

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Lactobacillus* spp. COMO CANDIDATO A PROBIÓTICAS

Lilian Sánchez^{1*}, J. Vichi*, Marisleidys Llanes*, Erica Castro**, Dulce M. Soler*, Ivette Espinosa*, G.L. Kociubinski***, Celia L. Ferreira****

¹Dirección Producciones Biofarmacéuticas, *Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana. Correo electrónico: lilian@censa.edu.cu;

Universidad de Concepción. Chile; *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina; ****Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Av. PH Rofs, 36570 000, Brazil

RESUMEN: El uso de los lactobacilos como probióticos en los últimos años cobra un interés creciente debido a sus propiedades benéficas en animales y humanos. Con el objetivo de aislar y caracterizar cepas vaginales de *Lactobacillus* spp., mediante pruebas *in vitro* para considerar su posterior aplicación como probiótico se aislaron 24 cepas identificadas a nivel de grupo por el perfil de fermentación de carbohidratos y la producción de gas a partir de la glucosa. A todas las cepas se les determinó su estabilidad de crecimiento a pH ácidos y a diferentes temperaturas. De ellas se seleccionaron 9 que presentaron las mejores características como candidatos a probióticos por sus resultados en las pruebas de hidrofobicidad frente a solventes orgánicos como tolueno, xileno y hexadecano, hemaglutinaron frente a eritrocitos humano, auto-agregaron, coagregaron con *Escherichia coli* y *Candida albicans* e inhibieron el crecimiento de estos patógenos. Se evaluó el perfil de susceptibilidad a 17 antimicrobianos y revelaron resistencia a 7 de ellos.

(Palabras clave: *Lactobacillus*; probiótico)

In vitro ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Lactobacillus* spp. STRAINS AS A PROBIOTIC CANDIDATE

ABSTRACT: The use of lactobacilli as probiotics in recent years had has an increased interest due to their beneficial properties in animals and humans. In order to isolate and characterize *Lactobacillus* spp. vaginal strains by *in vitro* tests to consider their subsequent application as a probiotic, 24 strains identified at group level by the carbohydrate fermentation profile and gas production from glucose were isolated. Growth stability of all strains was determined at acid pH and at different temperatures. From them, 9 strains were selected showing the best probiotic characteristics as candidates by their scores on tests of hydrophobic versus organic solvents such as toluene, xylene and hexadecane positive hemagglutination against human erythrocytes, autoaggregation, coaggregation with *Escherichia coli* and *Candida albicans*, inhibiting the growth of these pathogens. The susceptibility profile of 17 antimicrobials was evaluated, showing resistance in 7 of them.

(Key words: *Lactobacillus*; probiótico)

INTRODUCCIÓN

En el hombre, los animales y las plantas se encuentran los lactobacilos por ser huéspedes naturales. Los lactobacilos representan el grupo de bacte-

rias ácido láctico (BAL) más difundido ya que pueden crecer en todos los hábitats que contengan azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y baja tensión de oxígeno. Tienden a dominar numéricamente y limitan

o impiden el desarrollo de microorganismos patógenos por ser buenos productores de ácido láctico y de sustancias antimicrobianas (1,2).

Muchas de las propiedades de los lactobacilos hacen que puedan ser clasificados como probióticos, microorganismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped (3,4). La mayoría de las cepas que se emplean como probióticos, pertenecen al género *Lactobacillus*, que son comensales humanos y se han aplicados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos, aspectos que garantizan su inocuidad. Sin embargo, a pesar de que estas bacterias se consideran seguras (GRAS), se recomienda por la OMS que sean sometidas a pruebas para que su aplicación no tenga efectos colaterales, que afecten negativamente la salud del huésped (5).

En los inicios se consideraba que los microorganismos que se emplearían como probióticos, debían formar parte de la flora normal del intestino de la especie animal a la que se suministraran, sin embargo, posteriormente esta condición no se consideró indispensable siendo más importante los efectos beneficiosos que ocasionaban en el huésped así como su inocuidad (6). Para que la administración de bacterias ácido lácticas como probióticas, tanto en humanos como en animales, sea exitosa, tienen que ser resistentes a condiciones específicas (7).

