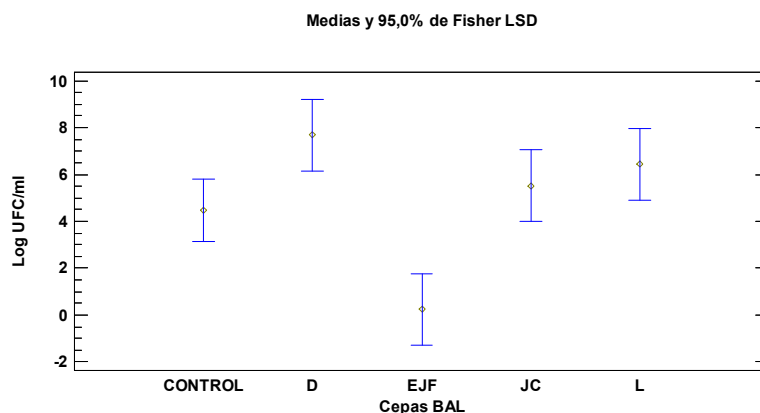
Viabilidad celular BAL simulando condiciones intestinales pH 8 y enzima pancreatina (Sigma)



La viabilidad celular de las BAL (L, D, JC y EJJ) simulando la condición digestiva con la enzima pancreatina a pH 8 (Figura 22), indica la alta viabilidad y supervivencia a estas condiciones de 3 de ellas, en comparativa con el control, resaltando la capacidad de sobrevivir en el tiempo de la cepa D, que desde el minuto 0 de exposición a esta condición se mantuvo constante hasta el minuto 360 con un recuento de viables de 10^8 Log UFC/ml.

Figura 23.

Gráfico de medias y 95,0% de Fisher LSD para prueba con pancreatina



Nota. Gráfico generado en el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I

La viabilidad celular de las BAL (L, D, JC y EJJ) simulando la condición digestiva con la enzima pancreatina a pH 8 (Figura 22), indica la alta viabilidad y supervivencia a estas condiciones de 3 de ellas, en comparativa con el control, resaltando la capacidad de sobrevivir en el tiempo de la cepa D, que desde el minuto 0 de exposición a esta condición se mantuvo constante hasta el minuto 360 con un recuento de viables de 10^8 Log UFC/ml.

Resultado contrario dado por la cepa EJJ afectada de manera significativa desde el minuto 0 de exposición disminuyendo su recuento a 10^1 Log UFC/ml y en los tiempos posteriores inhibiendo su crecimiento totalmente. Las cepas L y JC aumentan sus recuentos en los tiempos 0 y 240 a 10^7 Log UFC/ml, sin embargo, estos disminuyen en el tiempo 360 a 10^6 Log UFC/ml alcanzando el mínimo de células viables para la aplicación en productos probióticos. La prueba estadística de medias de Fisher LSD con un 95,0% de confianza (Figura 23), arroja un valor-P menor que 0,05, por tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de viabilidad a Pancreatina entre las Cepas BAL.

Días et al. (2013), señalan que los aislados con alta tasa de supervivencia en condiciones *in vitro* del tracto gastrointestinal son candidatos potenciales para atravesar con éxito la barrera gastrointestinal humana. Bao et al. (2010) y Han et al. (2021) coinciden en que el fluido pancreático no presenta un efecto significativo en la viabilidad de las cepas, apoyando los resultados de alta viabilidad observada en la cepa D.

El pH en el intestino delgado, que varía de 6,0 a 7,0, es menos agresivo que el fluido gástrico (Cook et al., 2012). Sin embargo, los ácidos biliares y las enzimas digestivas pueden comprometer la viabilidad de los probióticos mediante la disrupción de la membrana celular y el daño del ADN. (Yao et al., 2020). Estudios *in vitro* han demostrado que la viabilidad de *Lactobacillus salivarius* Li01 y *Pediococcus pentosaceus* Li05 se reduce en fluido intestinal simulado (Yao et al., 2017; Yao et al., 2018), lo cual es conforme con la disminución observada en las cepas L, JC y la inhibición completa de la cepa EJF.

Los microorganismos en el tracto gastrointestinal no son meros residentes pasivos; sus interacciones con el sistema inmunológico generan señales responsables de muchos de los beneficios de los probióticos (Sharifi-Rad et al., 2020). Un ejemplo de esto es el aumento en los niveles de anticuerpos IgA en bebés amamantados en comparación con aquellos alimentados con leche de fórmula, evidenciando el efecto estimulante de los probióticos sobre el sistema inmunológico (Thompson et al., 2015).

