



Probióticos, una mirada objetiva sobre microorganismos
beneficiosos para la salud.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tutor: Susana Fattori

Alumno: Antonella Coccia

Matrícula: 132722

Carrera: Ciencias Químicas (1401)

Año: 2020

Agradecimientos

Muchas personas han contribuido indirecta o directamente con este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, Susana Fattori, por su incansable entusiasmo, por su sabiduría y paciencia. Gracias Susana por introducirme al fascinante mundo de los probióticos y por acompañarme en cada etapa de esta tesina.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y el apoyo de Danone Argentina. Mi más profundo agradecimiento por brindarme el espacio, el conocimiento, las herramientas y habilidades para el análisis práctico que le terminó de dar forma a esta tesina. A Sheerly Rodríguez Acosta quien me recibió en el laboratorio con los brazos abiertos y a Adrián Jorge Costantini quién con mucha paciencia me compartió los conocimientos prácticos para realizar los recuentos.

Es para mí sumamente importante agradecer también al Ingeniero Ricardo Weill quien me brindó su apoyo y sus recursos en cada etapa de este desarrollo.

Me gustaría expresar mi gratitud a cada uno de mis maestros y profesores, los cuales me inspiraron desde una edad temprana el amor hacia esta disciplina; para ellos mi eterno agradecimiento.

A mi director de carrera, Daniel Bacelo, por aconsejarme y ayudar a que mis objetivos profesionales se cumplan.

Desde lo personal, agradecer a mis amigos por haberme prestado un oído y brindado un consejo cada vez que lo necesité.

Agradezco a Martín Rosas, por las innumerables sesiones de estudio durante estos 5 años, por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida.

Gracias a mi hermano, Lucas Coccia, por ser mi motor durante este largo camino.

Finalmente, agradecer a mis padres, Mónica y Andrés, por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por creer en mí y por apoyarme en cada momento.

Tabla de contenidos

I. RESUMEN	4
II. OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
III. INTRODUCCIÓN	5
Microbiota intestinal beneficiosa.....	5
Historia del origen de los probióticos.....	6
Historia de los probióticos en Argentina	7
Concepto de probiótico y definiciones relacionadas.....	8
Beneficios y mecanismo de acción de los probióticos	12
Productos del mercado que contienen probióticos	13
IV. CAPÍTULOS	20
IV a. YOGUR	20
Yogur como vehículo para probióticos	21
Elaboración de yogures con probióticos.....	23
IV b. NORMATIVA ACTUAL	23
Legislación actual y rotulado de alimentos con probióticos	25
Antecedentes normativos en el mundo	26
Proyecto de directrices del Codex Alimentarius sobre probióticos	27
IV c. RECuento DE MICROORGANISMOS	28
Objetivos de la parte experimental	28
Materiales y métodos	28
Resultados	33
Análisis de resultados.....	34
Comparación con otras metodologías.....	35
V. DISCUSIONES	36
VI. CONCLUSIONES	37
VII. BIBLIOGRAFÍA	38
VIII. ANEXOS	43

Palabras Claves

Probióticos

Microorganismos

Yogur

Microbiota

Paraprobióticos

Abreviaturas

CAA	Código Alimentario Argentino
WHO (OMS)	Organización Mundial de la Salud
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
CERELA	Centro de Referencia para Lactobacilos
EFFCA	European Food and Feed Cultures Association
IDF	International Dairy Federation

I. RESUMEN

Los probióticos juegan un papel muy importante en la salud, cuando se consumen en cantidades suficientes en un alimento, estos seres vivos microscópicos son capaces de aportar beneficios adicionales para la salud. El tracto gastrointestinal humano es el hogar de más de 100 billones de microorganismos que conforman la microbiota gastrointestinal. Hoy en día se cuenta con suficiente evidencia científica que demuestra la contribución de dichos microorganismos a la salud gastrointestinal, la nutrición y defensa del organismo. En este trabajo se analizó el impacto de los probióticos sobre dichas funciones, su utilización por parte de la industria en una gran variedad de alimentos y cosméticos, entre otros; la normativa vigente, tanto nacional como internacional y los conceptos actuales de postprobióticos y prebióticos. Se ensayó una técnica que permitió el aislamiento, identificación y recuento de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, y *Bifidobacterium* presentes en diferentes yogures, alimentos con una extensa historia en el uso de microorganismos probióticos. Los recuentos de bacterias acidolácticas del fermento estuvieron comprendidos entre $1,0 \times 10^7$ y $3,5 \times 10^9$ UFC/g y el de las bacterias probióticas en el rango de $3,5 \times 10^6$ y $5,8 \times 10^8$ UFC/g. Se presentó una mirada objetiva sobre los microorganismos probióticos, que deja el campo abierto a futuras investigaciones en materia de probióticos, postprobióticos, prebióticos y simbióticos y el amplio espectro de posibilidades de aplicación que poseen en distintas áreas, además de la industria alimentaria.

SUMMARY

Probiotics play a very important role in health; when consumed in sufficient quantities in a food, these microscopic beings are capable of providing additional health benefits. The human gastrointestinal tract is home to more than 100 billion microorganisms that make up the gastrointestinal microbiota. Today there is enough scientific evidence that shows the contribution of these microorganisms to gastrointestinal health, nutrition and defense of the body. The impact of probiotics on these functions was analyzed in this work, as well as their implementation in a great variety of foods and cosmetics, among others, by the industry; current national and international regulations and the concepts of postprobiotics and prebiotics. A technique that includes the isolation, identification and enumeration of *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium* present in different yogurts (food with an extensive history in the use of probiotic microorganisms) was tested. The counts of lactic acid bacteria of the ferment were between 1.0×10^7 and 3.5×10^9 CFU/ g and the counts of the probiotic bacteria were in the range of 3.5×10^6 and 5.8×10^8 CFU/ g. An objective look at probiotic microorganisms was presented, which leaves the field open to future research on probiotics, postprobiotics, prebiotics and symbiotics; and a wide spectrum of possible applications to different areas in addition to the food industry.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

En la actualidad, cepas de microorganismos que incluyen bacterias acidolácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* se adicionan a los alimentos lácteos fermentados con el fin de aportar características organolépticas particulares y beneficios al tracto intestinal de quienes los consumen. A estos microorganismos se los conoce como probióticos. El objetivo principal de este trabajo es mostrar el impacto positivo de los microorganismos probióticos sobre la microbiota intestinal y el estado actual del mercado de alimentos con probióticos en Argentina.

Se espera que el trabajo contribuya a enriquecer el material bibliográfico existente, sea una guía para la implementación de la metodología aplicable al recuento de microorganismos probióticos, aporte conocimiento sobre los beneficios de los probióticos y el estado actual de la normativa en la materia y conlleve a la motivación de estudiantes sobre el complejo y fascinante mundo de los probióticos.

Objetivos específicos

1. Analizar los beneficios que provienen del consumo de probióticos.
2. Introducir conceptos relacionados a los probióticos.
3. Emplear una técnica para el aislamiento y recuento de las bacterias acidolácticas utilizadas en la elaboración de yogures con probióticos.
4. Comparar la técnica ensayada con otras técnicas aplicables al recuento de microorganismos probióticos.
5. Entender qué microorganismos probióticos se consumen y en qué productos.
6. Revisar la normativa actual en Argentina y en el mundo en materia de probióticos.

III. INTRODUCCIÓN

Microbiota intestinal beneficiosa

El tracto gastrointestinal humano es el hogar de más de 100 billones de microorganismos que forman lo que se denomina microbiota gastrointestinal. Hoy en día se sabe que dichos

microorganismos contribuyen con las dos funciones primordiales del sistema gastrointestinal, nutrición y defensa. Ambas funciones no dependen únicamente de la estructura propia del tubo digestivo, sino también de la presencia de dichos microorganismos que reconocen elementos foráneos y rechazan posibles agresiones provenientes del mundo exterior, entre otras (Goktepe, 2010).

La población microbiana del intestino humano incluye unos 100 billones de bacterias de unas 500 a 1.000 especies distintas (Eckburg, 2005), (Tannock, 2006). Entre ellas se pueden reconocer géneros predominantes como *Clostridium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, Bacteroides y *Bifidobacterium*; especies raras como *Streptococcus*, *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*; y especies transitorias como bacterias lácticas y levaduras (Biocodex, 2020). La ecología intestinal varía de persona a persona, esta singularidad está dada por diferentes factores como: los modos de alimentación (inclusiva la leche materna la cual es de gran influencia), los fármacos que se ingieren, los hábitos alimentarios y las maneras de cocinar, el entorno y modo de vida (medio rural frente a urbano; actividad física). Además, factores como la genética, el componente anatómico del tracto intestinal, la edad gestacional (parto prematuro frente a parto en término), el modo de nacimiento (parto vaginal frente a cesárea) o la edad se reconocen como factores influyentes (Team, G., 2020).

