



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS



**“PARÁMETROS DESCRIPTIVOS EN EL ESTUDIO DE LA
AUTOAGREGACIÓN DE *Lactobacillus plantarum* 299v A DIFERENTES
pH”**

TESIS

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

I.I.A. Jaqueline Stephanie Ley Martínez

Directores de Tesis:

Dr. Ebner Azuara Nieto

Dra. María Guiomar Melgar Lalanne

Xalapa de Enríquez, Veracruz, México

Octubre, 2016



La presente tesis titulada

"Parámetros descriptivos en el estudio de la autoagregación de *Lactobacillus platarum* 299v a diferentes pH",

Realizada por la

I.I.A. JAQUELINE STEPHANIE LEY MARTÍNEZ

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 10 de octubre de 2016.

Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara

Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo

Dr. Cid Ramón González González

DEDICATORIA

A mi madre Gloria Martínez: Gracias por brindarme siempre tu apoyo, por estar conmigo en las buenas y en las malas, gracias por recordarme siempre que podía, por tus ánimos, por no dejarme caer y enseñarme que a pesar de que la vida no es fácil, puedo salir adelante.

A mi prometido Jose Erick Ortega: Gracias por no solo ser el pilar de mi vida y fuente de mi motivación constante, sino también por todos estos años de apoyo incondicional. Te amo y créeme que siempre estaré ahí para ti.

Mis abuelos Elena Nájera y Margarito Martínez: Muchas gracias por sus palabras llenas de sabiduría, por sus consejos, por recordarme siempre lo bonito de la vida los amo y siempre estarán en mi corazón.

A mis suegros y cuñadas, Mariana Valencia, Jose Facundo Ortega, Jazmín Angélica Ortega, Jessica Ortega Valencia y Luis Carlos Castañeda: Gracias por ser mi segunda familia, por no dejarme caer por más difícil que fuera la prueba, y más que nada por tener un espacio para mí en su corazón.

A mi familia: Gracias por darme su apoyo y consejos a lo largo de mi vida, por enseñarme que independientemente de la situación que viva puedo no solo concluir mis objetivos, sino sobresalir.

A mis amigos Cinthya Condado, Dafne Ivette, Liesel Cerecedo y Emanuel Castillo: Gracias por su apoyo incondicional, por sacarme una sonrisa cuando más lo he necesitado y por estar conmigo sin importar que, gracias por todas aquellas historias inolvidables que hemos creado juntos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de generación de la M.C.A. Jazmín Olivo, Flor Ortiz, Karina Hernández, Andrés Pancardo, Annai Cabrera, Diana Caudillo, Mónica Pérez, Yatzil García, Jesús Briones, y Ana Polanco por ser unos excelentes amigos, por acompañarme en este trayecto y por hacer de la maestría una experiencia inolvidable.

AGRADECIMIENTO

A la universidad Veracruzana por permitirme formarme como profesional.

A mis directores de tesis el Dr. Ebner Azuara Nieto y la Dra. Guiomar Melgar Lalanne por permitirme conocerles y por haber creído en mi desde el inicio, gracias por sus enseñanzas, apoyo y orientación durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Darío Iker Téllez Medina, Dr. Humberto Hernández Sánchez y al Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez del IPN, por recibirme en sus instalaciones, por sus acertadas aportaciones y por enseñarme que existen personas con tanta sabiduría y sencillez.

A la Biol. Greta Hanako Rosas Saito del INECOL y su hija Namiko Harumy, por todo su aprecio, afecto y por enseñarme lo sorprendente que puede ser la microscopia.

A mis sinodales el Dr. Cid Ramón González, Dr. Cesar Beristaín y Dra. Rosa Isela Guzmán por sus valiosas sugerencias, aportaciones y tiempo invertido durante la
revisión de esta tesis.

A la Dra. Maribel Jiménez porque sin ella nunca hubiera conocido lo maravilloso que es la investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE CUADROS.....	XII
INDICE DE ECUACIONES	XIII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO DE REFERENCIA	13
2.1. Probióticos.....	13
2.1.1. Beneficios de los probióticos a la salud	13
2.1.2. Bacterias ácido lácticas.....	15
2.1.2.1. Género lactobacillus	16
2.2. Lactobacillus Plantarum.....	16
2.2.1. Lactobacillus plantarum 299v.....	17
2.3. Tracto gastro intestinal	18
2.3.1. Adhesión	20
2.3.2. Agregación.....	24
2.3.3. Características de la superficie celular de las bacterias	25
2.4. Potencial zeta.....	28

2.5.	Hidrofobicidad	30
2.6.	Análisis morfométrico y fractal.....	33
2.7.	Modelado descriptivo	36
2.7.1.	Modelo cinético y de probabilidad	37
2.7.1.1.	Cinética.....	38
2.8.	Cinética química	39
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	41
4.	OBJETIVO E HIPOTESIS.....	42
4.1.	Objetivo general	42
4.2.	Objetivos específicos	42
4.3.	Hipótesis.....	42
5.	MATERIALES Y METODOS.....	43
5.1.	Esquema general	43
5.2.	Aspectos generales	43
5.3.	Materiales.....	44
5.3.1.	Materia prima	44
5.3.2.	Reactivos.....	44
5.3.3.	Equipos	44
5.4.	Métodos.....	46
5.4.1.	Activación, conservación de la cepa	46
5.4.2.	Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v	46
5.4.3.	Autoagregación	46
5.4.4.	Obtención de imágenes por microscopia óptica	47
5.4.5.	Toma de imágenes por microscopia electrónica de barrido (SEM)	47
5.4.6.	Análisis de imagen	48
5.4.7.	Potencial zeta.....	48

5.4.8.	Hidrofobicidad	49
5.4.9.	Modelado matemático	50
5.4.10.	Análisis estadístico	50
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	51
6.1.	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	51
6.2.	Cinéticas de agregación de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	52
6.3.	Potencial zeta	54
6.4.	Hidrofobicidad	55
6.5.	Modelo matemático	58
6.6.	Micrografías por microscopia óptica en cinéticas de Lp 299v	62
6.6.1.	Análisis de imagen	63
6.6.2.	Análisis morfométrico	69
6.7.	Micrografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido en cinéticas de Lp 299v	74
6.7.1.	Análisis de imagen	75
6.7.2.	Análisis morfométrico	79
	CONCLUSIONES	82
7.	ANEXOS	83
7.1.	Agar y caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)	83
7.2.	Agar MRS para técnica de conteo en microgota	83
7.3.	Buffer PBS	84
7.4.	Solución piraña	84
7.5.	Buffer Sorensen pH 7.4	85
7.6.	Solución Glutaraldehído 2.5%	85
7.7.	Cinética de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v versus DO 560nm en MRS	85
7.8.	Cinética de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v versus DO 600nm en PBS	86

7.9. Conteo por microgota	87
7.10. Cinéticas de crecimiento de Lp 299v a diferentes pH y temperaturas	87
BIBLIOGRAFIA	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tracto gastrointestinal.	19
Figura 2. Figura esquemática que muestra el espesor in vivo de las dos capas de mucus (la fuertemente adherida y la débilmente adherida) en el cuerpo, antro, duodeno, yeyuno, íleon y colon del tracto gastrointestinal de ratas Wistar macho. Adaptada.....	21
Figura 3. Explicación de la interferencia de los EPS en la adhesión de bacterias probióticas y patógenas en la mucosa intestinal. a) Los EPS pueden adherirse directamente al mucus e inhibir la adhesión de probióticos; b) los EPS pueden adherirse a la superficie del probiótico aumentando la adhesión a la mucosa; c) los EPS de las bacterias patógenas favorecen la adhesión de éstas a la mucosa. Adaptada.....	23
Figura 4. Cinética de crecimiento de Lp 299v en caldo MRS.....	51
Figura 5. Cinética de autoagregación a 37°C pH 5.0, 7.0 y 9.0 a 600 nm durante 24 h. Barras de desviación estándar (SD) a partir de tres experimentos independientes realizados por duplicado.	53
Figura 6. Hidrofobicidad de Lp 299v con hidrocarburos (Cloroformo y n-Hexadecano).	56
Figura 7. Relación entre, hidrofobicidad al hexadecano y porcentaje de autoagregación a lo largo del tiempo a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0.....	57
Figura 8. Datos ajustado con el modelo de Juárez-Tomas (2005) de datos obtenidos en cinética de autoagregación a pH a) 3.6, b) 5.0, c) 7.0 y d) 9.0	60
Figura 9. Compensación cinética en el proceso de autoagregación a diferentes pH. ..	62
Figura 10. Micrográficas obtenidas por microscopia óptica a 100x de cinéticas de agregación a 37 °C, pH 9 y 4 h en su a)precipitado y b)sobrenadante.....	63
Figura 11. Ajuste de escala en micrografía obtenida por microscopía a 100x.....	63
Figura 12. Binarización de imagen por ajuste de resolución en micrografía a 100x.	64

Figura 13. Ajuste de contraste en micrografía obtenida por microscopia a 100x.....	64
Figura 14. Ajuste de umbral en micrografía obtenida por microscopía a 100x para denotar las partículas a analizar.	65
Figura 15. Remarcado de contorno de partículas obtenidas por microscopia a 100x. .	65
Figura 16. Cierre de contornos por binarización de capturas por microscopia a 100x.	66
Figura 17. Relleno de partículas de capturas obtenidas por microscopia a 100x.	66
Figura 18. Análisis de imagen con descarte de tamaño.....	67
Figura 19. Base de datos resultante del análisis de partículas de micrografías a 100x.	67
Figura 20. Interfaz de análisis de fractalidad por plugin FracLac.	68
Figura 21. Ejemplo de micrografías digitales de Lp299v agregación. 1) en condiciones iniciales (de pH 7,0; 0 h); 2) bajo condiciones de agregación máxima (pH 5,0, 20 h)	68
Figura 22. Micrografías procesadas obtenidas por microscopia óptica a 100x de cinéticas de agregación a 37°C y diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0) de las horas 0, 6, 14, 20 y 24h de su precipitado y sobrenadante.	69
Figura 23. Histogramas de frecuencia de análisis morfológico de circularidad a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a los tiempos 0 (1a), 4(1b) y 24 h(1c); relación de aspecto y Feret a los mismos parámetros.	72
Figura 24. Lagunaridad y dimensión fractal de Lp 299v en función del tiempo a 24 h .	74
Figura 25. Micrografía obtenida por microscopia óptica a 20 000x de cinéticas de agregación a 37°C, pH 7 y 0 h.	75
Figura 26. Ajuste de escala en micrografía obtenida por microscopía a 20 000x.....	75
Figura 27. Binarización de imagen por ajuste de resolución en micrografía a 20 000x.	76
Figura 28. Ajuste de umbral en micrografía obtenida por microscopía a 20 000x para denotar las partículas a analizar.	76
Figura 29. Eliminación de ruido en micrografía a 20 000x	77
Figura 30. Análisis de imagen con descarte de tamaño.....	77

Figura 31. Base de datos resultante del análisis de micrografías a 20 000x	78
Figura 32. Micrograffas obtenidas por microscopia SEM a 20 000x de cinéticas de agregación a 37°C y diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0) de las horas 0, 4 y 24h de su precipitado.....	78
Figura 33. Curva de crecimiento de Lp 299v de DO560 nm versus unidades formadoras de colonia por mililitro.	86
Figura 34. Curva de crecimiento de Lp 299v de DO600 nm versus unidades formadoras de colonia por mililitro.	86
Figura 35. Diluciones para la técnica de conteo por microgota de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v.	87
Figura 36. Cinéticas de autoagregación a 37, 35 y 39 °C a pH a) 3.6, b) 5.0, c) 7.0 y d) 9.0	88

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efectos más importantes reportados de cepas probióticas	14
Cuadro 2. Efectos benéficos para la salud de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v.	18
Cuadro 3. Regiones y características del tracto gastrointestinal.....	19
Cuadro 4. Orden de reacción.	39
Cuadro 5. Cinéticas de autoagregación a distintas absorbancias iniciales.....	52
Cuadro 6. Valores de potencial zeta obtenidos en cinética de agregación a 24 h a 37°C y pH 5.0, 7.0 y 9.0.	54
Cuadro 7. Coeficiente de correlación de Pearson (R) entre hidrofobicidad al hexadecano (%) y autoagregación a 2,4,20,22 y 24h.....	57
Cuadro 8. Auto-agregación de Lp299v en diferentes pH y temperatura utilizando el modelo de asociación exponencial.	61
Cuadro 9. Parámetros de tamaño evaluados durante el análisis de imagen de la cinética de agregación a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0.....	70
Cuadro 10. Parámetros de forma evaluados durante el análisis de imagen de la cinética de agregación a 37 °C a pH 5.0, 7.0 y 9.0	71
Cuadro 11. Análisis morfológico de Lp299v a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24 h. .	73
Cuadro 12. Análisis de Curtosis y asimetría de las partículas.	74
Cuadro 13. Parámetros evaluados durante el análisis de imagen por SEM de la cinética de agregación a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0 de las tomas de precipitado y sobrenadante.	79
Cuadro 14. Análisis morfológico de <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24 h.....	80
Cuadro 15. Comparación de medidas obtenidas por microscopía óptica y SEM de los parámetros de Feret y Relación de aspecto a pH 5.0, 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24h	81

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación [1] . Velocidad de reacción.....	35
Ecuación [2] . Ecuación de circularidad.....	35
Ecuación [3] . Ecuación de relación de aspecto.....	39
Ecuación [4] . Ecuación despejada de velocidad de reacción.....	39
Ecuación [5] .Ecuación integrada de velocidad de reacción	40
Ecuación [6] . Ecuación de Arrhenius.....	40
Ecuación [7] . Ecuación linealizada de la ecuación de Arrhenius.....	40
Ecuación [8] . % de Autoagregación.....	47
Ecuación [9] . % de Hidrofobicidad	49
Ecuación [10] . Ecuación de Arrhenius ajustada	50
Ecuación [11] . Ecuación linealizada para la determinación de la temperatura isocinética	50
Ecuación [12] . Ecuación de la velocidad de autoagregación.....	58
Ecuación [13] . Concentración de probióticos en función de los microorganismos autoagregados	58
Ecuación [14] . Sustitución de velocidad de autoagregación en concentración de probioticos en función de los microorganismos autoagregados	59
Ecuación [15] . Separación de variables de autoagregación en concentracion de probióticos en función de los microorganismos autoagregados	59
Ecuación [16] . Determinación del logaritmo ajustado a ecuación de autoagregación.	59
Ecuación [17] . Aplicación del logaritmo para completar la diferencial	59
Ecuación [18] . Ecuación descriptiva de la autoagregación en cinética	59
Ecuación [19] . Ecuación para la determinacion de microorganismo autoagregados en función del tiempo	59

ABREVIATURAS

%	Porcentaje.
±	Más/menos.
AR	Relación de aspecto.
aW	Actividad de agua.
BAL	Bacterias ácido lácticas.
BATH	Adhesión bacteriana a los hidrocarburos.
D.O.	Densidad óptica.
DF	Dimensión Fractal.
DLVO	Teoría Deryaguin-Landau-Verwey-Oberbeek.
Ea	Energía de activación.
EPS	Exopolisacáridos.
et al.	Y colaboradores.
Etc.	Etcétera.
g ó RFC	Fuerza G, gravedad o Fuerza centrífuga relativa.
g	Gramo.
h	Hora.
H. R.	Humedad relativa.
K	Constante cinética
L	Litro.
Lp 299v	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v.
M	Molar.
min	Minuto.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.
MRS	Caldo/ Agar Man, Rogosa y Sharpe.
mV	Milivolt.

nm	Nanómetro.
°C	Grados centígrados.
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos.
SD	Desviación estándar.
t	Tiempo.
TB	Temperatura isocinética
TGI	Tracto gastro intestinal.
TMH	Temperatura media armónica.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
V	Velocidad de la cinética
v/v	Volumen / Volumen.
µm	Micrómetro.

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que, al consumirse en cantidades apropiadas, confieren al huésped algún beneficio para la salud. Para ejercer dicha acción es necesario que se adhieran a la superficie epitelial y se agreguen entre ellas (autoagregación) o con otras cepas (coagregación) para aumentar su tiempo de tránsito intestinal. Las interacciones que regulan la autoagregación son fenómenos superficiales inespecíficos que pueden analizarse por métodos indirectos (adhesión a hidrocarburos) y directos (determinación de la carga electrocinética o potencial zeta). Además, durante la autoagregación a diversas condiciones las bacterias pueden modificar sus parámetros morfológicos. En la presente investigación, se evaluó la capacidad de autoagregación de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v (Lp299v) y sus propiedades superficiales en condiciones simuladas de pH (5.0, 7.0 y 9.0) durante 24 h.

La agregación resultó ser dependiente del tiempo ($p < 0.01$) pero no del pH ($p = 0.166$). La cepa presentó un carácter hidrofílico y acidófilo; el potencial zeta, presentó valores negativos en todas las condiciones analizadas. A nivel morfológico, pudieron observarse cambios tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica con un margen de error menor a $0.22 \mu\text{m}$ lo que indica que el microscopio óptico puede utilizarse de forma adecuada y precisa para el análisis morfométrico. El diámetro de Feret varió entre 0.9 y $2.7 \mu\text{m}$, la circularidad entre 0.521 y 0.640 y la relación de aspecto entre 2.118 y 2.363 . El análisis fractal se mantuvo constante en todas las condiciones analizadas y resultó ser independiente del pH y tiempo mientras que los parámetros de forma no dependieron ni del pH ni del tiempo ($P > 0.05$). Finalmente, el fenómeno de autoagregación estudiado resultó ser entrópico. Por ello, se puede concluir que la cepa Lp299v modifica sus cargas superficiales y tamaño en función del tiempo para adaptarse a las condiciones de pH existentes del medio y así autoagregarse. La autoagregación en esta cepa no parece estar regulada por fuerzas iónicas sino por la presencia de sustancias hidrofílicas.

Palabras clave: Lp 299v, autoagregación, modelo matemático, análisis morfológico, potencial zeta.

SUMMARY

Probiotics are live microorganisms, which when are consumed in adequate amounts confer a health benefit. To exert such action it is necessary to be able to adhere to the epithelial surface and to be added among the cells themselves (autoaggregation) or with other bacterias (coaggregation) to increase its intestinal transit time. Aggregation involve various factors that affects the adhesion: time, pH (2.0 to 9.0), salts and enzymes secreted, etc. These factors affect bacterial physiology and morphology. The interactions that regulates the aggregation are superficial and unspecific that can be analyzed by indirect methods (adhesion to hydrocarbons) and direct (determination of the zeta potential). In this research the autoaggregation ability of the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 299v (Lp299v) and their surface properties in three simulated conditions of intestinal pH (5.0, 7.0 and 9.0) for 24 h were evaluated.

The aggregation turned out to be time dependent ($p < 0.01$) but not pH dependant ($p = 0.166$). The strain showed a hydrophilic and acidophilus character; zeta potential showed negative values in all conditions tested. Morphological changes could be observed by optical microscopy and by electron microscopy with a margin of error less than $0.22 \mu\text{m}$ indicating that the optical microscope can be suitable and accurate for morphometric analysis. Feret's diameter ranged from 0.9 to $2.7 \mu\text{m}$, the circularity from 0.521 to 0.640 and the aspect ratio between 2.118 and 2.363 . The Fractal analysis remained in all conditions analyzed and found to be independent of pH and time while the shape parameters were not pH or time dependent ($P > 0.05$). Finally, the self-aggregation phenomena studied proved be entropic. Therefore, It was conclude that Lp 299V strain modifies their surface charges and size depending on the time to adjust to the pH conditions existing in the medium and thus autoagregarse. Autoaggregation in this strain does not seem to be regulated by ionic forces, but by the presence of hydrophilic substances. Aggregation could be improved with the use of mechanical forces to increase their entropy. However, to check it out further studies are necessary

Keywords: Lp 299v, autoaggregation, Mathematical model, morphological model, zeta potential.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped beneficios para la salud al ingerirse en cantidades de entre 10^6 y 10^7 UFC /g (FAO/WHO, 2002; Dilnawaz, et al., 2011). Entre los efectos benéficos que se les atribuyen se encuentran: la mejora de la salud intestinal, la estimulación y desarrollo del sistema inmune, la síntesis y la mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes, la reducción de síntomas de intolerancia a la lactosa, y reducción de riesgo de ciertas enfermedades como la diabetes (Nagpal, et al., 2012). Sin embargo, para desarrollar estos beneficios a través de la producción de metabolitos, debe sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal donde el pH varía entre 2.0 hasta 9.0 en el intestino delgado y adherirse a la superficie epitelial del intestino delgado (Savoie, et al., 2015).

El cuerpo humano está expuesto a una gran cantidad de microorganismos, siendo el intestino el que concentra una mayor cantidad (10^{13} - 10^{14} UFC/g) (Mitsuoka, 1992) y variabilidad (cerca de 500 especies). De entre estas especies, la mayoría son comensales (es decir, no ocasionan daño), pero, en los últimos años se ha visto que algunas de ellas tienen importantes funciones en el sistema inmune y en la prevención de numerosas enfermedades por lo que son consideradas como probióticas (Tiihonen, et al., 2010). La eficacia de los probióticos depende en buena medida de su tiempo de residencia gastrointestinal, que depende a su vez de la agregación entre las bacterias, y de su adhesión a las superficies de la mucosa que recubre las células epiteliales (Prajapati & Jashbhai, 2013).

La habilidad de las bacterias probióticas para formar agregados vía autoagregación es una característica deseable. Los autoagregados pueden adherirse a la superficie de la mucosa intestinal incrementando la persistencia de la bacteria en el intestino. Además, pueden inhibir la adhesión de patógenos previniendo su colonización. Adicionalmente, incrementan la masa celular necesaria para el éxito de su funcionalidad (Collado & Meriluoto, 2008). A pesar de su importancia, los mecanismos de autoagregación son todavía inciertos ya que dependen tanto de la cepa como del ambiente, de igual forma se sabe son el resultado de interacciones complejas entre

distintos componentes de la superficie celular y segregados bacterianos (García-Cayuela, et al., 2014). A la fecha, pocos estudios han explorado el fenómeno de autoagregación en periodos largos de tiempo y a diferentes pH.

Los lactobacilos se encuentran de manera natural en numerosos alimentos fermentados y en el tracto gastrointestinal humano (mucosa oral, vaginal e intestinal). Algunas cepas de este género son consideradas probióticas y tienen numerosos beneficios a la salud comprobados, sobre todo en la restauración de la microbiota intestinal tras procesos diarreicos. Entre ellas, destaca la cepa Lp299v (utilizada en el presente trabajo de investigación), encontrada de manera natural en la mucosa oral e intestinal y con beneficios a la salud como en el tratamiento del síndrome de color irritable (Klarin, et al., 2005), alta tolerancia al estrés salino así como a pH ácido y alcalino (de Vriesa, et al., 2006) y alta capacidad de agregación y adhesión (M.L.Johansson, et al., 1993).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Probióticos

La utilización de microorganismos intestinales para la mejora de la salud se remonta a principios del siglo XX (Metchnikoff, 1907). Las especies más utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL) y a las bifidobacterias aunque también se utilizan levaduras como la *Sacharomyces boulardii*.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2002). El protocolo de la FAO (2002) establece los criterios que deben seguir los microorganismos para poder ser considerados probióticos en estudios *in vitro*, que son:

- Ser de origen humano.
- Ser seguro para su consumo.
- Sobrevivir el paso por el tracto gastro intestinal.
- Adherirse a la mucosa intestinal.
- Producir metabolitos benéficos para la salud.

Posteriormente, estos beneficios deben ser corroborados mediante estudios *in vivo* en animales, *in vivo* en voluntarios sanos y epidemiológico. La cepa Lp 299v cumple con todos estos requisitos (Adawi & Jeppson, 2003).

2.1.1. Beneficios de los probióticos a la salud

Algunos de los principales beneficios reportados por diversas cepas probióticas se encuentran en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Efectos más importantes reportados de cepas probióticas

CEPA PROBIÓTICA	BENEFICIOS CLINICOS REPORTADOS
<i>Bifidobacterium</i> BB-12	Alivia los síntomas de eczema atópico, produce un efecto modulador inmunológico, mejora la erradicación de <i>H. Pylori</i> y protege contra la diarrea aguda.
<i>L. acidophilus</i> La-5	Equilibra la microflora intestinal, protege contra la diarrea de viajero, mejora el sistema inmunológico, mejora la erradicación de <i>H. pylori</i> , alivia el estreñimiento y mejora las condiciones intestinales.
<i>L. casei</i> 431	Mejora la respuesta inmune después de la vacunación y promueve una recuperación más rápida de los episodios de diarrea en niños.
CEPA PROBIÓTICA	BENEFICIOS CLINICOS REPORTADOS
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4 + BB12	Mejora el cólico/irritabilidad en los lactantes, reduce el uso de antibióticos y reduce el riesgo de diarrea por rotavirus en lactantes.
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	Reduce la actividad de la enzima fecal, disminuye la mutagenicidad fecal, previene la diarrea relacionada con radioterapia y mejora el estreñimiento.
<i>L. F19</i>	Mejora la flora gastrointestinal y la salud inmunológica.
<i>L. fermentum</i> strain VRI 003 (PCCO®)	Promueve una mayor eficacia clínica dentro de la salud inmune, adyuvante a la vacuna contra la gripe, apoya la respuesta inmune en atletas y en relación con la dermatitis atópica.
<i>L. casei</i> Shirota	Previene los trastornos intestinales, reduce la actividad enzimática fecal, promueve efectos positivos en la reducción de la recurrencia del cáncer superficial de vejiga.
<i>L. acidophilus</i> NCF	Reduce la hinchazón abdominal.
<i>L. rhamnosus</i> GG	Reduce el riesgo de infecciones de las vías respiratorias superiores en los niños y sirve como tratamiento de la diarrea.
<i>L. reuteri</i>	Acorta la duración de la diarrea por rotavirus.
<i>L. salivarius</i> WB21	Mejora / mantiene la salud oral en sujetos con alto riesgo de enfermedad periodontal.
<i>S. boulardii</i>	Previene la diarrea asociada a antibióticos y funciona como tratamiento de colitis por <i>C. difficile</i> .
<i>L. Rosell-52</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>Rosell-175</i> ,	Previene agentes patógenos y la diarrea del viajero.
<i>L. plantarum</i> 299v	Reduce los síntomas de colon irritable

Fuente: (Prajapati & Jashbhai, 2013)

2.1.2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un importante grupo de microorganismos Gram positivos que producen ácido láctico como principal producto metabólico a partir de carbohidratos. Han sido utilizadas como complementos alimenticios, y son altamente valoradas por sus propiedades probióticas. Muchas cepas con propiedades probióticas, como *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus acidophilus* LA1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* LP01, *Lactobacillus fermentum* RC-14 son ampliamente utilizadas y producidos a escala industrial (Giraffa, et al., 2010). Sin embargo, un gran número de microorganismos potencialmente probióticos continúan desconocidos (Ramos, et al., 2013).

El mayor grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) pertenece al género *Lactobacillus* que comprende más de 100 especies. Se utilizan comúnmente como cultivos iniciadores industriales y también en algunas fermentaciones de alimentos artesanales (Agudelo, et al., 2010) ya que su contribución a la conservación es debido a la acidificación (producción de ácido láctico) y la producción de otros compuestos antimicrobianos (bacteriocinas y peróxido de hidrógeno). Sin embargo, también son útiles debido a su capacidad para contribuir a las características de sabor y textura, atributos relacionados con los alimentos de ácido láctico fermentado. Además, son habitantes naturales de la cavidad oral, urogenital y tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales. Muchos BAL son capaces de crecer en una amplia gama de temperaturas, concentración de sal y pH (Melgar-Lalanne, et al., 2013).

Las BAL son comúnmente utilizadas como organismos probióticos, que ayudan a mantener una microbiota intestinal equilibrada, con exclusión de los patógenos y ayudan a mantener la homeostasis intestinal por influir en el sistema inmune de la mucosa. Entre varios factores, la adhesión al epitelio intestinal es una de las características deseables para un probiótico con posibilidades de éxito, ya que, asegurará la colonización de las superficies mucosas, al menos transitoriamente, interfiriendo así con la unión de patógenos y permitiendo una interacción eficiente con las células del sistema inmune (Muñoz-Provencio, et al., 2009).

2.1.2.1. Género *Lactobacillus* spp.

Los lactobacilos son bacilos o coco-bacilos Gram-positivos que frecuentemente forman cadenas. Son catalasa negativos, no esporulados y en general inmóviles (unas pocas especies presentan flagelos peritricos). Es un género muy amplio en el que se incluyen más de 100 especies con propiedades heterogéneas. Esta diversidad se ve reflejada en el contenido en G+C de sus miembros, que varía desde un 32% hasta un 52%. En cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, pueden ser mesófilos o termófilos. El pH óptimo de crecimiento oscila entre 5,5 y 6,2, son anaerobios aerotolerantes y su crecimiento se ve favorecido en atmosfera microaerófila con un 5-10 % de CO₂. Desde el punto de vista fenotípico y atendiendo a sus características metabólicas, se pueden clasificar en tres grupos en función de la presencia o ausencia de los enzimas fructosa-1,6- difosfato aldolasa y fosfoacetolasa (Krieg, et al., 2011):

- Grupo I. Homofermentadores estrictos. Comprende el grupo de *Lactobacillus acidophilus* formado por seis especies: *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. amilovorans* y *L. gallinarum*.
- Grupo II. Heterofermentadores facultativos. Las especies principales de este grupo son: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sakei* y *L. curvatus*.
- Grupo III. Heterofermentadores estrictos. Se incluyen en este grupo *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. viridescens*.

