



POTENCIALIDAD PROBIOTICA DE UN FERMENTO LACTICO EN PREVENCION DE ENFERMEDAD DIARREICA EN RATONES LACTANTES

Alvaro Pazos,¹ Miryam Astudillo,² Luis Eduardo Bravo,³ María Clara Yopez.⁴

Recibido Mayo 25 - 04 Enviado para modificaciones Junio 17 - 04 Aceptado Agosto 4 - 04

RESUMEN

La enfermedad diarreica aguda tiene alta prevalencia en nuestro medio, siendo una de las principales causas de morbimortalidad infantil en Colombia.⁽¹⁾ La utilización de probióticos puede ser una alternativa en el uso como profiláctico o terapéutico en desórdenes gastrointestinales.⁽²⁾ Ante este escenario el presente estudio realizó procesos de fermentación ácido láctica con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* para obtener un producto alimentario que al ser utilizado como probiótico, fue capaz de proteger la colonización intestinal de *Salmonella typhimurium* en ratones lactantes. Inicialmente el efecto antagónico *in vitro* del producto fermentado por el método de los micropocillos dio muestras evidentes de inhibición de *S. typhimurium*, *H. pylori*, *Y. enterocolitica* y *Sh. boydii*, y en un menor grado *V. cholerae*. Seguidamente se comprobó el efecto probiótico *in vivo* con ratón lactante Albino suizo a los cuales se les suplementó la dieta con el alimento fermentado, tanto antes como posterior al reto con *Salmonella typhimurium*. Mediante el modelo murino se pudo demostrar que los animales retados y que no recibieron probióticos tienen una probabilidad de sobrevida menor, 0.25, en comparación a 0.95 de probabilidad de los ratones retados y alimentados con probióticos. La colonización por *S. typhimurium* solo se manifestó en los recuentos promedios de las muestras de heces de los ratones retados dos días post-reto, sugiriendo que existe prevención de la infección por *S. typhimurium* en el grupo tratado con probiótico y concluir entonces que el probiótico tiene un efecto protector en ratones contra la cepa patógena de *S. typhimurium*.

PALABRAS CLAVES: Enfermedad Diarreica, Probiótico, *Lactobacillus casei*

INTRODUCCIÓN

Los procesos de fermentación con bacterias ácido lácticas son comúnmente utilizados en países tropicales en la producción y preservación de

alimentos, por su bajo costo de operación, inhibición de microorganismos indeseables que llegan con el proceso y mejoramiento de las cualidades

¹ M.Sc. Microbiología. Profesor Asistente. Universidad de Nariño. Departamento de Biología. e-mail:biologia@udenar.edu.co

² M.Sc. Microbiología. Profesor Titular. Universidad del Valle. Departamento de Microbiología. E-mail myrafpu@yahoo.com

³ M.Sc. Microbiología. Profesor Titular. Universidad del Valle. Departamento de Patología. E-mail lebravo@emcali.net.co

⁴ M.Sc. Biomedicina. Profesor Asociado. Universidad de Nariño. Departamento de Biología. E-mail mcyeh@udenar.edu.co

organolépticas y nutricionales del producto.^(3,4, 5, 6) Actualmente son bien conocidos los beneficios en la salud derivados de la utilización de alimentos fermentados por bacterias ácido lácticas, como: Control de las infecciones entéricas; inmunopotenciadores en malnutrición; favorecimiento de la utilización de lactosa en personas con malabsorción de lactosa, acción hipocolesterolemica.^(7,8,9,10) e inhibitoria de algunos tipos de tumores intestinales y urinarios inducidos químicamente.^(11, 12, 13, 14) Se muestra mucho interés en cierto tipo de bacterias lácticas para ser usadas como probióticos vehiculados en alimentos fermentados.^(15, 16, 17, 18) es probable que actúen como factores inmunomodulantes que no ocasionan agresión del mucus al realizar el efecto protector. El cohabitad de la microbiota intestinal y los lactobacilos bacteriocinogénicos no degradan fructoligosacaridos, carbohidratos propios de las glicoproteínas del mucus intestinal, dando la posibilidad de interactuar los mecanismos y moléculas del sistema inmune junto con las células antagónicas secretoras de bacteriocinas.^(19, 20, 21, 22, 23, 24)