Entre las propiedades más importantes está la capacidad de atravesar la barrera digestiva para que se puedan multiplicar y colonizar el intestino, ser estable durante el proceso de producción, comercialización distribución y que lleguen vivo a su destino. Deben poseer actividad antimicrobiana porque esta característica hace que las BAL, cuando se administran en cantidad adecuada, tengan potencial para generar una barrera frente a los patógenos. Generalmente, la adhesión a células epiteliales está considerada como un factor importante para lograr la colonización y prerrequisito esencial para ejercer una actividad probiótica sin embargo, hay quien considera que un rápido crecimiento del microorganismo puede lograr el mismo fin (7,8, 9).

Dado que existen numerosos reportes en la literatura sobre la presencia de lactobacilos en heces y vaginas (9, 10, 11), en este trabajo se propone, a partir de aislamientos hechos en vagina humana, detectar mediante experimentos *in vitro*, cepas de lactobacilos con propiedades probióticas con posibilidad de usarse en humanos o animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios y condiciones de cultivo

Las bacterias ácido lácticas aisladas se cultivaron en caldo o agar Mann Rogosa Sharp (MRS, BioCen) a 37°C durante 24-48 horas, sin agitación y para el crecimiento en agar, se emplearon jarras de anaerobiosis bajo una atmósfera de CO₂ de un 10 %. Como medio de conservación a corto plazo se utilizó medio agar y caldo MRS a 4-8°C con pases mensualmente. Para la conservación a largo plazo, se utilizó caldo MRS con un 30% de glicerol y el medio conformado por leche descremada (10%), extracto de levadura (0,5%), y glucosa (1 %), a -20°C.

Obtención y procesamiento de la muestra

Las cepas de microorganismos se obtuvieron de muestras vaginales de 198 mujeres sanas de la provincia Mayabeque, Cuba. El tiempo transcurrido entre la recolección de las muestras y su procesamiento fue de aproximadamente 10 minutos. Las muestras vaginales, previo consentimiento de las donantes y con conocimiento pleno del uso posterior, fueron recolectadas directamente con un hisopo estéril que se introdujeron directamente en tubos con 5 mL de caldo MRS durante 8 horas. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, y 1/1000) en solución tampón fosfato- salino (PBS) y se sembró 0,1- 0,2 mL en placas Petri con agar MRS, que fueron incubadas a 37°C en anaerobiosis durante 48 horas. Se escogieron aquellas placas en las que el número total de colonias crecidas se encontraba entre 100 y 150, se tomaron entre 10 y 12 colonias equivalente a la raíz cuadrada del total de ellas, de esta manera se garantizó tomar muestras representativas de los microorganismos presentes (12).

Selección e identificación de las cepas

Se seleccionaron las cepas de lactobacilos por las características fenotípicas como la morfología de sus colonias y la observación microscópica después de realizada la coloración de Gram a las bacterias. Fueron realizadas pruebas bioquímicas como catalasa, indol y producción de ácido a partir de glucosa (13).

Capacidad fermentativa

Se realizó el crecimiento de un cultivo fresco de 18 horas de cada cepa en caldo MRS sin extracto de carne y sustituyendo la glucosa por los siguientes carbohidratos al 1%: D-glucosa, Galactosa, Asculin, Xilosa, Manosa, Sacarosa, Melibioza, Maltosa, Almidón, Ramnosa, Manitol, Salicina, Melizitosa, y se le

adicionó el indicador bromocresol púrpura. Todos fueron incubados a 37°C durante 24 horas, posteriormente se efectuó la lectura de los resultados (13,14).

Caracterización y selección de cepas de *Lactobacillus* sp. con actividad de antagonismo microbiano

Crecimiento en condiciones hostiles

A diferentes pH: Se cultivaron las cepas aisladas en caldo MRS al cual se le ajustó el pH inicial a pH 2,5; 3, 4; 5,4; 6,4. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24-48 horas.

A diferentes temperaturas: Se cultivaron las cepas en caldo MRS y se incubaron en 15; 30; 37 y 45°C durante 24-48 horas. El crecimiento se observó visualmente en cada una de las variantes evaluadas.

Determinación de hidrofobicidad:

Se determinó la hidrofobicidad superficial de las cepas aisladas de *Lactobacillus* ssp. mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico de las células cultivadas en sistema de dos fases agua-disolvente orgánico, como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios.