2.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es miembro del grupo II. Se encuentra en una gran cantidad de alimentos fermentados tradicionales así como en el tracto gastrointestinal humano. Ha demostrado poder sobrevivir el tránsito gástrico y colonizar el tracto intestinal de los seres humanos y otros mamíferos (Dias, et al., 2013). Entre sus principales características se encuentran las siguientes:

- **pH:** crece bien en medios ligeramente ácidos, con diferentes valores iniciales de pH que oscilan desde 4.5 - 6.4, en donde con su óptimo de desarrollo está entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 a 3.6 y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos.

- **Necesidades de oxígeno:** son aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular su crecimiento.
- **Temperatura de crecimiento:** son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunas cepas crecen por debajo de 15°C y hasta por debajo de 5°C (Krieg, et al., 2011).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum* 299v

La cepa Lp299v pertenece al género *Lactobacillus* y se encuentra de forma natural en la mucosa intestinal (Johansson, et al., 1993) y oral de los seres humanos (Ducrotté, et al., 2012). No forma esporas, tiene forma de bastoncillo, es una bacteria microaerófila que se presenta aislada, formando pares o cadenas cortas, es homofermentadora produciendo ácido láctico sólo a partir de la glucosa en condiciones anaerobias y puede fermentar una amplia variedad de mono, di y trisacáridos, así como también hidratos de carbono procedentes de plantas, como la esculina, para producir ácidos (Adawi & Jeppson, 2003). Posee la capacidad para colonizar la mucosa de los seres humanos, además de poseer propiedades de adhesión específicas (Adlerberth, et al., 1996). Tiene excelentes características de adherencia, utilizando los sitios de unión de la manosa en las células de la mucosa, considerando esta como una posible base para la exclusión de adhesión de otras bacterias, por lo tanto la prevención de la translocación (Klarin, et al., 2005; Muñoz-Provencio, et al., 2009). Se ha demostrado que esta cepa estimula la producción de mucina en células HT-29 (De Vries, et al., 2006).

Los principales efectos para la salud de Lp299v se resumen en el **Cuadro 2:**

Cuadro 2. Efectos benéficos para la salud de *Lactobacillus plantarum* 299v.

ESTUDIO	DOSIS (UFC/g)	EFEECTO
EVIDENCIA REPORTADA		
Johansson et al. (1998)	2.0×10^{10}	Aumenta contenido en ácidos grasos de cadena corta de las heces
Johansson M.L. (1998)	Desconocido	Incrementa la proporción de ácidos carboxílicos en heces, en especial la de ácido acético y propiónico (fuente de energía para células de la mucosa).
C. N. Jacobsen (1999)	Desconocido	Presenta actividad antibacteriana frente a <i>L. monocytogenes</i> , <i>B.cereus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Y. enterocolytica</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>E. faecalis</i>
Johansson et al. (1993)	5.0×10^8	Cambia la microbiota en el íleon y el recto
Kingamkono et al. (1999)	Desconocido	Disminuye hasta seis veces del transporte de Enterobacteriaceae fecal
Naruszewicz et al. (2002)	2.0×10^{10}	Reduce de LDL-colesterol (11,7%) y el fibrinógeno (21,0%)
Cunningham-Rundles et al. (2000)	Desconocido	Mejora de la respuesta inmunitaria natural
Wullt et al. (2003)	5.0×10^{10}	Reduce 1/3 de recurrencia de la diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i>
Nobaek et al. (2000)	2.0×10^{10}	Reduce los síntomas de Síndrome de Colon Irritable
PRUEBAS IN VITRO		
Alander et al. (1998)	1.4×10^9	Disminuye las enterobacterias y clostridios, ligero aumento enterococos
McCracken et al. (2002)	1UFC/1000 células	Aumenta la IL-8 mRNA en las células epiteliales y en la regulación de la secreción de IL-8
Michail and Abernathy (2003)	10^7 , 10^8 y 10^9	Inhibe la migración de neutrófilos inducida por <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Mack et al. (1999)	10^5 , 10^7 , 10^8 y 10^9	Inhibe la adherencia <i>E. coli</i> enteropatógena

Fuente: (De Vries, et al., 2006).

2.3. Tracto gastro intestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) es el sistema que permite que mediante el consumo de alimentos y el proceso de digestión se extraigan energía y nutrientes, para luego excretar los residuos (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Regiones y características del tracto gastrointestinal.

Región	Longitud (m)	Área (m ²)	pH	Tiempo de residencia
Cavidad Oral			6.5	
Esófago	0.3	0.02	6.8	> 30 s
Estomago	0.2	0.2	2-3	1-5 h
Duodeno	0.3	0.02	5-6.5	> 5min
Yeyuno	3	100	6.9	1-2 h
Íleon	4	100	7-8	2-3 h
Cólon	1.5	3	5.5-8	15-48 h

Fuente: (Calvo Carrillo, 2013)

El TGI realiza funciones de digestión, absorción, secreción y de barrera, además de ser un órgano endocrino y formar parte del sistema inmunológico. Entre las principales funciones de este, se encuentra la absorción de nutrientes la cual realiza mediante la superficie intestinal la cual consta de pliegues, vellosidades y micro vellosidades.

Las vellosidades intestinales son estructuras en forma de dedos de aproximadamente 1 mm de altura (**Figura 1**), recubiertos de células epiteliales especializadas, los enterocitos, cuya función es la toma de nutrientes. Para ello su membrana luminal está cubierta con micro vellosidades, estructuras de 1 µm de alto y 0,1 µm de diámetro que a su vez están recubiertas por una capa de mucus protector formada por glicoproteínas (Johansson, et al., 2013).

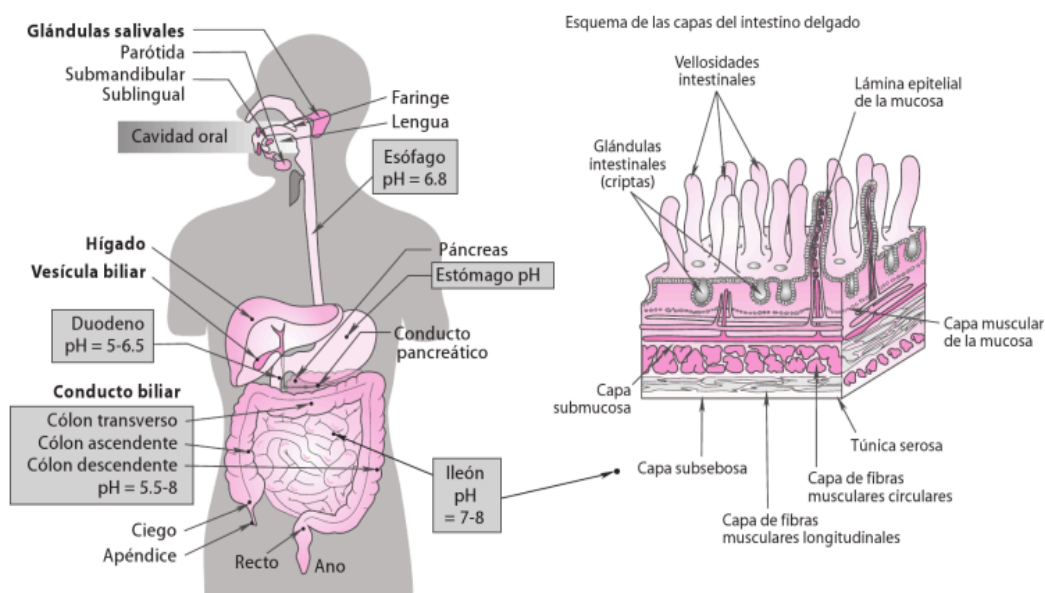


Figura 1. Tracto gastrointestinal. (Calvo Carrillo, 2013)

2.3.1. Adhesión

Los probióticos deben adherirse a las células epiteliales y a la mucosa del intestino delgado (Van Tassell & Miller, 2011) para poder producir beneficios a la salud a través de distintos mecanismos como son la competencia por los lugares de adhesión y algunos nutrientes, la secreción de sustancias antimicrobianas, la inactivación de toxinas y la estimulación del sistema inmune (Collado & Meriluoto, 2008).

El epitelio intestinal se encuentra en contacto permanente con el contenido luminal y con una variada microbiota siendo el mayor mecanismo de defensa utilizado para proteger el TGI del medio ambiente. Esta barrera intestinal está formada por mucosa, péptidos antimicrobianos, IgA secretados y el complejo de adhesión que forman la células epiteliales (Ohland & MacNaughton, 2010). Se ha comprobado que algunos probióticos también presentan a nivel intestinal efectos antagónicos frente a patógenos de los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Campylobacter* y *Candida* (Collado & Meriluoto, 2008; Anas, et al., 2008)

La adhesión, como todas las interacciones de los microorganismos con su ambiente, es un fenómeno superficial en el que participan las características físico-químicas de la superficie de la bacteria y las de la superficie (biótica o abiótica) a la que se adhiere. En el caso de bacterias Gram positivas la superficie celular está formada por una membrana celular, la pared celular y en algunos casos, una cápsula externa de polisacáridos (EPS capsulares) y compuestos de origen proteico (mayoritariamente adhesinas y glicoproteínas) (Sánchez, et al., 2012).

La composición de la pared celular, formada mayoritariamente por la presencia de carbohidratos y proteínas, confiere a la superficie celular un carácter hidrofílico o hidrofóbico (Palmer, et al., 2007). Durante la última década se ha estudiado la presencia de genes relacionados con la proteínas que dirigen la adhesión de los lactobacilos al mucus, sin embargo, el proceso de adhesión parece ser multifuncional y, además de las estructuras proteicas, los exopolisacáridos bacterianos juegan un papel importante que es necesario elucidar (Juge, 2012).

Para simular la adhesión a la mucosa intestinal se han desarrollado distintos modelos *in vitro* que incluyen el empleo de líneas celulares epiteliales (Caco-2 y HT-29), mucus intestinal inmovilizado o matrices extracelulares de moléculas que incluyen colágeno y

fibronectina para determinar las capacidades de adhesión (Vélez, et al., 2007; Lebeer, et al., 2008).

La totalidad del TGI está recubierto por una capa de mucus que a su vez se subdivide en dos cuyo espesor varía a lo largo del TGI: una fuertemente adherida a las células epiteliales y otra débilmente adherida en contacto con el lumen (**Figura 2**) (Atuma, et al., 2001). Por lo tanto, el mucus constituye una barrera físico-química entre el contenido intestinal y el epitelio por lo que es posible utilizarlo para simular el proceso *in vitro* de adhesión (Sánchez, et al., 2012). Además, debido a su papel de protección, las mucinas ricas en glicano tienen preferencia por ciertos tipos de unión con bacterias. Aunque las interacciones mucus-microbiota en el TGI juegan un papel crucial en las relaciones entre patógenos y probióticos con el hospedador, las adhesinas y los ligandos relacionados con la interacción han sido poco estudiados.

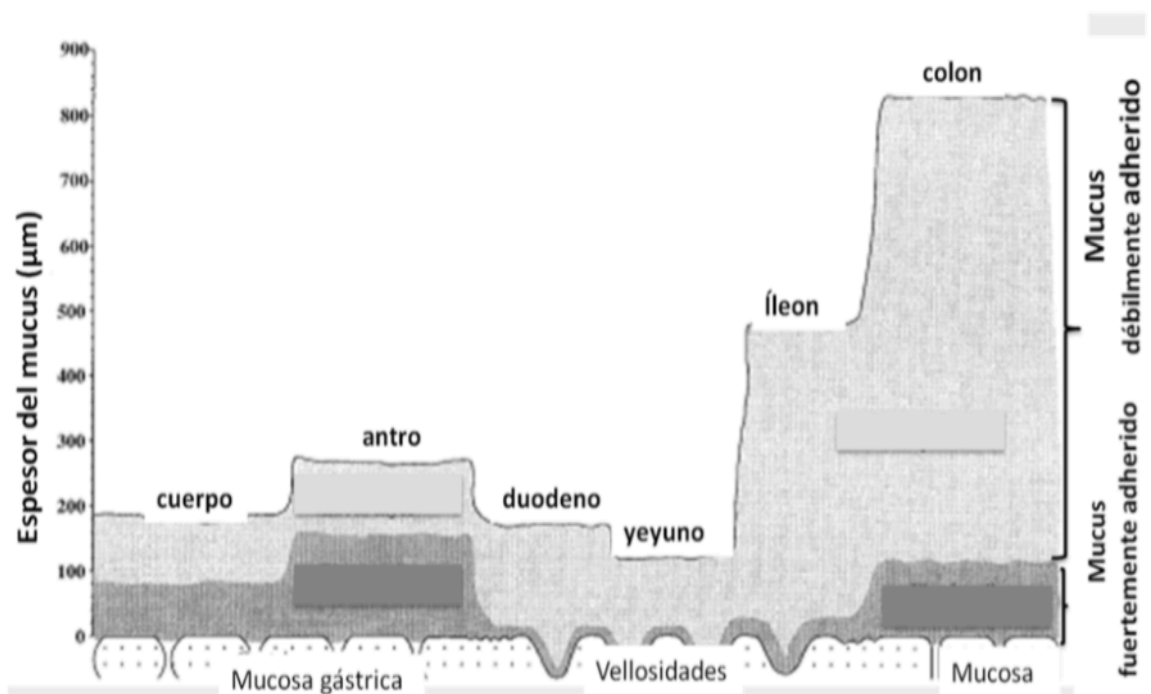


Figura 2. Figura esquemática que muestra el espesor *in vivo* de las dos capas de mucus (la fuertemente adherida y la débilmente adherida) en el cuerpo, antro, duodeno, yeyuno, íleon y colon del tracto gastrointestinal de ratas Wistar macho. Adaptada (Atuma, et al., 2001).

Los mecanismos relacionados con la adhesión bacteriana no se conocen todavía a fondo. Sin embargo, se sabe que existen múltiples factores relacionados con la

adhesión como los tipos de fuerza implicados, la composición de la pared celular y la composición de la superficie a la que se adhieren. Entre las fuerzas responsables de la adhesión se encuentran las fuerzas de Van der Waals y las interacciones ácido-base de Lewis, que a su vez están relacionadas con el comportamiento hidrofílico o hidrofóbico de la superficie celular (Bellon-Fontaine, et al., 1996). La superficie de la pared celular puede estar dominada por la presencia de proteínas superficiales que provee de grupos hidrofóbicos a la pared celular o de exopolisacáridos que otorgan un carácter hidrofílico a la pared celular y que pueden ser responsables de la adhesión de algunas cepas probióticas a la mucosa intestinal (Ruas-Madiedo, et al., 2006).

La colonización gastrointestinal de bacterias tanto patógenas como benéficas depende de la habilidad de las bacterias para adherirse al epitelio que, en el caso de bacterias patógenas se da principalmente por fuerzas hidrofóbicas y por la presencia de proteínas superficiales (Bermudez-Brito, et al., 2012). Las bacterias probióticas pueden contribuir a la barrera intestinal evitando la adhesión de patógenos de manera específica al competir por los lugares de unión a las células epiteliales y a la capa de mucosa. Además, los probióticos pueden promover la secreción de mucus (Ohland & MacNaughton, 2010) y fortalecer la función barrera mediante la producción de exopolisacáridos (tanto capsulares como gelificantes) (Ruas-Madiedo, et al., 2006).

Se han descrito numerosos compuestos extracelulares que contribuyen a la adhesión de manera inespecífica como el ácido lipoteicoico que es responsable de la hidrofobicidad de la membrana celular de los lactobacilos. De manera similar los EPS contribuyen a las propiedades físico-químicas de la superficie celular al igual que las adhesinas (proteínas superficiales de membrana) (Kleerebezem, et al., 2010). Los EPS son polisacáridos de cadena larga secretados al medio ambiente exterior de la célula por bacterias y microalgas. Consisten en unidades repetidas principalmente de glucosa, galactosa, manosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Algunos no se encuentran fuertemente unidos a la superficie celular por lo que pueden ser secretados produciendo una ligera gelificación o pueden encontrarse formando una cápsula fuertemente adherida a la superficie bacteriana.

En algunos patógenos, como *Escherichia coli* O157:H7, la producción de EPS se ha relacionado con la mayor tolerancia a condiciones de estrés térmico, ácido, oxidativo y

osmótico (Chen, et al., 2011). La producción de EPS puede favorecer la adhesión a la mucosa intestinal o inhibirla (**Figura 3**), tanto en bacterias probióticas como patógenas, dependiendo de las características de estos polisacáridos y cómo se encuentran adheridos a la pared celular (Ruas-Madiedo, et al., 2006).

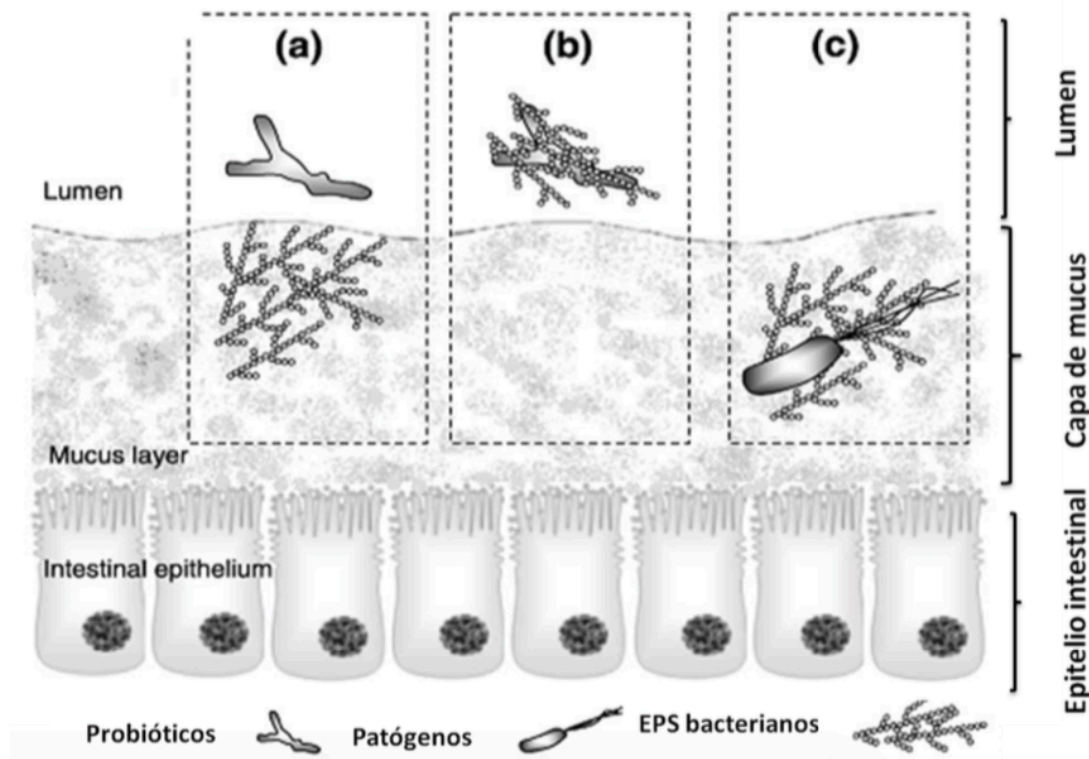


Figura 3. Explicación de la interferencia de los EPS en la adhesión de bacterias probióticas y patógenas en la mucosa intestinal. a) Los EPS pueden adherirse directamente al mucus e inhibir la adhesión de probióticos; b) los EPS pueden adherirse a la superficie del probiótico aumentando la adhesión a la mucosa; c) los EPS de las bacterias patógenas favorecen la adhesión de éstas a la mucosa. Adaptada (Ruas-Madiedo, et al., 2006).

La agregación celular relaciona la adherencia célula-célula entre bacterias de la misma cepa (autoagregación) o entre cepas genéticamente diferentes (coagregación). Esto resulta de mucha importancia en el intestino donde los probióticos son activos. Por un lado, la agregación entre bacterias de la misma cepa o entre bacterias con características probióticas facilita la secreción de sustancias benéficas para el hospedador. La coagregación entre cepas probióticas y cepas potencialmente patógenas puede reducir y/o evitar la actividad patógena al impedir que el patógeno llegue a las células epiteliales. En general, las cepas probióticas presentan mayores

capacidades de autoagregación que las cepas patógenas. Además, se ha reportado que la hidrofobicidad a disolventes apolares se correlaciona en algunos casos con la autoagregación de las cepas (Goktepe, et al., 2006).

La inhibición de bacterias patógenas por algunas BAL incluye diversos mecanismos, como la competencia por los lugares de adhesión y las fuentes de nutrimentos, la secreción de sustancias antimicrobiana, la inactivación de toxinas y la estimulación inmunológica. Los microorganismos con la habilidad de coagregarse con otras bacterias pueden tener ventajas sobre aquellos que no son capaces de agregarse ya que pueden eliminarse con mayor dificultad del medio ambiente intestinal (Collado & Meriluoto, 2008).

2.3.2. Agregación.

Con el fin de manifestar efectos benéficos, las bacterias probióticas necesitan lograr una masa adecuada a través de la agregación. En consecuencia, la capacidad de los probióticos a agregarse es una propiedad deseable (Collado & Meriluoto, 2008). Los microorganismos con la capacidad de coagregación con otras bacterias tales como patógenos pueden tener una ventaja sobre los organismos no agregados, los cuales se eliminan más fácilmente del medio ambiente intestinal (Madsen, 2012).

La agregación bacteriana entre los microorganismos de la misma cepa (autoagregación) o entre cepas genéticamente diferentes (coagregación) es de considerable importancia en varios nichos ecológicos, especialmente en el intestino humano. La autoagregación de cepas probióticas es necesaria para la adhesión a las células epiteliales intestinales (Nola, et al., 2012), mientras que mediante la coagregación puede formarse una barrera que impida la colonización por microorganismos patógenos (Dias, et al., 2013).

Se ha llegado a sugerir que durante la coagregación las bacterias ácido lácticas se vuelven inhibidores de algunas bacterias, lo que permite que estas sean consideradas como un importante mecanismo de defensa del huésped contra la infección. Por lo tanto, se puede deducir que algunos de las propiedades probióticas específicas atribuidas a BAL son gracias a la coagregación de estas (Collado & Meriluoto, 2008).

En general, las cepas probióticas presentan mayores capacidades de autoagregación que las cepas patógenas.

2.3.3. Características de la superficie celular de las bacterias

La adhesión se define como la unión medible entre una bacteria y un sustrato biótico o abiótico (John, et al., 2004). La adhesión bacteriana permite que las bacterias no sean arrastradas por la motilidad intestinal y secreciones, permitiendo que estas puedan instalarse en un lugar apropiado para su crecimiento, ya que los nutrientes tienden a concentrarse en las superficies de sólido-líquido. La capacidad *in vitro* para adherirse a cualquier estructura de la mucosa se ha sugerido como un "criterio de selección" para identificar cepas de probióticos que pueden ser exitosas para colonizar a los seres humanos o animales (Adlerberth, et al., 2000).

Las bacterias pueden ser consideradas como partículas coloidales que viven, y como tales, obedecen a las leyes de la físico-química, siendo para esto necesario para considerar la naturaleza de las células bacterianas, dado que estas no tienen superficie, geometría simple, o composición de la superficie molecular uniforme (Zehnder & van Loosdrecht, 1990). La superficie de las células bacterianas es un factor de mucha relevancia, ya que determina su interacción con la mucosa gastrointestinal influyendo en su localización y en su funcionalidad. Se ha sugerido que la capacidad de adherirse a la mucosa influye en las relaciones con otras bacterias y con el hospedador, en el primer caso alterando la composición local de la microbiota, y en el segundo interaccionando con el sistema inmunitario del hospedador (Katsikogianni & Missirlis, 2004).

La adherencia está mediada por adhesinas bacterianas, que reconocen los receptores de mucosa específicos (Tuomola, et al., 199). En esencia, todas las bacterias presentes en la naturaleza son capaces de expresar adhesinas, las cuales permiten que las bacterias puedan reconocer y unirse en las superficies de destino (Per Klemm & Munk, 2010). La interacción inicial entre la bacteria y la superficie inerte implica más que acción de las adhesinas, esta requiere también de fuerzas físico-químicas no específicas tales como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y polaridad; fuerzas a las que se somete al acercarse a la superficie gastro

intestinal (Vila, et al., 2008). Las propiedades superficiales se pueden caracterizar en términos de su fisicoquímica (es decir, hidrofobicidad de la superficie, la carga y composición química), así como sus atributos físicos (es decir, topología de la superficie y morfología) (Habimana, et al., 2014):

Hidrofobicidad de la superficie. Los materiales hidrofílicos son más resistentes a la adhesión bacteriana que los hidrófobos. Cuando se trata de materiales porosos las propiedades hidrófobas / hidrófilas de la capa activa varían, ya que el ángulo de contacto se ve afectada por la porosidad.

Carga de la superficie de membrana. La carga superficial es dependiente del grado de disociación y por lo tanto el pH de la solución. La carga superficial se compensa por contra-iones en solución creando una doble capa eléctrica en la superficie.

Composición química de la membrana. La unión bacteriana para algunos microorganismos puede ser correlacionada con la química de superficie.

Aspereza. Se acepta generalmente que la rugosidad superficial mejora la adhesión bacteriana, al existir un aumento del área de superficie y depresiones en la superficie son ambos responsables de una mayor colonización

Morfología de la superficie y la microtopografía. Abarca características de la superficie que son generalmente de gran volumen en comparación con los de rugosidad y podría incluir, por ejemplo crestas y depresiones en la superficie de la membrana asociada con el proceso de fabricación.

Las bacterias adquieren su carga superficial debido a la ionización de sus grupos funcionales de la pared celular de tipo ácido-base. En suspensión acuosa, las células bacterianas generalmente tienen una carga neta negativa en su pared celular a pH neutro. Sin embargo, la magnitud de la carga varía de especie a especie y está influenciada por factores tales como la edad del cultivo, la fuerza iónica, medio de crecimiento, el pH y la estructura de la superficie bacteriana. De acuerdo con estudios previos realizados sobre superficies de la membrana, el aumento de electronegatividad de la pared celular bacteriana generalmente llevado a la reducción de la adhesión bacteriana sobre el sustrato (Habimana, et al., 2014).

La Integridad de la membrana de la célula determina la distribución de iones de ambos lados de la membrana celular y, en consecuencia potencial de superficie (es

decir, la distribución de carga en la superficie bacteriana) la cual está relacionada con las condiciones en que crecen las bacterias. Por lo tanto, el potencial de superficie (en forma de potencial zeta) de las células individuales se puede considerar como un índice del estado metabólico de las bacterias (Gomez Zavaglia, et al., 2003) y, en particular, la presencia de sales biliares en medios de cultivo afecta la superficie bacteriana de microorganismos (Schar-Zammaretti, et al., 2005; González-Vázquez, et al., 2014).

Para que existan interacciones entre las bacterias y la superficie, es necesario que se encuentren a una distancia mínima de 50nm, cuando esto ocurre aparece una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals, lo cual sucede debido a un efecto dipolo entre átomos o moléculas. A medida que se va acercando a la superficie y a una distancia más corta que la interacción por las fuerzas de Van der Waals, aparece una fuerza de repulsión debida a la carga negativa de la bacteria y del material que suelen ser del mismo signo. A esta fuerza se le denomina "potencial zeta". De la interacción de estas dos fuerzas depende el mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material y es lo que se denomina energía libre de Gibbs. Cuando la bacteria llega a una distancia de 2nm se puede predecir que la adhesión será irreversible, sin embargo a una distancia de 10 nm la situación es crítica ya que la bacteria, dependiendo de su tamaño y otros factores, puede adherirse reversible o irreversiblemente (Ábalos, 2005).

Las estructuras de la superficie celular también afectan a la adhesión microbiana a superficies sólidas. Se ha concluido que existen apéndices celulares los cuales se dividen en polisacáridos y nanofibras, cuya función es tender un puente entre el cuerpo de la célula y un sustrato. Los polisacáridos se dividen a su vez en dos clasificaciones más, los lipopolisacáridos, los cuales se compone de lípido A, polisacáridos básicos, y una región ultra periférica de O unidades de antígeno; y sustancias exopoliméricas. De igual forma las nanofibras se dividen en pilis (complejos de varios tipos de subunidades de proteínas), adhesina portavehículos (nanofibras monoméricas u oligómeros cortos en bacterias Gram-negativas) y en nanofibras únicas, clasificación que abarca dos tipos de nanofibras: "tallo" (adhesina de polisacárido) y "hamus" (posee una "región de gancho" en la punta y una "región cosquilleo" en el tallo central (Hori & Matsumoto, 2010).