Se consideran varias las sustancias que producen las bacterias lácticas y que inducen capacidad antagónica contra bacterias saprófitas y patógenas, entre otras se pueden mencionar: Peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas, microcinas, ácido láctico, ácidos orgánicos, reuterina, iones de hidrógeno y ácidos grasos volátiles.^(25, 26, 27, 28, 29, 30, 31) Además la inhibición del crecimiento está sujeta a la competencia por nutrientes y espacio entre los microorganismos.⁽³²⁾

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación del Aislado

Luego de garantizar la activación y conservación del lactobacilo se utilizaron pruebas Bioquímicas de asimilación de azúcares (API AC-50, BioMériux) e identificación fisiológica del aislado de tracto intestinal humano, aislamiento hecho en la primera etapa de este estudio, por Barney. La identificación final del aislado se soportó además en la evaluación de los

resultados usando el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's y en literatura descriptiva de árboles filogenéticos.^(33, 34, 35)

Elección del Sustrato.

Se realizaron 4 ensayos para fermentación en matraz. Los ensayos variaron en el tipo de sustrato o fuente de carbono y en la fuente de nitrógeno que aportan sus componentes, esto permitió establecer cual fue el que mejor se adaptó a las condiciones de crecimiento exigidas por el microorganismo y los siguientes parámetros de fermentación: Biomasa, producción de proteína, rendimiento de ácido láctico, consumo de azúcares, asimilación de azúcares reductores.^(36, 37, 38) Los medios evaluados se diferenciaron en cuanto a las siguientes fuentes de carbono: Harina de trigo, harina de yuca, harina de plátano, melaza y fuentes de nitrógeno: Extracto de carne, extracto de levadura y leche en polvo, ajustando sus proporciones de acuerdo a las establecidas en el medio MRS (De Man, Rogosa et Sharpe).

Fermentación en Reactor

Se estableció la cinética de crecimiento en reactor de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el sustrato elegido con el fin de estandarizar las condiciones de crecimiento y el tiempo óptimo de cosecha. Las fermentaciones se realizaron en un reactor SETRIC 002M, el cual contiene tubas autoclavables y un sistema de agitación, regulación de temperatura por circulación de agua y control del pH por adición de NaOH 5N. Se ajustaron las proporciones anteriores del medio a fermentar llevando el volumen útil de la mezcla en el reactor a 1.5 litros con agitación fija de 150 rpm; temperatura de 30°C, pH 6.0 y con un volumen de inóculo de 150 ml (10 % (v/v)).⁽³⁹⁾ Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo regulares de una hora. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry,⁽⁴⁰⁾ los azúcares por el método de Dubois,⁽⁴¹⁾ los azúcares reductores por el método DNS. El ácido láctico por HPLC (Merck - Hitachi), columna (Biorad Aminex HPX 87H) y finalmente la

biomasa por recuento en placa y peso seco.^(42, 43, 44)

Ensayo de inhibición antagónica *in vitro*.

Se utilizaron los enteropatógenos *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Shigella boydii* y *Yersinia enterocolitica* como bacterias indicadoras de inhibición. Para probar el efecto antagónico se utilizaron dos métodos: El de Tagg, J.R., o de los micropocillos. Este detecta la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora, pasiva, causada por la cepa examinada, activa⁽⁴⁵⁾ y el de Visser, R. Utiliza discos de agar con la cepa examinada inoculados invertidos sobre la cepa indicadora de inhibición.⁽⁴⁶⁾

Ensayo de Inhibición por Bacteriocinas

La inhibición del crecimiento por acción de bacteriocinas se realizó por una adaptación del método de Tagg y McGiven.^(47, 48)

Modelo Murino

La evaluación del efecto protector del probiótico contra patógenos bacterianos *in vivo* se realizó en un modelo murino. Se utilizaron ratones lactantes *Albino suizo*, de la colonia mantenida en el bioterio del Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. Se trabajó con cuatro grupos de 20 ratones cada uno para evaluar el efecto protector y el efecto terapéutico del producto alimenticio. Un primer grupo recibió el probiótico como parte suplementaria de su dieta consistente en leche materna únicamente; un segundo grupo recibió el sustrato y sus aditivos sin fermentar, previamente esterilizados; un tercer grupo no recibió ningún suplemento, solo fueron lactados y un cuarto grupo, recibió el suplemento fermentado luego de ser retado con el patógeno. Todos los animales fueron lactados por sus madres durante todo el ensayo. El microorganismo probiótico que se valoró en el ensayo de protección fue *L. casei subsp rhamnosus*, cultivado en el sustrato elegido en reactor, hasta el tiempo de cosecha. El patógeno para el reto fue *S. typhimurium*, luego de ser incubado en tripticasa soya caldo a 30°C por 12 horas.⁽⁴⁹⁾