Para evaluar la hidrofobicidad en la superficie bacteriana se realizó un ensayo con las indicaciones reportadas por Frizzo *et al.* (15). Cada una de estas cepas crecidas de cultivo fresco en caldo MRS a 37°C se lavaron con PBS, se llevó a una densidad óptica (DO) de 0,6 a 560 de longitud de onda (λ) y se mezclaron con la misma cantidad de n-hexadecano, xileno y tolueno, a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min., se midió la DO λ_{560} de la fase acuosa. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Hidrofobicidad} = \frac{DO \lambda_{560} \text{ antes de mezclar } t - DO \lambda_{560} \text{ después de mezcla} \times 100}{DO \lambda_{560} \text{ antes de mezclar}}$$

Prueba de Hemoaglutinación:

Se determina la capacidad de adhesión a células epiteliales según lo descrito por Reid *et al.* (9). Se toman 50 μ L de las cepas evaluadas con D.O de 0,7 correspondiendo a la escala Mac Farlam de 1×10^7 UFC/mL y se unen a 50 μ L eritrocitos humanos grupo A⁺ y O⁺; carnero y conejos previamente lavados al 0,5% y colocan en placas plásticas de hoyos redondos y se incubaron a temperatura ambiente y a 4°C por 2 horas.

Prueba de agregación:

Las cepas de *Lactobacillus* ssp. con mejores resultados en el estudio de hidrofobicidad se les realizó el ensayo de agregación de acuerdo a la técnica utilizada por Reniero *et al.* (16). Los cultivos, incubados 18 h a 37°C en MRS, se centrifugaron y se lavaron tres veces con agua destilada y se resuspendieron en el volumen inicial con una solución de Ringer-lactato y se llevaron a una DO de 0,7. Los sobrenadantes de cada una de las cepas se filtraron y se agregaron a la suspensión a una concentración final del 10% (v/v), posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. La agregación se considera positiva cuando las partículas visibles, similares a la arena y formadas por las células agregadas, se depositarán en el fondo del tubo dejando el sobrenadante limpio en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente.

Producción de peróxido de hidrógeno:

Se les determinó a las cepas seleccionadas y para ello se utilizó el protocolo descrito por Felten *et al.* (17). Las cepas de *Lactobacillus* sp. fueron sembradas sobre placas con 20 mL de agar MRS, suplementadas con 5mg de 3,3', 4,4'-tetrametilbenzidina (Sigma) y 0,2 mg de peroxidasa (horse radish, Sigma) incubadas en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas. Posteriormente, las placas fueron expuestas al aire. La identificación de bacterias productoras de H₂O₂ se realizó después de la incubación y formación de pigmentos azules alrededor de las colonias, se consideró dos categorías: no productora y productora de H₂O₂.

Coagregación con patógenos: El ensayo de coagregación fue diseñado basado en métodos reportados por Reid *et al.* (9). Las suspensiones de microorganismos ajustaron a una D.O de 0,7 en PBS. Una alícuota de 500 μ L de los cultivos de las cepas seleccionadas de *Lactobacillus* spp. fueron centrifugadas filtradas y mezcladas con la 500 μ L de

Escherichia coli
ATTC 25922 y
Candida albicans
ATCC 3153 incubadas en zaranda

orbital a 100 rpm por 2 horas. Las suspensiones fueron observadas macroscópicamente y bajo microscopio óptico con un lente de 100 X. La prueba se consideró positiva cuando se hizo visible la sedimentación de las células sobre el fondo del tubo en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron controles con suspensiones en PBS de las BAL y los patógenos utilizados.

Inhibición del crecimiento

Una alícuota de 500 µL de los cultivos de las cepas seleccionadas *Lactobacillus* sp de 18 horas de crecimiento con D.O de 0,7 se centrifugó y se tomó el sobrenadante filtrado y fueron mezcladas con la 500 µL de cultivos frescos *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Candida albicans* ATCC 3153. Se incubaron en zaranda orbital termostata a 100 rpm por 8-12 horas a 37°C. Posteriormente, fueron sembradas en medio Agar Nutriente y Agar Dextrosa Sabouraud para evaluar su crecimiento durante 24 horas a 37°C. Se utilizó como control las suspensiones en PBS de los patógenos utilizados.