2.4. Potencial zeta

El potencial zeta se utiliza para medir las cargas electrostáticas de las superficies celulares. En prácticamente todos los aspectos de la biología de las bacterias, las propiedades de la pared celular y de la superficie de las bacterias son de importancia. Las bacterias también están en sistemas que pueden modificar la composición de la superficie durante la fase de crecimiento, o en reacción a cambios en la composición del medio (Ubbink & Schär-Zammarett, 2007). Estos cambios en la composición de la superficie se reflejan posteriormente en cambios en sus propiedades coloidales (Schar-Zammaretti, et al., 2005).

Las interacciones bacterianas y la adhesión son fenómenos complejos que implican generalmente las interacciones no específicas coloidales y eventos de unión específica; el equilibrio entre los dos, dependiendo del tipo de bacteria, estado de la superficie de acogida y las condiciones ambientales. Dos parámetros coloidales se consideran generalmente de gran importancia en el análisis de las propiedades de la superficie bacteriana (Rosenberg, 2006): la hidrofobicidad de la superficie y la movilidad electroforética o potencial zeta (Ubbink & Schär-Zammarett, 2007).

El potencial zeta es definido como el potencial eléctrico de una partícula cargada en el plano de cortadura, el cual usualmente hace referencia en la descripción de las partículas en solución. El potencial zeta se muestra como un lugar cerca del plano de corte, en el límite de la capa difusa (Hunter, 1986). El plano de corte, o el plano de deslizamiento, es la distancia desde la superficie hasta la distancia en solución en la que las moléculas de disolvente no están ligados a la superficie y no se mueven como una unidad con la partícula. En este límite, el potencial zeta puede ser determinada y una densidad de carga puede inferir (Adamson, 1958).

El potencial zeta depende de la carga iónica de la bacteria y de la superficie del material, pero también tiene una influencia el medio iónico en el que están sumergidas estas superficies (Wilsona, et al., 2001; Bravo-Ferrada, et al., 2015). Normalmente, alrededor de la bacteria y del material en donde ambos tienen con carga negativa, se forma una concentración de hidrogeniones del medio en el que se encuentre para neutralizar la carga. Dependiendo de la ionización del medio se necesitará una capa mayor o menor para neutralizar la carga, obteniendo en las dos superficies una doble

capa. Así, en medios iónicos altos la doble capa es muy delgada y permite un mayor acercamiento entre las dos superficies. Sin embargo, en medios iónicos medios o bajos, la doble capa es de mayor grosor y la distancia de la bacteria a la superficie sólida es mayor, ya que la bacteria se detiene cuando las dobles capas entran en contacto. El resultado de estas interacciones es el mayor o menor acercamiento de la bacteria a la superficie del material. Cuando la bacteria llega a una distancia de 2 nm se puede predecir que la adhesión será irreversible, sin embargo a una distancia de 10 nm esta será reversible o irreversible. Según la teoría Deryaguin-Landau-Verwey-Oberbeek (DLVO) a distancias mayores, la adhesión puede considerarse reversible (Ábalos, 2005).

El Potencial zeta es un valor absoluto para la carga de superficie bacteriana, que bajo la mayoría de condiciones fisiológicas tiene un valor negativo. Desde carga se correlaciona inversamente con la hidrofobicidad, en donde la ausencia de una carga superficial o un valor cercano a 0 mV indicarán mayor afinidad de las bacterias a las interfaces hidrófobos (de Wouters, et al., 2015).

La teoría DLVO es una hipótesis cualitativa, que describe la posibilidad o no de que la adhesión sea reversible o irreversible, pero en ningún modo cuantifica la adhesión. Una vez que la bacteria está cerca de la superficie sólida, entran en juego las fuerzas de corto alcance, donde la interacción de fuerzas es sustituida por una serie de fuerzas adhesivas, que tienen un carácter de enlace primario, ya sea iónico o covalente. A veces existe una separación entre las dos superficies, pero es debido a los polisacáridos extracelulares fabricados por los microorganismos involucrados (Poortinga, et al., 2002).

Para llevar a cabo la adhesión se involucran interacciones fisicoquímicas, tales como fuerzas de largo alcance de Van der Waals, fuerzas electroestáticas de medio alcance e interacciones hidrofóbicas y polares de corto alcance (Weerkamp, et al., 1988). En general, las interacciones electroestáticas juegan un rol importante en el proceso de adhesión, por ejemplo permitiendo que microorganismos con bajo potencial zeta se adhieran en mayores cantidades (Weerkamp, et al., 1988), mismo comportamiento reportado por diferentes autores en múltiples tipos de pruebas (Marjorie, et al., 1987).

La superficie de la célula bacteriana es altamente dinámica y responde a los cambios ambientales a través de la adsorción de iones y componentes macromoleculares, que son grupos cargados que no solo pueden asociarse o disociarse de los cambios en el pH o la fuerza iónica del fluido de suspensión, sino también del enfoque de una superficie cargada, ya sea de otra bacteria o un sustrato. Esto, además, puede inducir cambios en la conformación de diferentes tipos de apéndices superficiales, tales como pilis, fimbrias o flagelos (Mozes, et al., 1991). Por otra parte, la superficie de la célula bacteriana puede ser penetrable a los disolventes y solutos, en iones particulares, ya sea debido a la presencia de una capa de peptidoglicano como en las bacterias Gram-positivas, la presencia de apéndices de la superficie o un limo cápsula. Dentro de la pared celular bacteriana, muchos grupos están presentes y la distribución de estas cargas influye en las interacciones eléctricas de la doble capa durante la adhesión bacteriana; a diferencia de muchos coloides sintéticos en donde las cargas eléctricas en el plano de la superficie externa determina su interacción con otras superficies. (Poortinga, et al., 2002).

A menor pH los valores de potencial zeta son positivos. La superficie de la célula bacteriana es cargada por la disociación y asociación de grupos de superficie ionizables y adsorción específica, especialmente de cationes multivalentes. Las características de la superficie de células estructurales se presentan como una capa de iones penetrable en la pared celular bacteriana, produciendo una conductividad alta en la superficie. La carga bacterial de superficie celular cambia fuertemente en respuesta a factores ambientales, con ello contribuye a la naturaleza dinámica de las superficies de las células bacterianas (Poortinga, et al., 2002). Varias bacterias han adaptado mecanismos para sobrevivir a medios con diferentes concentraciones de sales biliares (Pumbwe, et al., 2007).

2.5. Hidrofobicidad

La adhesión microbiana a superficies sólidas es un paso importante en el proceso de degradación y / o patogenicidad de los alimentos en la industria alimentaria y en el de formación de biopelículas (Bellon-Fontaine, et al., 1996). Estudios más recientes han demostrado que la hidrofobicidad de las superficies sólidas influye en la adherencia de

bacterias, células eucariotas y proteínas (Oliveira, et al., 2001). Por otro lado, las bacterias y otros microorganismos, incluyendo partículas virales, han desarrollado muchas formas diferentes de utilizar el efecto hidrófobo con el fin de adherirse a sustratos (Doyle, 2000). De hecho, existen razones de peso para creer que el efecto hidrófobo puede ser la principal fuerza impulsora para la adhesión de la mayoría de los patógenos (Duncan-Hewitt, 1990).

A pesar de la reconocida importancia del efecto hidrófobo, ha sido difícil dar una definición satisfactoria de este concepto (Doyle, 2000). Las definiciones de hidrofobicidad se han dado en términos de principios termodinámicos o desde un punto de vista hipotético. Este último se debía principalmente a los intentos de explicar reconocimiento biológico sobre la base de las interacciones hidrofóbicas que se producen entre la enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, lectina-carbohidrato o adhesina-receptor (Oliveira, et al., 2001). Desde un punto de vista químico, Blokzijl & Engberts (1993) dieron la siguiente definición detallada de hidrofobicidad: "A temperaturas y presiones moderadas, compuestos apolares son poco solubles en agua". Tradicionalmente, la resistencia de los compuestos apolares a disolver en agua se ha atribuido a la hidrofobicidad de estos compuestos, en otras palabras, su miedo al agua. De hecho, el término hidrofobia es engañosa. Las interacciones de dispersión de London entre agua y compuestos apolares son favorables y bastante abundantes. Es más apropiado señalar que el compuesto apolar debe entrometerse en un líquido que se caracteriza por una muy alta densidad de energía de cohesión. Cada molécula de agua está fuertemente inclinada a no sacrificar ninguno de sus enlaces de hidrógeno, lo que lleva inevitablemente a la reorientación significativa de las moléculas de agua en la superficie de la molécula de soluto no polar.

La hidrofobicidad es probablemente debido, a una interacción compleja entre los componentes con carga negativa, con carga positiva, hidrófobos e hidrófilos en la superficie de las bacterias. Muchas investigaciones sobre los mecanismos fundamentales que rigen este fenómeno han demostrado la participación de estática e interacciones de Van der Waals electromagnéticas, y más recientemente de interacciones de los ácidos de Lewis en "carácter electrón-aceptor / donador electrón" (Bellon-Fontaine, et al., 1996). La hidrofobicidad relativa de células bacterianas se ha

determinado por varios métodos, tales como la adherencia microbiana a los hidrocarburos, cromatografía de interacción hidrófoba, la agregación en la presencia de diferentes soluciones de sales y la adhesión a filtros de nitrocelulosa.

La adherencia microbiana a los hidrocarburos ha sido ampliamente utilizada para medir la hidrofobicidad de la superficie celular de las bacterias, como la adhesión a la superficie de las células huésped, la cual determina la capacidad de colonización de bacterias, que es un paso crucial en el establecimiento de los probióticos en el intestino. La adhesión bacteriana a los hidrocarburos (BATH) ha sido ampliamente utilizada para estimar el componente físico-químico en las capacidades de adherencia de las cepas bacterianas. Este método indirecto cuantifica la hidrofobicidad de la superficie de las bacterias mediante la cuantificación del porcentaje relativo de bacterias retenidas en una fase hidrófoba después de la mezcla con una fase acuosa que contiene el cultivo bacteriano inicial. Sin embargo, la lectura de la prueba BATH está fuertemente influenciada por el disolvente utilizado, el pH experimental, y la fuerza de la mezcla aplicada (de Wouters, et al., 2015).

El método de adhesión BATH se basa en el método de adhesión a los hidrocarburos (MATH, por sus siglas en inglés) el cual se utilizó desde 25 años atrás, este se basa en el grado de adherencia de las células a varios hidrocarburos apolares seguido de un periodo de fuerte agitación. Los hidrocarburos son capaces de adsorber una parte de las bacterias debido a las fuerzas hidrofóbicas que presentan y que se puede medir de manera indirecta a través de la disminución de la absorbancia en la fase acuosa (Rosenberg, et al., 1980). Como la solubilidad del hidrocarburo en la solución reguladora es muy baja, el sistema se comporta como un sistema de tres fases: la fase acuosa (la solución reguladora), la fase orgánica (el hidrocarburo) y los microorganismos (fase sólida). La fase acuosa se encuentra completamente saturada por el hidrocarburo (fase orgánica) por lo que se pueden medir los microorganismos adsorbidos al hidrocarburo. La cantidad de hidrocarburos que son adsorbidos por la pared celular depende de la cepa y posiblemente de las condiciones de crecimiento así como de la disponibilidad de hidrocarburo (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003).

La adhesión, como todas las interacciones de los microorganismos con su ambiente, es un fenómeno superficial en el que participan las características físico-químicas de la

superficie de la bacteria y las de la superficie (biótica o abiótica) a la que se adhiere. En el caso de bacterias Gram positivas, la superficie celular está formada por una membrana celular, la cual en algunos casos por una cápsula externa de polisacáridos (EPS capsulares) y compuestos de origen proteico (mayoritariamente adhesinas, glicoproteínas) (Sánchez, et al., 2012). La composición de la pared celular, está formada mayoritariamente por la presencia de carbohidratos y proteínas confiere a la superficie celular un carácter hidrofílico o hidrofóbico (Palmer, et al., 2007).

La hidrofobicidad y la carga superficial bacteriana puede diferir entre las cepas de las especies, los cambios con la variación en el estado fisiológico de las células, con la composición de los medios de suspensión o podría implicar la expresión de proteínas asociadas a la superficie variables entre las cepas. Pelletier, et al. (1997) informó de las propiedades físico-químicas de superficie de la célula microbiana, incluyendo la presencia de material proteínico (glicol) en los resultados de la superficie celular en mayor hidrofobicidad, mientras que las superficies hidrófilas se asocian con la presencia de polisacáridos.

La capacidad de autoagregación es uno de los factores clave que determinan la capacidad de la cepa probiótica de adherirse a la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la capacidad del tracto urogenital, mientras que la coagregación ayuda a la creación de una barrera que impide la colonización por patógenos (Abdulla, et al., 2014). Estudios anteriores con lactobacilos han mostrado variabilidad de hidrofobicidad de la superficie y una correlación lineal entre la hidrofobicidad y su unión a polímeros hidrófobos (Tsuneda, et al., 2003).

2.6. Análisis morfométrico y fractal

La microscopía permite realizar análisis cuantitativos y cualitativos de estructuras y características espaciales de microorganismos y/o comunidades bacterianas (Liu, et al., 2001). El análisis de imagen mediante software analiza de manera eficaz imágenes, convirtiéndolas en modelos numéricos que ayudarán a predecir aspectos de función y estructura.

Los microorganismos bacilares pueden tener diferentes respuestas dependiendo de las concentraciones del sustrato, esto debido a su relación superficie/volumen a

comparación de bacterias de forma más esférica (Storck, 2014). Sin embargo; existen factores de estrés, los cuales pueden causar cambios en las bacterias ya sean morfológicos o de tamaño, los cuales pueden ser por limitación de nutrientes, presencia de sales, cambios de pH, daño en ADN, exposición a antibióticos entre otros (Palmfeldt, 2000). Las técnicas computarizadas de análisis de imagen permiten el análisis de datos significativamente relevantes de poblaciones microbianas. La microscopía óptica permite analizar la morfología de las bacterias de manera semi cuantitativa ya que los márgenes de error en las mediciones pueden ser grandes en partículas de menos de 3 μm , mientras que la microscopía de barrido electrónico permite realizar el análisis morfométrico tanto de tamaño como de forma con alta precisión.

Cinco grandes tipos de información en el análisis microbiano pueden ser considerados gracias a la extracción y segmentación de imágenes microscópicas. Estos incluyen el reconocimiento de la diversidad morfológica celular, la abundancia de células, acomodo espacial, procesos metabólicos y relaciones filogenéticas de las células entre sí y su entorno. El proceso de análisis de imágenes semiautomático de células para evaluar estos aspectos de las comunidades microbianas se puede dividir principalmente en cuatro etapas: (I) la adquisición de imágenes, la digitalización y la segmentación para localizar las células; (II) la medición automática para extraer características de interés; (III) la clasificación de diferentes tipos de células; y (IV) el análisis estadístico, los cálculos y la interpretación de los datos (Liu, et al., 2001).

La morfología de las partículas es un factor determinante del comportamiento de las mismas, en donde muchas de las propiedades físicas y químicas de estos sistemas dependen de la geometría de forma de las partículas y la superficie. Así, la caracterización morfológica de las partículas es de gran importancia para diferentes áreas de conocimiento. Un sistema de análisis de imagen comprende al menos un microscopio conectado a una cámara fotográfica o de vídeo, conectado a su vez a un sistema de procesamiento a una computadora la cual convierte una imagen de la analógica en forma digital (es decir, una matriz de píxeles), esto conforme a los criterios especificados por el usuario, y (b) se aplica otros algoritmos para caracterizar el tamaño y la forma de las partículas identificadas en la imagen (Sergio Almeida-Prieto, 2007). El análisis de imágenes permite medir la forma de la partícula factores y proporcionar

información valiosa, entre estos factores se encuentra: área, perímetro, circularidad, relación de aspecto, Feret, etc. (Olson, 2011). El análisis de imagen para figuras esferas o elípticas involucra el análisis de diferentes parámetros de análisis, para así definir de mejor manera los cambios morfológicos reflejados en valores numéricos; siendo parámetros como relación de aspecto (AR por sus siglas en inglés) y circularidad aquellos que determinan mejor los cambios morfológicos de estos (Anneke, 2004). La circularidad es un criterio de exclusión para el análisis, el cual sirve para discriminar partículas que son más o menos esféricas, está definida por la siguiente ecuación:

$$circularidad = 4\pi(\text{área}/\text{perímetro}^2)$$

Ecuación [1]

La circularidad está considerablemente ligada con los parámetros de área y perímetro, mostrando valores menos circulares al tener partículas de un mismo perímetro pero de áreas pequeñas (Yasuhiro, 2016). Valores superiores a 0.8 son valores considerados esféricos (Ebeling, 2014). La relación de aspecto (AR) está definida como la relación entre la distancia mínima y máxima de los límites de la partícula a su centroide (Liu, 2001), esta es definida por la siguiente ecuación:

$$AR = \text{Longitud del eje mayor} / \text{Longitud del eje menor}$$

Ecuación [2]

La AR indica que tan alargada es una figura (Anneke, 2004), lo cual a su vez indica que a una relación de aspecto con valor 1, la circularidad tendrá un valor a 1 dando como resultado una partícula con forma circular (Podzeck, 1999; Yasuhiro, 2016). Mientras mayor sea la relación de aspecto, menor será la circularidad (Yasuhiro, 2016).

La geometría fractal es una rama muy joven de las matemáticas. Mandelbrot en 1986 dio una definición bastante intuitiva de conjunto fractal: “un conjunto en el que las partes son similares al total, en algún sentido”. La geometría fractal es una teoría construida con el fin de caracterizar de manera apropiada objetos irregulares. El concepto de fractal (Mandelbrot 1983), ha sido empleado como un método capaz de caracterizar formas irregulares presentes en la naturaleza o creadas por el hombre. Algunos investigadores han establecido que la dimensión fractal (DF) se correlaciona bastante bien con la percepción visual humana de regularidad o “suavidad” frente a la de irregularidad o “rugosidad” de los perfiles de las superficies.

A partir de los ensayos de Mandelbrot sobre geometría fractal, se desarrolló una nueva ciencia, rama de las matemáticas, llamada geometría fractal. Esta nueva geometría se basa en el uso de algoritmos y dimensiones fraccionarias a diferencia de la tradicional geometría euclidiana que utiliza modelos matemáticos y dimensiones enteras. La geometría de fractales permite describir las morfologías de la naturaleza, mismas que no son adecuadamente descritas por la geometría euclidiana.

La palabra “fractal” proviene del latín *fractus*, que significa “fragmentado”, “fracturado”, o simplemente “roto” o “quebrado”, términos muy apropiados para objetos cuya dimensión es fraccionaria. El término fue acuñado por Benoît Mandelbrot en 1977 apareciendo en su libro “The Fractal Geometry of Nature”. Al estudio de los objetos fractales se le conoce, generalmente, como geometría fractal.

Un fractal es un conjunto matemático que puede gozar de autosimilitud a cualquier escala, su dimensión no es entera o si es entera no es un entero normal. El hecho que goce de autosimilitud significa que el objeto fractal no depende del observador para ser en sí, es decir, si tomamos algunos tipos de fractales podemos comprobar que al hacer un aumento doble el dibujo es exactamente igual al inicial, si hacemos un aumento 1000 comprobaremos la misma característica, así pues si hacemos un aumento n , el dibujo resulta igual luego las partes se parecen al todo. Un fractal viene a ser el producto final que se origina a través de la iteración infinita de un proceso geométrico bien especificado. Este proceso geométrico elemental, que es generalmente de naturaleza muy simple, determina perfectamente la estructura final, que muy frecuentemente, debido a la repetición infinita que se ha efectuado, tiene una complicación aparente extraordinaria.

2.7. Modelado descriptivo

Un modelo predictivo microbiológico de alimentos es una expresión matemática, el cual describirá el crecimiento, sobrevivencia, inactivación y procesos bioquímicos de los microorganismos, esta área usualmente es denominada como microbiología predictiva (Whiting, 1995).

La microbiología predictiva es una disciplina que se basa en la aplicación de modelos matemáticos que describen y predicen el crecimiento, supervivencia e inactivación

microbiana así como sus procesos bioquímicos en condiciones específicas. Generalmente bajo factores o condiciones controladas como pH, actividad de agua (aW), temperatura, concentraciones de antimicrobianos, etc. (Gastelum-Reynoso & Lopez-Malo, 2008).

Un requisito lógico e imprescindible para la confección de un modelo matemático adecuado es la obtención de datos apropiados que describan los efectos de diferentes factores en el desarrollo bacteriano. La estrategia a seguir para la confección de un modelo predictivo de crecimiento bacteriano consta según Roberts y Jarvis (1983) de las siguientes fases: desarrollo, recopilación de datos y validación.

En el desarrollo de un modelo, es esencial conocer los requisitos de este. Los experimentos deben ser diseñados de tal manera para hacer el mejor uso del tiempo y los recursos. Para llevar a cabo el desarrollo de un modelo es requerido una generación de datos, los cuales dependiendo de la cantidad, llevara a una mayor precisión y fiabilidad del modelo derivado (McDonald & Sun, 1999). Tras el desarrollo de modelos a partir de datos experimentales, un modelo debe ser validado en situaciones reales (Baranyi, et al., 1996). Habiendo obtenido un modelo que parece adecuado, se le enfrenta a datos experimentales, acción denominada como validación. Los estudios de validación deben demostrar que los microorganismos se comportan de manera similar tanto en el laboratorio como en un sistema alimentario de verdad (McDonald & Sun, 1999).

2.7.1. Modelo cinético y de probabilidad

Dentro de un modelo predictivo, el uso de ciertas funciones matemáticas es la base de la clasificación de los modelos. Lo más importante es que un modelo esté basado en cinética y en probabilidad (Whiting, 1995). Los primeros calculan la vida microbiológica de los productos alimentarios, es decir, el período de tiempo durante el cual el número de microorganismos en el alimento es menor que un determinado valor. Los últimos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifica las condiciones de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento (Md. Fakruddin, 2011).

Los modelos cinéticos pueden diferir en su enfoque. Un enfoque común es el modelo de velocidad de crecimiento de un organismo y su uso para la predicción basada en el

crecimiento exponencial de dicho microorganismo. En ambos enfoques, los modelos se construyen con la ayuda de una cuidadosa recolección de datos del número de microorganismos, bajo el estudio de criterios intrínsecos y extrínsecos, tales como temperatura, pH y aW (Whiting, 1995).

Los modelos cinéticos pretenden explicar el tiempo que toma un crecimiento específico, en términos de variables ambientales. Se pueden incluir algunas otras variables como gases en la atmósfera, potencial redox, estructura biológica, humedad relativa, contenido nutricional y propiedades antibacterianas (Baranyi & Roberts, 1995).

2.7.1.1. Cinética

La cinética es una rama de la ciencia natural que se ocupa de los tipos y mecanismos de cualquier proceso físico, químico o biológico. Los estudios cinéticos en el área de la microbiología cubren las diferentes áreas, como lo son: crecimiento, supervivencia y muerte, la formación de productos, adaptaciones, mutaciones, ciclos celulares, efectos ambientales y las interacciones biológicas (Panikov, 2002). En el caso concreto de que el objeto de estudio sean las reacciones químicas, la disciplina implicada se denomina cinética química.

La cinética química se encarga de determinar la rapidez de las reacciones químicas y tiene, como objetivo el estudio de los factores que influyen en la rapidez de un proceso químico, como lo son la temperatura, los cambios de concentración de reactantes, la adición de catalizadores, modificación de pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, etc. (Engel, et al., 2007). De igual forma se conocen procesos microbiológicos que se producen con gran rapidez, mientras que otros son muy lentos y poco apreciables a periodos de tiempo cortos, esto mediante un tipo de energía suministrada, la cual en muchas ocasiones es por influencia de la temperatura. De manera usual cuanto mayor sea la energía de activación, menor será la velocidad de la reacción llevando a un cambio neto de energía por el cual las reacciones se clasifican como: Exotérmicas (cuando existe liberación de energía en forma de calor durante una reacción) y endotérmicas (cuando la energía es suministrada del entorno para efectuar una reacción).

2.8. Cinética química

La cinética química estudia las velocidades de las reacciones químicas y los mecanismos a través de los cuales esta se produce. La velocidad de reacción es la velocidad con la que desciende o aumenta la concentración de un producto durante una reacción (Mahan & Myers, 1987). La velocidad de reacción se puede expresar a través de una ecuación cinética similar a :

$$v = k[A]^n$$

Ecuación [3]

Donde k es la constante cinética, A es el reactivo y n es el orden de reacción. De acuerdo a este último parámetro las cinéticas pueden clasificarse en orden 0, primer orden, segundo orden y tercer orden (Logan, 2000) (**Cuadro 4**), siendo la de primer orden la más encontrada en la naturaleza (Petrucci, et al., 2011).

Cuadro 4. Orden de reacción.

Orden de reacción	Unidades de la constante de velocidad	Función de la concentración igual a kt
0: orden cero	$mol\ dm^{-3}\ s^{-1}$	x
1: primer orden	s^{-1}	$\ln[a/(a-x)]$
2: segundo orden	$dm^2\ mol^{-1}\ s^{-1}$	$\frac{x}{a(a-x)}$
3: tercer orden	$dm^6\ mol^{-3}\ s^{-1}$	$\frac{a^2 - (a-x)^2}{2a^2(a-x)^2}$

Una reacción de primer orden tiene una ecuación de velocidad cuya suma de exponentes $m+n+\dots$, es igual a 1; este tipo de reacción estará determinada por la ecuación de velocidad de reacción:

$$Velocidad\ de\ reaccion = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k[A]$$

Ecuación [4].

Siendo la ecuación integrada para esta reacción de primer orden la siguiente:

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -kt \quad o \quad \ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0$$

Ecuación [5].

En donde A_t es la concentración de A para el tiempo, A_0 es la concentración para $t=0$ y k es la constante de velocidad. Las cinéticas químicas no solo involucran factores como la velocidad, si no que se espera que estas aumenten su velocidad por influencia de la temperatura, la cual al ser disminuida retrasaría a la misma. Este tipo de proceso es fácilmente explicado por la ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Ecuación [6]

donde A es una constante dependiente de la reacción. Según esta ecuación, k aumenta de modo exponencial cuando aumenta la temperatura, en ella aparecen dos parámetros: La energía de activación (E_a), la cual está relacionada con la barrera de energía que deben superar los reactivos para transformarse en productos; y el factor pre exponencial o factor de frecuencia (A). El modo más cómodo de trabajar con la ecuación de Arrhenius es transformarla en su forma linealizada. Si se aplican logaritmos neperianos a ambos lados de la igualdad, se obtiene:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T}$$

Ecuación [7]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La microbiota intestinal juega un papel importante en el manteniendo de la salud humana. Para que las bacterias benéficas (probióticas) puedan ejercer dicho efecto, es necesario que puedan adherirse a las superficies epiteliales del tracto gastrointestinal. Como un requisito previo a esto, se ha reportado la necesidad de que las bacterias puedan agregarse entre sí (autoagregación) para generar una masa celular tal que puedan ejercer un efecto significativo en la salud.

La agregación de las bacterias se ve afectada por factores medioambientales del sistema gastrointestinal como son: el pH, temperatura, sales y enzimas. Estas condiciones pueden modificar la morfología y la fisiología bacteriana y, por tanto, de capacidad de agregación. El conocimiento del efecto de los factores sobre la agregación puede ayudar a entender los mecanismos de agregación para desarrollar productos con probióticos más eficaces.