Si se analiza la microbiota intestinal de una persona a lo largo de su vida, se puede evidenciar una evolución. Se podría decir que la “ecología intestinal” de un bebé no es la misma que la de un adulto, ni estas son idénticas a la de un anciano. Los recién nacidos presentan una microbiota en exponente crecimiento y diversificación, mientras que la del adulto se suele encontrar estable a menos que aparezca algún problema de salud particular que la altere. Llegando a la vejez, la microbiota intestinal comienza a empobrecerse (Team, G., 2020).

A lo largo de los años se ha intentado entender qué características representan un microbioma “sano”. En estos términos se han delimitado ciertos parámetros centrales que parecen estar asociados con: la salud del huésped, la diversidad microbiana, la abundancia relativa de ciertos microbios y su riqueza genética y la resistencia de las poblaciones microbianas. Es por esto que la complicada relación bidireccional huésped-microbiota es vital para mantener la salud (Tuddenham, 2015). Una microbiota sana logra una verdadera asociación, una simbiosis, con el intestino y realiza funciones tanto locales como sistémicas, es decir, a escala de todo el organismo (Biocodex, 2020). En el cuerpo humano las microbiotas estables más relevantes se encuentran en el tracto gastrointestinal, la piel y la vagina. La que reside en el intestino es la más compleja en cuanto a población de microorganismos como a funciones. Una de las principales actividades en las que participa y que se desarrollará a lo largo de este trabajo es la intervención en el sistema inmunitario intestinal el cual protege al cuerpo de agresiones de agentes patógenos como las bacterias o los virus. En efecto, el intestino es el principal depósito

de células inmunitarias del organismo y este documento da cuenta de cómo los probióticos pueden contribuir con esa función (Kitazawa, 2014).

Historia del origen de los probióticos.

Históricamente la humanidad ha consumido grandes cantidades de probióticos en forma de alimentos fermentados mucho antes de que este término fuera establecido. El asentamiento de las poblaciones creó la necesidad de tener que almacenar los excedentes de alimentos, surgiendo así la fermentación controlada como medio de conservación. Esta técnica puede ser rastreada hasta miles de años atrás.

Los primeros productos de origen fermentativo que se reconocen son bebidas alcohólicas como producto de la fermentación de frutos, el vino y la cerveza representan las primeras bebidas fermentadas, desde hace más de 1.000 años. El pan, a partir de la fermentación de levaduras, surgió en Egipto 4000-3500 años a.C. y en la India apareció una especie de yogur llamado Dahi que consistía en leche agria coagulada. Muchos son los alimentos que se comenzaron a conservar mediante la fermentación, en el anexo I de este trabajo se puede ver la evolución en la historia de los alimentos fermentados (Ray, 2015).

Sin embargo, la lógica detrás de la fermentación comenzó a entenderse recién en 1665 con la identificación de los microorganismos causantes de ella, de la mano de van Leeuwenhoek y Hooks (Gest, 2004). El esplendor del consumo de alimentos fermentados disminuyó notoriamente a partir de 1864, cuando Napoleón III encargó al científico Louis Pasteur que estudiara las alteraciones causantes del deterioro del vino, ya que suponían pérdidas para el sector. Pasteur descubrió que ciertas bacterias eran las causantes del daño y propuso como solución calentar el vino hasta los 44 °C por breve tiempo. Fue entonces, que a principios del siglo XX la pasteurización, proceso que debe el nombre a su creador, eliminó a los microorganismos de la ecuación (Debré, 1998).

Fue recién a principios del siglo XX cuando se observó por primera vez el rol beneficioso que juegan algunas bacterias. En 1907 el microbiólogo ruso, Premio Nobel en Medicina, Élie Metchnikoff, desarrolló la hipótesis de que los microorganismos que transforman la leche también podían equilibrar la flora intestinal humana y ser la clave para agregar años a la vida. A su vez sugirió -La dependencia de los microbios intestinales de los alimentos permite adoptar medidas para modificar la flora de nuestros cuerpos y reemplazar los microbios nocivos por microbios útiles - (Metchnikoff, 1907). Al mismo tiempo, el pediatra francés Henry Tissier, observó que unas bacterias caracterizadas por la forma "Y" se encontraban en menor número en las heces de niños con diarrea, en comparación con niños sanos (Tissier, 1906). Tissier sugirió que estos microorganismos podrían ser administrados a los pacientes con diarrea para ayudarlos a restablecer la salud de la flora intestinal. No fue sino, hasta el año 1960 que el término "probiótico" comenzó a utilizarse para nombrar sustancias producidas por microorganismos que

promueven el crecimiento de otros microorganismos (Lilly, 1965). En el anexo II se puede ver cómo el concepto de probiótico fue mutando y tomando forma a lo largo de los años hasta el 2001, año en el que un Comité de Expertos de FAO/OMS propone la definición más aceptada hasta el día de hoy (Weill, 2017).

Historia de los probióticos en Argentina

Argentina es un país pionero en la investigación, desarrollo y normativa de probióticos. El Centro de Referencia para Lactobacilos, mejor conocido como CERELA (CERELA, CONICET, Tucumán) fue fundado en el año 1976. Este instituto fue creado a través de un convenio tripartito entre el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), la Fundación Miguel Lillo y la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC). Junto con la empresa SanCor C.U.L desarrolló la primera leche cultivada del país a la cual se la denominó SanCor Bio.

La creación de SanCor Bio comienza cuando un equipo de médicos del hospital del Niño Jesús de Tucumán muestra a científicos de CERELA su preocupación por la creciente cifra de mortalidad infantil a causa de cuadros de diarrea agudos. A partir de ese momento, comenzaron las investigaciones que resultaron en el aislamiento de probióticos provenientes de las heces de niños que, habiendo estado expuestos a la enfermedad, hubieran resistido naturalmente. Para el año 1984 ya se habían aislado las bacterias de las heces y se realizaban estudios sobre los microorganismos individuales para comprobar que tuvieran la capacidad de desarrollarse en leche e inhibir los patógenos causantes de la muerte de los niños. Entre los microorganismos aislados, la cepa *Lactobacillus casei* fue la que mejor eficiencia demostró.

Luego de muchos estudios tecnológicos, metabólicos e inmunológicos SanCor C. U. L. y CERELA presentaron en 1995 la primera leche fermentada probiótica capaz de tratar la desnutrición y la diarrea, y estimular la producción de inmunoglobulina. Años más tarde, otras empresas desarrollaron productos lácteos con probióticos como Actimel (2001) y Activia (2006) que se unieron a los ya importados como Yakult (leche fermentada probiótica de una empresa japonesa) (De Paula, 2018).

Concepto de probiótico y definiciones relacionadas

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación la cual forma parte de la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS), define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2001), (FAO/WHO, 2002). Esta misma definición fue adoptada en el Código Alimentario Argentino (Artículo 1389) para los alimentos que contienen probióticos.

Lo que establece la anterior definición es que un microorganismo es probiótico si está vivo y confiere algún beneficio para la salud de quien lo consume, lo que indica que no todo microorganismo es probiótico. Para sustentar el beneficio, se requiere de evidencia científica. Se trata de estudios clínicos que deben llevarse a cabo para demostrar un beneficio comprobable y medible para cada cepa que se quiera rotular como probiótico. A su vez, la definición especifica que los microorganismos deben ser suministrados en cantidades adecuadas aludiendo a que, en caso contrario, no se apreciarían dichos beneficios.

Por otra parte, se mencionan a los probióticos como microorganismos en general. Esto se debe a que el término no se restringe a bacterias, sino que es más amplio. Se han reconocido propiedades probióticas tanto de algunas bacterias, como de levaduras. A pesar de esto, los microorganismos más comúnmente utilizados son las bacterias. Dentro de los probióticos de aplicación alimentaria se pueden reconocer a microorganismos de los grupos de lactobacilos y bifidobacterias; siendo las especies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum* las más comunes (De Paula, 2018). En el anexo III se presenta un cuadro que muestra las especies más utilizadas, incluyendo las mencionadas anteriormente.

Otro concepto relacionado a los probióticos, aunque diferente, es el de prebiótico. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles por el huésped, que tienen efectos benéficos a través de su metabolismo selectivo en el tracto intestinal (Gibson, 2004).