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Se utilizó el método de difusión en disco modificado, substituyendo el agar Müeller Hinton por agar MRS. Los antimicrobianos probados fueron: Ampicilina (25 µg), Rocefin (25µg), Cefuroxima (30µg), Metronidazol (30 µg), Azitomicina (10 µg) Nistatina (100 unidades), Penicilina(10 µg), Triplesulfa (25µg), Kanamicina (30 µg), Vancomicina(30 µg), Cloranfenicol(30 µg), Gentamicina(30 µg), Amikacina (30 µg), Ciprofloxacina (25 µg), Amoxicilina (30 µg), Streptomicina (30 µg), Oxitetraciclina (30 µg), todos de la firma Oxoid. Se incubaron por 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis y posteriormente se midieron los halos de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 24 cepas de *Lactobacillus*, las que presentaron los rasgos fenotípicos que distinguen las BAL de otros microorganismos: bacilos Gram-positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos. La identificación a nivel de grupo se realizó por medio de los patrones de fermentación de azúcares y producción de CO₂ a partir de glucosa; en el grupo A clasificados como homofermentativos obligados se encuentran las cepas L- 87, 89, 60, 61, 128, 136, 148, 175, 179, 195, 197; y en el grupo B heterofermentativos facultativos se hallan las restantes L- 59, 84, 86, 135, 137, 138, 174, 178, 179/1, 181, 185, 196, 198.

Se considera que en el proceso de selección de cepas de interés probiótico, es fundamental comprobar la capacidad de tolerancia a las condiciones adversas a su paso por el tracto gastrointestinal, su comportamiento ante los agentes empleados en el tratamiento de infecciones, sus propiedades adherentes a células epiteliales e inhibitorias ante patógenos *in vitro* para demostrar el mecanismo de acción de exclusión y competencia por los sitios receptores.

En este trabajo se comprobó que cuando las cepas aisladas de *Lactobacillus* spp. fueron sometidas a diferentes condiciones de crecimiento, se pudo obser-

var que todas crecieron a pH 5,4 - 6,6 a temperaturas de incubación 30-37°C a hasta las 48 horas. El crecimiento en medio líquido de las cepas evaluadas se presenta a través de este, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas.

En la Tabla 1, se observa el comportamiento en condiciones hostiles del crecimiento de las cepas aisladas; el 16,6% de las cepas evaluadas resultaron sensibles a pH bajos y solo a temperatura de 45°C la cepa L-174 tuvo un crecimiento distintivo. Los resultados obtenidos reflejan las propiedades principales de las cepas probióticas por su resistencia a pH extremos y a diferentes temperaturas.

Las características físico-químicas de la pared celular bacteriana, tanto como la naturaleza de la superficie a la que se adhiere, influyen sobre los fenómenos de autoagregación y adhesión. En los ensayos de adhesión o hidrofobicidad frente a solventes polares se logró seleccionar 9 cepas con los mejores porcentajes, y posteriormente se les realizó el ensayo de hemaglutinación, ambos se muestran en la Tabla 2. Los mayores porcentajes fueron encontrados en las cepas L-136, L-179, L-87, coincidiendo con la hemaglutinación positiva. Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron que existe una correlación entre la hidrofobicidad-potencial y una hemaglutinación positiva con eritrocitos de los grupos O+ y A+. Las cepas menos hidrofóbicas fueron negativas para la hemaglutinación.

Hay evidencia que los ácidos lipoteicoicos proporcionan hidrofobicidad de la pared celular bacteriana, la cual está directamente relacionada con cepas adherentes (18). También se ha visto que componentes proteínicos superficiales se encuentran involucrados en este fenómeno.

La capacidad de agregación es una característica que se puede utilizar para iniciar el estudio de las interacciones microbianas. Existe una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio intestinal o vaginal, la actividad de agregación y la hidrofobicidad de su superficie (1,8,12). Las 9 cepas seleccionadas fueron capaces de autoagregar y en la mayoría se observa una formación macroscópica granular que se forma rápidamente en un tiempo de 15-25 minutos coincidiendo con las propiedades de coagregaron frente a los patógenos utilizados como los revelados en la Tabla 3. La coagregación con patógenos puede impedir el acceso del mismo a los tejidos receptores, de hecho es una explicación alternativa por la pérdida de adherencia de *E. coli* y *C. albicans* a las células epiteliales intestinales y

TABLA 1. Comportamiento del crecimiento de las cepas aisladas a diferentes pH y temperaturas en medio MRS a las 48 horas./ *Growth behavior of strains isolated at different pH and temperatures in MRS medium at 48 hours*