El trabajo que se presentó consistió en evaluar la relación existente entre la auto-agregación y las propiedades de la superficie celular de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v en condiciones simuladas de pH intestinal durante 24 h.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. Objetivo general

Determinar las características superficiales en condiciones simuladas de pH intestinal de auto-agregados de *Lactobacillus plantarum* 299v

4.2. Objetivos específicos

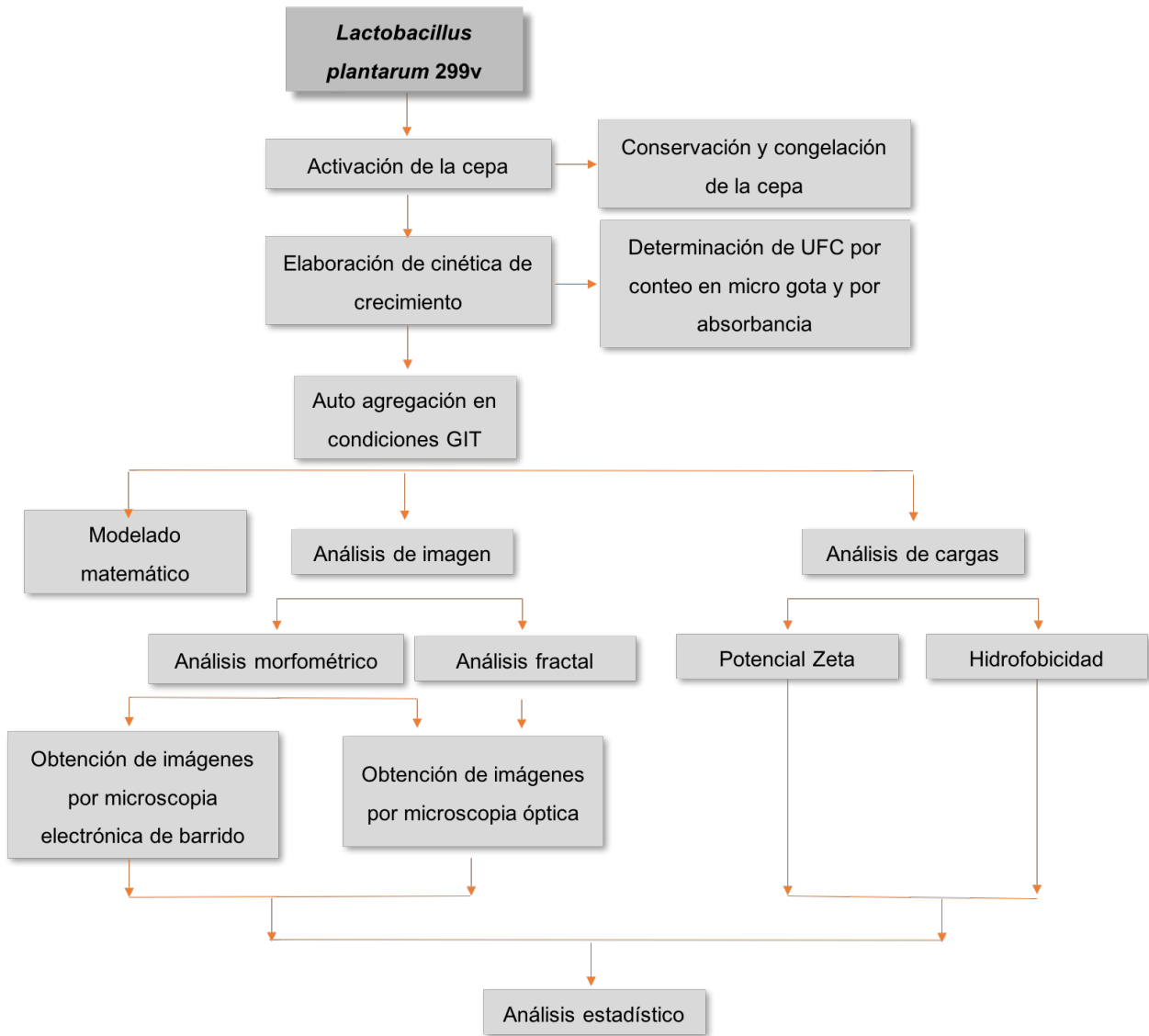
- Determinar las cinéticas de auto-agregación durante 24 h de *Lactobacillus plantarum* 299v por método espectrofotométrico a diferentes condiciones de pH
- Realizar un análisis morfométrico y fractal de las bacterias autoagregadas durante 24 h a diferentes pH.
- Determinar las características fisicoquímicas de la superficie celular de las bacterias autoagregadas durante 24 h a diferentes pH.
- Determinar la existencia de interacciones entre las modificaciones en la superficie celular, su morfología y fractalidad en las bacterias auto-agregadas durante 24 h a diferentes pH.
- Elaborar un modelo matemático ajustado a las cinéticas de agregación obtenidas a 24h a diferentes pH.

4.3. Hipótesis

Las características de la superficie celular en diferentes condiciones fisiológicas modificaron la autoagregación de *Lactobacillus plantarum* 299v.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Esquema general



5.2. Aspectos generales

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Maestría en Ciencias Alimentarias del Instituto de Ciencias Básicas perteneciente a la Universidad Veracruzana con dirección Av. Dr. Rafael Sánchez Altamirano s/n, Col. Industrial Ánimas, carretera Xalapa-las trancas Km 3.5, C.P. 91190 en Xalapa, Veracruz, México.

5.3. Materiales

5.3.1. Materia prima

La cepa *Lactobacillus plantarum* 299v fue aislada del producto comercial Protransitus LP® (Barcelona, España)

5.3.2. Reactivos

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

Agar Bacteriológico (BD Bioxon, México).

Agar Difco™ Lactobacilli MRS, (Difco, Le Point de Claix, Francia).

Agua destilada tipo II.

Buffer PBS ajustado a pH 3.6, 5.0, 7.0, 9.0 (**Ver Anexo 7.3**)

Buffer Sorensen pH 7.4 (**Ver Anexo 7.4**)

Caldo Difco™ Lactobacilli MRS, (Difco, Le Point de Claix, Francia).

Cloroformo ($CHCl_3$)

Cloruro de Potasio (KCl)

Cloruro de Sodio (NaCl)

Etanol 100% (Sigma-Aldrich, U.S. A.).

Etanol 97% (Sigma-Aldrich, U.S. A.).

Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4)

Fosfato de sodio dibasico (Na_2HPO_4)

Fosfato de sodio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)

Glicerol ($C_3H_8O_3$)

Glutaraldehído 25% (Electron Microscopy Sciences, Inglaterra).

Hexadecano (Sigma-Aldrich, U.S. A.).

Hidróxido de Sodio (NaOH)

Solución Glutaraldehído 2.5% (**Vér Anexo 7.6**)

Solución piraña (H_2O_2 y H_2SO_4 , 4:1) (**Ver Anexo 7.4**)

5.3.3. Equipos

Analizador de potencial zeta plus (Brookhaven Instruments, New York, EUA).

Autoclave, (Vactech, India)

Balanza Analítica Precisa, (modelo XT220A, Suiza).

Balanza Denver Instrument, (modelo PAX-1502. New York, E.U.A).

Baño maria (BÜCHI Heating Bath B-490, Suiza).

Baño Maria (Oakton 12501-00, Vernon Hills, E.U.A.).

Cámara digital (Nikon DS-Vi 12.11 Megapíxeles, Tokio, Japón).

Campana de siembra (CBS Scientific, modelo P-030-202-55, E.U.A.).

Centrifuga de ependorf (ESPRESSO Thermo Scientific, modelo11210800, China).

Centrifuga refrigerada (Hettich Universal 32R, modelo D-78532, Alemania).

Congelador Biomédico (Sanyo, modelo MDF-U5411, Japón).

Desecador (Scienceware Z553395, U.S.A.).

Espectrofotómetro (UV-Visible Jasco, modelo SSE-343 V530, Japón).

Incubadora a 37 °C (Binder BF 115-UL, Alemania).

Ionizador de metales (Quorum Q150R S, Inglaterra).

Micro centrifuga refrigerada (Eppendorf Centifuge 5424 R, Alemania).

Microscopio electrónico de barrido (SEM) (FEI Quanta Feg 250, U.S.A.).

Microscopio óptico (Nikon Eclipse Ci-E, Tokio, Japón).

Mini centrífuga (SM1008, Science MED, Finlandia).

Parrilla eléctrica de agitación con calentamiento (MIDSCI, SH-1500, E.U.A.).

Pipeta automática de 1 mL (Science MED, Finlandia).

Pipeta automática de 10 µL (Science MED, Finlandia).

Pipeta automática de 100 µL (Science MED, Finlandia).

Pipeta automática de 5 mL (Science MED, Finlandia).

Potenciómetro (Hanna, modelo pH211, E.U.A.).

Refrigerador (LG Express Cool Turbo GR-T546GV, Corea del Sur).

Secador por punto crítico (Quorum k850, Inglaterra).

Termo registrador (DeltaTrak 20902, México).

Ultrasonido (Leo B20Q, Taiwan).

Vortex (Genie 2 Scientific Industries modelo G560, E.U.A.)

5.4. Métodos

5.4.1. Activación, conservación de la cepa

La cepa utilizada para esta investigación fue Lp299v (Protransitus LP®, Barcelona, España). Lp299v se activó a partir de su forma comercial en caldo MRS; posteriormente, se garantizó su pureza mediante la técnica de cultivo en placa (agar MRS) y se tomó una colonia para su proliferación.

Se resuspendió en 100 ml de Caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Difco, Le Point de Claix, Francia) y se incubó a 37 °C por 24 horas. La cepa fue almacenada a 8°C en solución agua-glicerol (50:50 v/v) en microtubos estériles (0.5 mL). Se centrifugó a 1500x g durante 15 min. a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados de 50 mL con buffer salino de fosfatos (PBS pH 7.0); la biomasa obtenida, se utilizó en las formulaciones para las pruebas posteriores. Lp299v se guardó en congelación (-20°C) en caldo MRS con glicerol al 20% como crio protector hasta su uso posterior. La densidad óptica de las suspensiones bacterianas a 560 nm en PBS se ajustó a 1 ± 0.02 nm.

5.4.2. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* 299v

Se realizó una cinética de crecimiento de Lp299v (Protransitus LP®, Barcelona, España) donde se identificaron las etapas y velocidad de crecimiento, determinando las horas de incubación en las que termina la fase exponencial y comienza la fase estacionaria. Se resuspendió la cepa en 100 mL de caldo MRS (Difco, Le Point de Claix, Francia) estéril y se incubó a 37 ± 1 °C de 24 horas. Se prepararon los blancos correspondientes de caldo MRS; se analizó cada hora la DO 600 nm, donde se obtuvo una cinética de crecimiento del microorganismo LP299v, se realizó esta actividad por triplicado.

5.4.3. Autoagregación

La cepa se resuspendió en caldo MRS a 37°C por 24 h en condiciones aeróbicas, se centrifugó para obtener el precipitado a 10000 g, 10 min (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA), posteriormente se lavó dos veces con tampón fosfato salino (Buffer PBS) (NaCl 8 g/L ; KCl 0.2 g/L; Na₂HPO₄·2H₂O 1.44 g/L; KH₂PO₄ 0.24 g/L; pH 5.0, 7.0

y 9.0) y fue resuspendida en el mismo buffer. Se ajustó la absorbancia a 1 (600nm) (Espectrofotómetro UV-Visible Jasco, modelo SSE-343 V530, Japón) con el fin de estandarizar el número de bacterias (Collado, Meriluoto and Salminen 2007). Se prepararon alícuotas de 5 ml con la suspensión de la bacteria en solución buffer PBS previamente ajustada, para posteriormente ser agitadas en vórtex durante 10 segundos (Vortex Genie 2 G560, Scientific Industries, USA). Las alícuotas se incubaron a 35, 37 y 39 °C durante 24 h, leyendo la absorbancia del sobrenadante en intervalos de 2 h. La agregación fue determinada con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ autoagregación} = \left(1 - \frac{\text{Abs sobrenadante}}{\text{Abs inicial}} \right) * 100$$

Ecuación [8]

Los resultados se expresaron en porcentaje. Las pruebas se realizaron por triplicado para su posterior análisis.

5.4.4. Obtención de imágenes por microscopía óptica

Durante las cinéticas de agregación, se tomaron gotas de 10 µL en intervalos de 2h durante 24 h a 35, 37 y 39°C con una pipeta Pasteur previamente esterilizada. La gota fue colocada en portaobjetos previamente funcionalizados con solución piraña (ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno 4:1 v/v) para posteriormente ser secados en flama. Las imágenes fueron tomadas usando una cámara digital (Nikon DS-Vi 12.11 Megapixel, Tokio, Japón) adaptada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ci-E, Tokio, Japón) siendo vistas en el software NIS- Elements F2.30 a un aumento de 100x con una resolución 1280 x 960 pixeles, almacenadas en formato *.tiff.

5.4.5. Toma de imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizaron tres cinéticas a pH 5.0, 7.0 y 9.0, de las cuales se tomaron los precipitados correspondientes a 0, 4 y 24h. La muestra se fijó con solución de Glutaraldehído al 2.5% durante 4h, para posteriormente realizar 3 lavados con Buffer Sorensen a pH 7.4 y centrifugando a 2500 g, 10min, 10°C en una micro centrifuga refrigerada (Eppendorf Centifuge 5424 R, Alemania). El tapón se deshidrató de manera gradual de 10% en 10% partiendo de alcohol 30% hasta llegar a alcohol 100% en donde se realizaron tres lavados, durante cada cambio se centrifugo la muestra a 3500

g, 5 min, 10°C; posterior al cambio de alcohol se deshizo el tapón con ayuda de Vortex (Genie 2 Scientific Industries modelo G560, E.U.A.).

Para el análisis de las muestras, se funcionalizaron porta-muestras de metal, los cuales fueron previamente limpiados, pulidos y pasados por Ultrasonido (Leo B20Q, Taiwan) por 5 min. Una vez secos se colocó la muestra para posteriormente llevarla a un secador por punto crítico (Quorum k850, Inglaterra) para su secado con CO₂ líquido. Una vez secada la muestra esta recibió un baño de oro con un Ionizador de metales (Quorum Q150R S, Inglaterra). Las muestras se mantuvieron en un desecador (Scienceware Z553395, U.S.A.) a 15% H.R., para posteriormente ser vistas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) (FEI Quanta Feg 250, U.S.A.).

5.4.6. Análisis de imagen

El análisis de imagen fue realizado mediante el software ImageJ v1.50d (<http://imagej.nih.gov/ij>) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Se tomaron al menos tres campos de cada muestra o cinética de agregación. Se analizaron varios algoritmos y modelos de agregación para calcular los parámetros de dimensiones geométricas y fractal. Por último se convierte la imagen a una pseudo-binaria mediante la adaptación de umbrales (threshold), el cual se ajusta automáticamente y manualmente para definir los contornos de objetos individuales y produciendo de este modo una imagen binaria. Las imágenes fueron guardadas en formato * .tiff. El área, perímetro, diámetro y aspecto Feret de especies individuales se obtuvieron como parámetros geométricos, la dimensión fractal del contorno (DF) y lagunaridad se determinaron mediante el uso de FraCLac plug.in v2.5 para ImageJ.

5.4.7. Potencial zeta

La medición del potencial zeta se realizó en un analizador de Zeta Plus (Zetaplus Brookhaven Instruments, Holtsville, Nueva York, EE.UU.) siguiendo la metodología propuesta por Ayala-Torres et al., 2013, con algunas modificaciones. Lp 299v se hizo crecer en condiciones aerobias, se recuperó el sobrenadante por centrifugación (10.000 g, 15 min), se lavó con PBS previamente ajustado a un D.O. 600 nm 1.0 con el mismo PBS. La temperatura de las muestras se controló a 37 °C con un baño de agua (BÜCHI

Calefacción Baño B-490, Suiza). potencial 3 fue monitorizada a las 0, 2, 4, 16, 20 y 24 h a pH 5,0, 7,0 y 9,0. Los resultados se analizaron con el software zetapw32 5.58 (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, Nueva York, EE.UU.).

5.4.8. Hidrofobicidad

El método de adhesión bacteriana a los hidrocarburos (BATH, por sus siglas en inglés) se basa en el grado de adherencia de las bacterias a varios hidrocarburos apolares seguido de un periodo de fuerte agitación. El método MATH fue determinado modificando el método clásico propuesto por Bellon-Fonaine et al., 1996. Las cepas de lactobacilos crecieron aproximadamente 16 h bajo condiciones aerobias y las suspensiones bacterianas fueron recolectadas por centrifugación (3,000 x g, 20 min, 4 °C), lavadas dos veces en una solución fosfatos salina (PBS; pH 7.0) y se volvieron a suspender en la misma solución reguladora. Posteriormente, se tomaron 4 mL de cada suspensión bacteriana previamente ajustados a una absorbancia a 560 nm de 0.48 ± 0.08 y se pusieron en contacto con 1 mL de de cada hidrocarburo apolar (xileno, n-octano y n- hexadecano). Los tres disolventes poseen características similares de polaridad / polarizabilidad. El sistema de dos fases se mezcló por agitación en vortex durante 120 s. Posteriormente, se dejó reposar los tubos durante 1 h en un baño de agua a 37 °C para permitir la separación entre fases. Finalmente, se determinó la absorbancia a 560 nm de las fases acuosas. El porcentaje de hidrofobicidad de cada disolvente se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Hidrofobicidad (H\%)} = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) * 100$$

Ecuación [9]

Donde:

A_i es la absorbancia a 560 nm de la fase acuosa al principio del experimento (sin el disolvente) y,

A_f es la absorbancia a 560 nm de la fase acuosa al final del experimento.

Para describir las propiedades de aceptor y/o donante de electrones (como las propiedades ácido / base de Lewis) de las células microbianas, se realizó la prueba de MATS que utiliza dos disolventes polares, el cloroformo, un aceptor de electrones y el

acetato de etilo, un donante de electrones siguiendo el método desarrollado por Bellon-Fontaine, *et al.*, 1996 con el mismo método que en el caso anterior.

5.4.9. Modelado matemático

Para la elaboración del modelo matemático se prepararon soluciones reguladoras de PBS a pH 3.6, 5.0, 7.0 y 9.0 (**Ver Anexo 8.4**). Para la elaboración de la cinética se realizaron cinéticas de autoagregación adicionales a las utilizadas para la toma de imágenes a un pH adicional (pH 3.6) y a dos temperaturas adicionales (35 y 39°C); esto con el fin de tener más puntos en la elaboración del modelo.

La energía de activación(E_a en Jmol^{-1}) se calcula a partir de las constantes cinéticas (k_{agg}) a cuatro diferentes pH y tres temperaturas, con una ecuación de tipo Arrhenius:

$$k_{agg} = c_{eq} e^{\frac{E_a}{RT}}$$

Ecuación [10]

Una vez calculada E_a y K_o , se podrá estimar con la forma linealizada la temperatura isocinetica.

$$k_o = c_{eq} e^{\frac{E_a}{RT_B}}$$
$$\ln k_o = \ln c_{eq} + \frac{E_A}{RT_B}$$

Ecuación [11]

En donde c_{eq} es la constante cinética de equilibrio predicho para todos los valores de pH cuando la agregación se lleva a cabo a la temperatura isocinética (TB) (Aguilar, et al., 2016).

5.4.10. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA (Sigma Plot 12.5, Systat Software, USA) para determinar la significancia estadística de los parámetros morfométricos analizados durante el análisis de imagen. Se hicieron comparaciones de medias por el método Holm-Sidak con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 299v

Se realizó una cinética de crecimiento de *Lp299v* identificando las etapas de la curva de crecimiento, Fase logarítmica [I], exponencial [II] y estacionaria [III]; encontrando que a las 24h se encontraba en la fase estacionaria, por lo que es a este tiempo al cual se incubó *Lp299v* para preparar los inóculos de cada tratamiento experimental.

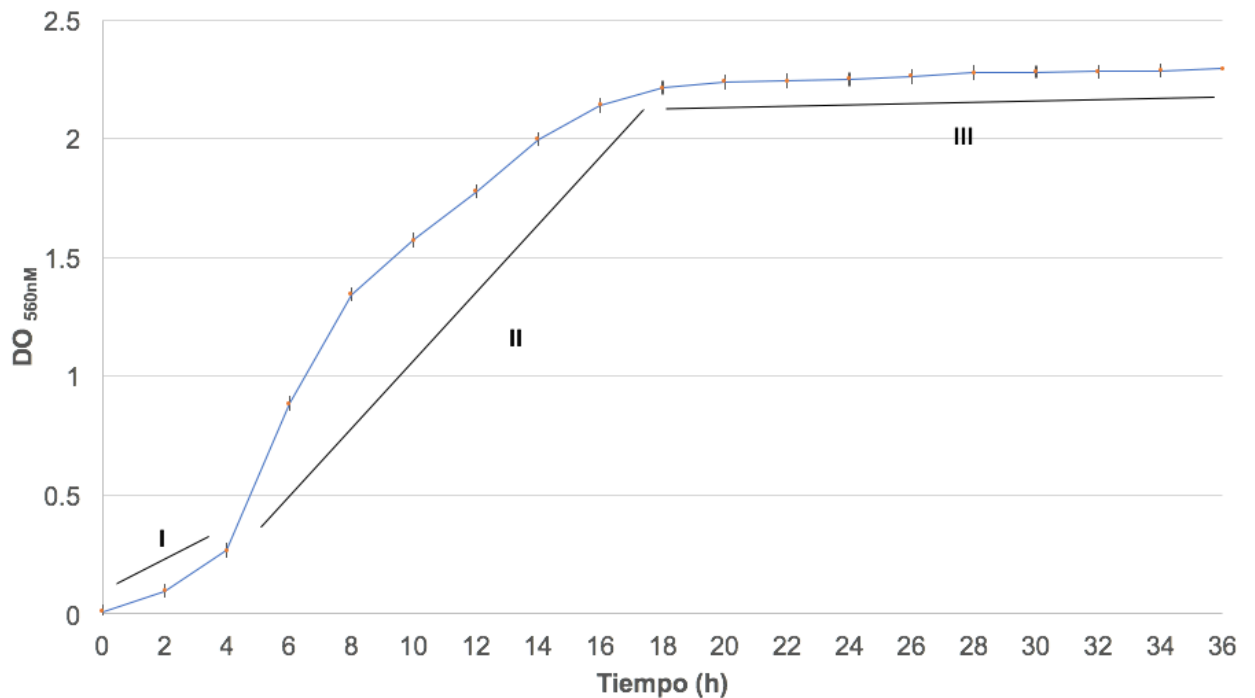


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Lp 299v* en caldo MRS

Estudios realizados por Lian et al., (2002) y Guevara (2009) indican que la mejor etapa de recuperación del microorganismo para pruebas es la estacionaria, por ser la fase de crecimiento donde es más resistente a condiciones de estrés. Con la finalidad de que la cepa se encontrara en fase estacionaria se tomaron 24 horas como el tiempo de incubación Absorbancia a 560 nm de 2.255 ± 0.06 .

6.2. Cinéticas de autoagregación de *Lactobacillus plantarum* 299v

Para la selección de las concentraciones con las que se desarrollaron las cinéticas, se realizaron pruebas preliminares donde se tomó como inicio de la prueba diferentes absorbancias del microorganismo (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5), donde para cada una se midió la absorbancia del sobrenadante en intervalos de 2 horas, por triplicado, dando como resultado la siguiente cuadro (**cuadro 5**):

Cuadro 5. Cinéticas de autoagregación a distintas absorbancias iniciales.

	A=.25	A=.50	A=.75	A=1	A=1.25	A=1.50
0 h	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
2 h	26.172 ± 0.781	24.851 ± 0.795	24.647 ± 0.275	25.494 ± 0.099	26.020 ± 0.376	16.555 ± 0.134
4 h	31.771 ± 0.983	32.207 ± 0.398	32.496 ± 0.333	32.642 ± 0.673	32.459 ± 0.279	19.181 ± 0.139
6 h	40.885 ± 0.597	39.298 ± 0.414	38.713 ± 0.625	40.020 ± 0.356	40.541 ± 0.443	21.206 ± 0.556
8 h	45.052 ± 0.813	43.009 ± 0.639	43.078 ± 0.425	42.523 ± 0.206	42.766 ± 0.210	23.921 ± 0.193
10 h	46.745 ± 0.451	43.738 ± 0.398	43.739 ± 0.275	44.071 ± 0.453	43.985 ± 0.321	24.522 ± 0.215
12 h	47.917 ± 0.597	44.599 ± 0.414	44.753 ± 0.275	44.895 ± 0.206	45.204 ± 0.200	26.101 ± 0.306
14 h	50.260 ± 0.597	46.587 ± 0.414	47.972 ± 0.275	47.760 ± 0.302	48.145 ± 0.321	27.971 ± 0.134
16 h	50.781 ± 1.033	49.304 ± 0.398	49.559 ± 0.202	50.033 ± 0.399	49.868 ± 0.279	28.705 ± 0.241
18 h	52.865 ± 0.902	49.636 ± 0.500	50.353 ± 0.425	50.296 ± 0.261	50.662 ± 0.200	30.329 ± 0.444
20 h	51.042 ± 0.813	51.889 ± 0.717	51.235 ± 0.275	51.252 ± 0.411	50.026 ± 0.165	32.977 ± 0.353
22 h	53.255 ± 0.597	53.413 ± 0.607	52.425 ± 0.425	52.899 ± 0.347	43.641 ± 0.287	24.433 ± 0.241
24 h	41.276 ± 2.289	49.238 ± 0.607	50.176 ± 0.501	49.835 ± 0.206	41.044 ± 0.408	17.401 ± 0.168

Los valores son la media en % de agregación ± desviación estándar, n=3.

En el **cuadro 5** se muestra que la absorbancia del sobrenadante disminuye de manera constante a lo largo de las primeras 18 h, incrementando nuevamente a partir

de las 20 h. Se seleccionó la absorbancia de 1, ya que es la que muestra de manera más precisa los incrementos durante la cinética. Las pruebas de agregación se repitieron a las temperaturas de 35, 37 y 39°C y bajo los pH 5.0, 7.0 y 9.0.

Los resultados a 37° y pH 5, 7 y 9 se muestran en la figura 5 con una absorbancia inicial a 600 nm de 1.000.

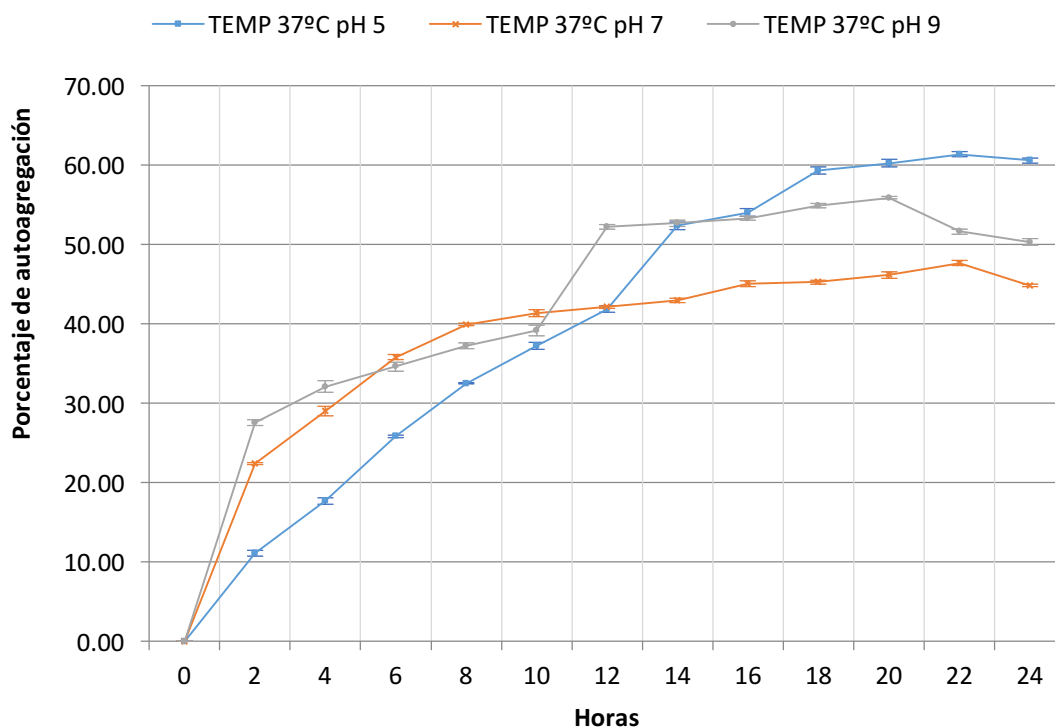


Figura 5. Cinética de autoagregación a 37°C pH 5.0, 7.0 y 9.0 a 600 nm durante 24 h. Barras de desviación estándar (SD) a partir de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

La auto-agregación resultó dependiente de tiempo ($P < 0,001$), pero no del pH ($P = 0,166$). La máxima autoagregación se observó a las 22 h en pH 5.0 (61.37 ± 3.06) siendo a pH 9.0 la máxima autoagregación a las 4h, tiempo en el que se encuentra en el intestino delgado (32.1 ± 7.0). Se realizaron conteos en placa para determinar la población a los tiempo 0, 4 y 24h, encontrando una población de $2.86 \times 10^8 \pm 0.08$ UFC/mL en los tres tiempos sin diferencias significativas por lo que la cepa pudo sobrevivir durante las 24 h que duró la cinética.

6.3. Potencial zeta

Para determinar cómo los cambios en el pH y el tiempo afectan las características de la superficie celular *Lp 299v*, se evaluó el potencial zeta. Se midió el potencial zeta de *Lp 299v* a lo largo de la cinética de agregación de 37°C con un pH 5.0, 7.0 y 9.0. Los valores obtenidos se reflejan en el cuadro siguiente (**Cuadro 6**)

Cuadro 6. Valores de potencial zeta obtenidos en cinética de agregación a 24 h a 37°C y pH 5.0, 7.0 y 9.0.

	Tiempo	Potencial Zeta (mV)
pH 5	0 h	-4.98 ± 0.25
	2 h	-10.8 ± 0.55
	4 h	-11.09 ± 0.14
	16 h	-10.03 ± 0.41
	18 h	-10.04 ± 0.56
	20 h	-7.9 ± 0.46
	22 h	-2.61 ± 0.49
	24 h	-0.22 ± 0.41
pH 7	0 h	-9.94 ± 0.35
	2 h	-11.14 ± 0.38
	4 h	-13.77 ± 0.29
	16 h	-15.05 ± 0.44
	18 h	-12.3 ± 0.22
	20 h	-12.99 ± 0.56
	22 h	-11.14 ± 0.34
	24 h	-5.39 ± 0.15
pH 9	0 h	-7.71 ± 0.63
	2 h	-9.94 ± 0.49
	4 h	-14.79 ± 0.40
	16 h	-16.81 ± 0.73
	18 h	-17.30 ± 0.58
	20 h	-15.04 ± 0.25
	22 h	-15.26 ± 0.39
	24 h	-14.24 ± 0.10

Los valores son la media ± desviación estándar, n=3.