La Asociación Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) recientemente revisó la definición de prebiótico y propuso la siguiente redacción: “un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos del huésped que confiere un beneficio para la salud” (Gibson, 2017) Los microorganismos intestinales beneficiosos fermentan a los prebióticos y obtienen su energía de supervivencia a partir de la degradación de las uniones indigeribles. Como resultado de esto, los prebióticos pueden influir selectivamente en la microbiota intestinal incentivando el desarrollo de los microorganismos más beneficiosos (Davani-Davari, 2019). La interacción prebiótico-microbiota genera ácidos grasos de cadena corta como el butírico, acético y propiónico, el primero posee excelentes efectos tróficos sobre el colonocito y favorece la correcta diferenciación celular; el acético se metaboliza fundamentalmente en la masa muscular y el propiónico en el hígado. (Dadone, 2005). Los prebióticos son en su mayoría oligosacáridos de carbohidratos no digeribles, cadenas de monosacáridos unidos por uniones glicosídicas de diferente grado de polimerización que el organismo humano no puede hidrolizar durante la digestión, por lo que llegan al colon prácticamente sin modificación. Se encuentran en vegetales tales como achicoria, alcauciles, ajo, cebolla, puerros, espárragos, grano de trigo, Topinambur (tubérculo), yacón y bananas. Los compuestos más estudiados y más frecuentemente utilizados como ingrediente en alimentos son los fructanos

(fructooligosacáridos (FOS) e inulina) y galactooligosacáridos (GOS), presentes en la leche materna, y cuyos efectos están relacionados con el enriquecimiento de *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium* spp. Otros candidatos con diferente grado de evidencia con respecto a su condición de prebióticos son el ácido linoleico conjugado (CLA), los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), mananooligosacáridos (MOS) y xilooligosacáridos (XOS). Según datos de bibliografía, algunos de los beneficios asociados a ellos son la mejora de las funciones gastrointestinales, reducción del riesgo de infecciones intestinales, aumento de la absorción de minerales como el calcio, modulación del metabolismo energético y aumento de la sensación de saciedad.

Se puede inferir entonces que la diferencia esencial entre prebióticos y probióticos es que los probióticos son organismos vivos mientras que los prebióticos son nutrientes beneficiosos para el desarrollo de la microbiota intestinal. Dicho de otra manera, los prebióticos son el alimento de los probióticos y se encuentran en los alimentos formando parte de lo que se denomina fibra dietaria. De esto se desprende que los prebióticos pueden ser beneficiosos para los probióticos, especialmente en lo que concierne al aumento de su crecimiento y actividad porque constituyen una simbiosis. La simbiosis se define como la “mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos a base de microbios vivos en el aparato digestivo del huésped” (Andersson, 2001), (FAO/WHO, 2001).

La simbiosis, probióticos y prebióticos, optimiza algunas funciones básicas de la microflora intestinal: metabólicas como aumento de la absorción de calcio y regulación del metabolismo hepático de los lípidos; funciones de defensa del organismo como prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales; funciones tróficas como prevención y tratamiento de las enfermedades con base autoinmune (Danone, 2005). Es importante señalar que la composición de la microbiota intestinal varía tanto entre los grupos etarios como entre los individuos y como consecuencia de ello, el grado en que los compuestos bióticos son metabolizados por los microorganismos intestinales puede diferir entre las personas al igual que los beneficios para la salud derivados de ellos. Muchos de los efectos beneficiosos de la adición de probióticos y prebióticos a los alimentos dependen de la producción de ácidos grasos de cadena corta y de compuestos tales como fracciones microbianas, bacteriocinas, proteínas funcionales, polisacáridos secretados, polisacáridos extracelulares, lisados de células, ácido teichoico (ácido presente en la pared celular de las bacterias gram-positivas), péptidoglicanos y estructuras bacterianas tipo pili.

Estos conocimientos contribuyeron a una revalorización de la fermentación de los alimentos y dieron lugar a un nuevo concepto, el de postbiótico. Los postbióticos son componentes bioactivos funcionales provenientes de la fermentación que pueden ser utilizados en combinación con nutrientes para promover la salud. A diferencia de los probióticos, la viabilidad

no es un requisito esencial para que un postbiótico posea beneficios para la salud lo que evita el desafío técnico de mantenerlos viables y estables en el alimento durante toda su vida útil (Wegh, 2019). La eficacia postbiótica se basa en los metabolitos microbianos, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, componentes de la pared celular u otras moléculas complejas que se generan durante el proceso de fermentación que, en algunos casos, está influenciada por los procesos a los cuales se somete al alimento. En la literatura hay estudios que muestran efectos clínicos e inmunomoduladores relevantes de los postbióticos y evidencia de que su uso en personas sanas puede mejorar la salud en general y aliviar los síntomas de enfermedades como cólicos en niños, dermatitis atópica y diferentes causas de diarrea en adultos.

Se pueden mencionar dos tipos de postbióticos:

- a) Las fórmulas infantiles fermentadas con bacterias productoras de ácido láctico u otras bacterias, que en la mayoría de los casos no contienen bacterias viables;
- b) Los paraprobióticos.

Según la definición más aceptada, los paraprobióticos o probióticos fantasma son "células microbianas no viables (intactas o rotas) o extractos de células crudas que, cuando se administran (por vía oral o tópica) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al consumidor humano o animal" (Taverniti, 2011). Así como el término probiótico se encuentra restringido a productos que contienen microorganismos vivos, los paraprobióticos hacen referencia a microorganismos no viables o fracciones de microorganismos que pueden tener un impacto positivo en la salud de quien lo consuma.

Aunque no han sido estudiados tan en profundidad como los probióticos, se los ha asociado con varios efectos biológicos destacando que podrían constituir una excelente opción para mejorar el estado de salud y el bienestar del organismo huésped. La mayoría de los datos en la literatura muestran que estos efectos están vinculados a su consumo directo y, por lo tanto, el uso de alimentos como portadores de paraprobióticos parece constituir un campo a explorar con varias oportunidades y desafíos (De Almada, 2016).

En términos generales, los probióticos actúan bajo un mecanismo basado en su interacción con otros microorganismos (miembros de la microbiota o patógenos) o con células huésped mientras que los paraprobióticos mantienen una relación con el huésped basada en el reconocimiento de los componentes o productos bacterianos que producen respuestas del tejido linfoide asociado a mucosas y, por lo tanto, al sistema inmune. En otras palabras, mientras que los probióticos ejercen un tipo de interacción que depende mayormente de la viabilidad de las células, los paraprobióticos poseen interacciones independientes de su viabilidad y, de esa forma, ejercen una exclusión competitiva (competencia por nutrientes o sitios de adhesión) e inhibición directa de ciertos microorganismos.

Además de los probióticos, prebióticos y postbióticos, existen las esporas. Diferentes cepas de *Bacillus coagulans* se utilizan en los alimentos como probióticos para mejorar y mantener el equilibrio de la microflora intestinal. Al igual que otros bacilos, ese microorganismo posee la capacidad de formar esporas. En los últimos años, el uso de esporas ha sido motivo de atención debido a su estabilidad frente al calor y a la acidez, propiedades que les permitirían sobrevivir a algunos de los procesos que se aplican a los alimentos.

Se han propuesto potenciales usos de las esporas como ingredientes en alimentos tales como té y hierbas para infusiones, productos horneados, bebidas, barras de cereal, cereales para el desayuno, helados y postres congelados, pastas, snacks, golosinas, sopas, fórmulas infantiles, entre otros (FDA, 2019). Este nuevo enfoque de los microorganismos probióticos aún requiere de investigaciones con respecto a su seguridad y eficacia. Las esporas resisten el pasaje a través del estómago, alcanzan el intestino delgado, germinan, se multiplican y generan diferentes compuestos asociados a algún beneficio para la salud.

Beneficios y mecanismo de acción de los probióticos

Es importante destacar que la microflora del cuerpo humano es diferente dependiendo del órgano en la que se encuentre; por ejemplo, la microflora del aparato respiratorio es distinta de la flora del intestino, en este hay bacilos y en la nariz hay cocos. Al momento de elegir el probiótico y el efecto sobre la salud debe tenerse en cuenta dicha diferencia, ya que, siguiendo el ejemplo anterior la presencia de bacterias del intestino en la nariz podría generar problemas.

Los beneficios de los probióticos sobre la microbiota intestinal están directamente relacionados con la generación de un ecosistema intestinal favorable. Según la declaración del consenso de expertos del año 2014, se podría adjudicar una posible distribución de los mecanismos entre probióticos. Algunos de ellos podrían estar ampliamente difundidos entre los géneros más comúnmente estudiados: resistencia a la colonización, producción de ácidos y ácidos grasos de cadena corta, regulación del tránsito intestinal, normalización de la microbiota perturbada, aumento de la rotación de enterocitos, exclusión competitiva de patógenos, son algunos de los ejemplos. Por otro lado, en dicho documento se afirma que también puede haber mecanismos frecuentes entre la mayoría de las cepas de una especie probiótica: síntesis de vitamina, antagonismo directo, refuerzo de la barrera intestinal, actividad enzimática y neutralización de agentes cancerígenos. También se han distinguido, otros mecanismos más específicos asociados a algunas cepas en particular como, por ejemplo, efectos neurológicos, inmunológicos, endocrinológicos y la producción de especies bioactivas (Hill, 2014).