Además, *Lactobacillus brevis*, como cepa dominante, ha mostrado beneficios similares, actuando sobre el eje intestino-cerebro a través de vías inmunes, metabólicas y nerviosas (Sharifi-Rad et al., 2020). Por tanto, las cepas BAL presentan una variabilidad significativa en su viabilidad bajo condiciones digestivas simuladas con pancreatina. La cepa D demostró una notable resistencia, manteniendo una alta viabilidad en esta condición, mientras que la cepa EJF fue la más afectada. Al comparar las cepas JC y EJF aisladas de leche materna se evidencia que presentaron diferente comportamiento en la viabilidad, lo cual puede atribuirse al tiempo de lactancia de las madres, dado que JC se obtuvo a los 18 meses de lactancia en Neiva, madre de 35 años y EJF a los 2 meses de lactancia en Bogotá, madre de 34 años; la microbiota presente en la leche materna está condicionada al tiempo de lactancia, la alimentación, edad de la madre y el ambiente que la rodea. Estas diferencias subrayan la importancia de seleccionar cepas probióticas no solo por su resistencia a condiciones ácidas, sino también por su capacidad de sobrevivir en el ambiente del intestino delgado y sus potenciales beneficios inmunológicos.

El análisis de los datos recolectados en los ensayos simulando las condiciones gastrointestinales, el análisis de varianza simple ANOVA con un nivel del 95% de confianza arroja un valor- $P < 0.05$ para todos los ensayos, existiendo una diferencia

significativa entre los diferentes tiempos de exposición a las enzimas presentes en la saliva (pH 6), la pepsina (pH 2) y la pancreatina (pH 8) en la viabilidad celular de las cepas BAL.

También es importante mencionar que el mercado biotecnológico en países desarrollados ha mostrado ser un campo significativo para el desarrollo socioeconómico, impulsado en gran parte por el creciente interés y demanda de productos probióticos. Este mercado ha pasado de generar 32.060 millones de dólares en 2015 a 64.020 millones de dólares en 2022, y se espera que alcance ingresos de 74 mil millones de dólares en 2024, gracias a una mayor conciencia global sobre la salud y la eficiencia de los probióticos (Folicaco Sandoval et al., 2018; Catillo-Escandón et al., 2019; Hernández et al., 2019).

Es importante destacar que la eficacia y los beneficios para la salud de los probióticos es dependiente de la cepa microbiana, es decir de su origen geográfico como las cepas BAL aisladas de los productos generados en el Huila (Colombia). Así mismo, las BAL con potencial probiótico no solo se encuentran en productos lácteos, sino también en vegetales como el repollo y frutos como el café (Sharifi-Rad et al., 2020; Ladino Garzón, 2017).

En términos de regulación, el Ministerio de Sanidad italiano ha establecido desde 2013 que los alimentos y complementos alimenticios etiquetados como probióticos deben contener un número mínimo de células viables de 1×10^9 UFC (Hill et al., 2014). Similarmente, Byakika et al. (2019) sugieren que el beneficio de un probiótico está relacionado con su concentración en el intestino, recomendando al menos 10^7 UFC/g de contenido fecal. Además, la dosis mínima recomendada es de 1×10^7 células probióticas vivas por gramo o mililitro de producto al momento de su consumo (Huang et al., 2017). En Colombia, el artículo 22 de la resolución 333 de 2011 establece que los productos probióticos deben contener al menos 1×10^6 UFC de bacterias viables por gramo hasta el final de su vida útil (Ministerio de la Protección Social, 2011).

8. Impactos del proyecto y limitaciones al estudio.

Conocimiento sobre la viabilidad de cepas BAL nativas de la región surcolombiana y su potencial biotecnológico aportando al conocimiento y estudio de la colección de cepas del laboratorio de Microbiología de alimentos (Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana) de investigaciones previas, ya que se ha evidenciado cepas nativas con potencial probiótico, lo cual será vital para pasar a estudios *in vivo* para verificar el efecto. Algunas limitaciones presentadas en el desarrollo de este estudio es la disponibilidad del material adecuado para la incubación de las bacterias, ya que según las sugerencias de muchos autores las BAL son aerobias facultativas, sin embargo, su crecimiento es favorecido por la condición anaerobia.

9. Conclusiones

Las enzimas presentes en la saliva no presentan una incidencia significativa en la tasa de supervivencia y viabilidad de las BAL en los diferentes tiempos de exposición ya que se mantuvieron en el orden de 10^5 hasta 10^{10} Log UFC/ml.