Técnica de Alimentación y Reto

El probiótico se administró desde el día del nacimiento hasta el día 21, o sea, durante todo el ensayo, con un volumen tal que contenía 1×10^5 bacterias durante 3 veces al día, utilizando pipeta automática Gibson. 10-100µl, que se ajustó a un volumen de 50µl mas o menos 20µl, aproximadamente. El segundo grupo se alimentó con el sustrato estéril en iguales dosis; el tercer grupo no recibió ningún suplemento alimenticio y el cuarto grupo con el producto probiótico a partir del mismo día que aparecieran los síntomas de diarrea, en iguales dosis que los anteriores. Todos los grupos que recibieron suplemento en su alimentación lo hicieron desde el momento de su nacimiento hasta el final del ensayo. El reto de los animales se realizó con una dosis previamente estandarizada del patógeno escogido 0.5×10^8 bact/ml, siete días después de su nacimiento y administrada a la mitad de los ratones de cada uno de los grupos. Esta cantidad fue distribuida a su vez en 4 dosis de 250µl suministrada cada 6 horas y con ayuda de microsonda esofágica de 0.5 mm de diámetro útil.

Poder de Colonización

El poder de colonización del lactobacilo y la inhibición de la colonización del patógeno, se evaluó indirectamente, practicando recuentos en superficie de viables de bacterias lácticas y *S. typhimurium* de heces frescas de ratones, tanto de retados como no retados. Las muestras se tomaron aleatoriamente a 10 ratones por grupo, durante cada día de los 13 días de duración del ensayo. Los inóculos se realizaron en superficie en MRS agar modificado con azul de anilina (Difco laboratories) y en PCA (Merck) respectivamente.

Análisis Estadístico

El estudio estadístico en el programa Statgraphics fue posible realizarlo luego de la construcción de una base de datos a partir de la recopilación de las medidas de peso de los ratones, sobrevida y cuantificación del número de UFC de bacterias

lácticas y *S. typhimurium*, e incluyó el test de análisis de variantes de una vía, ANOVA, prueba de rangos múltiples, DUNCAN y un análisis de estimación de sobrevida por Kaplan-Meier.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados para la identificación final del microorganismo fueron evaluados y comparados con una base de datos, que permitió identificar el aislado como: *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

Elección del Sustrato

El análisis del desarrollo del probiótico considerado como el sustrato elegido se resumió en la Tabla 1. Esta se diseñó para hacer un análisis comparativo de los parámetros de fermentación entre los sustratos elegidos, esto es, un análisis interensayos.

En los 4 sustratos propuestos se obtuvieron resultados con tendencia divergente y esto es lo que

se esperaba, pues se trata de componentes nutricionales heterogéneos, que se presentan en proporciones igualmente distintas.

El aislado mostró una gran capacidad para producir ácido láctico, pues su mayor rendimiento luego de los análisis en HPLC del sobrenadante del cultivo fue de 1,97 g/g. La utilización de las fuentes de carbono en la fermentación control fue casi total y su conversión a proteínas formadas exhibió valores del orden de 5 g/l.

Comparando los valores de proteínas en la Tabla 1, se puede fácilmente apreciar que el medio melaza - leche permite su máxima expresión, seguida de las harinas de plátano y harina de yuca con valores de 24,5; 22,3 y 17,9 g/l respectivamente. La biomasa obtenida tuvo su pico máximo a las 48 horas de incubación cuando la bacteria se propagó en harina de plátano - leche, su valor fue de 40×10^7 UFC / ml; la utilización de las fuentes energéticas de carbono fueron altas para las propuestas trigo - leche y melaza - leche, esta última además para azúcares reductores.