Como se menciona anteriormente en la sección “Concepto de probiótico y definiciones relacionadas”, los beneficios ofrecidos por los probióticos deben ser comprobables, para ello se requieren estudios clínicos bien diseñados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, siendo fundamental, encontrar una relación directa entre el consumo de cierto microorganismo con el

efecto deseado. Entonces, se pueden definir ciertos criterios a examinar como por ejemplo la relación temporal entre el consumo y el efecto, cuán fuerte es esa relación, la dosis-respuesta, replicación de resultados, consideración de explicaciones alternativas para esa relación y la especificidad de la asociación. Una vez definido el beneficio de determinada cepa, se puede proceder al desarrollo del producto comercial. Para esto, se debe establecer el régimen de dosis y duración recomendada para que el producto lleve la alegación de salud correspondiente al probiótico.

Entre los beneficios que aportan los probióticos a la salud humana se encuentran la prevención de desórdenes inmunológicos como asma, cáncer, diabetes o artritis. Por otro lado, son utilizados en el tratamiento de desórdenes intestinales como diarrea, constipación, colitis e infecciones por *Salmonella* y *Shigella*. Además, se han demostrado beneficios en el tratamiento de la intolerancia a la lactosa y otros desórdenes como vaginitis, enfermedades del hígado relacionadas al consumo de alcohol, cáncer, hipercolesterolemia y estabilización de la flora intestinal (Goldin, 1998), (Gill, 2008).

Los probióticos juegan un papel importante en la prevención y tratamiento de la constipación. Aunque este beneficio se restringe a ciertas cepas, es aprovechado actualmente en la creación de diferentes productos con el fin de ayudar al bienestar de los consumidores. Así mismo, el consumo de ciertos probióticos ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la inflamación intestinal como consecuencia de alergias alimentarias. Algunos estudios sugieren que los probióticos pueden disminuir la inflamación intestinal y reacciones de hipersensibilidad en lactantes con alergias alimentarias y eczema atópico resultante (Goldin, 1998). Más allá de la inflamación como respuesta a alérgenos, existe la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) la cual consta principalmente de dos formas: la enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Ambas enfermedades son de naturaleza crónica y se caracterizan clínicamente por recaídas y remisiones. En ambos casos, el tratamiento con probióticos mostró ser una buena alternativa para la modulación o regulación de las respuestas inmunes desreguladas (Gill, 2008).

Uno de los beneficios más estudiados históricamente es la prevención de diarreas causadas por ciertos virus y bacterias patógenas. Este problema es de gran relevancia debido a la cantidad de niños que mueren anualmente por esta causa y la cantidad de adultos que se ven afectados diariamente con consecuencias mucho menos fatales. Es por esto que a lo largo de los años un sinnúmero de estudios in vivo e in vitro han dado prueba de cómo cepas de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* pueden ser usadas para prevenir y tratar diarreas agudas en niños y adultos. También han demostrado que los probióticos pueden ser utilizados para aliviar síntomas de cuadros de diarrea asociados a antibióticos o infecciones causadas por *Clostridium difficile* o *Helicobacter pylori* (FAO/WHO, 2001)

El refuerzo del sistema inmune innato es sin duda uno de los beneficios más importantes del consumo de probióticos debido a que la respuesta inmunológica está estrechamente ligada a una microbiota sana. Los parámetros inmunológicos de la mucosa intestinal pueden ser alterados mediante el uso de bacterias acidolácticas. Mediante distintos mecanismos los microorganismos estimulan el sistema inmunitario del huésped para mejorar la inmunidad innata (actividad de macrófagos y células NK), humoral (anticuerpo específico de patógeno / vacuna y células productoras de anticuerpos), e inmunidad basada en células T reguladoras (Gill, 2008). Sin duda, este beneficio tiene el potencial de influir en la salud general de la población mundial con el desarrollo de tratamientos preventivos basados en la ingesta de probióticos.

Productos del mercado que contienen probióticos

En los últimos años se ha visto un incremento en el mercado de variedad de productos con agregado de probióticos. Si en un comienzo se limitaban principalmente a los alimentos lácteos fermentados, hoy se pueden encontrar en otros alimentos: chocolates, té, fórmulas para lactantes, barras de cereal, suplementos dietarios y en otros productos tales como cosméticos, alimento para animales, medicamentos ginecológicos y muchas otras innovaciones más.

Todos los organismos vivos presentan naturalmente colonias de microorganismos en distintas partes de sus organismos. Los seres humanos, por ejemplo, presentan microorganismos en la piel, boca, faringe, aparato respiratorio, tracto urogenital y tracto intestinal. Cada órgano presenta varias cepas de microorganismos, pero diferentes entre sí. En el Anexo IV se presenta un esquema de la distribución de los microorganismos en el cuerpo humano. Como ya se mostró en la sección “Microbiota intestinal beneficiosa”, las bacterias que conforman la microbiota del intestino humano contribuyen al sistema inmunológico del cuerpo y pueden ser favorecidas con el agregado de microorganismos probióticos. Esta premisa se puede extrapolar al resto de las microbiotas del cuerpo humano y a otros organismos vivos, lo que despierta la necesidad de investigar qué cepas funcionan como probiótico para dichas microbiotas y que productos se pueden desarrollar a partir de eso.

Algunos de los productos con probióticos que actualmente se encuentran en el mercado son:

- Fórmulas para lactantes

Estos productos están pensados para aportar a los lactantes ciertos nutrientes que satisfacen las necesidades alimentarias durante los primeros meses de vida, y los de la primera infancia (niños entre 1 y 2 años de edad) para la adaptación progresiva a la alimentación normal de la segunda infancia, es decir en el período de crecimiento en el que se encuentren. En general se utilizan como suplementos de la leche materna o como alimentación complementaria. En los últimos 15 años se ha demostrado que la leche materna contiene entre 1.000-10.000

bacterias/mL de leche y que su composición bacteriana es muy variada, aunque principalmente contiene bifidobacterias y lactobacilos, los cuales como ya se ha mencionado, poseen actividad probiótica. Estas son especialmente saludables para el individuo, y sobre todo para el lactante. La inclusión de microorganismos probióticos a las fórmulas para lactantes y alimentos para la alimentación complementaria es una forma de aportar los microorganismos que normalmente vendrían con la leche materna. Algunos de los beneficios que se reconocen de esta incorporación son la función anti-inflamatoria e inmunoreguladora que tienen un papel fundamental en la salud intestinal del bebé (Pérez Cano, 2020).



Fig.1. Fórmula Novalac con *Bifidobacterium lactis*. Fuente: <http://www.pmfarma.es/noticias/26023-ferrer-presenta-su-formula-infantil-mas-completa-novalac-premium-plus.html>

Fig.2. Fórmula NAN- A.R, Nestle con *L. reuteri*. Fuente: <https://shop.nestle.com.ar/products/nan-a-r-lata-x-400g>

- Chocolates con probióticos

El chocolate o cacao es rico, entre otros compuestos, en polifenoles (Hayek, 2013). Los polifenoles son flavonoides que poseen poder antioxidante. Más allá de los beneficios propios del cacao, se pueden encontrar chocolates con efecto probiótico, con beneficios adicionales. Este efecto no proviene del chocolate per se, sino que está asociado a su utilización como matriz para proporcionar probióticos al organismo. Según Homayouni (2016), el chocolate es un producto que muestra gran potencial para ser utilizado como portador de cepas probióticas como *Lactobacillus casei* o *paracasei*, con la ventaja de ser un alimento consumido por todos los grupos de edad. Un ejemplo muy innovador es el de Mela, proyecto de la diseñadora y científica chilena María Apud Bell que se basa en una píldora electrónica desechable que se ingiere y arroja información sobre el estado de la microbiota de esa persona quien luego recibirá bombones de chocolate con microorganismos probióticos especialmente seleccionados para sus necesidades.



Fig.5. Bombones de chocolate con probióticos. Fuente: <https://economis.com.ar/bombones-de-chocolate-con-probioticos/>

- Suplementos dietarios

Los suplementos dietarios son alimentos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de personas sanas que poseen necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Son productos que contienen uno o varios nutrientes (péptidos, proteínas, lípidos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra dietaria), en algunos casos se incluyen hierbas en su formulación. En los últimos años los probióticos han pasado a formar parte de la formulación de estos alimentos, alegando beneficios particulares para la salud, dependiendo de la cepa probiótica presente y su combinación con determinados nutrientes.