No	Cepas	pH 4	pH 3	pH 2,5	15°C	37°C	45°C
1	L-59	++++	+++	++	+++	++++	+
2	L-179	++++	++++	+	++	++	-
3	L-197	++++	+++	++	++	++	+
4	L-135	++++	+++	+++	+++	++++	+
5	L-174	++++	+++	+++	+	+++	++
6	L-138	++++	+++	++	+++	+++	-
7	L-175	++++	+++	+++	++	+++	-
8	L-136	++++	++++	+++	+	+	-
9	L-181	++++	+++	++	+++	+++	-
10	L-185	++++	++++	+++	+++++	+++++	-
11	L-198	++++	++++	+	++	+++++	-
12	L-87	+++	++	+	+++	+++	-
13	L-195	++	++	-	++	+	-
14	L-137	+++	++	+	++	++++	-
15	L-89	++++	++	-	++++	+++++	-
17	L-128	+++	+	-	++++	+++++	-
18	L-60	++++	++	+	+++	+++	-
19	L-148	+	-	-	++	+++	-
20	L-178	++++	+++	+	++	+++	-
21	L-61	++++	+++	-	++	+++	-
22	L-179-1	+++++	++++	++	++	+++	-
23	196	+++++	++++	+++	+++	++++	-
24	84	++++	+++	+++	++++	++++	-

+++ Abundante crecimiento; ++ Crecimiento normal; – Crecimiento negativo

TABLA 2. Resultados en las pruebas de hidrofobicidad y hemaglutinación de las cepas seleccionadas. n=3./ *Results of hydrophobicity and haemagglutination tests of the strains selected*

CEPAS	Hidrofobicidad %			Hemaglutinación		
	p-xileno	Tolueno	Hexadecano	O+	A +	Carn
L- 136	85±0,05	86±0,70	80±0,5	+++	+++	-
L-179-1	82±0,35	85±0,9	75±0,3	+++	+++	-
L- 87	78±0,07	89±1,3	84±0,57	+++	++	-
L-175	70±0,04	80±0,35	59,3±0,6	++	++	+
L-198	72,3±0,02	54±0,80	70,3±0,4	++	+++	+
L-181	66±0,2	83±0,78	80±0,5	++	+++	+
L-59	42±0,04	59±1,4	40±0,63	++	++	-
L-60	37±0,34	80±0,6	80±0,75	++	+	+
L-197	34±0,09	73±0,5	70±0,4	+	+	-

+++Reacción muy fuerte; ++Reacción fuerte normal; + Reacción débil; - No se detectan reacción

TABLA 3. Resultados de la autoagregación, coagregación e inhibición con patógenos de las cepas seleccionadas n=3./ *Results of autoaggregation, coaggregation with pathogens and inhibition of the strains selected*

Autoagregación									
Cepas	L- 136	L-179-1	L- 87	L-175	L-197	L-198	L -59	L-181	L-60
Tiempo (min.)	15±0,12	20±0,05	17 ±0,06	45±0,08	37±0,15	30±0,23	15±0,06	25±0,07	60±0,05
Coagregación con patógenos hasta las 2 h									
<i>C. albicans</i>	+++	++	++	+	++	++	+++	++	-
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+
Inhibición de patógenos durante 24 horas									
<i>C. albicans</i>	++	-	-	++	++	++	++	+	-

+++ Muy fuerte; ++ normal; + débil; - No se detectan reacción, y/o inhibición.

vaginal en presencia de lactobacilos, además su capacidad de agregar la distingue de otras ya que hace posible su acción ante microorganismos patógenos formadores de biopelículas (18).

El perfil de sensibilidad a antibiótico de cada una de las cepas estudiadas mostró variabilidad en su comportamiento. La mayoría de las cepas fueron resistentes hacia Azitromicina, Nistatina, Triplesulfa Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Kanamicina. Estas resistencias se han atribuido como un aspecto intrínseco y no transmisibles (19). Sin embargo, no todas las resistencias a antibióticos en los lactobacilos son intrínsecas, algunos pueden ser codificada por plásmidos por lo tanto su resistencia a los antibióticos deben ser cuidadosamente evaluados antes de su uso como probiótico comercial.

Cuando se realizó la prueba de inhibición *in vitro* ante los patógenos evaluados quedó demostrada la acción antimicrobiana de las cepas seleccionada ante *E. coli*, ya que no se observó crecimiento de este microorganismo al parecer debido a la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético, bajando el pH a 3-4 en los cultivos de las cepas evaluadas limitando el desarrollo de *E. coli*. Los efectos perjudiciales de estas moléculas en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana y subsiguiente alteración de la Fuerza Protón Motriz, así como, descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (20).