En los valores obtenidos se puede apreciar el comportamiento del potencial zeta en los diferentes pH, en donde el potencial zeta tiende a disminuir en las primeras 18h aumentando después de las 20 h. En pH 5 se puede observar que, a pesar de ser un medio ácido y por esto mismo tener mayor potencial zeta, este valor no es bajo al inicio de la cinética (-4.98 ± 0.25 mV), el cual al culminar la misma adquiere valores similares a 0; este comportamiento se observa en el resto de las tomas, siendo el pH más neutro el que posee valores de menor magnitud.

El potencial zeta de *Lp 299v* agregado a diferentes pH y tiempo se examinó en solución amortiguadora PBS para amortiguar la solución en los diferentes pH. Se pudo observar que para todas las muestras bacterianas, el potencial zeta fue negativo en todo el rango de pH. El análisis de ANOVA por dos vías mostró que el potencial zeta era independiente del pH ($P < 0,05$) pero no del tiempo ($p = 0,033$; $F = 3,125$). Todas las muestras mostraron potenciales zeta negativos. El potencial zeta más negativo dio a pH 9,0 y 18 h (-17.310 ± 0.578 mV), siendo la más alta a pH 5,0 y 24 h ($-0.215 \pm 0,4172$ mV). El potencial zeta negativo indica la presencia de compuestos aniónicos en la superficie celular tales como ácido teicoico, polisacáridos ácidos y proteínas (Dertli, et al., 2015)

Las bacterias intestinales se encuentran bajo constante competencia por los nutrientes y la colonización. El aumento de la adhesión en el intestino se considera como una gran ventaja entre los microorganismos, en donde el potencial zeta es un parámetro significativo, debido a que este está asociado con la hidrofobicidad de los mismos, valor que tiende a ser mayor adquiriendo valores cercanos a 0 mV (de Wouters, et al., 2015). La capacidad de las bacterias de adherirse es dependiente de las características fisicoquímicas y de la superficie de la bacteria, en donde una menor hidrofobicidad y valores más negativos de potencial zeta indican una baja capacidad de agregación.

6.4. Hidrofobicidad

Para determinar cómo los cambios en el pH y el tiempo afectan las características de la superficie celular *Lp299v*, se evaluó la hidrofobicidad a 37°C y pH 5.0, 7.0 y 9.0. Los valores obtenidos se reflejan en la figura siguiente (**Figura 6**):

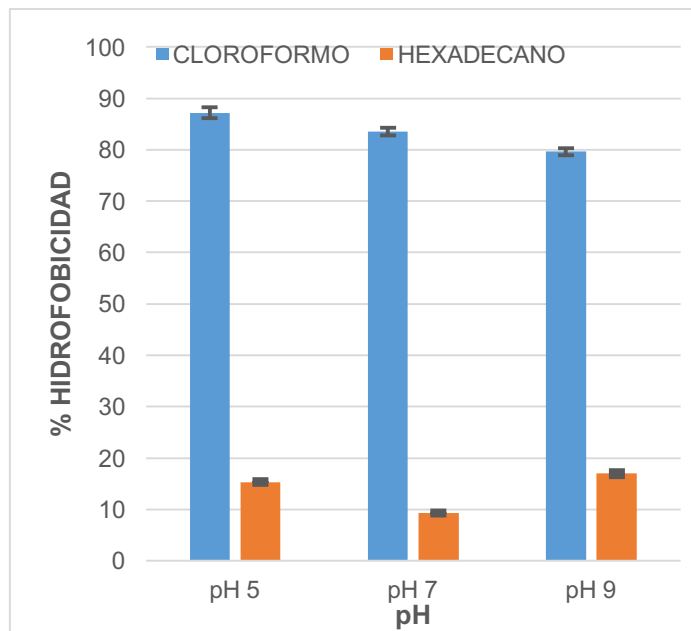


Figura 6. Hidrofobicidad de Lp 299v con hidrocarburos (Cloroformo y n-Hexadecano).

La cepa de Lp299v mostró una mayor hidrofobicidad al cloroformo, denotando así una mayor afinidad a solventes polares, siendo mayor a un pH 5 (87.19 ± 1.10), mismo valor que posee un valor más cercano a 0 mV en potencial zeta (-4.98 ± 0.25 mV), denotando así según varios autores un mayor potencial de adhesión (de Wouters, et al., 2015). Se realizó una correlación de Pearson (**Cuadro 7**), implicando los valores de potencial zeta e hidrofobicidad al hexadecano en donde este fue alto en tiempos de agregación 4 y 22h ($R = -.951$; $R = .984$), denotando así una mayor afinidad a solventes polares en las primeras horas, para posteriormente tener características hidrofóbicas. Cabe destacar, sin embargo, que la correlación resultó negativa durante los tiempos iniciales y positiva en los tiempos más largos indicando que las cargas superficiales bacterianas se modifican durante el tiempo para mantener la autoagregación. Este punto soporta la hipótesis de que la autoagregación se relaciona fuertemente con la hidrofobicidad de la superficie celular (Collado & Meriluoto, 2008). Dado que la autoagregación resultó ser un fenómeno dependiente del tiempo (como se indicó con anterioridad), las bacterias parecen modificar su carga superficial a lo largo del tiempo. La cepa Lp299v exhibió un carácter alcalino y relativamente hidrofílico, tal y como se ha reportado con anterioridad (Muñoz-Provencio, et al., 2009; Melgar-Lalanne, et al., 2013)

Cuadro 7. Coeficiente de correlación de Pearson (R) entre hidrofobicidad al hexadecano (%) y autoagregación a 2,4,20,22 y 24h

Hidrofobicidad al Hexadecano (%)	Autoagregación (%)					
	tiempo	2h	4h	20h	22h	24h
R		-.914	-.951	.806	.984	.971

Los cambios de afinidad se pueden deber a la presencia de EPS en la superficie celular (Yanchun, et al., 2011). Los EPS empiezan su crecimiento en el inicio de los procesos, sin un momento de latencia, lo que conlleva a una reducción de producción de los mismos pasadas las primeras 14h (Ricciardi, et al., 2002), esto podría deberse a que en algunos casos se puede utilizar EPS como fuente energética para las cepas que usualmente los producen (Gientka, et al., 2016), logrando así también una nivelación del pH y cargas del medio en el que se encuentra (De Vuyst, et al., 1998; Cerning, et al., 1994). Sin embargo, también implicaría cambios en la hidrofobicidad, dado que al disminuir la cantidad de compuestos polares (carbohidratos), tornándose a adquirir características más hidrofóbicas(**Figura 7**) (Voet, et al., 2007).

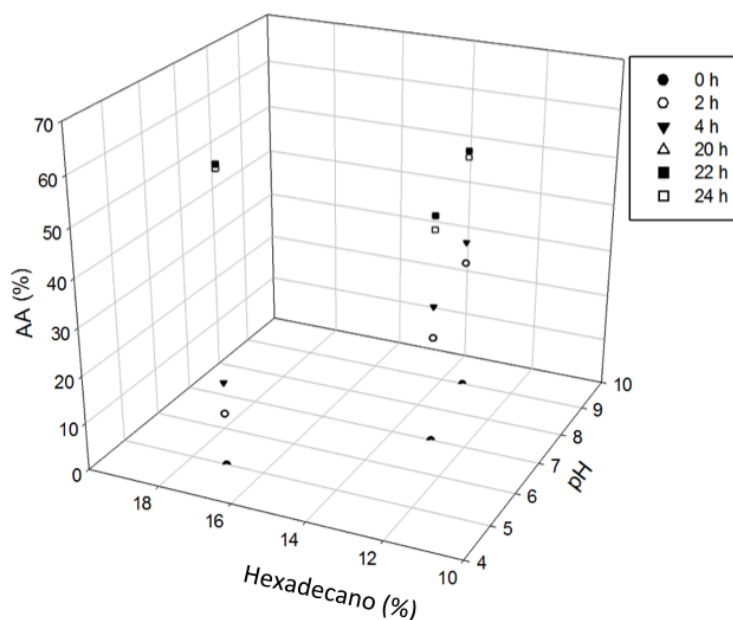


Figura 7. Relación entre, hidrofobicidad al hexadecano y porcentaje de autoagregación a lo largo del tiempo a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0.

En la **Figura 7**, se observa la relación entre hidrofobicidad al hexadecano y autoagregación a los distintos pH.

6.5. Modelo matemático

Los porcentajes auto-agregación obtenidos para cada muestra de cultivo bacteriano se representaron gráficamente como una función del tiempo de duración de ensayo auto-agregación (0-24h) (**Ver anexo 7.10**). Las curvas resultantes de los datos experimentales se ajustaron a un modelo propuesto por Juarez Tomas, et al., (2005) el cual se determinó de la siguiente manera:

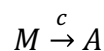
Sea **M**=concentración de probióticos que no están agregados, pero pueden autoagregarse a medida del tiempo

A= concentración de probióticos autoagregados a medida del tiempo

Am= máxima concentración de probióticos autoagregados

C=constante cinética de primer orden para la autoagregación de probióticos

La autoagregación de probióticos puede explicarse, planteando el proceso de “autoagregación” como una reacción de primer orden de la forma siguiente:



De acuerdo a la reacción anterior. La ecuación de la velocidad de autoagregación viene dada por:

$$\frac{dA}{dt} = cM$$

Ecuación [12]

La concentración M de probióticos que no se han autoagregado al tiempo t, pero que tienen la capacidad de autoagregarse, puede expresarse en función de los microorganismos que ya están agregados, utilizando la siguiente ecuación:

$$M = Am - A$$

Ecuación [13]

Sustituyendo la ecuación (13) en la ecuación (12) obtenemos:

$$\frac{dA}{dt} = c(Am - A)$$

Ecuación [14]

Separando variables en la ecuación (14)

$$\frac{dA}{(Am - A)} = c dt$$

Ecuación [15]

para completar la diferencial en la ecuación (15) a la forma $\frac{du}{u} = \ln u$, tomamos

$$u = Am - A, \therefore du = -dA$$

Ecuación [16]

utilizando la ecuación (16) , podemos escribir la ecuación (15) de la siguiente forma:

$$-\left[\frac{-dA}{(Am - A)}\right] = c dt$$

Ecuación [17]

Por lo tanto, la ecuación (17) puede ser escrita como:

$$-d \ln(Am - A) = c dt$$

Ecuación [18]

Las condiciones frontera para integrar la ecuación (28) son:

Si $t = 0, A = 0$

Si $t = t, A = A$

$$-\int_0^A d \ln(Am - A) = c \int_0^t ct$$

$$-[\ln(Am - A) - \ln Am] = c (t - 0)$$

$$\ln\left(\frac{Am - A}{Am}\right) = -ct$$

$$\ln\left(1 - \frac{A}{Am}\right) = -ct$$

$$1 - \frac{A}{Am} = e^{-ct}$$

$$\frac{A}{Am} = 1 - e^{-ct}$$

$$A = Am(1 - e^{-ct})$$

Ecuación [19]

La **Figura 8** muestra las cinéticas de autoagregación obtenidas en Buffer PBS a diferentes pH (3.6, 5.0, 7.0 y 9.0) y temperaturas (35, 37 y 39°C), durante 24h. Se puede observar un cambio en el aumento de la biomasa (A), el cual puede ser atribuido a varios de los factores que están siendo manejados durante el modelamiento.

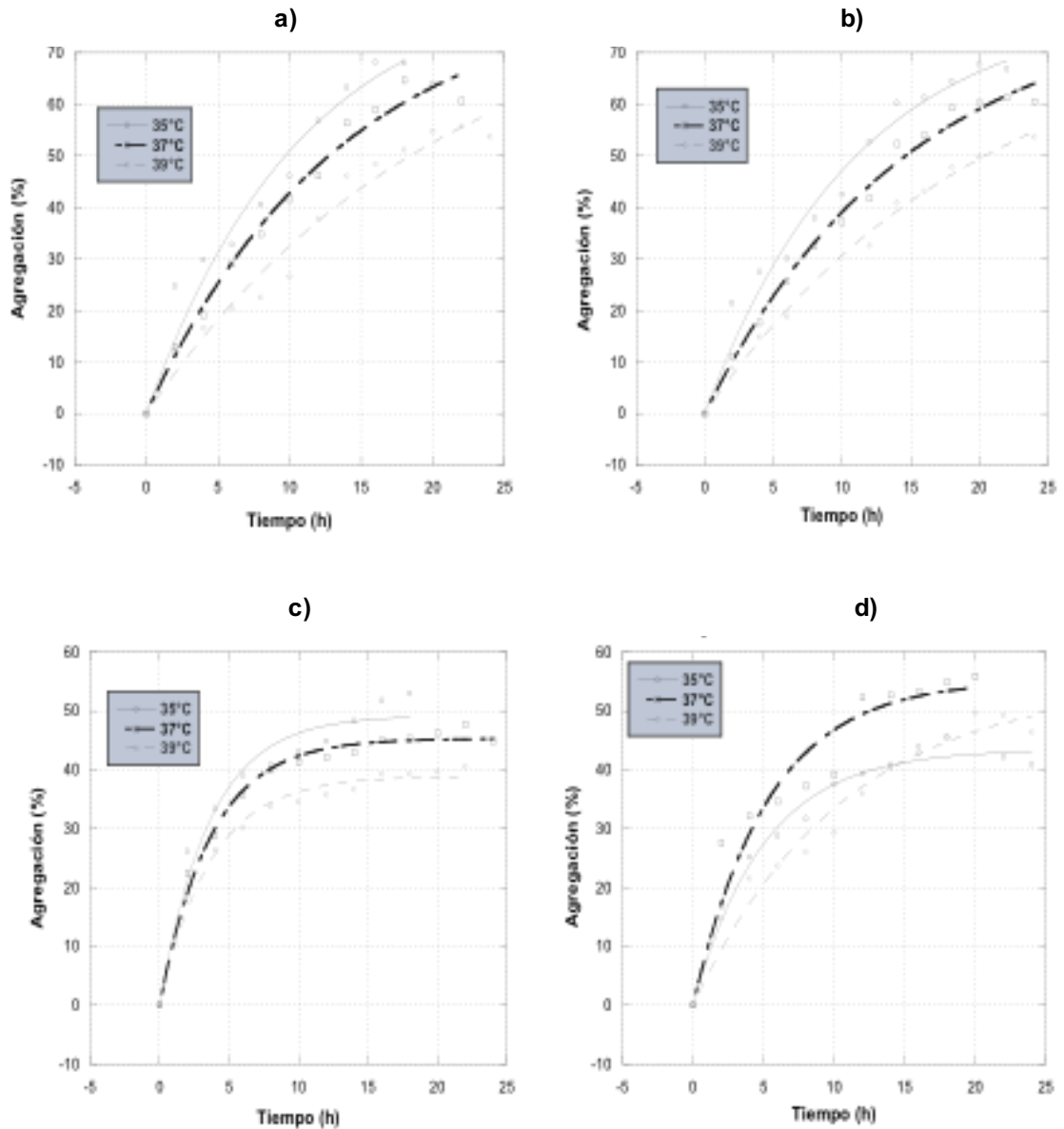


Figura 8. Datos ajustado de datos obtenidos en cinética de autoagregación a pH a) 3.6, b) 5.0, c) 7.0 y d) 9.0

El **cuadro 8** muestra los parámetros de auto-agregación estimados por el modelo de asociación exponencial, a partir de los datos experimentales obtenidos de la

autogregación de Lp 299v se pueden observar cambios significativos a lo largo de las cinéticas tanto con las modificaciones de temperatura como con las de pH del medio.

Cuadro 8. Auto-agregación de Lp299v en diferentes pH y temperatura utilizando el modelo de asociación exponencial.

pH	Temperatura (°C)	C (h ⁻¹)	Am (%)	R
3.6	35	0.0922	84.63	0.979
	37	0.0734	82.38	0.992
	39	0.0485	84.76	0.984
5.0	35	0.0900	79.53	0.987
	37	0.0670	80.14	0.995
	39	0.0490	79.23	0.997
7.0	35	0.2802	49.18	0.982
	37	0.2727	45.29	0.994
	39	0.2718	38.82	0.993
9.0	35	0.1991	43.42	0.990
	37	0.1880	55.24	0.959
	39	0.0946	54.71	0.983

Una vez que E_A y k_o han sido calculadas, se estimó la temperatura isocinética (TB) con la **Ecuación 11** y con la elaboración del grafico del $\ln k_o$ contra los datos de E_a y la obtención de la pendiente.

La **Figura 9** muestra la cinética de compensación obtenida por la autoagregación a diferentes valores de pH, obteniendo una temperatura isocinética (TB)de 31 °C. Cada punto corresponde a la misma reacción pero en un medio con una modificación de pH. Si el gráfico sigue una línea recta, representa el cambio causado en la energía de activación por un cambio en el valor de pH, el cual se compensa por el cambio en el factor de frecuencia (k_o). Este derivado corresponde a la pendiente de la línea recta y tiene unidades de temperatura, esta temperatura define la compensación cinética y ayuda a conocer el punto de equilibrio (Aguilar, et al., 2016).

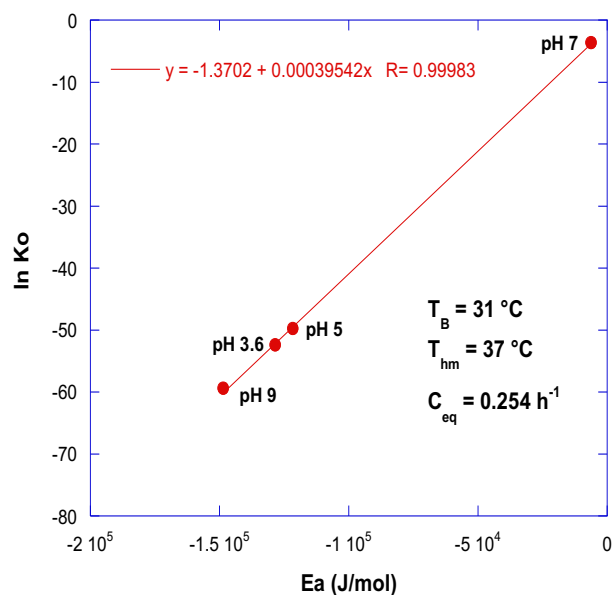


Figura 9. Compensación cinética en el proceso de autoagregación a diferentes pH.

Para todos los valores considerados de pH, el mecanismo que controla la autoagregación es entrópico, ya que la temperatura isocinética ($T_B = 31 \text{ }^\circ\text{C}$) es más baja que la temperatura media armónica ($T_{HM} = 37^\circ\text{C}$). Un control entrópico implica que el parámetro cinético que influye más en el valor de la constante cinética es el factor de frecuencia en lugar de la energía de activación (Aguilar, et al., 2016).

Para cada valor de pH, un aumento de la temperatura podría causar un aumento en la constante cinética; sin embargo, la compensación cinética puede mejorarse utilizando energías diferentes a la energía térmica, como la energía mecánica u otro tipo de energía que ayude a producir agitación en el medio donde se realiza la auto-agregación de los probióticos.

6.6. Micrografías por microscopía óptica en cinéticas de *Lp299v*

Las muestras obtenidas de *Lp299v* de las cinéticas realizadas a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0 se observaron en microscopio óptico. Para la obtención y análisis se tomaron capturas con un objetivo de 100x, de las cuales se obtuvieron capturas por cada hora y en cada una de sus partes (precipitado y sobrenadante obteniendo así imágenes sin procesar como las que se muestren en la **Figura 10**.

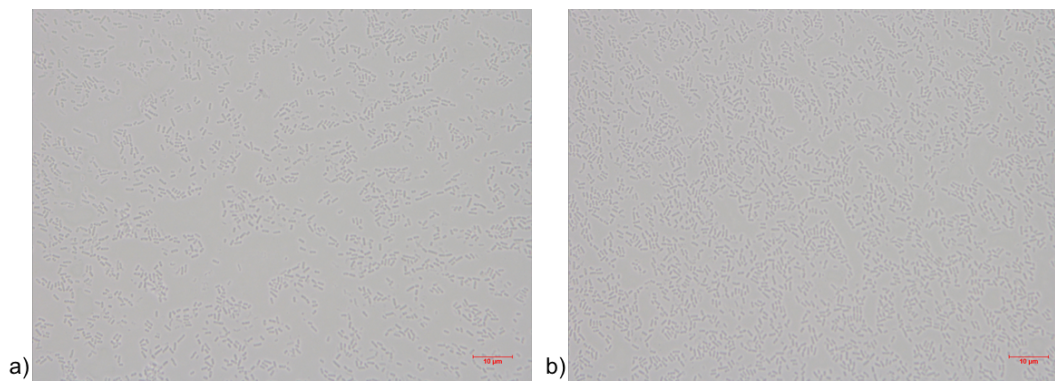


Figura 10. Micrografías obtenidas por microscopía óptica a 100x de cinéticas de agregación a 37 °C, pH 9 y 4 h en su a)precipitado y b)sobrenadante.

6.6.1. Análisis de imagen

Para el análisis de imagen se utilizó el software ImageJ v1.50d, el cual fue de gran ayuda para procesar las imágenes obtenidas durante las cinéticas de agregación. Cada una de las micrografías obtenidas fueron procesadas de manera individual y manual, acorde a las características particulares de cada una de ellas.

La imagen se abrió desde el software para ser procesada File → Open → Selección del archivo, se ajustó la escala durante la toma de las micrografías (**Figura 11**).

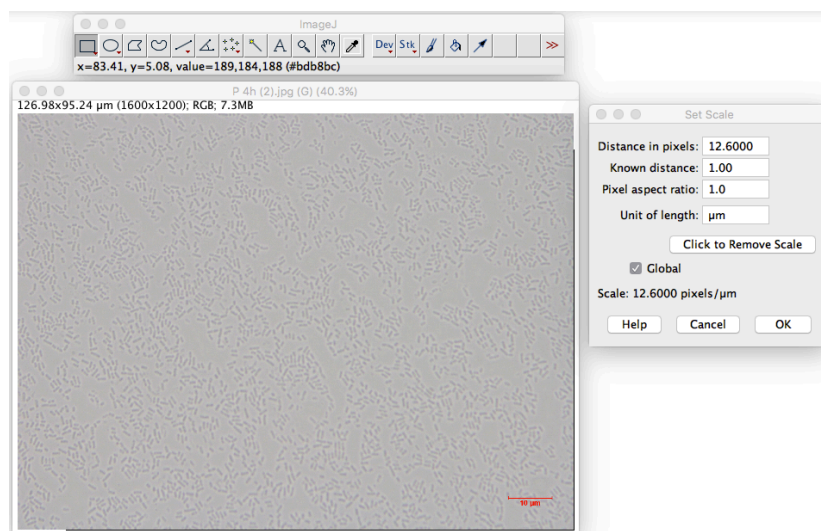


Figura 11. Ajuste de escala en micrografía obtenida por microscopía a 100x.

Se binarizaron los colores de la imagen cambiando la resolución de la misma de una imagen RGB a color a una de 8 bits (**Figura 12**) en Image → Type → 8-bit.

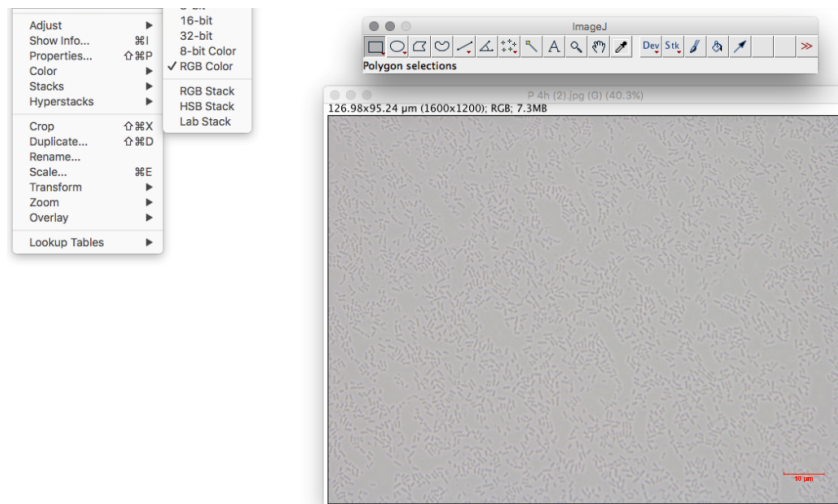


Figura 12. Binarización de imagen por ajuste de resolución en micrografía a 100x.

Debido a que la imagen en tonos de grises era difícil de diferenciar, se prosiguió a cambiar el contraste denotando los colores oscuros de la imagen, logrando así tener una imagen diferenciable del fondo (**Figura 13**) en Image → Adjust → Brightness/contrast.

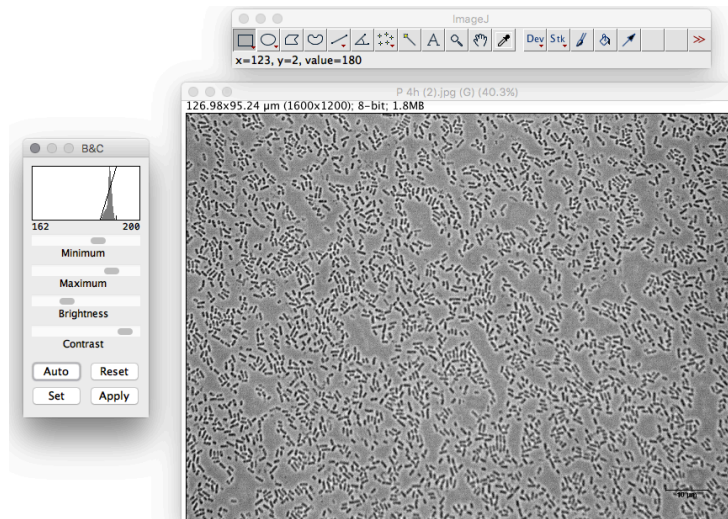


Figura 13. Ajuste de contraste en micrografía obtenida por microscopia a 100x.

Se realizó un ajuste de umbral (threshold) en la que se eliminó el fondo y se remarcaron las bacterias volviéndolas más oscuras y diferenciables, en este punto se procedió a remarcar las bacterias (**Figura 14**) en Image → Adjust → Threshold.

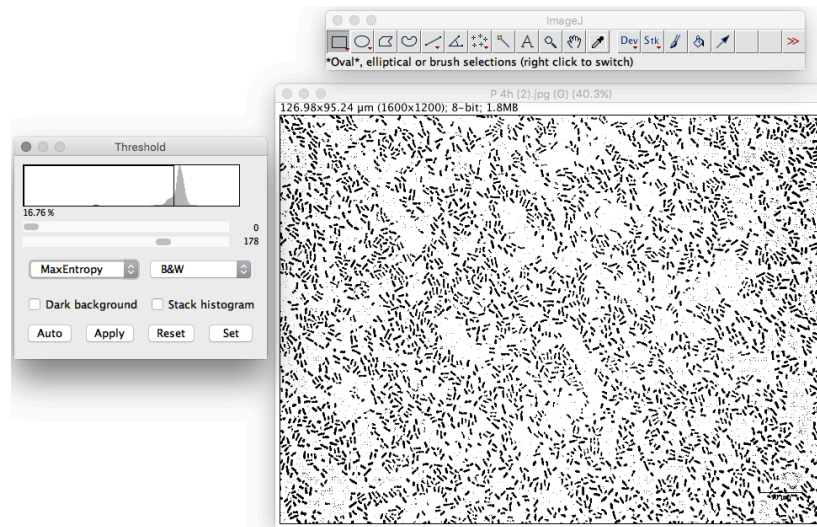


Figura 14. Ajuste de umbral en micrografía obtenida por microscopía a 100x para denotar las partículas a analizar.

Se remarcaron los contornos de las partículas, para así delimitar a la partícula en Process → Find Edges (**Figura 15**).

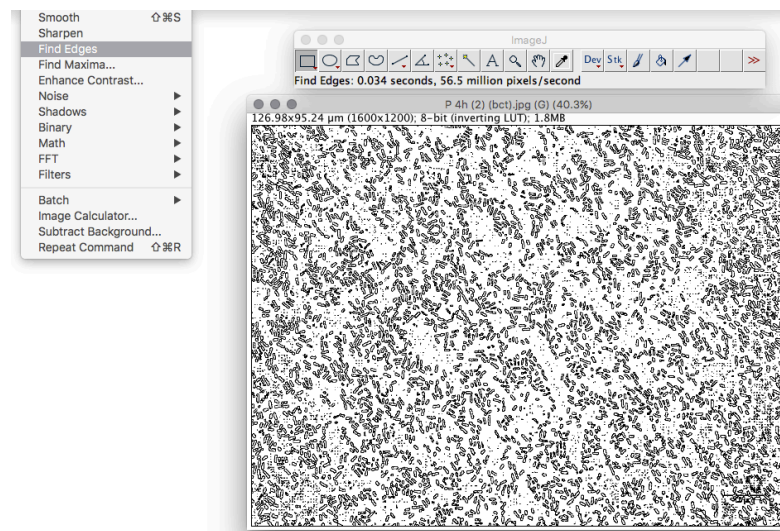


Figura 15. Remarcado de contorno de partículas obtenidas por microscopía a 100x.