Fig.3. Culturelle: Cápsulas con *Lactobacillus GG* Fuente: https://www.amazon.com/Culturelle-Digestive-Probiotic-Vegetarian-Capsules/dp/B07ML1Y8G7/ref=sr_1_5?dchild=1&keywords=Probi%C3%B3tico+%5B30+Mil+Millones+de&qid=1598385124&sr=8-5&tag=guiadesuplementos.es-us-20

Fig.4. PROBIOLAC: Cápsulas con 15 cepas bacterianas. Fuente: <https://aavalabs.com/products/probiotic?lang=es>

- Kéfir

Esta bebida históricamente conocida es el producto fermentado con cultivos acidolácticos elaborados con granos de kéfir, *Lactobacillus kefir*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kéfir están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevicie* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*) (Artículo. 576, CAA). Hoy en día se puede encontrar el Kéfir de leche, que parece un yogur, o el Kéfir de agua que es menos viscoso y se le adiciona azúcar para desencadenar la fermentación a falta de la lactosa de la leche.



Fig.6. Nódulos de Kéfir. Fuente: <https://www.comprarkefir.es/kefir-de-leche-fresco.html>

- Cosméticos: Cremas cosméticas

Con el objetivo de generar un impacto positivo en el llamado microbioma de la piel, se han desarrollado cremas con probióticos. Las mismas proclaman equilibrar a los microorganismos presentes en la piel para de esa forma reforzar la barrera de defensa que es la piel para los seres humanos.



Fig.8. Bálsamo para la piel con probióticos. Fuente: <https://www.schrammek.com/beautynews/probiotic-skincare-probiotic-balm-probiosense-for-sensitive-skin/>

Fig.9. Línea de BioBalance, cremas con probióticos. Fuente: <https://www.smlhealth.com/product/biobalance-probiotic-restorative-beauty-sleep-serum/>

- Kombucha

La kombucha es una infusión que se prepara con té y se fermenta con SCOBY, un cultivo simbiótico de levaduras y bacterias beneficiosas para la microbiota. Esta bebida fermentada se ha consumido desde el año 220 a.C. durante la dinastía Tsin en Manchuria, China. En ese momento se le adjudicaban ciertas propiedades mágicas. Luego, se hizo muy popular en Rusia y fue consumido como tratamiento para enfermedades metabólicas, hemorroides y reumatismo (Greenwalt, 2000). Hoy en día la kombucha es consumida en todas partes del mundo con alegaciones referentes a su actividad probiótica y antioxidante.



Fig.7. Kombucha, Pink Lady Apple. Fuente: <https://health-ade.com/products/pink-lady-apple-kombucha-16-oz-12-pack>

- Desodorantes

Se han realizado variados estudios sobre el microbioma de la piel que dan idea del rol que tienen las bacterias en el olor que se genera en las axilas. Se estima que algunas cepas de bacterias generan más olor que otras por lo que un balance equilibrado de bacterias podría mejorar el problema de las axilas que huelen mal. Hoy en día, hay formulaciones de desodorantes con prebióticos y probióticos para aumentar la efectividad en la mitigación de olores.



Fig.10. Desodorante natural con probióticos. Fuente: <https://www.amazon.com/Natural-deodorant-daydry-probiotics-dambre/dp/B07BTLJ85Z>

Fig.11. Desodorante orgánico con probióticos. Fuente: <https://costarica.desertcart.com/products/35918222-organic-island-deodorant-baking-soda-free-with-probiotics-for-sensitive-skin-2-5-oz-stick-natural-with-magnesium-arrowroot-kaolin-clay-zinc-oxide-aluminum-free-unscented-vegan-single-stick>

- Medicamentos ginecológicos

Se trata de probióticos vaginales mejor conocidos como óvulos probióticos. La microbiota vaginal, coloquialmente llamada flora vaginal, está formada por millones de bacterias de distintas especies que ofrecen protección frente a las diferentes infecciones vaginales. Las bacterias que están en mayor proporción son diversas especies de *Lactobacillus* (96%). Cuando se suministran estos óvulos, los probióticos se adhieren a la mucosa vaginal y restablecen la flora íntima de forma natural. Algunos ejemplos:



Fig.12. Óvulos con probióticos marca Melagyn. Fuente: <https://www.gynea.com/productos/melagyn-probiotico-vaginal>

Fig.13. Óvulos con probióticos marca ISDIN. Fuente: <https://www.isdin.com/producto/woman-isdin/isadin-plus>

- Alimentos para animales

En el campo de la nutrición animal, no solamente debe tenerse en cuenta el diseño de nuevas estrategias para mejorar y aumentar la producción de alimentos de origen animal, sino también cuidar su salud y fundamentalmente garantizar la inocuidad de los alimentos producidos y las condiciones higiénico-sanitarias durante el proceso. Los probióticos representan una importante herramienta como ingrediente en alimentos para animales tales como aves, cerdos y rumiantes. Actualmente en el mercado se encuentran alimentos para mascotas con probióticos y prebióticos.



Fig.14. Suplemento para perros All Natural. Fuente: <https://www.thehealthydogco.com/es/producto/enzimas-digestivas-para-perros-totalmente-naturales/>

Fig.15. Suplemento para perros con sensibilidad cutánea. Fuente: <https://www.nutrique.com.ar/productos/skin-sensitivity>.

Fig.16. Suplemento para pollos con 3 cepas de microorganismos. Fuente: <https://nutricionanimal.info/biomin-ew-nutrition-premiados-feed-innovations-eurotier-2016/>

Sin duda todos los productos mencionados anteriormente son una muestra de cómo las diferentes industrias han obtenido provecho de los beneficios que los probióticos tienen para ofrecer. En la siguiente sección se hará hincapié en los yogures, producto históricamente apreciado por sus propiedades probióticas y principal foco de este trabajo.

IV. CAPÍTULOS

IV a. YOGUR

Yogur como vehículo para probióticos

Según el CAA se entiende por Yogur o Yoghurt o logurte al producto cuya fermentación se realiza con cultivos protosimbióticos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a los que en forma complementaria pueden

acompañar otras bacterias acidolácticas que, por su actividad, contribuyen a la determinación de las características del producto terminado. Dichas bacterias son lábiles a pH ácido por lo que una vez ingeridas, no permanecen viables más allá del estómago donde los jugos gástricos promueven un ambiente ácido de alrededor de pH 1,2 - 2,0. Por el contrario, los microorganismos probióticos son resistentes a dichos valores de acidez y logran alcanzar el ecosistema intestinal, de ahí la posibilidad de incorporarlos a alimentos como el yogur.

La industria láctea incorpora probióticos a sus yogures desde mediados de los años 90. El yogur como matriz para la incorporación de probióticos es realmente eficiente por dos motivos. En primer lugar, al ser conservado en frío permite que los microorganismos se mantengan viables durante todo el período de vida útil del alimento y lleguen en cantidades necesarias a los consumidores. Esto es sumamente importante debido a que los efectos positivos de los probióticos sobre la salud humana se evidencian solo al ser administrados en cantidades adecuadas. En segundo lugar, se entiende que el yogur es un alimento que se consume con frecuencia lo que favorece a la regularidad de consumo necesaria para que los beneficios sean apreciables (De Paula, 2018)

Elaboración de yogures con probióticos

Hoy en día se puede encontrar una gran variedad de yogures, si hacemos foco en el yogur propiamente dicho y dejamos de lado los ingredientes como cereales y frutas, se pueden diferenciar dos grandes grupos en base a la viscosidad. Los yogures “firmes” que son aquellos que presentan una alta viscosidad y los “líquidos” que pueden ser más o menos fluidos según la formulación utilizada y el proceso tecnológico elegido. En ambos casos, la industria láctea emplea las bacterias fermentadoras y los probióticos como cultivos liofilizados y/o cultivos congelados.

En términos generales la producción de todos los yogures comienza a partir de una leche higienizada por medios mecánicos adecuados. Se estandariza el contenido de grasa y de sólidos no grasos, el extracto seco no graso se aumenta mediante el agregado de leche en polvo para elevar el contenido de sólidos totales hasta 10 a 15% (p/v), se adicionan azúcares, otros edulcorantes y colorantes, dependiendo del tipo de yogur. Luego se procede a realizar una pasteurización, o tratamiento térmico equivalente que garantice la inocuidad del producto seguido de una homogenización. En este último paso se reduce el tamaño de los glóbulos grasos de la leche lo que da como resultado un producto de textura más suave.

El siguiente paso del proceso consta de la inoculación de la leche con las bacterias productoras de yogur. Dichas bacterias son inoculadas bajo una técnica reconocida como DVI, Direct to Vat Inoculation, que implica el agregado de los cultivos directamente al tanque de fermentación donde se produce el yogur.