El estudio demuestra que las cepas BAL D y L, aisladas de café, son capaces de resistir la exposición a condiciones gástricas ácidas (pepsina, pH 2), manteniéndose viables a lo largo del tiempo, con una disminución más pronunciada en la cepa L. Por otro lado, las cepas BAL JC y EJJ, aisladas de leche materna, no resistieron estas condiciones ácidas, mostrando una reducción significativa en la cantidad de UFC. En condiciones intestinales simuladas (pancreatina, pH 8), las cepas BAL L, D y JC mantuvieron su viabilidad, mientras que la cepa BAL EJJ no fue capaz de sobrevivir. Esto sugiere que las cepas aisladas de café tienen una mayor capacidad de resistencia tanto en ambientes ácidos como alcalinos, en comparación con las cepas aisladas de leche materna.

En general las cepas BAL L, D y JC se mantienen viables a los cambios de pH y enzimas que se dan en el tránsito gastrointestinal, por lo que son microorganismos resistentes a la digestión como característica probiótica, siendo de interés para su potencial uso como probiótico.

10. Recomendaciones

Es imprescindible realizar una caracterización molecular para determinar a nivel de género y cepa de las bacterias que se están trabajando para así validar aún más los estudios previos realizados con dichas BAL y también continuar con la evaluación de adherencia y colonización de epitelio intestinal para confirmar los beneficios producidos por los microorganismos probióticos. Además, evaluar estas cepas BAL en condiciones *in vivo*.

11. Bibliografía

- Abiola, R. R., Okoro, E. K., & Sokunbi, O. (2022). Lactic acid bacteria and the food industry - A comprehensive review. *International Journal of Health Sciences and Research*, 12(5), 128–142. <https://doi.org/10.52403/ijhsr.2022016>
- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Ahmed, A., Ahmad, M. H., Maan, A. A., Tufail, T., Anjum, F. M., & Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Science & Nutrition*, 7(12), 3931–3940. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1254>
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Amorocho Cruz, C. M. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra*. Universitat Politècnica de València.
- Benavides Martín, M. A. (2023). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valoración de matrices vegetales* (M. P. Almajano Pablos, C. Narváez Rincón, & M. C. Quicazán Sierra, Eds.). Universitat Politècnica de Catalunya.
- Byakika, S., Mukisa, I. M., Byaruhanga, Y. B., & Muyanja, C. (2019). A review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Reviews International*, 35(5), 427–466. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815>

- Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto- Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22(0). <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/s1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/s1696-2818(09)71927-4)
- Cervantes-Elizarrarás, A., Cruz-Cansino, N. del S., Ramírez-Moreno, E., Vega-Sánchez, V., Velázquez-Guadarrama, N., Zafra-Rojas, Q. Y., & Piloni-Martini, J. (2019). In vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, 9(3), 601. <https://doi.org/10.3390/app9030601>
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 454–460. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02212.x>
- Collado, Maria Carmen, Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Cortés Gaona, M. del P., & Amorocho-Cruz, C. (2021). Evaluation of Lactic Acid Bacteria (LAB) against *Shigella sonnei* ATCC 25931. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 105, 89–97. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.20210958>

- De Filippis, F., Pasolli, E., & Ercolini, D. (2020). The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 454–489. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa015>
- Dias, F. S., Duarte, W. F., Martins Santos, M. R. R., Ramos, E. M., & Schwan, R. F. (2013). Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. *Journal of Food Protection*, 76(6), 991–998. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-491>
- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., R. Barrón, L. J., Villarán, M. del C., & Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64(103669), 103669. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103669>
- Escorza Mistrán, O. (2018). Identificación de la presencia de bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* tolerans relacionadas con actividad antimicrobiana. *Red de Repositorios Latinoamericanos*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3548960?show=full>
- Fajardo-Argoti, C., Jurado-Gámez, H., & Parra-Suescún, J. (2021). Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre *Escherichia coli* O157:H7. *Revista Udca Actualidad & Divulgacion Científica*, 24(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733>
- FAO/WHO. (2001). *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. <https://www.iqb.es/digestivo/pdfs/probioticos.pdf>