Tabla 1. Elección del sustrato inter-ensayos

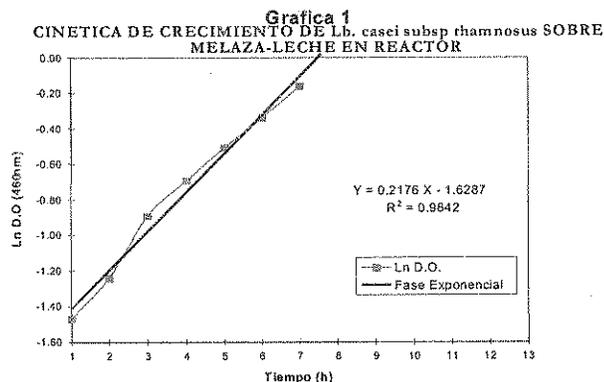
SISTRATOS ELEGIDOS	PARAMETROS DE FERMENTACION						SUSTRATO ELEGIDO
	BIOMASA UFC/ml NETAS	PROTEINA PRODUCCION G/L	Ac. LACTICO RENDIMIENTO G/L	Az. TOTAL CONSUMO. G/L	Az. REDUCTOR ASIMILACION. G/L	ACIDEZ PH	
A 2 = Harina de Yuca + Extracto de carne	96×10^5	17.9	2.1	3.7	1.24	6.93	D 1
B 1 = Harina de Trigo + Leche	14×10^7	1.3	0.19	23.4	3.9	6.16	
C 1 = Harina de Plátano + Leche	40×10^7	22.3	2.59	4.9	5.9	5.65	
D 1 = Melaza + Leche	12×10^7	24.5	0.39	20.1	6.2	6.16	
ELECCION	C 1	D 1	C 1	B 1	D 1	C 1	55%
PONDERACION	25%	50%	10%	5%	5%	5%	

Sustrato elegido: D1 = MELAZA + LECHE

Fuente: Esta investigación.

Comportamiento Cinético del Aislado

Una de las observaciones hechas en el análisis de la selección del sustrato mediante fermentación en matraz, es que el aislado presenta un crecimiento dependiente de la composición del medio de cultivo.

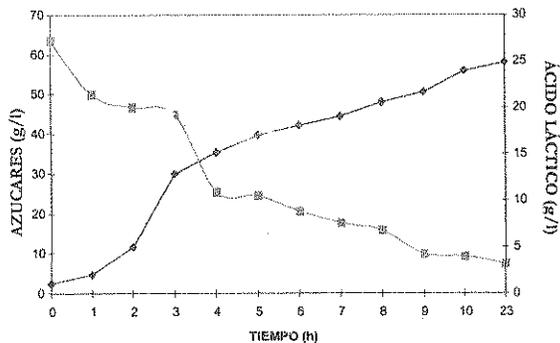


μ : Tasa de crecimiento; t_d : tiempo de duplicación; reactor con pH, temperatura y rpm controladas

En la gráfica 1 se aprecia que el aislado inicia su crecimiento rápidamente en las primeras 7 horas, sugiriendo que se adapta fácilmente a las condiciones del nuevo medio como característica poco observada en la etapa de latencia. Lo anterior se sustenta sobre la base de que el inóculo a una densidad celular de 11×10^7 bacterias por ml. cursa posiblemente por la fase de crecimiento exponencial y continúe así en el medio melaza-leche. A una tasa de crecimiento de 0.22 h^{-1} , considerada como moderada, a un tiempo de duplicación de 3,15 h el microorganismo crece consumiendo paralelamente los azúcares fermentables de una forma extremadamente alta hasta su agotamiento a las 10 horas de incubación, como se observa en la gráfica 2.

La curva ascendente muestra la producción de ácido láctico y la curva descendente el consumo de azúcares. Se aprecia además que la producción de ácido láctico se incrementa simultáneamente al consumo de azúcares, su aumento se da hasta el agotamiento del azúcar en el medio, incluso luego del crecimiento celular se continúa produciendo este metabolito. De acuerdo a las anteriores observaciones se puede clasificar la fermentación

Gráfica 2
CONSUMO DE AZUCARES Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO subsp rhamnosus SOBRE MEDIO MELAZA-LECHE EN CONTROL DE pH



como in batch tipo I, pues la formación de ácido láctico deriva directamente del metabolismo primario utilizado para la producción de energía. El crecimiento, el catabolismo del carbohidrato y la formación del producto se llevan a cabo casi en paralelo, esto sugiere que los eventos de idiofase (fase de formación de producto) y trofofase (fase de crecimiento) ocurren sin separarse en el tiempo, siguiendo rutas metabólicas primarias.