Luego se procede a la incorporación de los microorganismos probióticos siguiendo los protocolos correspondientes a cada textura de yogur. Si se está elaborando un yogur firme, se inocula y se lleva a cabo el proceso de fermentación dentro del mismo envase que llega al consumidor. En el caso de los yogures líquidos (batidos o bebibles) la fermentación se realiza en los tanques fermentadores y el producto coagulado se somete a un proceso de quiebre de la cuajada y fluidización mediante bombas especializadas, con agitación suave o intensa, dependiendo de la textura final del producto (bebible o líquido). A continuación, se enfría parcialmente y se agregan los microorganismos probióticos.

En el siguiente diagrama de flujo se puede apreciar el proceso de producción de yogures con probióticos:

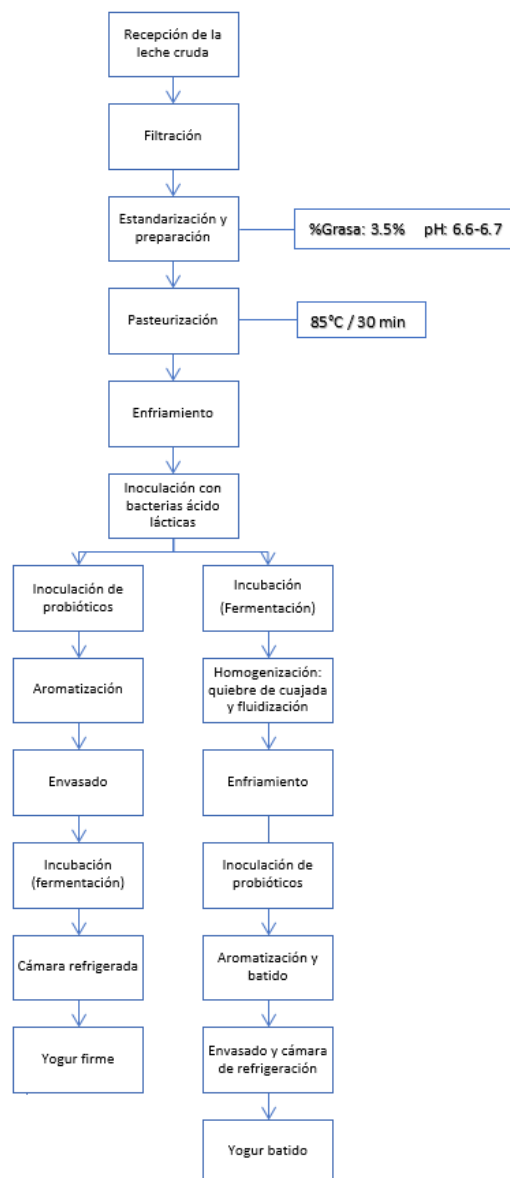


Fig.17. Diagrama de flujo de proceso productivo de yogures con probióticos.

La fermentación de la leche para la obtención de yogures es una acidificación mediante un proceso de fermentación láctica llevada a cabo por los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Dichas bacterias actúan cooperativamente, cada especie produce metabolitos que son aprovechados por la otra y de esta forma ambas crecen a mayor velocidad que si estuvieran solas. Ahora bien, los probióticos prácticamente no intervienen en este proceso a pesar de estar presentes por lo que cabe la posibilidad de que aumenten en un orden logarítmico de ser capaces de desarrollarse parcialmente durante la fermentación. Lo que esto quiere decir es que para que el consumidor obtenga un número viable de probióticos que ejerza beneficios sobre la salud, estos se deberán agregar en niveles de 1×10^7 UFC/ml para que alcancen niveles de 1×10^8 UFC/ml al llegar al consumidor (De Paula, 2018).

IV b. NORMATIVA ACTUAL

Legislación actual y rotulado de alimentos con probióticos

Actualmente el mercado de productos probióticos, a nivel internacional, no posee un marco regulatorio definido. En muchos casos los probióticos son incorporados como ingrediente en un alimento, con el objeto de incluir alegaciones de salud en su rotulado. En el mercado argentino, hay una notable variedad de marcas y tipos de yogures, aunque son pocos los casos en los que se puede advertir la presencia de probióticos. En el caso de estos productos, los puntos más importantes a especificar en el rótulo están relacionados con la cantidad y cepa de microorganismos que presenta el producto y su estabilidad en el tiempo. Es fundamental que los fabricantes alcancen una estabilidad y uniformidad de los alimentos con probióticos para evitar confusión o engaño al consumidor. De aquí la importancia de exigir la incorporación de información detallada.

Aunque no se encuentra establecida una dosis efectiva de probióticos ni un estándar internacional para todas las cepas existentes, de acuerdo con la evidencia científica disponible el consumo de cantidades comprendidas entre 1×10^9 y 1×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/ gramo de producto de microorganismos probióticos es suficiente para garantizar el beneficio sobre la salud del organismo huésped.

En el Artículo 1389 del CAA, se establecen requisitos mínimos para la caracterización de un microorganismo como probiótico, siendo estos:

- Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie).
- Caracterización in vitro e in vivo.
- Demostración del efecto probiótico adjudicado.
- Demostración de la seguridad del microorganismo.

El primer punto (identificación de la cepa) hace alusión a los análisis que se deben llevar a cabo para la caracterización del microorganismo, los cuales, deben realizarse en laboratorios reconocidos por la autoridad sanitaria y con métodos validados. El segundo ítem (caracterización in vitro e in vivo) hace referencia a diferentes estudios que permiten demostrar que el microorganismo resiste las principales barreras biológicas del organismo arribando viable al intestino. Como tercera condición, debe demostrarse mediante ensayos in vivo e in vitro los beneficios para la salud atribuidos al microorganismo. El último punto refiere que la cepa no debe ser riesgosa para la salud ni presentar o promover la translocación bacteriana (pasaje de bacterias del intestino más allá de los nódulos mesentéricos), es decir que el microorganismo no debe generar un daño para la salud al ser ingerido por el consumidor. Con estos cuatro puntos, el CAA garantiza que el término probiótico no sea utilizado al azar o indiscriminadamente.

Así mismo, la regulación establece la forma en la que debe ser presentado el producto. Este deberá: -presentarse comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa de la(s) cepa(s) que lo componga(n) y la concentración de células viables de cada una de ellas (UFC/g) (Artículo 1389 del CAA). Se entiende según este artículo, que la carga de células viables deberá estar comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima. Únicamente cumpliendo los requisitos descritos se podrá rotular al producto: "... con probióticos" llenando el espacio en blanco con la denominación de venta del alimento correspondiente.

Es importante remarcar que, un alimento que contiene probióticos que cumplen con los requisitos del artículo mencionado anteriormente, puede declarar los beneficios que aporta a la salud del consumidor en su publicidad. Dichas declaraciones de propiedades saludables pueden ser permitidas si resultan consistentes con la política nacional de salud, si están respaldadas por una cantidad de evidencia científica válida y suficiente como para justificar dichas declaraciones, y si provee información verídica y no engañosa que ayude al consumidor a elegir una alimentación saludable (Disposición N° 7730, 2011). Es decir, si el elaborador de un alimento con probióticos quisiera utilizar alegaciones de salud en los mensajes que publiciten su producto, estas deberían estar justificadas científicamente lo que evita que el término probiótico sea utilizado erróneamente y confunda a los consumidores. La autorización se puede obtener cumplimentando todos los requisitos establecidos en la "Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos", anexo de la citada Disposición. La Comisión Evaluadora de Declaraciones de Propiedades Saludables es la encargada de evaluar la documentación y emitir un informe fundado aconsejando a la Autoridad Sanitaria Nacional la autorización de las alegaciones de salud en la publicidad el alimento motivo de la solicitud.

Antecedentes normativos en el mundo

Son pocos los países que cuentan con normas sobre probióticos y aquellos que las tienen, presentan puntos de vista diversos y criterios diferentes sobre la inocuidad, caracterización, calidad, requisitos de etiquetado y definición del término. Argentina es pionera en el tema y presenta un marco regulatorio muy detallado en comparación con otros países. Como se plantea en la subsección “Legislación actual y rotulado de alimentos con probióticos”, el CAA adopta una definición para el término probiótico, un protocolo de evaluación para su uso como ingrediente en los alimentos y una definición de alimento con probióticos. Este no es el caso de muchos países.

En Australia y Nueva Zelanda no hay regulaciones específicas sobre probióticos ni una definición para ellos. Los microorganismos probióticos, son considerados “nuevos alimentos”.

Canadá desarrolló una guía que tiene el objetivo de clarificar el uso aceptable de la declaración de propiedades saludables de los probióticos en el etiquetado y publicidad de los productos alimenticios que los contengan.

En el caso de Europa, no hay normativa ni directrices que definan a los probióticos, ni una lista de cepas reconocidas o especies individuales de probióticos. Solo uno de los Estados Miembro de la Unión Europea, Italia, ha desarrollado ciertos requisitos para calificar cepas específicas como probióticas.

India presenta una normativa que define a los alimentos con probióticos añadidos y Tailandia tiene una norma específica para los probióticos y una definición para los productos que los contengan.