Se procedió a cerrar los contornos de las partículas mediante la orden Process → Binary → Make Binary (**Figura 16**), con el fin de mejorar la imagen y facilitar el analisis de las microscopias.

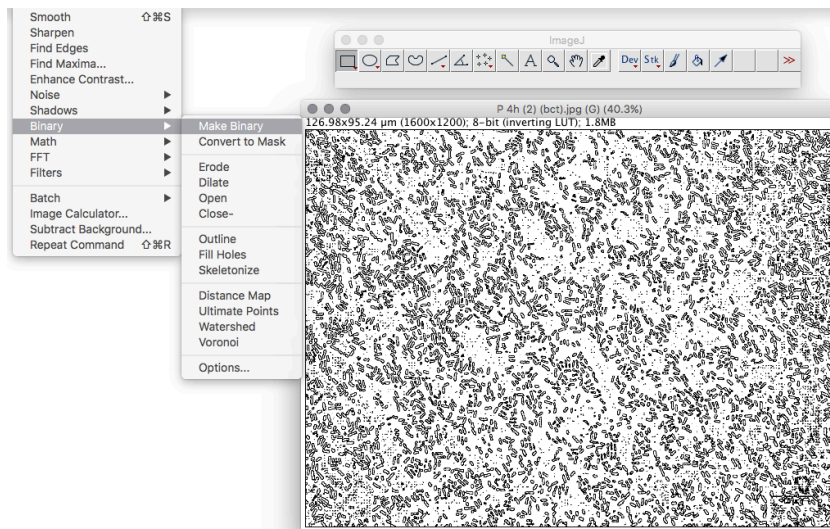


Figura 16. Cierre de contornos por binarización de capturas por microscopía a 100x.

Se rellenaron las partículas mediante la orden Process → Binary → Make Binary (Figura 17)

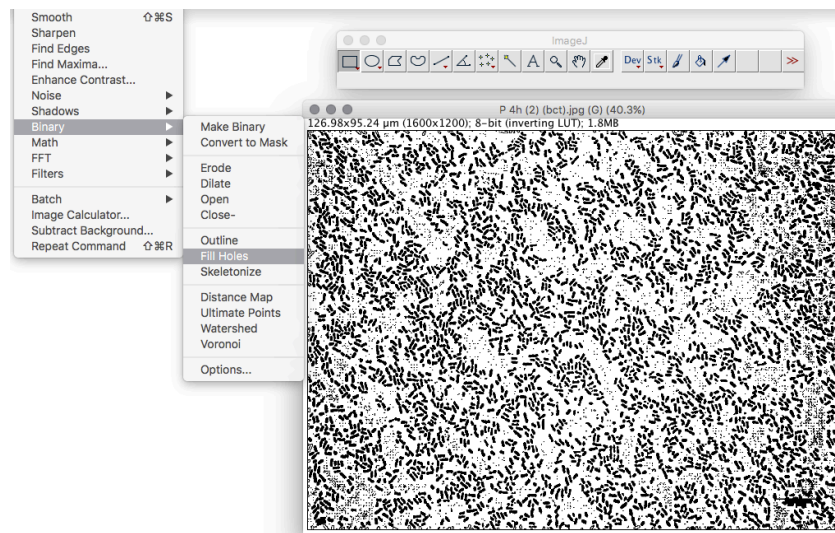


Figura 17. Relleno de partículas de capturas obtenidas por microscopía a 100x.

Para el análisis y reconocimiento de las características de cada una de las bacterias, se realizó un conteo de las bacterias y una delimitación de contorno por tamaños, estandarizando las bacterias a una medida de 0.1 a $1.4 \mu\text{m}^2$ y dándonos así una base de datos de cada una de las partículas reflejadas en la imagen, los parámetros principales a analizar fueron: área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret, relación de aspecto, cuenta total de bacterias y área total de las mismas. (Figura 18).

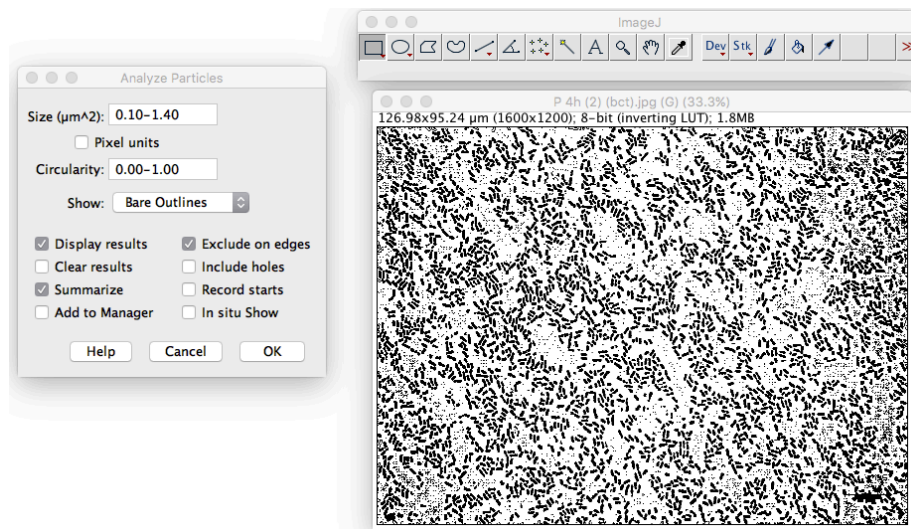


Figura 18. Análisis de imagen con descarte de tamaño.

Se obtuvo como resultado una base de datos con los parámetros de área, perímetro, circularidad, Feret y relación de aspecto (**Figura 19**).

	Area	Perim.	Circ.	Feret	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret	AR	Round	Solidity
15927	0.365	3.879	0.305	1.657	6.825	93.175	163.301	0.468	4.404	0.227	0.624
15928	0.277	2.973	0.394	1.240	42.143	93.095	129.806	0.730	1.580	0.633	0.409
15929	0.290	3.224	0.350	1.321	45.159	93.889	32.735	0.640	1.941	0.515	0.420
15930	0.265	2.814	0.420	1.211	65.317	93.095	121.608	0.673	1.892	0.529	0.459
15931	0.391	4.122	0.289	1.873	79.127	94.683	53.616	0.635	2.990	0.334	0.435
15932	0.302	3.178	0.376	1.292	94.762	94.127	47.490	0.729	1.812	0.552	0.429
15933	0.315	3.588	0.307	1.497	10.714	94.048	32.005	0.628	2.376	0.421	0.422
15934	0.359	3.654	0.338	1.516	12.460	93.333	132.879	0.673	2.517	0.397	0.456
15935	0.265	2.748	0.440	1.180	111.111	93.333	132.274	0.617	1.843	0.543	0.486
15936	0.277	3.205	0.339	1.309	117.857	93.492	165.964	0.635	1.864	0.536	0.383
15937	0.334	3.840	0.284	1.597	124.524	93.333	116.565	0.714	2.064	0.484	0.377
15938	0.277	3.205	0.339	1.309	75.556	93.810	14.036	0.556	2.474	0.404	0.458
15939	0.214	2.411	0.463	1.010	106.746	93.492	135.000	0.617	1.734	0.577	0.511
15940	0.202	2.253	0.499	0.855	55.556	94.286	68.199	0.635	1.280	0.781	0.471
15941	0.258	2.728	0.426	1.145	67.778	92.402	146.210	0.611	1.957	0.511	0.526

Summary												
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Perim.	Circ.	Solidity	Feret	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret
Drawing of P 2h (2).jpg	3596	1286.980	0.358	10.642	3.810	0.344	0.436	1.559	58.161	45.005	94.081	0.674

Figura 19. Base de datos resultante del análisis de partículas de micrografías a 100x.

Para la realización del análisis fractal, se tomó la imagen que delimita a las bacterias y se analizó con el plugin FracLac encontrado dentro del mismo Software, el cual permitió analizar parámetros como lagunaridad y DF (**Figura 20**).

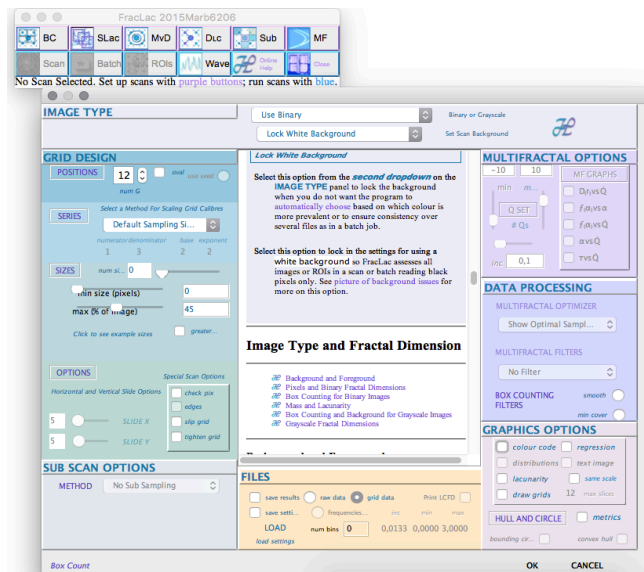


Figura 20. Interfaz de análisis de fractalidad por plugin Fraclac.

Las imágenes obtenidas en microscopio óptico se utilizaron para analizar su geometría y fractalidad, el análisis se realizó después de que las micrografías fueron binarizadas. Las micrografías ópticas (100 x) de la cinética de auto-agregación de Lp299v en PBS mostraron la forma de varilla cocoides típica de las cepas de *L. plantarum*.

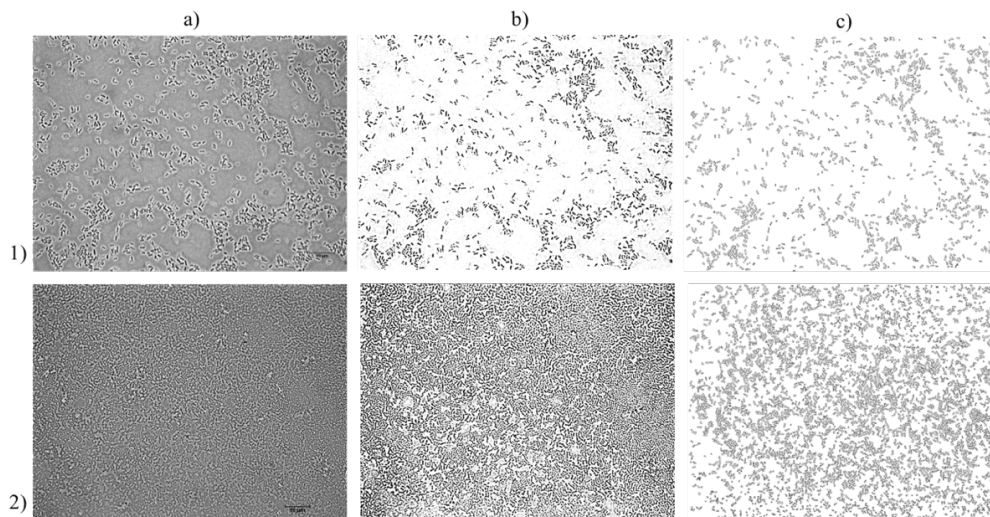


Figura 21. Ejemplo de micrografías digitales de Lp299v agregación. 1) en condiciones iniciales (de pH 7,0; 0 h); 2) bajo condiciones de agregación máxima (pH 5,0, 20 h). Las micrografías fueron binarizados (b1, b2) y analizadas (c1, c2) con el software ImageJ.

Al finalizar el proceso se obtuvieron imágenes procesadas de cada una de las partes (precipitado y sobrenadante) a cada hora desde el inicio de la cinética **Figura 22**.

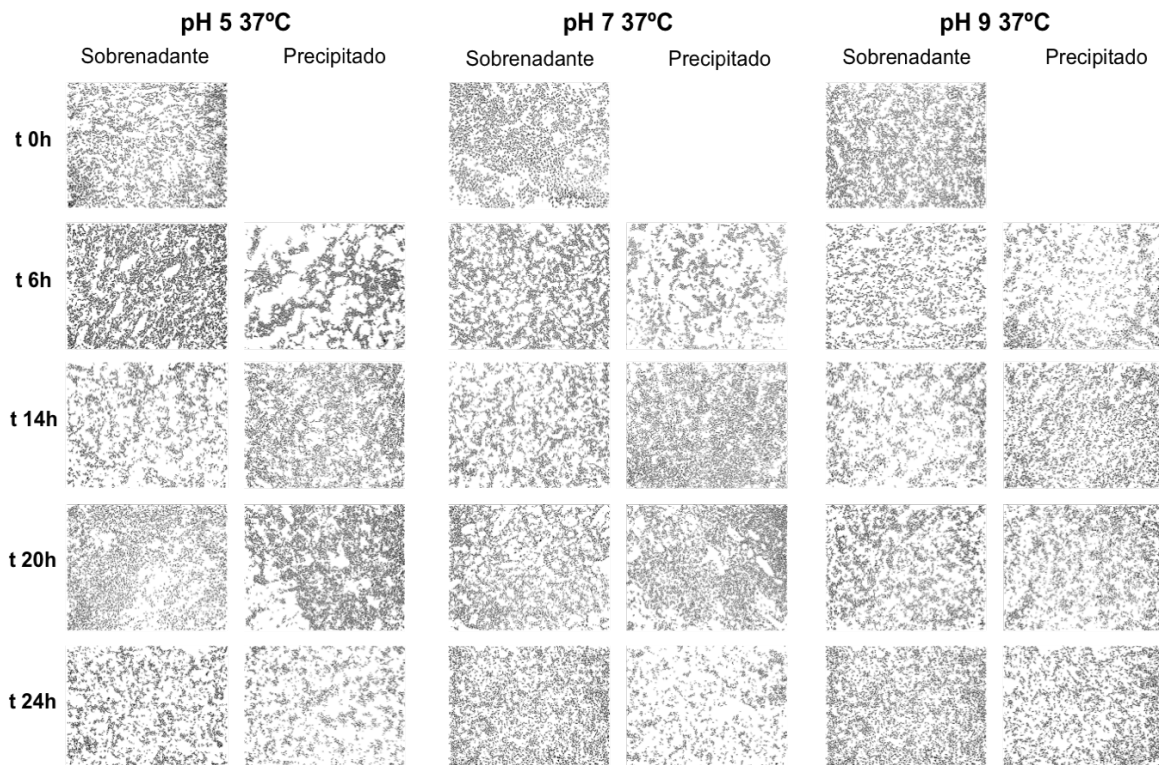


Figura 22. Micrografías procesadas obtenidas por microscopía óptica a 100x de cinéticas de agregación a 37°C y diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0) de las horas 0, 6, 14, 20 y 24h de su precipitado y sobrenadante.

Como se observa en la **Figura 22**, el microorganismo se encontró distribuido en diferentes proporciones en cada una de las imágenes, observándose que en el tiempo 0 la población inicial de los microorganismos es homogénea tanto en el precipitado como en el sobrenadante. Las siguientes tomas se puede observar un incremento en la población en el precipitado y una disminución en la del sobrenadante; sin embargo se observa que al llegar a las 20 h la población del precipitado disminuye, mientras que la del sobrenadante tiende a aumentar.

6.6.2. Análisis morfométrico

Se observó la morfología de las bacterias *Lp299v* de la cinéticas a 37 °C a diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0). Se determinaron los parámetros morfométricos de área, perímetro,

circularidad, diámetro de Feret, relación de aspecto y cuenta total de bacterias además de DF y lagunaridad. Los resultados se muestran en el **Cuadro 9 y 10**.

Cuadro 9. Parámetros de tamaño evaluados durante el análisis de imagen de la cinética de agregación a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0.

	h	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Diámetro de Feret (μm)
pH 5	0 h	0.707 ± 0.288	3.958 ± 1.015	1.475 ± 0.008
	2 h	0.403 ± 0.313	2.715 ± 1.501	1.076 ± 0.007
	4 h	0.627 ± 0.276	3.763 ± 1.148	1.427 ± 0.011
	6 h	0.566 ± 0.257	3.584 ± 1.176	1.355 ± 0.010
	8 h	0.752 ± 0.268	3.988 ± 1.042	1.544 ± 0.010
	10 h	0.502 ± 0.346	3.033 ± 1.545	1.199 ± 0.010
	12 h	0.576 ± 0.239	3.517 ± 0.988	1.358 ± 0.010
	14 h	0.627 ± 0.283	3.783 ± 1.177	1.406 ± 0.011
	16 h	0.483 ± 0.126	2.699 ± 0.366	1.092 ± 0.013
	18 h	0.624 ± 0.277	3.814 ± 1.244	1.410 ± 0.011
	20 h	0.480 ± 0.219	3.277 ± 1.042	1.255 ± 0.012
	22 h	0.538 ± 0.185	3.317 ± 0.774	1.322 ± 0.007
	24 h	0.589 ± 0.283	3.754 ± 1.266	1.370 ± 0.011
pH 7	0 h	0.602 ± 0.241	3.604 ± 0.932	1.375 ± 0.009
	2 h	0.723 ± 0.287	3.762 ± 0.902	1.492 ± 0.014
	4 h	0.674 ± 0.246	3.759 ± 0.890	1.444 ± 0.007
	6 h	0.600 ± 0.202	3.493 ± 0.741	1.373 ± 0.008
	8 h	0.537 ± 0.227	3.301 ± 0.773	1.293 ± 0.012
	10 h	0.613 ± 0.215	3.576 ± 0.833	1.384 ± 0.007
	12 h	0.534 ± 0.199	3.369 ± 0.813	1.310 ± 0.009
	14 h	0.557 ± 0.217	3.496 ± 0.903	1.329 ± 0.007
	16 h	0.527 ± 0.197	3.414 ± 0.889	1.298 ± 0.007
	18 h	0.615 ± 0.225	3.623 ± 0.891	1.385 ± 0.007
	20 h	0.584 ± 0.222	3.505 ± 0.894	1.360 ± 0.009
	22 h	0.519 ± 0.221	3.396 ± 0.956	1.291 ± 0.009
	24 h	0.569 ± 0.301	3.745 ± 1.296	1.336 ± 0.009
pH 9	0 h	0.789 ± 0.303	4.128 ± 0.303	1.547 ± 0.008
	2 h	0.910 ± 0.332	4.233 ± 0.332	1.643 ± 0.012
	4 h	0.923 ± 0.285	4.220 ± 0.285	1.674 ± 0.010
	6 h	0.911 ± 0.268	4.207 ± 0.268	1.671 ± 0.010
	8 h	0.901 ± 0.236	4.192 ± 0.236	1.663 ± 0.009
	10 h	0.910 ± 0.306	4.211 ± 0.306	1.649 ± 0.012
	12 h	0.618 ± 0.226	3.616 ± 0.226	1.400 ± 0.008
	14 h	0.632 ± 0.216	3.587 ± 0.216	1.407 ± 0.008
	16 h	0.613 ± 0.258	3.711 ± 0.258	1.394 ± 0.010
	18 h	0.624 ± 0.222	3.596 ± 0.222	1.405 ± 0.008
	20 h	0.698 ± 0.247	3.866 ± 0.247	1.488 ± 0.008
	22 h	0.574 ± 0.267	3.673 ± 0.267	1.368 ± 0.011
	24 h	0.739 ± 0.274	4.102 ± 0.274	1.530 ± 0.008

Los valores son la media ± desviación estándar, n=3.

Cuadro 10. Parámetros de forma evaluados durante el análisis de imagen de la cinética de agregación a 37 °C a pH 5.0, 7.0 y 9.0

pH	h	CIRCULARIDAD	AR	CUENTA TOTAL
pH 5	0 h	0.566 ± 0.005	2.183 ± 0.010	4837
	2 h	0.710 ± 0.004	2.157 ± 0.009	10739
	4 h	0.565 ± 0.007	2.323 ± 0.012	2798
	6 h	0.568 ± 0.006	2.315 ± 0.012	3104
	8 h	0.603 ± 0.006	2.389 ± 0.011	3312
	10 h	0.711 ± 0.006	2.181 ± 0.012	5675
	12 h	0.589 ± 0.006	2.326 ± 0.011	3266
	14 h	0.559 ± 0.006	2.186 ± 0.012	3005
	16 h	0.824 ± 0.007	1.771 ± 0.017	920
	18 h	0.555 ± 0.007	2.197 ± 0.013	2805
	20 h	0.574 ± 0.008	2.279 ± 0.015	2002
	22 h	0.617 ± 0.004	2.405 ± 0.009	4912
	24 h	0.539 ± 0.006	2.183 ± 0.012	3175
pH 7	0 h	0.584 ± 0.005	2.245 ± 0.010	4079
	2 h	0.632 ± 0.007	2.323 ± 0.015	1749
	4 h	0.601 ± 0.005	2.276 ± 0.009	5482
	6 h	0.616 ± 0.005	2.358 ± 0.009	4441
	8 h	0.608 ± 0.007	2.312 ± 0.014	1972
	10 h	0.604 ± 0.004	2.303 ± 0.008	6149
	12 h	0.593 ± 0.006	2.330 ± 0.011	3264
	14 h	0.578 ± 0.005	2.268 ± 0.009	5123
	16 h	0.578 ± 0.005	2.274 ± 0.009	5447
	18 h	0.593 ± 0.005	2.277 ± 0.009	5170
	20 h	0.599 ± 0.005	2.321 ± 0.010	3974
	22 h	0.572 ± 0.006	2.252 ± 0.011	3380
	24 h	0.521 ± 0.005	2.118 ± 0.010	4566
pH 9	0 h	0.579 ± 0.005	2.191 ± 0.010	5028
	2 h	0.620 ± 0.007	2.283 ± 0.013	2394
	4 h	0.640 ± 0.005	2.363 ± 0.011	3469
	6 h	0.637 ± 0.006	2.403 ± 0.011	2995
	8 h	0.640 ± 0.005	2.416 ± 0.010	3255
	10 h	0.632 ± 0.007	2.307 ± 0.013	2341
	12 h	0.598 ± 0.005	2.313 ± 0.010	4403
	14 h	0.614 ± 0.005	2.337 ± 0.010	3912
	16 h	0.572 ± 0.006	2.197 ± 0.012	3340
	18 h	0.609 ± 0.005	2.349 ± 0.010	4352
	20 h	0.597 ± 0.005	2.313 ± 0.009	5363
	22 h	0.556 ± 0.006	2.257 ± 0.012	3139
	24 h	0.573 ± 0.005	2.224 ± 0.009	5365

Los valores son la media ± desviación estándar, n=3.

Se analizaron estadísticamente los tiempos 0, 4 y 24 h para observar las posibles diferencias. Los histogramas de frecuencia obtenidos se pueden observar en la **Figura 23**.

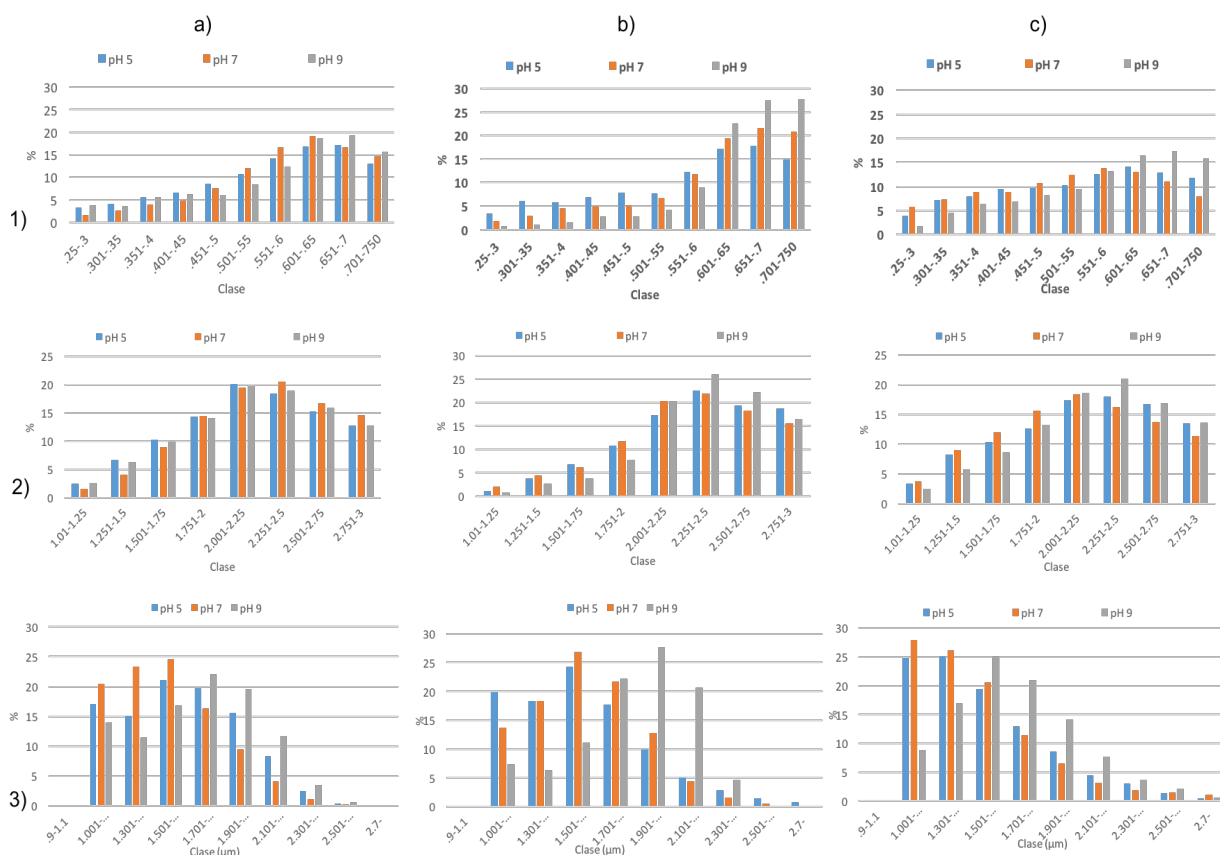


Figura 23. Histogramas de frecuencia de análisis morfológico de circularidad a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a los tiempos 0 (1a), 4(1b) y 24 h(1c); relación de aspecto y Feret a los mismos parámetros.

Para estos parámetros obtenidos se analizó el promedio, la mediana, los percentiles 90 y 10, al igual que la distribución del tamaño de partícula; estos valores están reflejados en el **cuadro 10**. En el tiempo 0 h se puede apreciar una mayor cantidad de partículas con circularidad entre 0.4 y 0.5, la cual tiende a aumentar cercana las 4 h, volviendo a valores similares a los iniciales a las 24 h. La relación de aspecto involucra valores desde 1.0 hasta 3.5, entendiendo así que el valor de 1.0 involucra partículas con alta circularidad (Almeida-Prieto, et al., 2007). Los valores de relación de aspecto más frecuentes se encuentran entre 1.5 y 2.5 a las 0h, 2 a 2.75 a 4h y 1.25 a 2.25 a las 24h.

Cuadro 11. Análisis morfológico de Lp299v a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24 h.

PH		CIRCULARIDAD			RELACION DE ASPECTO		
		0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
pH 5	PROMEDIO	0.566	0.565	0.539	2.183	2.323	2.183
	MEDIANA	0.590	0.601	0.557	2.211	2.372	2.227
	PERCENTIL 90	0.712	0.716	0.706	2.792	2.864	2.807
	PERCENTIL 10	0.374	0.355	0.343	1.530	1.704	1.465
	DISTRIBUCION DE TAMAÑO DE PARTICULA	0.573	0.601	0.651	0.571	0.489	0.602
pH 7	PROMEDIO	0.584	0.601	0.521	2.245	2.276	2.118
	MEDIANA	0.602	0.633	0.534	2.270	2.310	2.129
	PERCENTIL 90	0.717	0.726	0.692	2.822	2.828	2.779
	PERCENTIL 10	0.420	0.408	0.332	1.647	1.664	1.440
	DISTRIBUCION DE TAMAÑO DE PARTICULA	0.494	0.502	0.674	0.518	0.504	0.629
pH 9	PROMEDIO	0.579	0.640	0.573	2.191	2.363	2.224
	MEDIANA	0.612	0.660	0.599	2.219	2.391	2.267
	PERCENTIL 90	0.719	0.731	0.719	2.790	2.838	2.811
	PERCENTIL 10	0.381	0.512	0.380	1.532	1.865	1.558
	DISTRIBUCION DE TAMAÑO DE PARTICULA	0.552	0.332	0.566	0.567	0.407	0.553

Los valores son la media \pm desviación estándar, n=3.

De acuerdo al análisis de los resultados, se pudo observar que en las bacterias con mayor circularidad se encuentran en pH 9 a las 24 h, siendo las de menor circularidad las de pH 7.0 y 0 h, se observa un ligero incremento de la circularidad a los diferentes pH al llegar a las 4 h, el cual vuelve a disminuir al cabo de las 24 h. Este comportamiento fue observado en bacterias *Lactobacillus reuteri* en donde a diferentes pH las bacterias cambian su morfología en las primeras horas, la cual vuelve a ser similar pasando 10 h (Shen & Chou, 2014; Palmfeldt & Hahn-Hägerdal, 2000). De igual forma se observa en la relación de aspecto un alargamiento a las 4 h, siendo el pH 5.0 el que presenta una mayor elongación a esta hora, comportamiento presentado también en *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra la cual en entornos diferentes a los usuales torna su forma bacilar a una más alargada y delgada (Sieniawskaa, et al., 2015); un mayor alargamiento esta también relacionado con una mayor capacidad de adhesión y de capacidad de crecimiento (Bron, et al., 2004; Storck, et al., 2014).