Antagonismo Bacterial *in vitro*

El grado de antagonismo del aislado sobre los enteropatógenos, se resume en la tabla 2

Tabla 2 Grado de antagonismo *in vitro* de *L. casei subsp rhamnosus* sobre cepas indicadoras de inhibición por el método de Tagg, J.R., o de los micropocillos.

Bacterias Indicadoras de Inhibición	Grado de Antagonismo
<i>Salmonella typhimurium</i>	++++
<i>Vibrio cholerae</i>	++
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++++
<i>Helicobacter pylori</i>	++++
<i>Shigella boydii</i>	++++

La determinación del efecto antagonístico del producto fermentado dio muestras evidentes de inhibición de las 5 cepas enteropatógenas por el método de los micropocillos, mas no de la misma manera por la técnica de los discos de agar. Los mejores efectos antagonísticos *in vitro* del probiótico

sobre las cepas patógenas de referencia se muestran en las Fotos 2 y 3.

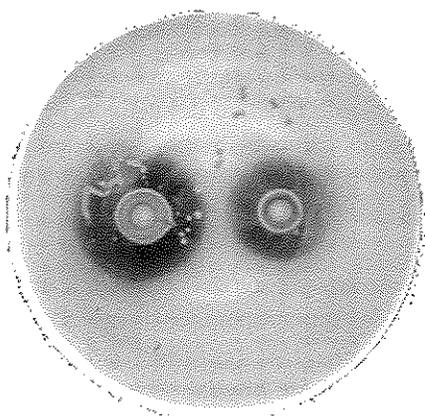


Foto 2. Arriba: Antagonismo microbial sobre *Shigella boydii*. Foto 3. Abajo: Capacidad antagonica sobre *Helicobacter pylori*.

Detección de Actividad Bacteriocinogénica del Probiótico

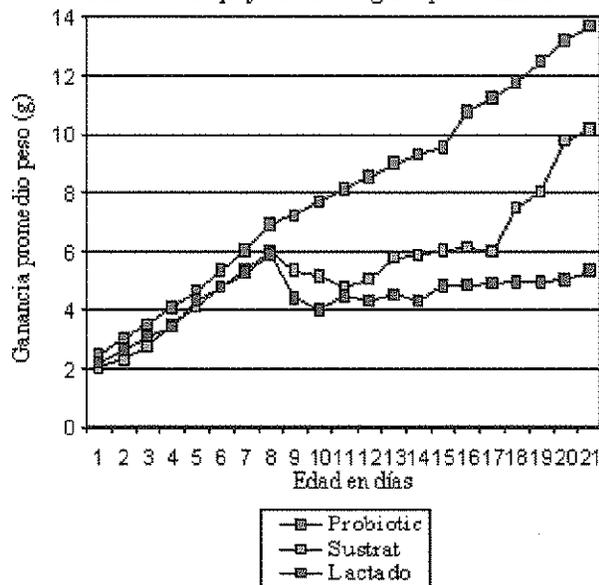
La bacteriocina presente en el sobrenadante del centrifugado del probiótico y ajustado el pH a 6,0 siguió mostrando actividad inhibitoria residual con relación al sobrenadante de la bacteriocina cruda, en todos los casos. Dicho de otra manera, el extracto crudo del sobrenadante suplementado con catalasa y ajustado el pH a 6,0 no modificó los resultados de

inhibición residual, lo que sugiere entonces, que la actividad inhibitoria del probiótico no puede ser solo atribuida al peróxido de hidrogeno o al ácido láctico, sino también a las bacteriocinas en mayor grado. Se pudo observar que los halos de inhibición se definieron mejor que en los análisis de antagonismo in vitro, debido probablemente al efecto de la bacteriocina concentrada por liofilización.

Protección Intestinal Contra *S. typhimurium* por Cultivos Probióticos en Modelo Murino.

El ensayo de protección intestinal contra *S. typhimurium* a través del producto probiótico fue la actividad que revistió la mayor importancia del presente trabajo, ya que conduce a probar la hipótesis con hechos que se dieron en el estudio *in vivo*.