La situación en los Estados Unidos es particular, ya que los probióticos se pueden considerar tanto alimentos como ingredientes. Para establecer la inocuidad del producto se acepta que el fabricante realice un proceso de libre determinación mediante el cual reconoce al componente alimentario como seguro, mediante una notificación voluntaria a la agencia reguladora de los ingredientes alimentarios siguiendo el proceso para nuevos ingredientes alimentarios con vistas a su uso en complementos alimenticios, cuando resulte aplicable. (CCNFSDU, 2019).

Los países del Cono Sur y el Caribe presentan requisitos que deben cumplir los microorganismos probióticos para figurar en el etiquetado de los alimentos. Brasil, Colombia y Ecuador, adoptaron al igual que Argentina, la definición propuesta por la FAO/OMS para el término probiótico. Brasil, además establece protocolos para la evaluación de los probióticos como ingredientes de los alimentos. A diferencia de Argentina, los protocolos brasileños exigen algunos estudios más específicos para aquellas especies cuya seguridad no se encuentra establecida aún, como por ejemplo: genotoxicidad y mutagenicidad; toxicidad aguda; toxicidad subcrónica; toxicidad a largo plazo; y toxicidad para la reproducción y el desarrollo, cuando la

cepa está destinada a niños menores de tres años y mujeres embarazadas (Resolução RDC Nº 241, 2018).

La disparidad en términos de normativa es sin duda una problemática a abordar. La comercialización a nivel internacional de productos con probióticos se ve altamente afectada por la falta de armonización entre los distintos países. Los entes reguladores nacionales se encuentran con obstáculos innecesarios a la hora de permitir la comercialización de un alimento con probióticos. A su vez, el mal uso del término probiótico por parte de los fabricantes, puede conducir a una interpretación equívoca cuando los consumidores deben elegir un producto. Por todo esto, el Comité de Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales está trabajando sobre un proyecto de directrices que espera armonizar la normativa en materia de probióticos para beneficio del comercio internacional y la protección de los consumidores.

Proyecto de directrices del Codex Alimentarius sobre probióticos

La Comisión del Codex Alimentarius es el más alto organismo internacional en materia de normas de alimentación. Es una entidad subsidiaria de FAO/OMS que compila todas las normas, códigos de comportamientos, directrices y recomendaciones de la Comisión en el llamado Codex Alimentarius. El Código se creó para proteger la salud de los consumidores, garantizar la aplicación de prácticas leales en el comercio internacional de los alimentos y coordinar todos los trabajos internacionales sobre normas alimentarias. Hoy en día el término probiótico se emplea en el Codex únicamente bajo la norma Doogh en un texto que hace referencia a los ingredientes permitidos en bebidas fermentadas (Codex Alimentarius, 2018). Por lo tanto, las regulaciones sobre probióticos como componente de los alimentos difieren entre países y es sin duda de vital importancia establecer una situación reglamentaria a nivel internacional.

El aumento en los últimos años del comercio mundial de probióticos es evidente y preocupa a los organismos reguladores. En 2017 la Asociación Internacional de Probióticos (IPA) propuso la elaboración de directrices sobre probióticos ante uno de los Comités del Codex Alimentarius (Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales). A partir de ese momento, por primera vez en el ámbito del Codex, se comenzó a trabajar sobre un documento de debate junto con un documento de proyecto de directrices para probióticos, tarea que quedó a cargo de Argentina. El principal objetivo del documento es abordar la preocupación en torno a la falta de un marco normativo armonizado para los probióticos aludiendo a que unas directrices internacionales armonizadas beneficiarían al comercio internacional de alimentos con probióticos y asistirían a las autoridades nacionales en su evaluación. Esto garantizaría que los consumidores reciban un producto inocuo y eficaz. Consecuentemente, el comité distingue como cuestiones principales a tratar: el establecimiento de una definición armonizada de “probióticos”, criterios mínimos de inocuidad y caracterización, la calidad y el etiquetado.

El uso indebido del término “probiótico” en la denominación de venta de algunos alimentos es un foco de preocupación. El origen de este problema viene dado por la falta de criterios definidos o directrices internacionalmente aceptadas sobre el concepto de microorganismos probióticos. A pesar de que existe una definición de la FAO/OMS (2001), ampliamente reconocida y revisada que define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”, a nivel mundial se comercializan productos como alimentos probióticos que no reúnen los requisitos mínimos para ser denominados como tales.

La producción de productos con probióticos presenta un gran desafío ya que los procesos industriales varían de país en país lo que da lugar a problemas relacionados con la calidad, la inocuidad y el etiquetado. La tarea que se está llevando adelante en el ámbito del Codex plantea establecer criterios de inocuidad y caracterización mínimos que se espera sean considerados como requisitos mínimos para considerar a una cepa como probiótico, que incluyen: caracterización taxonómica del microorganismo, caracterización funcional de la cepa y evaluación de la inocuidad del microorganismo para el uso previsto. Asimismo, los microorganismos deberán estar vivos cuando se consuman, encontrarse en cantidades adecuadas y debe demostrarse su viabilidad en el alimento al que será incorporado. En cuanto a la inocuidad, plantea el seguimiento de directrices ya existentes en el Codex para ese fin, así como también un aval científico para aquellos géneros y especies recientemente reconocidos como probióticos con pruebas in vitro y análisis genómicos y fenotípicos.

Respecto al etiquetado de los alimentos, se propondría que las etiquetas de productos que contengan probióticos muestren el nombre del microorganismo o microorganismos (género, especie y cepa) en la lista de ingredientes, cantidad de células viables de los microorganismos probióticos totales (UFC/g), nombre del alimento, porción y condiciones de almacenamiento.

Se espera que con el trabajo sobre las directrices anteriormente mencionadas se logre llegar a un marco normativo armonizado entre países miembros del Codex. Esto permitirá prácticas equitativas en la producción de alimentos con probióticos y la consecuente comercialización de carácter seguro tanto para los entes reguladores nacionales como para los consumidores.

IV c. RECUENTO DE MICROORGANISMOS

Objetivos de la parte experimental

- **Objetivo General**

Las técnicas actuales para el recuento de microorganismos probióticos en yogures son muy variadas. Danone, una empresa con amplia trayectoria en este campo, utiliza medios diferenciados para el aislamiento y recuento de bacterias acidolácticas. Dichos medios

permiten separar selectivamente los microorganismos probióticos según detallados protocolos para luego proceder al recuento de los microorganismos y de esta forma garantizar un producto seguro y estandarizado para los consumidores.

La siguiente práctica se llevó a cabo en los laboratorios de control de calidad microbiológica de la empresa Danone Argentina, donde se aplicó la técnica mencionada para el aislamiento, la identificación y recuento de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium* presentes en diferentes yogures.

- **Objetivo específico**

Emplear una técnica para el aislamiento y recuento de las cuatro bacterias acidolácticas utilizadas en la elaboración de yogures con probióticos.

Materiales y métodos

Se utilizaron reactivos de calidad analítica y agua para análisis. Los medios de cultivo o los reactivos preparados que no fueron utilizados inmediatamente, se los almacenó en la oscuridad a una temperatura de $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo no mayor a 1 mes.

Preparación de las muestras

Las muestras no fueron sometidas a ningún tratamiento previo.

Preparación de diluyentes y medios de cultivo

Todos los diluyentes y medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos.

- **Agua peptonada:** se preparó colocando 1000 ml de agua destilada junto con 8,50 g de cloruro de sodio (NaCl) y 1 g de triptona. Se dejó en agitación durante 15 minutos y se ajustó el pH a un valor de $7,0 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Agua peptonada con cisteína:** se preparó colocando 1000 ml de agua destilada junto con 8,50 g de cloruro de sodio (NaCl), 1 g de triptona y 0,30 g de L- cisteína. Se dejó en agitación durante 15 minutos y se ajustó el pH a un valor de $7,0 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Medio de cultivo M17 agar (BIOKAR):**

Composición (g/L):

Triptona	2,50
Digerido péptico de carne	2,50
Digerido péptico de soja	5,00
Extracto de levadura	2,50

Extracto de carne	5,00
Lactosa	5,00
Glicerofosfato de sodio	19,00
Sulfato de magnesio	0,25
Ácido ascórbico	0,50
Agar bacteriológico	15,00
Agua destilada	1.000

Preparación: siguiendo las instrucciones descritas en el envase.

- **Medio de cultivo MRS Oxgall agar (BIOKAR):**

Composición (g/L):

Digerido enzimático de caseína	10,00
Extracto de carne	10,00
Extracto de levadura	4,00
Glucosa	20,00
Tween 80	1,08
Fosfato dipotásico	2,00
Acetato de sodio	5,00
Citrato de amonio	2,00
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Agar bacteriológico	16,00
Bilis de Buey secada pura	0,50
Agua destilada	1.000

Preparación: según se describe en el envase.