- Ferrari, A., Vinderola, G., & Weill, R. (2020). *Alimentos fermentados microbiología, nutrición, salud y cultura* (Danone Cono Sur). Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida. https://www.danoneinstitute.org/wp-content/uploads/2020/12/Book-Fermented-Food-2020_sp.pdf
- Fina Martin, J., Palomino, M. M., Sanchez Rivas, C., Ruzal, S. M., & Allievi, M. C. (2017). Transferibilidad de DNA en *Lactobacillus*: ¿hay riesgo de transferencia horizontal desde la microbiota a probióticos y viceversa? *Química Viva*, 16, 1; 4. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/65477>
- Foliaco Sandoval, D. J., Valdez Barros, L. M., Gómez Nussbaumer, S. J., & Ganem Torres, Y. P. (2018). Determinación de parametros claves en el proceso de escalamiento para la producción de *Lactobacillus* spp. *Mente Joven*, 7, 45–58. https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/mente_joven/article/view/5607
- García Triana, B. E., Delfín Soto, O., Lavandero Espina, A. M., & Saldaña Bernabeu, A. (2012). Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 11(4), 450–456. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180425056004>
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015>
- Gómez Rodríguez, S. L. (2022). *Evaluación in vitro de las propiedades probióticas de bacterias ácido-lácticas aisladas del Queso Doble Crema* [Universidad Nacional de Colombia].

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83317/1037629177.2022.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- González Donapetry, P., Pescador Martín, P., Gómez-Gil Mira, R., & Ruiz Carrascoso, G. (2019). Caso importado de infección por *Shigella sonnei* portadora de betalactamasa de espectro extendido CTX-M-15. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 37(2), 141. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.006>
- González González, E., & González Carroza, E. (2019). Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Parte I. *Dialnet*, 16. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7137398>
- González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., & González Ponce, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta médica peruana*, 36(2), 145–151. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172019000200011
- González-Gallegos, N. (2020). Probióticos y efectos benéficos en el sistema inmunológico. *Researchgate*, 6. https://www.researchgate.net/publication/343223042_Probioticos_y_efectos_beneficos_en_el_sistema_inmunologico
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., Liu, J., Lv, L., Ling, Z., Berglund, B., Yao, M., & Li, L. (2021). Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>
- Haukioja, A., Yli-Knuuttila, H., Loimaranta, V., Kari, K., Ouwehand, A. C., Meurman, J. H., & Tenovuo, J. (2006). Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli

- and bifidobacteria *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(5), 326–332.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2006.00299.x>
- Helkimo, E., Carlsson, G. E., & Helkimo, M. (1978). Chewing efficiency and state of dentition: A methodologic study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 36(1), 33–41.
<https://doi.org/10.3109/00016357809026364>
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Asociación Interciencia*, 42(6), 340–346.
<https://www.redalyc.org/journal/339/33951621002/html/>
- Hernández, A., Larsson, C. U., Sawicki, R., van Niel, E. W. J., Roos, S., & Håkansson, S. (2019). Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *AMB Express*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0789-2>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, J.-L., Nie, S.-P., Min, F.-F., & Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1143–1150.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.072>

- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
- Inga Idrogo, A., & Guevara Guerrero, W. (2024). *Efecto de las bacterias probióticas (lactobacillus rhamnosus), en las características sensoriales y fisicoquímicas del queso fresco pasteurizado* [Universidad Nacional Autónoma de Chota]. <https://repositorio.unach.edu.pe/handle/20.500.14142/517>
- Instituto Nacional de la Salud. (2017). *Investigación De Brote Enfermedades Transmitidas Por Alimentos Y Vehiculizadas Por Agua*. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/PRO-Enfermedad-transmitida-por-alimentos.pdf>
- Instituto Nacional de la Salud. (2019). *Un nuevo informe insta a actuar con urgencia para prevenir una crisis causada por la resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
- Jiménez-Espinosa, K., & Amorocho-Cruz, C. M. (2020). *Evaluación de la actividad antibacteriana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) obtenidas de quesillo Huilense, fermentación de café y leche materna frente a Staphylococcus aureus ATCC BAA-977*. Universidad Surcolombiana.
- Jurado-Gámez, H., & Jarrín-Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Biosalud*, 14(2), 49–62. <https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.5>

- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Klaenhammer, T. (1999). Selection and design of probiotics. *International journal of food microbiology*, 50(1–2), 45–57. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00076-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00076-8)
- Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., Kumar, P., Poddar, D., Aggarwal, P. K., Henry, C. J. K., Jain, S., & Yadav, H. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(5), 473–496. <https://doi.org/10.3109/09637480903455971>
- Ladino Garzón, W. L. (2017). *Caracterización de las bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras que inciden durante el proceso de fermentación de café arábica (Coffea arabica) y su influencia en el análisis sensorial y calidad de la taza* [Universidad Surcolombiana]. <https://biblioteca.usco.edu.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=41877>
- Landa-Salgado, P., Caballero-Cervantes, Y., Ramírez-Bribiesca, E., Hernandez-Anguiano, A. M., Ramírez-Hernández, L. M., Espinosa-Victoria, D., & Hernández-Sánchez, D. (2019). Isolation and identification of potentially probiotic lactic acid bacteria for Holstein calves in the Mexican Plateau. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(1), 68–83. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4512>
- Leal Rojas, B., & Amorocho Cruz, C. M. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos comerciales frente a *Escherichia coli*. *Ingeniería y Región*, 18, 45–52. <https://doi.org/10.25054/22161325.1206>

- Liu, H., Gong, F., Wei, F., & Wu, H. (2018). Artificial simulation of salivary and gastrointestinal digestion, and fermentation by human fecal microbiota, of polysaccharides from *Dendrobium aphyllum*. *RSC Advances*, 8(25), 13954–13963. <https://doi.org/10.1039/c8ra01179f>
- López-Mendoza, J., Adriano-Anaya, L., Gálvez-López, D., & Vázquez-Ovando, A. (2023). Compuestos bioactivos en quesos: biosíntesis, actividad biológica y contribución de las bacterias ácido lácticas. *Agronomía mesoamericana: organo divulgativo del PCCMCA, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales*, 51432. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51432>
- Madrigal Mendoza, M. (2016). *Susceptibilidad a antibióticos de bacterias ácido lácticas aisladas del queso de poro artesanal de Balancán, Tabasco* [Colegio de Postgraduados]. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/3565>
- Marguet, E., Vallejo, M., Schulman, G., Ibañez, C., Ledesma, P., & Parada, R. (2017). BIOSILO DE RESIDUOS DE MERLUZA Y HARINA DE CEBADA FERMENTADOS CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SELECCIONADAS. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 112. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\)112-120](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)112-120)
- Martínez-Vázquez, D. G., Narvaéz-Guillén, B. L., Robledo-Olivo, A., Charles-Rodríguez, A. V., Martínez-Herrera, A. L., & Rangel-Ortega, S. del C. (2020). Inhibición de bacterias patógenas por bacterias acidolácticas en quesos de cabra. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 81, 24–31. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2020813138>

- Marwah, S., Poernomo, A. T., & Hendradi, E. (2023). Study of growth curve of *Lactobacillus plantarum* FNCC 0026 and its antibacterial activity. *Jurnal farmasi dan ilmu kefarmasian Indonesia*, 10(1), 38–43.
<https://doi.org/10.20473/jfiki.v10i12023.38-43>
- Mayo Pérez, B. (2019). *Resistencia a antibióticos en bacterias ácido-lácticas y productos lácteos* (A. Labella & D. Castro, Eds.). XXVII Congreso Nacional de Microbiología.
<https://digital.csic.es/handle/10261/212215>
- Medina Torres, E. A., Espinosa Padilla, S. E., Camacho Castillo, L. del C., & Aguilera, K. G. (2014). *El Uso De Probióticos Y Los Beneficios Sobre El Sistema Inmune*. Medigraphic.com. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2014/reb143b.pdf>
- Mianzhi, Y., & Shah, N. P. (2017). Contemporary nucleic acid-based molecular techniques for detection, identification, and characterization of *Bifidobacterium*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 987–1016.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1023761>
- Ministerio de la Protección Social. (2011). *Resolución 333 de 2011*. Gov.co.
<https://scj.gov.co/es/transparencia/marco-legal/normatividad/resoluci%C3%B3n-333-2011>
- Ministerio de Salud. (2021). *Enfermedades transmitidas por alimentos ETA*.
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/abece-eta-final.pdf>