En cuanto al debilitamiento del crecimiento de *C. albicans* al parecer está muy relacionado con la producción de H₂O₂ por las cepas L- 136, L- 175, L- 197,

L- 198 de *Lactobacillus* spp. que al realizar la prueba de formación de peróxido mostraron positividad. En general se cree que las cepas de *Lactobacillus* controla la microflora vaginal, incluyendo *C. albicans*, por la colonización del epitelio vaginal y la inhibición del crecimiento de los otros microorganismos. Por lo tanto, las cepas de *Lactobacillus*, como candidatos a probióticos, suelen ser probado primeramente *in vitro* para demostrar su capacidad de adherirse al epitelio vaginal, su actividad antimicrobiana a *Gardnerella vaginalis* y *C. albicans*, además su producción de H₂O₂ que, según varios autores, son los responsables de la actividad inhibitoria (9,21).

Estos *Lactobacillus* spp. solos o combinados entre sí, pueden resultar importante en la regulación y equilibrio del ecosistema vaginal o intestinal. En conclusión, los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que las cepas seleccionadas poseen características fisicoquímicas y biológicas compatibles con un potencial uso como probiótico: resistencia a pH ácido, buenas propiedades hidrofóbicas, hemaglutinantes, y autoagregantes, relacionadas con su capacidad de adhesión al epitelio intestinal y/o vaginal, actividad antimicrobiana como inhibición del crecimiento de *E. coli* y *C. albicans*; no obstante, no es necesario que los microorganismos cumplan con todos los criterios de selección ensayados, en consecuencia, las restantes cepas podrían ser sometidas a posteriores pruebas con el objeto de estudiar otras propiedades como tolerancia a las sales biliares, actividad hemolítica, producción de bacteriocinas y ácidos orgánicos con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos además de la formación de biopelículas.

REFERENCIAS

1. Rodriguez-Palacios A, Staempfli H, Duffield T, Weese J. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. 2009; 106 (2):393-401
2. Madureira AR, Pintado ME, Gomes AM, Malcata FX. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. *J Food Prot*. 2011;74(7):1194-1199.
3. Querra R, Quigley E, Madrid A. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastr Latinoam*. 2005;16(3):218-228.
4. Sant Y, Collado MC, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediatr Esp*. 2001;61: 476-482.
5. Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;36:223-227.
6. Alvarado CC, Díaz CG. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Rev. Fac Farma*. 2009;51(1):8-14.
7. Ferreira CLF. Grupos de bacterias lácticas. Caracterización y aplicación tecnológicas de bacterias probióticas. En Ferreira CLF, editor. *Prebiótico y probiótico: actualización y prospección*. Viçosa: Minas Gerais; 2003. P. 7-34.
8. Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, Hillier SL, Stamm WE. Hemagglutination adherence and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J Infect Dis*. 1995;171(5):1237-1243.
9. Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World J Urol*. 2006;24:28-32.
10. Supayang P, Sopa B, Orawan S. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal *Lactobacilli*. *Anaerobe*. 2006;12: 221
11. Arici M, Bilgin B, Sagdic O, Ozdemir C. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiol*. 2004;21:19-24.
12. Chamba JF, Duong C, Fazel, A, Prost F. Sélection des Souches de Bactéries Lactiques. *Bactéries Lactiques*. 1994;1:501-502.
13. Kandler O, Weiss N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9^{na} Ed. The Williams and Wilkins C. Baltimore. 1994; 1209-1234.
14. Dimitanova SP, Bakalov BV, Aleksandrova-Georgieva RN, Donova ST. Phenotypic and molecular identification of *Lactobacilli* isolated from vaginal secretions. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;41:469-477.
15. Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi IE, Sequeira G, Marti LE, Rosmini MR. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*. 2006;5:1-2.
16. Reniero R, Coconcelli P, Bottazzi V, Morelli L. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J Gen. Microbiol*. 1992;138:763-768.
17. Felten A, Barreau C, Bizet Ch, Lagrange PH, Philippon A. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:729-733.
18. Cintas L, Casaus P, Hernández PE. Actividades antimicrobianas de las bacterias ácido lácticas (I). *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 2000;(6):83-90.
19. Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Pociá P, Zarazaga M, Ruíz-Larrea F, Torres C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int J Food Microbiol*. 2006;111:234 - 240.
20. Mejía JA, Rueda Z, Guerrero B, Otoniel J, López G. Obtención de Cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in-vitro* como potenciales probióticas. *RC*. 2007;17(2).
21. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-W³och M, Maresz K, Heczko P. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis Obst Gynecol*. 2005;13(2):69-75.

(Recibido