Los valores obtenidos durante el análisis de AR y circularidad fueron analizados (**cuadro 11**), obteniendo que la distribución de los mismos es normal, debido a que el

valor de Curtosis es menor a 3.0, indicando que se presenta un reducido grado de concentración alrededor de los valores centrales de la variable (distribución platicúrtica); mientras que el valor de asimetría tiende a 0 (Fernández Fernández, et al., 2002).

Cuadro 12. Análisis de curtosis y asimetría de las partículas.

PH		CIRCULARIDAD			RELACION DE ASPECTO		
		0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
pH 5	CUENTA TOTAL	4837	2798	3175	4837	2798	3175
	CURTOSIS	-0.4964	-0.7225	-0.9956	-0.6895	-0.7225	-0.9956
	ASIMETRÍA	-0.6304	-0.6210	-0.3111	-0.6304	-0.6210	-0.3111
pH 7	CUENTA TOTAL	4079	5482	4566	4079	5482	4566
	CURTOSIS	0.0359	0.1683	-0.9536	0.0359	0.1683	-0.9536
	ASIMETRÍA	-0.7515	-0.9998	-0.2270	-0.7515	0.3201	-0.2270
pH 9	CUENTA TOTAL	5028	3469	5365	5028	3469	5365
	CURTOSIS	-0.3415	2.7724	-0.6613	-0.3415	2.7724	-0.6613
	ASIMETRÍA	-0.7737	-1.6048	-0.5848	-0.7737	-1.6048	-0.5848

Los valores son la media \pm desviación estándar, n=3.

Los parámetros fractales (DF y lagunaridad) fueron analizados en diferentes tiempos y pH (**Figura 24**).

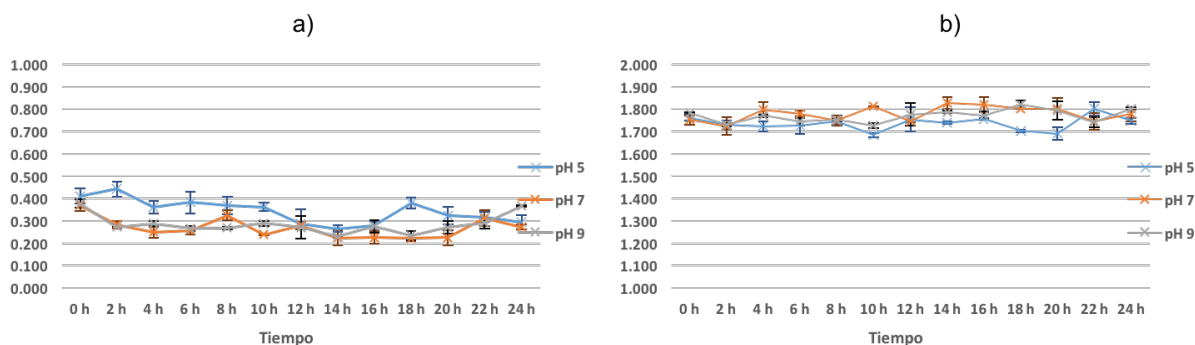


Figura 24. Lagunaridad y dimensión fractal de Lp 299v en función del tiempo a 24 h

Se realizó una ANOVA de dos vías en donde tanto lagunaridad y DF resultaron estadísticamente independientes del pH y del tiempo.

6.7. Micrografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido en cinéticas de Lp 299v

Las muestras obtenidas de Lp299v de las cinéticas realizadas a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0 a tiempos 0,4 y 24h se observaron en microscopio electrónico de barrido después de ser previamente procesadas y colocadas en porta muestras metálicos para su posterior análisis. Para la obtención y análisis de las imágenes se tomaron múltiples

capturas con un objetivo de 20 000x a una distancia de 10.2 mm de la platina. Las capturas resultantes tuvieron una resolución 1536×1103 pixeles a una escala comparativa de hasta 5 µm logrando así imágenes sin procesar como las que se muestran en la **Figura 25**.

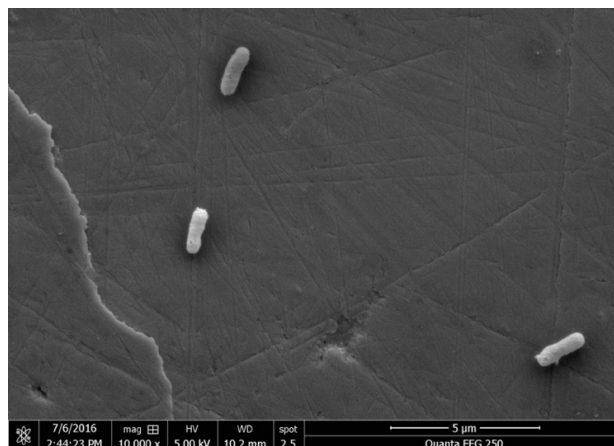


Figura 25. Micrografía obtenida por microscopía óptica a 20 000x de cinéticas de agregación a 37°C, pH 7 y 0 h.

6.7.1. Análisis de imagen

Para el análisis de imagen se utilizó el software ImageJ v1.50d. La imagen se abrió desde el software para ser procesada en File → Open → Selección del archivo, se ajustó la escala de las micrografías (**Figura 26**).

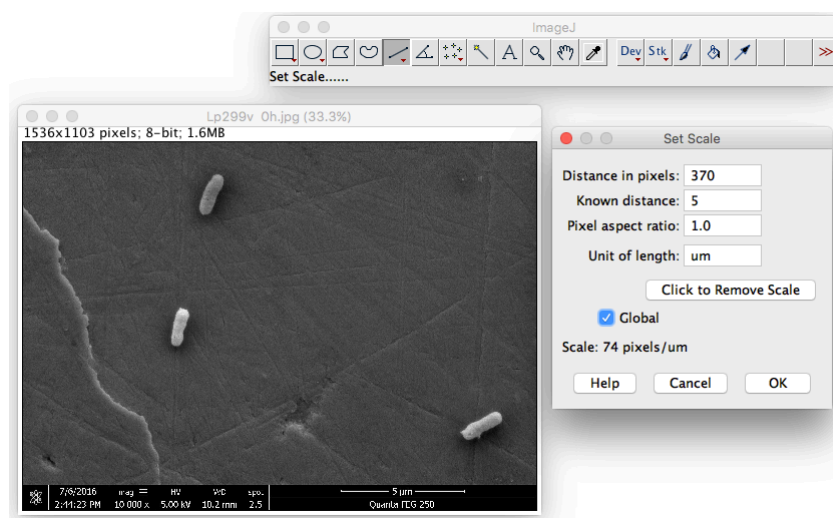


Figura 26. Ajuste de escala en micrografía obtenida por microscopía a 20 000x.

Se binarizo la imagen cambiando la resolución de la misma de una imagen RGB a una de 8 bits con el fin de facilitar el análisis (**Figura 27**) en Image → Type → 8-bit.

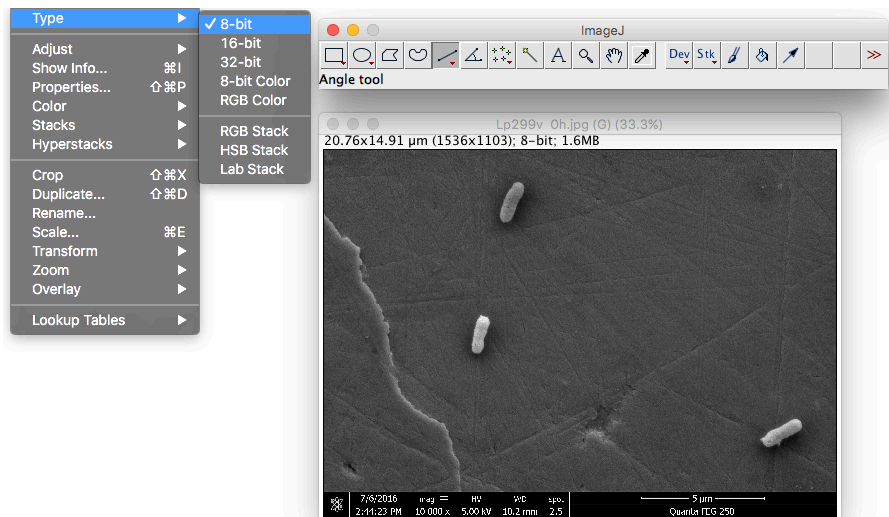


Figura 27. Binarización de imagen por ajuste de resolución en micrografía a 20 000x.

Debido a que la imagen se encontraba bastante iluminada y con diferenciación del fondo se procedió a realizar un ajuste de umbral en la que se eliminó el fondo y se remarcaron las bacterias volviéndolas más oscuras y diferenciables, en este punto se procedió a remarcar las bacterias (**Figura 28**) en Image → Adjust → Threshold.

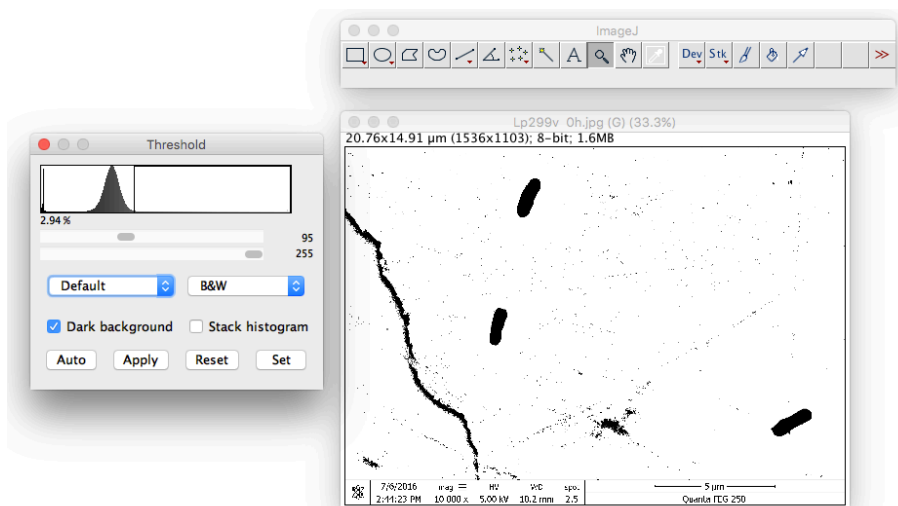


Figura 28. Ajuste de umbral en micrografía obtenida por microscopía a 20 000x para denotar las partículas a analizar.

Se eliminó el ruido para reducir los puntos extras de a imagen sin eliminar partes de la partícula Process → Noise → Despeckle (**Figura 29**).

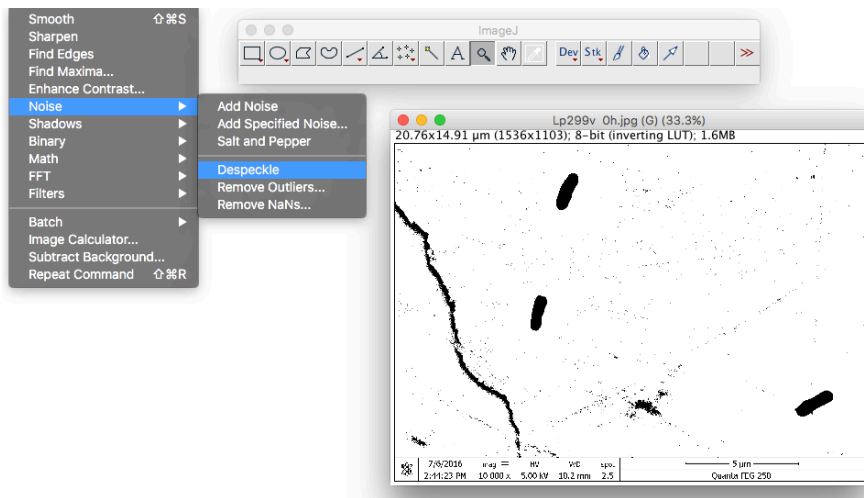


Figura 29. Eliminación de ruido en micrografía a 20 000 x.

Para el análisis morfométrico de las bacterias se realizó un conteo de las bacterias y una delimitación de contorno por tamaños, estandarizando las bacterias a una medida de 0.1 a $4 \mu\text{m}^2$, dándonos así una base de datos de cada una de las partículas reflejadas en la imagen, los parámetros principales a analizar fueron: área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret y relación de aspecto (**Figura 30**).

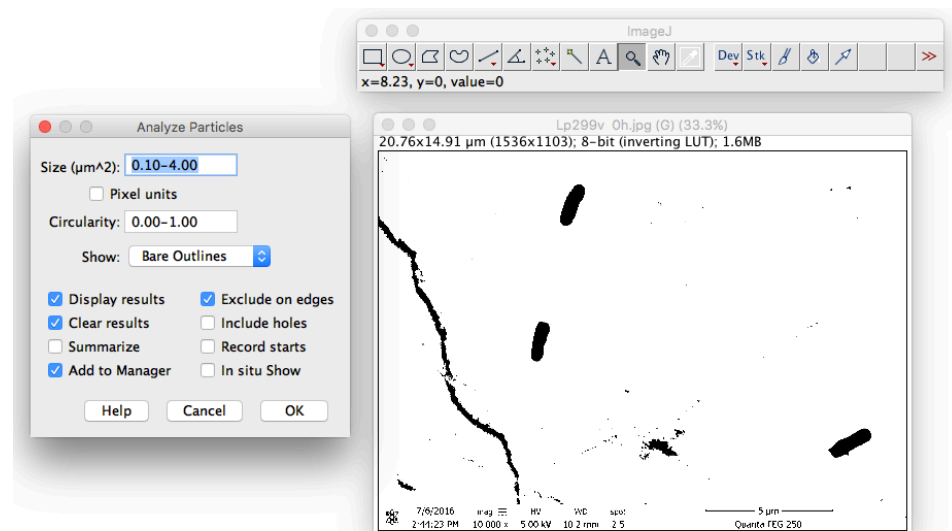


Figura 30. Análisis de imagen con descarte de tamaño.

Se obtuvo como resultado una base de datos con los parámetros de área, perímetro, circularidad, Feret y relación de aspecto, de los cuales únicamente se tomaron los datos de las partículas previamente reconocidas como bacterias (**Figura 31**).

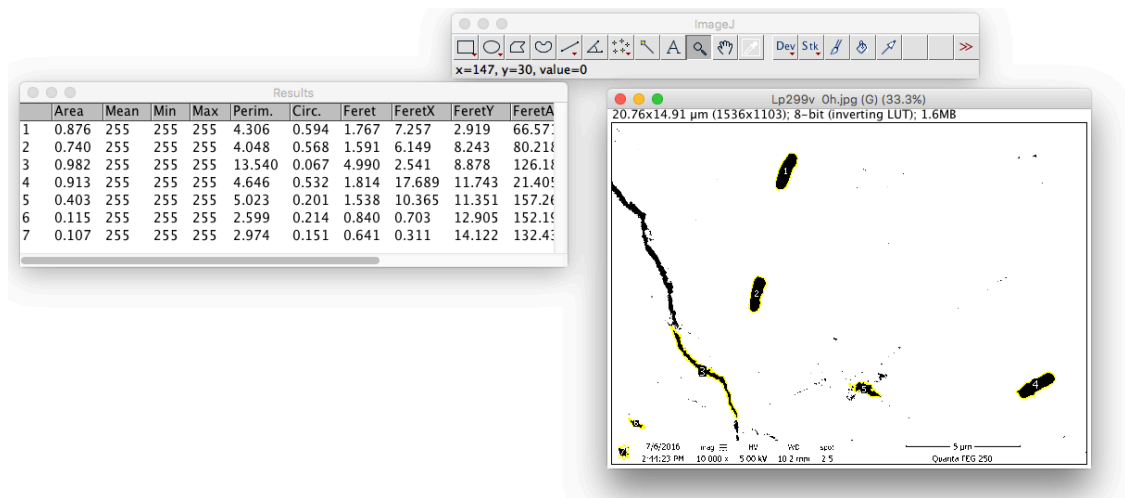


Figura 31. Base de datos resultante del análisis de micrografías a 20 000x

Al finalizar el proceso se obtuvieron imágenes procesadas del precipitado a las horas 0,4 y 24h a los pH 5.0, 7.0 y 9.0 (**Figura 32**).

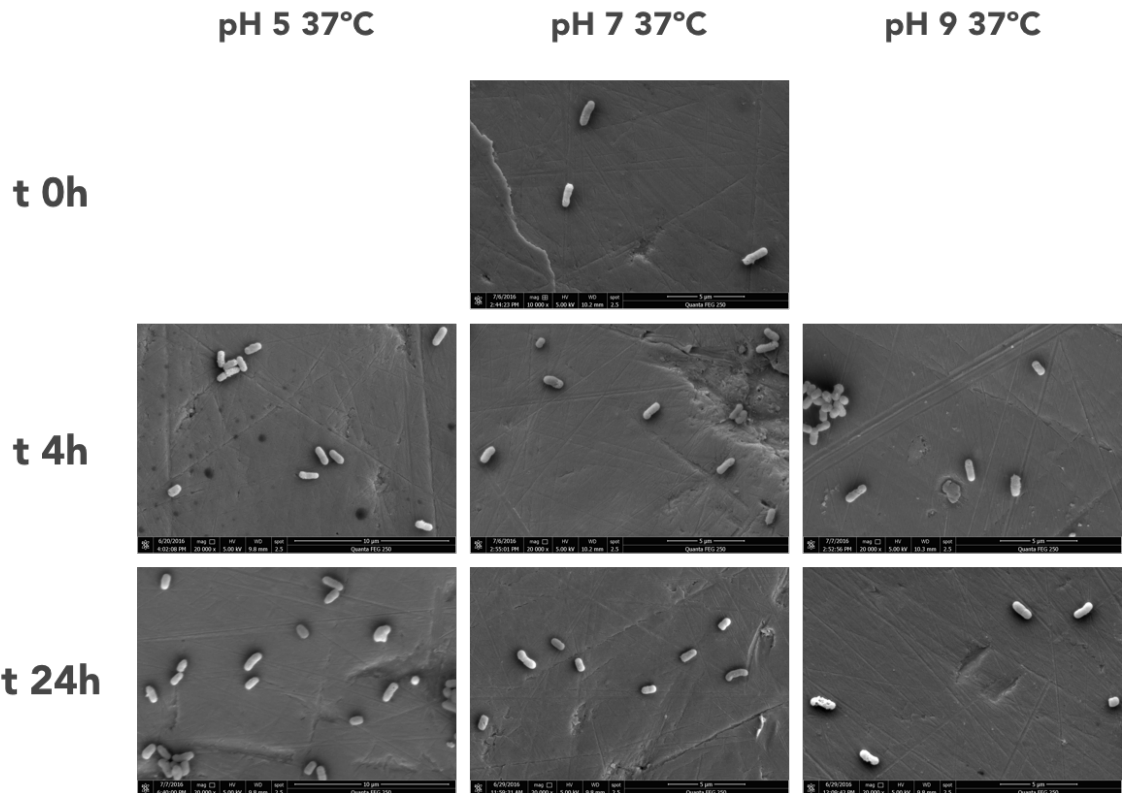


Figura 32. Micrografías obtenidas por microscopia SEM a 20 000x de cinéticas de agregación a 37°C y diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0) de las horas 0, 4 y 24h de su precipitado.

Como se observa en la **Figura 32**, el tamaño de las células observadas varía de cada una de las horas. De igual forma se puede apreciar cambios al modificar el pH del medio en el que se encuentra.

6.7.2. Análisis morfométrico

Se observó la morfología de las bacterias *Lp299v* de la cinéticas a 37 °C a diferentes pH (5.0, 7.0 y 9.0) con un SEM y se determinaron los siguientes parámetros morfométricos: diámetro de Feret y relación de aspecto. Los resultados fueron los siguientes (**Cuadro 13**):

Cuadro 13. Parámetros evaluados durante el análisis de imagen por SEM de la cinética de agregación a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0 de las tomas de precipitado y sobrenadante.

		FERET (μm)	AR
pH 5	0 h	1.358 \pm 0.294	2.311 \pm 0.01
	4 h	1.368 \pm 0.251	2.329 \pm 0.488
	24 h	1.183 \pm 0.233	2.059 \pm 0.45
pH 7	0 h	1.358 \pm 0.294	2.311 \pm 0.538
	4 h	1.362 \pm 0.195	2.471 \pm 0.313
	24 h	1.271 \pm 0.329	2.314 \pm 0.618
pH 9	0 h	1.358 \pm 0.294	2.311 \pm 0.538
	4 h	1.503 \pm 0.163	2.414 \pm 0.291
	24 h	1.376 \pm 0.159	2.323 \pm 0.297

Los valores son la media \pm desviación estándar, n=3.

Se realizaron cinéticas de agregación a 37°C a pH 5.0, 7.0 y 9.0, de donde se analizaron los tiempos 0, 4 y 24 h correspondientes al precipitado. En donde se pudieron observar diferentes cambios en los parámetros Feret y relación de aspecto. Para estos parámetros obtenidos se analizó el promedio, mediana, desviación estándar, error estándar, curtosis y factor de asimetría, estos valores están reflejados en el **cuadro 13**.

Cuadro 14. Análisis morfológico de *Lactobacillus plantarum* 299v a 37°C y pH 5.0 , 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24 h.

PH		RELACION DE ASPECTO			FERET (µm)		
		0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
pH 5	PROMEDIO	2.311	2.329	2.059	1.358	1.368	1.183
	MEDIANA	2.218	2.448	1.995	1.344	1.343	1.170
	DESVIACION ESTANDAR	0.538	0.488	0.450	0.294	0.251	0.233
	ERROR ESTANDAR	0.115	0.102	0.080	0.063	0.052	0.041
	CURTOSIS	0.709	0.923	0.695	0.337	0.120	-0.623
	ASIMETRIA	-0.624	-0.787	-0.660	0.550	-0.246	0.064
pH 7	PROMEDIO	2.311	2.471	2.314	1.358	1.362	1.271
	MEDIANA	2.218	2.541	2.104	1.344	1.313	1.221
	DESVIACION ESTANDAR	0.538	0.313	0.618	0.294	0.195	0.329
	ERROR ESTANDAR	0.115	0.090	0.132	0.063	0.056	0.070
	CURTOSIS	-0.227	-0.230	3.479	0.337	1.362	-0.647
	ASIMETRIA	-0.624	-0.003	-1.893	0.550	1.163	0.631
pH 9	PROMEDIO	2.311	2.414	2.323	1.358	1.503	1.376
	MEDIANA	2.218	2.364	2.350	1.344	1.445	1.379
	DESVIACION ESTANDAR	0.538	0.291	0.297	0.294	0.163	0.159
	ERROR ESTANDAR	0.115	0.075	0.079	0.063	0.042	0.043
	CURTOSIS	-0.227	0.020	-0.810	0.337	-0.754	0.573
	ASIMETRIA	-0.624	-0.356	0.362	0.550	0.763	0.465

Los valores son la media \pm desviación estándar, n=3.

Dentro de los resultados del análisis, se puede encontrar que en el tiempo 0 h la relación de aspecto tiende a estar en el valor $2.311 \pm .538$, lo cual indica que al encontrar valores superiores a 1 tendremos partícula con tendencia elíptica (Almeida-Prieto, et al., 2007), característica que predominara a lo largo de la cinética, siendo la relación de aspecto ligeramente mayor a las 4h y terminando a las 24 h con una relación de aspecto muy similar a la inicial. En el tiempo 0 h se pueden encontrar valores superiores a 1.0, lo que indica que se encuentran bacterias con características bacilares.

El diámetro de Feret muestra un ligero incremento al paso de las primeras 4 h, el cual tiende a disminuir una vez terminada la cinética a las 24 h, este valor está fuertemente relacionado con la longitud de la bacteria (Liu, et al., 2001). La distribución de los resultados se considera normal, debido a que el valor de curtosis analizado es menor a 3.0, el cual indica un reducido grado de concentración alrededor de los valores centrales de la variable (distribución platicurtica); mientras que el valor de asimetría tiende a 0, el cual a menores valores posea más simétrica es la distribución de los mismos (Fernández Fernández, et al., 2002). Las mediciones obtenidas por

microscopía SEM y óptica, denotaron la existencia de diferencias mínimas, las cuales pueden ser atribuidas al margen de error del microscopio óptico de $\pm 0.22 \mu\text{m}$ mencionado en el manual de operación del mismo (**Cuadro 14**).

Cuadro 15. Comparación de medidas obtenidas por microscopía óptica y SEM de los parámetros de Feret y Relación de aspecto a pH 5.0, 7.0 y 9.0 a 0, 4 y 24h

Análisis morfométrico	pH	Tiempo	Microscopio	Medición (μm)	Diferencia entre mediciones (μm)
Feret	pH 5.0	0h	SEM	1.3584	-0.1161
			Óptico	1.4745	
		4h	SEM	1.3678	-0.0594
			Óptico	1.4272	
		24h	SEM	1.1832	-0.187
			Óptico	1.3702	
	pH 7.0	0h	SEM	1.3584	-0.0169
			Óptico	1.3753	
		4h	SEM	1.3624	-0.0813
			Óptico	1.4437	
		24h	SEM	1.271	-0.0649
			Óptico	1.3359	
	pH 9.0	0h	SEM	1.3584	-0.1888
			Óptico	1.5472	
		4h	SEM	1.5034	-0.1704
			Óptico	1.6738	
		24h	SEM	1.3763	-0.1534
			Óptico	1.5297	
Relación de aspecto	pH 5.0	0h	SEM	2.3107	0.1274
			Óptico	2.1833	
		4h	SEM	2.3287	0.0062
			Óptico	2.3225	
		24h	SEM	2.0592	-0.1234
			Óptico	2.1826	
	pH 7.0	0h	SEM	2.3107	0.0654
			Óptico	2.2453	
		4h	SEM	2.471	0.1948
			Óptico	2.2762	
		24h	SEM	2.3138	0.1958
			Óptico	2.118	
	pH 9.0	0h	SEM	2.3107	0.1193
			Óptico	2.1914	
		4h	SEM	2.4138	0.051
			Óptico	2.3628	
		24h	SEM	2.3225	0.0984
			Óptico	2.2241	

CONCLUSIONES

- La autoagregación de Lp299v estuvo en función del tiempo pero no del pH, por lo que las bacterias se adaptaron a las distintas condiciones de pH utilizadas para mantener constante su autoagregación. La autoagregación aumentó a lo largo del tiempo hasta un máximo de 22 h y posteriormente las bacterias comenzaron a desagregarse. Esto indica que Lp299v puede adaptarse a los distintos pH intestinales y que su agregación ocurre durante las primeras 24 h.
- La cepa Lp299v es hidrofílica y tiene afinidad por compuestos alcalinos por lo que probablemente presente en su superficie celular exopolisacáridos ácidos.
- El potencial zeta fue negativo en todos los casos, tendiendo a ser más negativo a mayor pH del medio, lo que demostró que Lp 299v compensó fisiológicamente las cargas de su entorno para mantener su agregación.
- Lagunaridad y dimensión fractal resultaron estadísticamente independientes del pH y del tiempo, denotando un mismo mecanismo de agregación independiente del medio en el que se encuentra.
- La morfología de Lp 299v se vio afectada por las distintas condiciones, sin embargo, la cepa varió el diámetro de Feret siendo mayor a pH básicos a lo largo del tiempo pero mantuvo su forma en todas las condiciones, probablemente para mejorar su agregación.
- El microscopio óptico puede ser utilizado como un método rápido, confiable y económico para observar parámetros morfológicos en Lp 299v ya que el error comparado con el microscopio electrónico de barrido fue menor a 0.22 μm .
- El modelado obtenido fue una **cinética de 1er orden**, en donde la concentración de probióticos autoagregados es **dependiente del tiempo y de la concentración** de probióticos que **no están agregados, pero pueden autoagregarse** a medida del tiempo.
- La autoagregación de Lp 299v es un proceso entrópico el cual puede verse mejorado con el empleo de energía mecánica como es el caso de la agitación.

7. ANEXOS

7.1. Agar y caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)

Se utilizó agar y caldo MRS para Lactobacillus BD Difco™ (La Point de Claix, Francia) con la siguiente composición:

Ingredientes	Cantidad g/L
Proteasa pectona No. 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	1.0
Sulfato de manganeso	.05
Fosfato dipotasico	2.0
*Agar	15.0
* El caldo consta de los mismos ingredientes sin el agar. pH final 6.5 ± 0.2.	