Grafica 3.
Ganancia promedio de peso en ratones *Salmonella typhimurium* según tipo de alimento



En la gráfica 3 se observan diferencias en promedio de peso entre ratones retados en los tres grupos. El grupo de mayor peso promedio es el tratado con probióticos 13,7 g, luego el grupo tratado con sustrato 10,15 g y por ultimo el grupo lactado con 5,32g, al final del ensayo. Estas diferencias son estadísticamente significantes con una $P= 0.00$. Los promedios de pesos entre no retados son mayores

en los tres grupos, comparados con los de inoculados. Se puede aseverar que hubo una pérdida de peso promedio en los dos grupos de tratamientos luego del inóculo con *S. typhimurium* a los 7 días de nacidos, los ratones infectados con síntomas de diarrea perdieron peso hasta un día posterior al tratamiento con probióticos, esto es, presencia de diarrea y pérdida de peso durante dos días post-inóculo. Luego hubo una ganancia gradual de peso promedio mayor en el grupo tratado con probiótico como medida terapéutica, en comparación al grupo de ratones control. Las diferencias de pesos promedio a los 21 días del ensayo fueron estadísticamente significativas, P menor de 0.05, lo que lleva a concluir que el efecto terapéutico del probiótico se manifestó en la recuperación y la ganancia de peso observada luego del proceso infeccioso, en comparación al grupo lactado como control. Los pesos promedio al final del ensayo fueron 7,8 g y 5,3 g para los grupos tratados y no tratados con probióticos respectivamente.

Poder de colonización de *L. casei* subsp *rhamnosus* y *S. typhimurium* en heces murinas

En la gráfica 4 se aprecia que al siguiente día post-reto se presenta un pico de infección por *S. typhimurium*, coincidiendo con los síntomas de diarrea y pérdida de peso observados entre el octavo y décimo día del ensayo. Lo anterior permite aseverar que la colonización por *S. typhimurium* solo se manifestó en los recuentos promedios de las muestras de heces de los ratones retados dos días post-reto, sugiriendo que existe una protección de la colonización de *S. typhimurium* en los siguientes días del ensayo en el grupo tratado con probiótico, lo que no sucede con el grupo control o de ratones lactados, en los cuales el promedio de recuentos de UFC de *S. typhimurium* /g de heces en los siguientes días post inóculo tuvo su expresión máxima en el día 13 con $1,2 \times 10^7$ UFC/g de heces, cayendo gradualmente hasta el día 15, día de la muerte de los ratones.

CONCLUSIONES

De la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* en melaza-leche se puede

concluir que la tasa de crecimiento fue de 0.22 h^{-1} ; el tiempo de duplicación 3,15 h y el tiempo de cosecha 7 h.

El ácido láctico se incrementa simultáneamente al consumo de azúcares y hasta su agotamiento. De acuerdo a la anterior observación y el comportamiento cinético del aislado, se clasifica la fermentación como in batch tipo I, en la que los eventos de idiofase y trofofase ocurren sin separarse en el tiempo.

El efecto antagónico del producto fermentado por el método de los micropocillos dio muestras evidentes de inhibición de *S. typhimurium*, *H. pylori*, *Y. enterocolitica* y *Sh. boydii*, y en un menor grado *V. cholerae*. Sin embargo no así por el método de los discos de agar, donde solo fueron observados pequeños halos de inhibición del crecimiento de *V. cholerae* y *Y. enterocolitica*.

La bacteriocina concentrada por liofilización, suplementada con catalasa y ajustando el pH a 6,0 mostró pequeños cambios en su actividad inhibitoria residual, en comparación a los obtenidos con la bacteriocina cruda para los 5 patógenos estudiados, lo que sugiere entonces, que la actividad inhibitoria del probiótico no puede ser solo atribuida al peróxido de hidrogeno o al ácido láctico, sino también a las bacteriocinas en mayor grado.

La sobrevivencia del grupo tratado con probiótico fue mayor que la de los grupos control, pues así lo confirma el ANOVA mostrando una $P < 0.05$. Pudiendo concluir entonces que el probiótico tiene un efecto protector en ratones contra la cepa patógena de *S. typhimurium*.

El beneficio del probiótico se observa en forma contundente en los animales protegidos y retados, pues tuvieron ganancia de peso similar al grupo control, pudiéndose afirmar que la ausencia del reto y la protección con probióticos favorecen el crecimiento y desarrollo de los animales de manera significativa.