- Mishra, S., & Mishra, H. N. (2012). Technological aspects of probiotic functional food development: A review. *Nutrafoods*, 11(4), 117–130. <https://doi.org/10.1007/s13749-012-0055-6>
- Mohd-Zubri, N. S., Ramasamy, K., & Abdul-Rahman, N. Z. (2022). Characterization and potential oral probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* FT 12 and *Lactobacillus brevis* FT 6 isolated from Malaysian fermented food. *Archives of Oral Biology*, 143(105515), 105515. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105515>
- National Institutes Health. (2022). *Probióticos*. Nih.gov. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/>
- Ojha, A. K., Shah, N. P., Mishra, V., Emanuel, N., & Taneja, N. K. (2023). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from traditional fermented Indian food products. *Food Science and Biotechnology*, 32(14), 2131–2143. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01305-1>
- Oliviera Rodi, J. (2018). *Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso, para el control de Clostridium spp. responsables del defecto de “hinchazón tardía”* [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21466/1/uy24-19245.pdf>
- Ordoñez-Lozano, K. S., & Amorocho-Cruz, C. M. (2023). *Bacterias ácido-lácticas (bal) aisladas de fermentación de café, quesillo y de la leche materna como agentes inhibidores de E. coli ATCC 25922* Universidad Surcolombiana.
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. Who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias acido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117–129. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>
- Pérez Polanco, P., & Montaña Zetina, L. M. (2016). *SALIVA Y ENZIMA ALFA AMILASA: ESENCIALES PARA LA DIGESTIÓN*. Umich.mx. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/235-numero-27/421-saliva-y-enzima-alfa-amilasa-esenciales-para-la-digestion.html>
- Punia Bangar, S., Sharma, N., Bhardwaj, A., & Phimolsiripol, Y. (2022). Lactic acid bacteria: A bio-green preservative against mycotoxins for food safety and shelf-life extension. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 14(2), 13–31. <https://doi.org/10.15586/qas.v14i2.1014>
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *CIT Informacion Tecnologica*, 27(6), 115–128. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000600012>
- Rezvani, F., Ardestani, F., & Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.007>

- Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). RESISTENCIA EMERGENTE A LOS ANTIBIÓTICOS: UNA AMENAZA GLOBAL Y UN PROBLEMA CRÍTICO EN EL CUIDADO DE LA SALUD. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 32(1), 139–145. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36338592020>
- Salazar Salazar, Z., Hurtado Ayala, L., Perez Morales, E., Alcántara Jurado, L., Landeros Sánchez, B., & Brito Perea, M. (2017). Pruebas de susceptibilidad a bacteriocinas producidas por BAL en bacterias resistentes a antibióticos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 48(1), 7–17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956614002>
- Serna-Galvis, E. A., Martínez-Mena, Y. L., Porras, J., & Torres-Palma, R. A. (2022). Antibióticos de alto consumo en Colombia, excreción en orina y presencia en aguas residuales - una revisión bibliográfica. *Ingeniería y Competitividad*, 24(1). <https://doi.org/10.25100/iyc.24i1.11267>
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Kołożyn-Krajewska, D., Salehi, B., Milton Prabu, S., Schutz, F., Docea, A. O., Martins, N., & Calina, D. (2020). Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(9), 433. <https://doi.org/10.3390/medicina56090433>
- Thompson, A. L., Monteagudo-Mera, A., Cadenas, M. B., Lampl, M. L., & Azcarate-Peril, M. A. (2015). Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00003>

- Tian, J., Wang, X., Zhang, X., Chen, X., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q., Jiang, M., & Li, W. (2023). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion and fermentation in vitro by human gut microbiota of intrapolysaccharide from *Paecilomyces cicadae* TJJ1213. *Food Science and Human Wellness*, 12(2), 622–633. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.065>
- Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de pediatría* (Barcelona, Spain: 2003), 04, 30–41. <https://www.analesdepediatría.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>
- Valencia-García, F. E., Motato-Rocha, K. E., Vera-Peña, M. Y., & Sepúlveda-Lindarte, M. L. (2018). Kinetic parameters of lactic acid bacterial isolated from fermented milk “Suero Costeño”. *Dyna*, 85(206), 155–161. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.70995>
- Vazquez-Pertejo, M. T. (2022, octubre 1). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Vera Peña, M. Y., Cortés Rodríguez, M., & Valencia-García, F. E. (2019). Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 15(29), 179–213. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.15.29.7>
- Yao, M., Li, B., Ye, H., Huang, W., Luo, Q., Xiao, H., McClements, D. J., & Li, L. (2018). Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.024>

-
- Yao, M., Wu, J., Li, B., Xiao, H., McClements, D. J., & Li, L. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. *Food Hydrocolloids*, 72, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.033>
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857–874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>
- Zeashan, M., Afzaal, M., Saeed, F., Ahmed, A., Tufail, T., Ahmed, A., & Anjum, F. M. (2020). Survival and behavior of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. *Food Science & Nutrition*, 8(5), 2419–2426. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1531>
- Zommiti, M., Feuilloley, M. G. J., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1907. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121907>