Se suspendieron 55 g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos y mezcló calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

7.2. Agar MRS para técnica de conteo en microgota

Debido a las características tensoactivas otorgadas por el polisorbato 80, el agar MRS se convierte en un agar con dificultades para el desarrollo de esta técnica. Para tener las características adecuadas para el conteo por microgota se usó caldo MRS (Difco, Le Point de Claix, Francia) y agar Bacteriológico (BD Bioxon®, Estado de México, México). Para su preparación:

1. Se resuspende el polvo en 1lt de agua
Caldo Lactobacillus BD Difco™ -55g
Agar Bacteriológico BD Bioxon® -12g
2. Mezclar hasta homogeneizar

3. Calentar con agitación constante y hervir por un minuto hasta disolver el polvo
4. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min

7.3. Buffer PBS

Las pruebas de autoagregación y zetametria fueron elaboradas con bacterias suspendidas en Buffer fosfato salino 1x (PBS) ajustados a pH 5.0, 7.0 y 9.0 como se indica en la tabla, mientras que para el modelado matemático requirió una cinética más a pH 3.6.

Tabla. Composición de buffer fosfato salino (PBS a pH 5.0, 7.0 y 9.0).

Reactivo/pH	pH 3.6	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
NaCl (g/L)	8.000	8.000	8.000	8.000
KCl (g/L)	0.200	0.200	0.200	0.200
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.360	1.340	0.541	0.008
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	0.0008	0.021	0.854	1.410

7.4. Solución piraña

Reactivo
Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) al 96%
Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂) al 30%

1. Se preparó la solución piraña en un recipiente de vidrio con alta tolerancia térmica en una proporción 4:1v/v de H₂SO₄ y H₂O₂ respectivamente.
2. Se vertieron 4 partes de H₂SO₄ para posteriormente agregar lentamente el H₂O₂.
3. Se colocó un baño maría para disminuir la temperatura de la reacción debido a que es altamente exotérmica superiores a los 100 °C.

7.5. Buffer Sorensen pH 7.4

Reactivo
Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4)
Fosfato de sodio dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

1. Se preparan dos soluciones con cada uno de los reactivos:
A· 2.84 g de Na_2HPO_4 en 100 ml de agua destilada
B· 2.76 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada.
2. Se toman 40.5 ml de la solución A y 9.5 ml de la solución B, los cuales se mezclaron y se aforaron a 100 ml
3. El buffer se almacena en refrigeración a 4°C.

7.6. Solución Glutaraldehído 2.5%

Reactivo
Glutaraldehído 25%
Buffer de Sorensen 0.1M pH 7.4

1. Se preparó la solución de Glutaraldehído en un recipiente de vidrio dentro de una campana de extracción.
2. Para 10 ml de solución se vertieron 1 ml de Glutaraldehído al 25% y 9 ml de buffer de Sorensen.
3. La solución se prepara en pocas cantidades, ya que dura solo 1 día.

7.7. Cinética de *Lactobacillus plantarum* 299v versus DO 560nm en MRS

Se realizó una curva de crecimiento con concentraciones ajustadas de *Lactobacillus plantarum* 299v a fin de realizar un conteo en placa a 37 °C durante 24 horas y así obtener una gráfica de concentración de DO560 nm en MRS contra UFC/g. Las concentraciones se ajustaron aproximadamente a 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 de DO560 nm.

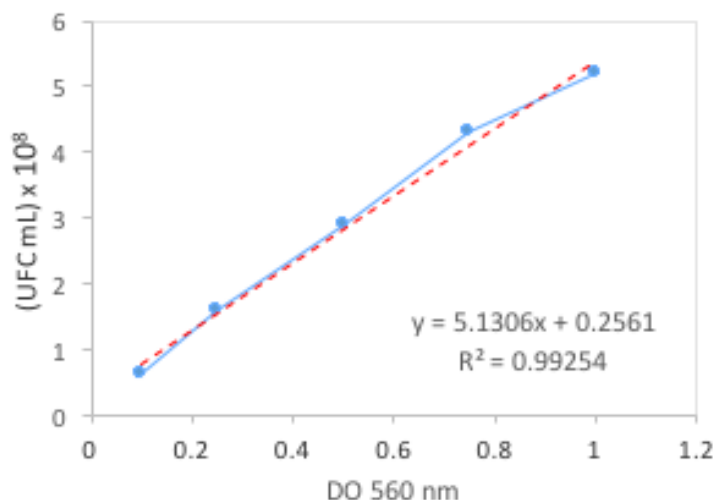


Figura 33. Curva de crecimiento de Lp 299v de DO560 nm en caldo MRS versus unidades formadoras de colonia por mililitro.

7.8. Cinética de *Lactobacillus plantarum* 299v versus DO 600nm en PBS

Se realizó una curva de crecimiento con concentraciones ajustadas de *Lactobacillus plantarum* 299v a fin de realizar un conteo en placa a 37 °C durante 24 horas y así obtener una gráfica de concentración de DO600 nm en PBS contra UFC/g. Las concentraciones se ajustaron aproximadamente a 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 de DO600 nm.

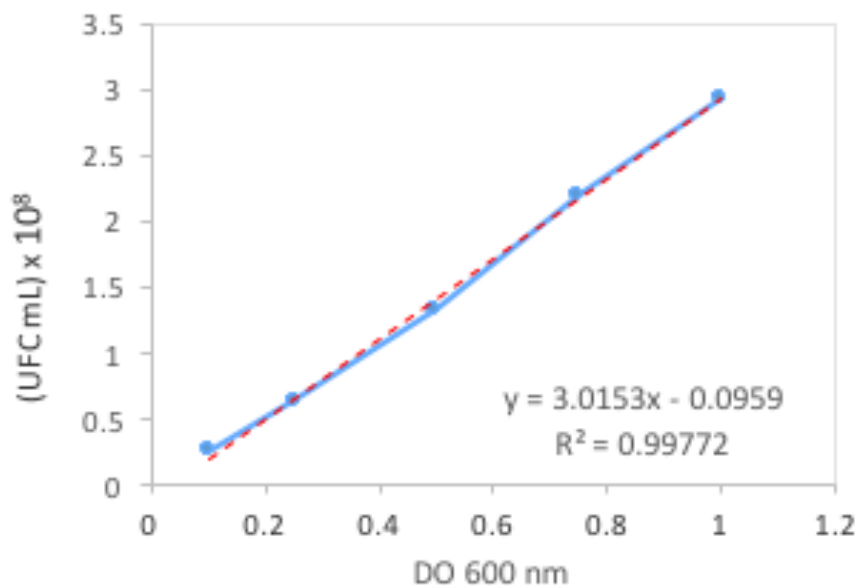


Figura 34. Curva de crecimiento de Lp 299v de DO600 nm en buffer PBS versus unidades formadoras de colonia por mililitro.

7.9. Conteo por microgota

Se resuspendió la cepa en Caldo Difco™ Lactobacilli MRS por 24 h a 37°C. Se centrifugo la suspensión con el microorganismo para ajustar la absorbancia a diferentes absorbancias 0.1, .25, .5, .75 y 1 adicionando buffer salino de fosfatos (PBS pH 7.0), se tomó posteriormente 1 mL y se colocó en un microtubo estéril, para posteriormente tomar 100 µL del tubo anterior homogenizando con 900 µL de solución PBS previamente colocados en otro microtubo. Se repitió la dilución 8 veces más como se muestra en la imagen, para posteriormente homogenizar. Se tomó 10 µL de cada una de las diluciones colocaron en una placa de agar previamente preparada (Agar Bacteriológico 1.2 gr/100ml, caldo MRS 5.5 gr /100 ml), se dejó secar la gota en una superficie plana para evitar su desplazamiento, una vez absorbida la gota por el agar se colocó a 37°C ± 1 por 24 h. Esta prueba se realizó por triplicado en cada uno de los conteos (**Figura 35**).

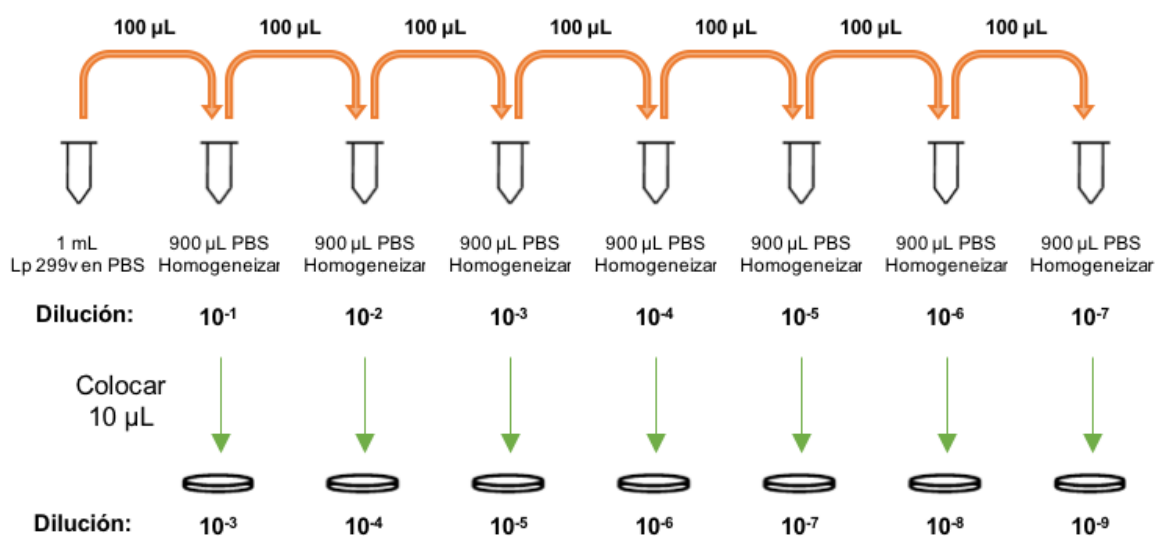


Figura 35. Diluciones para la técnica de conteo por microgota de *Lactobacillus plantarum* 299v.

7.10. Cinéticas de crecimiento de Lp 299v a diferentes pH y temperaturas

Se realizaron cinéticas de autoagregación a diferentes pH (3.6, 5.0, 7.0 y 9.0) y temperaturas (35, 37 y 39°C) durante un periodo de 24 h en intervalos de 2 h. Estas

cinéticas ayudaron a realizar el modelo matemático, cada cinética fue realizada por triplicado (**Figura 36**).

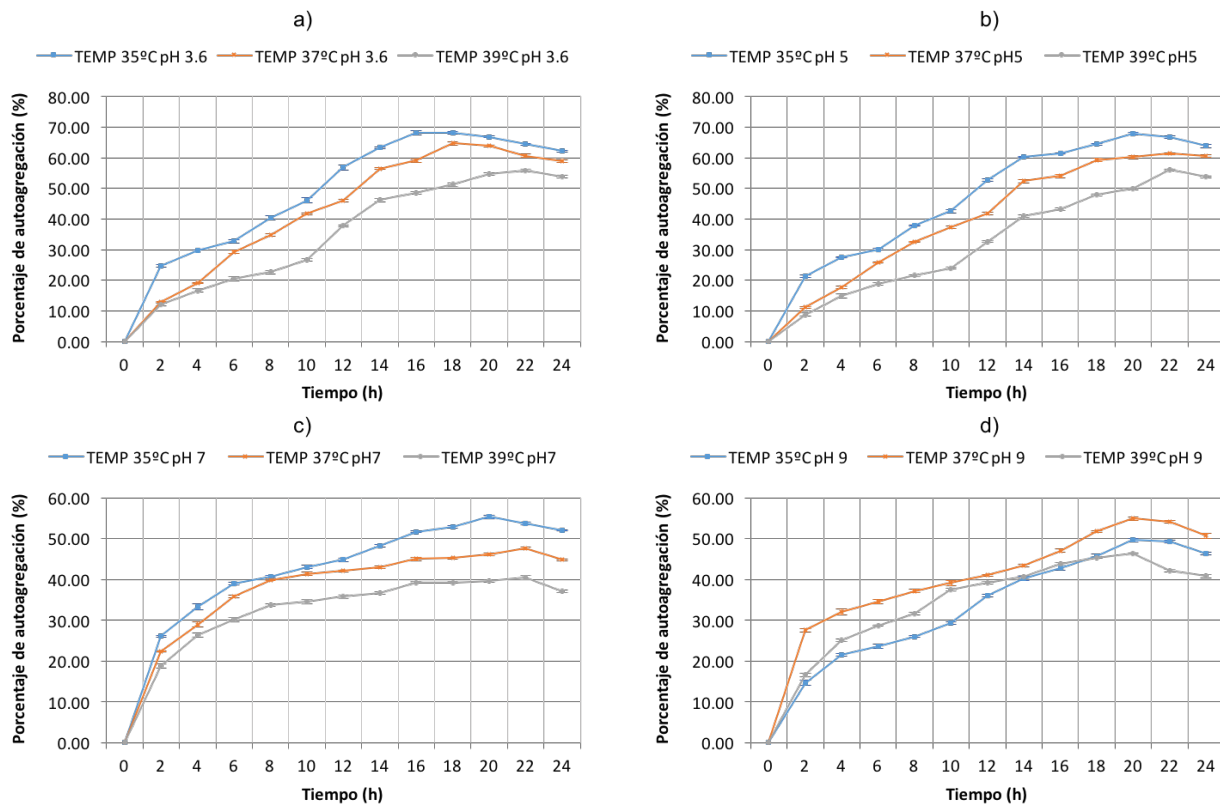


Figura 36. Cinéticas de autoagregación a 37, 35 y 39 °C a pH a) 3.6, b) 5.0, c) 7.0 y d) 9.0

BIBLIOGRAFIA

Ábalos, C., 2005. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances En Odontoestomatología*, 21(1), pp. 347-353.

Almeida-Prieto, S., Blanco-Mendez, J. & Otero-Espinar, F. J., 2007. Microscopic image analysis techniques for the morphological characterization of pharmaceutical particles: Influence of the software, and the factor algorithms used in the shape factor estimation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), p. 766–776.

Abdulla, A. A., Abed, T. A. & Saeed, A. M., 2014. Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity of Six Lactobacillus Strains. *British Microbiology Research Journal*, 4(4), pp. 381-391.

Adlerberth, I. y otros, 2000. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, Volumen 2, p. 223–239.

Adlerberth, I. y otros, 1996. A mannose-specific adherence mechanism in Lactobacillus plantarum conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and environmental microbiology*, Julio, 62(7), pp. 2244-2251.

Adamson, A. W., 1958. *Physical Chemistry of surfaces*. 6 ed. Los Angeles(California): Wiley-Interscience Publication.

Adawi, D. & Jeppson, B. y. M. G., 2003. *Composicion farmaceutica que comprende Lactobacillus plantarum y arginina..* España, Patente nº 2 112 818.

Agudelo, C., Ortega, R. & Hoyos, J. L., 2010. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: lactobacillus plantarum A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. *Facultad de ciencias agropecuarias*, 8(2), pp. 8-16.

Aguilar, K., Garvín, A., Azuara, E. & Ibarz, A., 2016. Rate-Controlling Mechanisms in the Photo-degradation of 5-Hydroxymethylfurfural. *Food Bioprocess Technol*, 9(8), pp. 1399-1407.

Anas, M., Eddine, H. J. & Mebrouk, K., 2008. Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goat's milk against Staphylococcus aureus. *World Journal of Dairy Food Science*, 3(1), pp. 39-49.

Atuma, C., Strugala, V., Allen, A. & Holm, L., 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), pp. G922-G929.

Blokzijl, W. & Engberts, J., 1993. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32(1), pp. 1545-1579.

Baranyi, J. & Roberts, T. A., 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(1), pp. 199-218.

Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T. & Roberts, T., 1996. Effects of parameterisation on the performance of empirical models used in predictive microbiology. *Food Microbiol*, 13(1), pp. 83-91.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & Van Oss, C., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7(1), pp. 47-53.

Bermudez-Brito, M. y otros, 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), pp. 160-174.

Bravo-Ferrada, B. y otros, 2015. Study of surface damage on cell envelope assessed by AFM and flow cytometry of *Lactobacillus plantarum* exposed to ethanol and dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, Marzo, Issue 118, pp. 1409--1417.

Bron, P. A. y otros, 2004. Genetic Characterization of the Bile Salt Response in *Lactobacillus plantarum* and Analysis of Responsive Promoters In Vitro and In Situ in the Gastrointestinal Tract. *Journal Of Bacteriology*, 186(23), pp. 7829–7835.

Brunser, O., Cruchet, S. & Gotteland, M., 2013. *Fisiología Gastrointestinal y nutrición*. Santiago(Chile): Nestle.

de Vriesa, M. C., Vaughanb, E. E., Kleerebezema, M. & de Vos, W., 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, Volumen 16, p. 1018–1028.

Calvo Carrillo, M. d. I. C., 2013. *Toxicología de los alimentos*. 1ª ed. Cd. de Mexico: McGraw Hill Mexico.

Cerning, J. y otros, 1994. Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), pp. 3914-3919.

Chen, J. y otros, 2011. Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation. *Food Function*, 2(3-4), pp. 174-182.

Collado, M. C. & Meriluoto, J. y. S. S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), pp. 1065-1073.

De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. & De Vos, W. M., 2006. Lactobacillus plantarum - survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), pp. 1018-1028.

De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. & Degeest, B., 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), p. 1059–1068.

de Wouters, T. y otros, 2015. Adhesion Potential of Intestinal Microbes Predicted by Physico-Chemical Characterization Methods. *PLOS ONE*, 10(8), pp. 1-17.

Dertli, E., Mayer, M. J. & Narbad, A., 2015. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in Lactobacillus johnsonii F19785. Dertli E, Mayer MJ, Narbad A. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in Lactobacillus johnsonii F19785. *BMC Microbiology*. 2015;15(1):8. doi:10.1186/s12866-015-0347-2., 15(1), p. 8.

Dilnawaz, P., Shakeel, M. & Ziyaurrahman A. R., S. T., 2011. A review on probiotics. pp. 26-33.

Dias, F. S., Duarte, W. F. & Schawn, R. F., 2013. Evaluations of adhesive properties of presumptive probiotic Lactobacillus plantarum strains. *Bioscience Journal*, Volumen 29, pp. 1678-1686.

Doyle, R. J., 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and Infection*, 2(4), p. 391–400.

Ducrotté, P., Sawant, P. & Jayanthi, V., 2012. Clinical trial: Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 14 Agosto, 18(30), pp. 4012-4018.

Duncan-Hewitt, W., 1990. Nature of the hydrophobic effect. In *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. pp. 39-73.

- Engel, T., Reid, P. & Hehre, W., 2007. *Introducción a la fisicoquímica: termodinámica*. 1ª ed. Distrito Federal: Addison Wesley.
- FAO/WHO, 2002. *Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, Londres, Ontario, Canada: Guidelines for evaluation of probiotics in food.
- Fernández Fernández, S. y otros, 2002. *Estadística descriptiva*. 2ª edición ed. Madrid: ESIC.
- García-Cayuela, T. y otros, 2014. Adhesion abilities of dairy Lactobacillus plantarum strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57(1), pp. 44-50.
- Gastelum-Reynoso, G. & Lopez-Malo, E. P.-G., 2008. Dinamica de sistemas: una herramienta para la microbiología predictiva. *Temas Selectos de ingeniería de los alimentos*, 2(2), pp. 27-40.
- Georgieva, R. y otros, 2009. Technological properties of candidate probiotic Lactobacillus plantarum strains. *International Dairy Journal*, 19(11), pp. 696-702.
- Gientka, I. y otros, 2016. The exopolysaccharides biosynthesis by Candida yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22(1), pp. 31-37.
- Giraffa, G., Chanishvili, N. & Widyastutic, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), p. 480–487.
- Goktepe, I., Juneja, V. & Ahmedna, M., 2006. *Probiotics in food Safety and Human Health*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Gomez Zavaglia, A., Tymczyszyn, E., De Antoni, G. & Disalvo, A., 2003. Action of trehalose on the preservation of Lactobacillus Delbrueckii Ssp. Bulgaricus by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1), pp. 1315-1320.
- González-Vázquez, R. y otros, 2014. Morphometric parameters, zeta potential and growth rate of Lactobacillus casei Shirota BY EFFECT OF DIFFERENT BILE SALTS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), pp. 189-199.
- Grajales, P. & Patiño, J., 2009. *Inmunología. Una ciencia activa*. 2ª Edición ed. Medellín(Colombia): Universidad de antioquia.

Habimana, O., Semião, A. & Casey, E., 2014. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*, Volumen 454, p. 82–96.

Hori, K. & Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, Volumen 48, p. 424–434.

Hunter, R. J., 1986. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Sydney: Academic Press.

Johansson, M. L. y otros, 1993. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied And Environmental Microbiology*, Enero, 59(1), pp. 15-20.

Johansson, M. E., Sjövall, H. & Hansson, G. C., 2013. The Gastrointestinal Mucus System in Health and Disease. *Gastroenterology & hepatology*, 10(6), pp. 352-361.

John, F. T., Spencer, A. & Ragout de Spencer, L., 2004. *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*. Nueva Jersey: Springer Science & Business Media.

Juarez Tomas, M., Wiese, B. & Nader-Macias, M. E., 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), p. 1383–1391.

Juge, N., 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, 20(1), pp. 30-39.

Klarin, B. y otros, 2005. Adhesion of the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v onto the gut mucosa in critically ill patients: a randomised open trial. *Critical care*, Abril, 9(3), pp. 285-293.

Kleerebezem, M. y otros, 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), pp. 199-230.

Katsikogianni, M. & Missirlis, Y. F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria- material interactions. *European cells & materials*, Volumen 8, pp. pages 37-57.

Krieg, N. R. y otros, 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Nueva York: Springer Science & Business Media.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S., 2008. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), pp. 728-764.

Levander, M. S., Forsberg, C. & Wahren, L., 2011. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Nordic College of Caring Sciences*, Julio, Volumen 16, pp. 122-128.

Liu, J. y otros, 2001. CMEIAS: A Computer-Aided System for the Image Analysis of Bacterial Morphotypes in Microbial Communities. *Microb Ecol*, Issue 41, p. 173–194.

Logan, S., 2000. *Fundamentos de Cinética Química*. 1ª ed. Madrid: Addison Wesley.

McDonald, K. & Sun, D.-W., 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 52, pp. 1-27.

M.L.Johansson, y otros, 1993. Administration of Different Lactobacillus Strains in Fermented Oatmeal Soup: In Vivo Colonization of Human Intestinal Mucosa and Effect on the Indigenous Flora. *Applied And Environmental Microbiology*, Enero, 59(1), pp. 15-20.

Madsen, K. L., 2012. Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, 5(1), pp. 55-59.

Mahan, B. M. & Myers, R. J., 1987. *Química: curso universitario*. 4ª ed. California: Addison-Wesley Iberoamericana.

Marjorie, M., Cowan, K., Grant, T. & Doyle, R. J., 1987. Energetics of the Initial Phase of Adhesion of Streptococcus sanguis to Hydroxylapatite. *Journal of bacteriology*, Julio, 169(7), pp. 2995-3000.

Md. Fakruddin, R. M., 2011. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science*, 40(2), pp. 121-131.

Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y., Reyes Méndez, A. I. & Hernández-Sánchez, H., 2013. In Vitro Evaluation of the Probiotic Potential of Halotolerant Lactobacilli Isolated from a Ripened Tropical Mexican Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(4), pp. 239-251.

Metchnikoff, I., 1907. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. Nueva York: Springer.

Mitsuoka, T., 1992. Intestinal Flora and Aging. *Nutrition Reviews* , Diciembre, 50(12), pp. 438-446.

Mozes, N., Handley, P. S., Busscher, H. J. & Rouxhet, P. G., 1991. *Microbial Cell Surface Analysis : Structural and Physicochemical Methods*. Nueva York: Publicaciones VCH.

Muñoz-Provencio, D. y otros, 2009. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch Microbiol*, 191(2), pp. 153-161.

Nagpal, R. y otros, 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*, Mayo, Volumen 334, pp. 1-15.

Nola, S., Erasmus, J. C. & Braga, V., 2012. Quantitative and Robust Assay to Measure Cell– Cell Contact Assembly and Maintenance. *Methods in molecular biology*, 827(1), p. 43.

Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P. & Fonseca, A. P., 2001. The Role Of Hydrophobicity In Bacterial Adhesion. *BioLine*, pp. 11-22.

Olson, E., 2011. Particle Shape Factors and Their Use in Image Analysis–Part 1: Theory. *Journal of GXP Compliance*, 15(3), pp. 85-96.

Ohland, C. L. & MacNaughton, W. K., 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), pp. G807-G819.

Palmer, J., Flint, S. & y Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), pp. 577-588.

Palmfeldt, J. & Hahn-Hägerdal, B., 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1), p. 235–238.

Panikov, N. S., 2002. *Kinetics, Microbial Growth*. 1^a ed. Moscow: Encyclopedia of Bioprocess Technology.

Pelletier, C. y otros, 1997. Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 63(2), p. 1725–1731.

Per Klemm, R. & Munk, V., 2010. Prevention of bacterial adhesion. Volumen 88, p. 451–459.

Petrucci, R. H., Herring, F. G., Madura, J. D. & Bissonette, C., 2011. *Química General*. 10ª ed. Madrid: Pearson.

Poortinga, A. T., Bos, R., Norde, W. & Busscher, H. J., 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*, Issue 47, p. 1±32.

Prajapati, V. S. & Jashbhai, B., 2013. Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals—A Review. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, Enero, Volumen 5, p. 81–91.

Pumbwe, L. y otros, 2007. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, Abril, Issue 47, p. 78–87.

Raff, H. & Levitzky, M., 2011. *Fisiología Médica: Un enfoque por aparatos y sistemas*. DF(DF): Mc Graw Hill Lange.

Ramiro-Puig, E. y otros, 2008. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española De Enfermedades Digestivas*, 100(1), pp. 29-34.

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. & Jespersen, L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol*, 36(1), pp. 22-29.

Revutskit, E., 1959. Temperature Changes in the human gastrointestinal tract and its rhythmic activity when empty. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 47(5), pp. 550-554.

Ricciardi, A. y otros, 2002. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), pp. 297-306.

Rosenberg, M., 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett*, Volumen 262, pp. 129-134.

Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), pp. 29-33.

Ruas-Madiedo, P. y otros, 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection*, 69(8), pp. 2011-2015.

Schär-Zammaretti, P. & Ubbink, J., 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical journal*, 85(6), pp. 4076-4092.

Schar-Zammaretti, P. y otros, 2005. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 8165-73.

Sánchez, B. y otros, 2012. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends in Food Science y Technology*, 26(1), pp. 56-63.

Savoie, F. y otros, 2015. Intestinal temperature does not reflect rectal temperature during prolonged, intense running with cold fluid ingestion. *Institute of Physics and Engineering in Medicine*, Enero, Volumen 36, pp. 259-272.

Sergio Almeida-Prieto, J.´. B.-M.´. F. J. O.-E., 2007. Microscopic image analysis techniques for the morphological characterization of pharmaceutical particles: Influence of the software, and the factor algorithms used in the shape factor estimation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Issue 67, p. 766–776 .

Shen, J.-P. & Chou, C.-F., 2014. Bacteria under the physical constraints of periodic micro-nanofluidic junctions reveal morphological plasticity and dynamic shifting of Min patterns. *Biomicrofluidics*, 8(4), p. 041103.

Shimakawa, Y. y otros, 2003. Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *International Journal of Food Microbiology*, Mayo, Volumen 81, p. 131–136.

Sieniawskaa, E., Swatko-Ossorb, M., Sawickib, R. & Ginalskab, G., 2015. Morphological Changes in the Overall *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Cell Shape and Cytoplasm Homogeneity due to *Mutellina purpurea* L. Essential Oil and Its Main Constituents. *Medical principles and practice*, 24(1), pp. 527-532.

Storck, T., Picioreanu, C., Viridis, B. & Batstone, D. J., 2014. Variable Cell Morphology Approach for Individual-Based Modeling of Microbial Communities. *Biophysical Journal*, 106(1), p. 2037–2048.

Tiihonen, K., Ouwehand, A. C. & Rautonen, N., 2010. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9(9), pp. 107-116.

Tsuneda, S. y otros, 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, Issue 223, p. 287^292.

Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C. & Salminen, S. J., 199. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Volumen 26, pp. 137-142.

Ubbink, J. & Schär-Zammarett, P., 2007. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(1), p. 263–270.

van der Mei, H., Weerkamp, A. & Busscher, H., 1987. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 6(5), pp. 277-287.

Van Tassell, M. L. & Miller, M. J., 2011. Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(4), pp. 613-636.

Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C. & Vanderleyden, J., 2007. Adherence factors of Lactobacillus in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), pp. 140-148.

Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J., 2008. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Formación Médica Continuada*, 26(1), pp. 48-55.

Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W., 2007. *Fundamentos De Bioquímica*. 2ª ed. Mexico: Médica Panamericana.

Weerkamp, A., Uyten, H. & Busscher, H., 1988. Effect of Zeta Potential and Surface Energy on Bacterial Adhesion to Uncoated and Saliva-coated Human Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research*, Julio, Issue 12, pp. 1483-1487.

Whiting, R. C., 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), pp. 467-494.

Wilsona, W. W., Wadeb, M. M., Holmana, S. C. & Champlin, F. R., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, Septiembre, Issue 43, p. 153–164.

Yanchun, Z. y otros, 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), pp. 2080-2091.

Zehnder, M. C. M. & van Loosdrecht, A. J. B., 1990. *Energetics of bacterial adhesion*. Países Bajos: Experientia.