El efecto protector o profiláctico del probiótico,

es mucho más eficaz que el efecto terapéutico, pues solo el 10% de los ratones murieron, en comparación del 60 % observado cuando se hizo uso del probiótico luego del reto. La medida terapéutica tomada en el estado álgido de la infección diarreica, obro de manera positiva, manifestándose en la inhibición de la colonización de *S. typhimurium*, desaparición de la diarrea, ganancia promedio de peso, más no de la restauración del equilibrio de la microbiota láctica normal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BARNEY, C.E. Bacterias lácticas bacteriocinogénicas - Efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Tesis de Maestría. Universidad del Valle, Departamento de Microbiología, Cali, Colombia. 1996
2. GILLILAND, S.E Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews* 1990. P 87: 175-188.
3. STEINKRAUS, K.H. Lactic acid fermentation in the production of food from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1983. P 49: 337-348
4. COOKE, R.D., Twiddy, D. R., Reilly, P.J. Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *Microbiology Reviews* 1987. P 46: 369-379.
5. DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. January 1989. P 164-167.
6. PEITERSSEN, N. Probiotics starter cultures for food products. In *Lactic Acid Bacteria*, Chr. Hansen's Laboratorium Denmark, Als, Hoersholm, Denmark. 1992 p: 227-233
7. COOKE, R.D., TWIDDY, D.R., REILLY, P.J. Lactic acid fermentation as a low-cost means of food preservation in tropical countries. *Microbiology Reviews* 1987. P 46: 369-379.
8. GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews* 1990. P 87: 175-188.
9. FERNÁNDEZ, C.F., SHAHANI, K. M. & AMER, M. A. Therapeutic role of dietary Lactobacilli and Lactobacilli fermented dairy products. *Microbiology Reviews*. 1987. P 46: 343-356.
10. PEITERSSEN, N. Probiotics starter cultures for food products. In *Lactic Acid Bacteria*, p: 227-233. Chr. Hansen's Laboratorium Denmark, Als, Hoersholm, Denmark. 1992
11. GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews* 1990. P 87: 175-188.
12. FICHERA, G.A., GIESE, G. Non-immunologically-mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cáncer Lett*. 1994. P 85: 95-103.
13. HAYATSU, H., HAYATSU, T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cáncer Lett*. 1993. P 73: 173-179
14. GAON, D., DOWECK, Y., GOMEZ, Z.A., RUIZ, H.A., OLIVER, G. Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin. *Medicina B. Aires*. 1995. P 55: 237-242.
15. GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews*. 1990. P 87: 175-188.
16. OYARZABAL, O.A., CONNER, D.E. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella spp.* by selected bacteria. *Poultry Science*. 1995. P 74(9): 1418-1425.
17. MORELLI, L. Molecular biology in probiotics. In *Lactic Acid Bacteria, Research and industrial applications in the agro-food industries*. Facolta di Agraria UCSC, Piacenza, Italia. 1992 P: 215-220.
18. LEVEAU, J. Y., BOUIX, M.(.). Techniques d'analyses et controle dans les industries agroalimentaires, En: *Le Controle Microbiologique*. Bourgeois, C.M.J.Y(Eds), technique documentation, Paris. APRIA, Paris, 1980. P: 106-129.
19. OYARZABAL, O.A., CONNER, D.E. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella spp.* by selected bacteria. *Poultry Science*. 1995. P 74(9): 1418-1425.
20. HAYATSU, H., HAYATSU, T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cáncer Lett*. 1993. P 73: 173-179
21. RUSELER, J. G., VANLIESHOUT, L.M., GOSELINK, M.J., MARTEAU, P. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. Journal of Gastroenterology*. 1995. P 30: 675-680.
22. PERDIGON, G., ALVAREZ, S., RACHID, M., AGUERO, G., GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. *Journal Dairy Science*. 1995. P 78(7): 1597-1606.
23. MILLAR, M. R., BACON, C., SMITH, S. L., WALKER, V., HALL, M.A. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Archives of Disease in Childhood*. 1993. P 69: 483-487.
24. STANSBRIDGE, S.M., WALKER, V., HALL, M.A., SMITH, S. L., MILLAR, M. R., BACON, L., CHEN, S. Effects of feeding premature infants with

- Lactobacillus GG* on gut fermentation. Archives of Disease in Childhood. 1993. P 69: 488-492.
25. FERNÁNDEZ, C.F., SHAHANI, K. M. & AMER, M. A. Therapeutic role of dietary Lactobacilli and Lactobacilli fermented dairy products. Microbiology Reviews. 1987. P 46: 343-356.
 26. TALARICO, T.I., CASAS, I.A., CHUNG, T.C., DOBROGOSA, W.J. Production and isolation of reuterina, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob. Agents Chemother. 1988. P 32: 1854-1858.
 27. JUVEN, B.J., MEINERSMANN, R. J., STERN, N.J. Antagonist effects of *Lactobacilli* and *pediococci* to control intestinal colonization by human enteropatogens in live poultry. Journal Applain Bacteriology. 1991. P 70: 95-103.
 28. LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTEVILLE, T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology. 1991
 29. KATO, T., MATSUDA, T., YONEYAMA, Y., KATO, H., NAKAMURA, R. Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and charaterization of it's bacteriocin. Biosci. Biotech. Biochem. 1993. P 57 (4): 551-556.
 30. BAREFOOT, S.F., KLAENHAMMER, T.R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Enviromental Microbiology 1983. P 45 (6): 1808-1815.
 31. HARTING, M.A., HEDGES, A.J., BERKELEY, R. C. Methods for studing bacteriocins. P: 315-422. In Methods in Microbiology. J.R Norris and D.W. Ribbons (Ed). Vol 7A. Academic Press, Inc, New York. 1972
 32. MORELLI, L. Molecular biology in probiotics. In Lactic Acid Bacteria, Research and industrial applications in the agro-food industries. P: 215-220. Facolta di Agraria UCSC, Piacenza, Italia. 1992
 33. KANDLER, O., WEISS, N. Regular, Nonsporting Gram-positive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacterieology. Vol 2.(Williams & Wilkins Eds). Baltimore, U.S.A, 1990. P: 1209-1234.
 34. SCHLEIFER, K.H., AMANN, L.R., HARTEL, C., EHRMANN, M., KÖHLER, W., KRAUSE, A. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria and their identification with nucleic acid probes. In Lactic Acid Bacteria. Research and industrial applications in the agro-food industries. 1991. P: 23-32.
 35. NOVEL, G. Taxonomie et phylogenie. En Les Bactéries Lactiques. Recherche et applications industrielles en agro-alimentaire. Actes du colloque Lactic 91. 1991
 36. THIVEND, P., MERCIER, C., GUILOT, A. Dosificación del almidón dentro de medios complejos. In Bacteries Lactiques. I.H. de Roissart (Eds). 1965. P: 239-284.
 37. LOWRY, O. H., ROSEBROUG, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biol. Chem. 1951. p 193:265-275.
 38. DUBOIS, M., HAMILTON, T.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 1956. P 28:350-356.
 39. RODRIGUEZ, S. Producción de biomosas lácticas a partir de harinas de yuca., Tesis. Universidad del Valle, Departamento de Biología, Cali, Colombia. 1995
 40. LOWRY, O. H., ROSEBROUG, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biol. Chem. 1951. p 193:265-275.
 41. DUBOIS, M., HAMILTON, T.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 1956. P 28:350-356.
 42. THIVEND, P., MERCIER, C., GUILOT, A. Dosificación del almidón dentro de medios complejos. In Bacteries Lactiques. I.H. de Roissart (Eds). 1965. P: 239-284.
 43. COOPER, T.G. Instrumentos y técnicas de bioquímica. Ed. Reverté, S.A. 1984
 44. HARTING, M.A., HEDGES, A.J., BERKELEY, R. C. Methods for studing bacteriocins. P: 315-422. In Methods in Microbiology. J.R Norris and D.W. Ribbons (Ed). Vol 7A. Academic Press, Inc, New York. 1972
 45. TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriology Review. 1976. P 40:722-756.
 46. TAGG, J. R., MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins appli. Microbiology. 1971. P 21: 943-951.
 47. HARTING, M.A., HEDGES, A.J., BERKELEY, R. C. Methods for studing bacteriocins. P: 315- 422. In Methods in Microbiology. J.R Norris and D.W. Ribbons (Ed). Vol 7A. Academic Press, Inc, New York, 1972.
 48. TAGG, J. R., MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. Appli. Microbiology. 1971, 21: 943-951.
 49. BARNEY, C.E.. Bacterias lácticas bateriocinogénicas - Efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos. Tesis de Maestría. Universidad del Valle, Departamento de Microbiología, Cali, Colombia, 1996