- **Medio de cultivo MRS Ácido agar (BIOKAR):**

Composición (g/L):

Digerido enzimático de caseína	10,00
Extracto de carne	10,00
Extracto de levadura	4,00
Glucosa	20,00
Tween 80	1,08
Fosfato dipotásico	2,00

Acetato de sodio	5,00
Citrato de amonio	2,00
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Agar bacteriológico	16,00
Agua destilada	1.000

Preparación: siguiendo las instrucciones del envase.

- **Medio de cultivo TOS-MUP agar (BIOKAR):**

Composición (g/L):

Peptona a partir de caseína	10,00
Extracto de levadura	1,00
Potasio dihidrógeno fosfato	3,00
Dipotasio hidrógeno fosfato	4,80
Amonio sulfato	3,00
Magnesio sulfato heptahidrato	0,20
L-cysteína monocloruro	0,50
Sodio propionato	15,00
Galactooligosacáridos (TOS)	10,00
Agar	15,00
Agua destilada	950

Preparación: se preparó el medio TOS propionato agar según las instrucciones del envase y se enriqueció con una solución de suplemento liofilizado MUP (suplemento Li-MUP, mupirocina de litio) preparada con 25 mg de Li-Mupirocina y 25 ml de agua destilada. El suplemento se agregó con jeringa al medio de cultivo evitando generar burbujas y alcanzando una proporción de 190 ml de TOS con 10 ml de MUP.

Instrumental

- Autoclave, que permite operar a una temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Tubos de ensayo de 20 mm de diámetro por 200 mm, aproximadamente, conteniendo 9 ml del diluyente estéril.
- Frascos de 200 ml de capacidad.
- Pipetas, calibradas para uso bacteriológico, con capacidad nominal de $1 \pm 0,1\text{ ml}$, $2 \pm 0,1\text{ ml}$, $5 \pm 0,1\text{ ml}$ y $10 \pm 0,1\text{ ml}$.
- Jeringa de $100\text{ ml} \pm 0,1\text{ ml}$.

- Probeta graduada de 20 ml.
- Placas de Petri estériles, de 90 mm a 100 mm de diámetro.
- Jarras de anaerobiosis.
- Generador de anaerobiosis ANAEROGEN (OXOID o CO2Gen).
- Test de anaerobiosis (MERK).
- Estufa, que permite operar a una temperatura de 37 °C ± 1 °C y 44 °C ± 1 °C.
- Balanza que permite pesar al 0,1 mg de precisión.
- Plancha calefactora con agitador magnético.
- Aparato para esterilización por filtración (0,22 µm de poro).
- Matraces de Erlenmeyer.
- Vortex.
- Baño de agua, que permite operar a 47°C ± 2 °C.
- pHmetro, de 0,1 unidades de precisión a 25 °C.

Procedimiento

Preparación de soluciones para placas

Se colocaron 90,0 ± 0,1 ml de agua peptonada en un frasco estéril a 20 °C. A cada frasco se le agregaron 10,0 ± 0,1 g de muestra del yogur elegido para analizar y se homogeneizó para formar una solución madre. Luego, se tomó 1,0 ml con pipeta automática y se lo colocó en un tubo de ensayo que contenía 9,0 ml de diluyente estéril. Inmediatamente se procedió a realizar diluciones seriadas hasta una concentración de 10⁻⁷ g/ml.

Para las diluciones seriadas se agitó en el Vortex el tubo de ensayo anterior unas 10 veces, luego se tomó una muestra de 1,0 ml con pipeta y esta se colocó en otro tubo de ensayo, el cual contenía 9,0 ml del agua peptonada, obteniendo así, una solución de concentración 10⁻² g/ml. A este último tubo se le realizó el mismo tratamiento que al anterior para tomar nuevamente 1,0 ml y diluirlo en 9,0 ml de agua peptonada. Este procedimiento se repitió hasta conseguir una concentración final de 10⁻⁷ g/ml.

Para el análisis de la cepa de *Bifidobacterium* se siguió el mismo procedimiento reemplazando el agua peptonada por agua peptonada con L-Cisteína.

Inoculación e incubación de las placas

A cada placa de Petri se le adicionaron 15 ml del medio de cultivo. Para el análisis de *Streptococcus thermophilus* se utilizó M17 agar, para *Bifidobacterium* el medio TOS-MUP agar, para *Lactobacillus casei*, MRS Oxgall agar y para *Lactobacillus bulgaricus* MRS ácido agar. Luego se inoculó 1,0 ml de cada tubo de ensayo de las diluciones seriadas en las placas de Petri correspondientes. Esto se realizó por duplicado.

Finalmente, se dejaron solidificar los medios a temperatura ambiente y se incubaron bajo las siguientes condiciones:

- *Streptococcus thermophilus* se incubó a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ en condiciones aeróbicas.
- *Bifidobacterium* se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $72\text{ h} \pm 2\text{ h}$, en condiciones anaerobias.
- *L. casei* se incubó durante $96\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ausencia de oxígeno.
- *L. bulgaricus* se incubó según los microorganismos acompañantes en cada caso, siguiendo las indicaciones de la Tabla N°1. De esta forma se espera inhibir el crecimiento de los microorganismos acompañantes y estimular el de *L. bulgaricus*

Tabla 1. Incubación de *L. bulgaricus* según microorganismos acompañantes.

Microorganismos acompañantes	Solo <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> .
Condiciones de incubación			
Temperatura	$37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	$44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	$37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
Atmósfera	Anaeróbica	Anaeróbica	Aeróbica
Tiempo	$48\text{ h} \pm 2\text{ h}$	$48\text{ h} \pm 2\text{ h}$	$72\text{ h} \pm 2\text{ h}$

Todas las placas fueron colocadas de forma invertida y en todos los casos donde eran requeridas condiciones de ausencia de oxígeno, se colocaron las placas en jarras de anaerobiosis junto con CO2Gen para proveer una atmósfera rica en dióxido de carbono y un test de control de anaerobiosis.

Recuento de microorganismos

El recuento de microorganismos probióticos se realizó bajo una fuente de luz contando las colonias formadas. Para esto fue necesario conocer la morfología de las distintas cepas. La apariencia macroscópica de *Bifidobacterium* son colonias redondeadas o lenticulares, algunas con forma de estrella, de 1-4 mm de diámetro y color blancuzco. Por otro lado, la apariencia macroscópica de *L. casei* es lenticular de un diámetro de 1 mm al igual que la de *S. thermophilus* que puede ser de 1 a 2 mm. Finalmente, *L. bulgaricus* presenta colonias lenticulares de 1 a 3 mm de diámetro.

Se retuvieron únicamente las placas en las cuales desarrollaron entre 10 y 300 colonias (placas retenidas).

Cálculo final

Se calculó el número de microorganismos por gramo (N) de muestra analizada utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,1 n_2) d$$

siendo:

ΣC : sumatoria de colonias contadas en todas las placas retenidas.

n_1 : número de placas contadas retenidas en la primera dilución contable.

n_2 : número de placas retenidas en la segunda dilución.

d: factor de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Resultados

A) Recuento de bacterias acidolácticas del fermento (final de vida+2)

Tipo de yogur	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Casei</i>	<i>Bulgaricus</i>	<i>Thermophilus</i>
Batido	N/A	N/A	3,50E+09	6,00E+07
Batido	N/A	N/A	1,00E+07	1,12E+09

B) Recuento de yogures con un solo tipo de microorganismo probiótico (final de vida+2)

Tipo de yogur	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Casei</i>	<i>Bulgaricus</i>	<i>Thermophilus</i>
Bebible	N/A	4,70E+08	8,30E+08	2,00E+08
Bebible	3,00E+08	N/A	3,50E+07	6,20E+07
Bebible	N/A	5,80E+08	3,70E+08	1,18E+08
Bebible	N/A	5,60E+08	6,10E+08	9,30E+07
Bebible	N/A	3,80E+08	1,20E+08	2,70E+08
Bebible	N/A	5,50E+08	7,80E+08	2,10E+08
Batido	N/A	4,00E+07	1,00E+07	3,00E+08

C) Recuento de yogures con dos tipos de microorganismos probióticos (final de vida+2)

Tipo de yogur	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Casei</i>	<i>Bulgaricus</i>	<i>Thermophilus</i>
Firme	6,00E+06	9,00E+07	3,40E+07	1,17E+09
Firme	1,60E+06	6,00E+07	1,00E+07	3,10E+08
Firme	1,20E+07	3,00E+07	9,00E+07	3,70E+08
Firme	3,50E+06	1,00E+07	4,40E+07	1,03E+09
Batido	1,10E+08	2,10E+08	2,80E+08	1,50E+08

En todos los casos las unidades se corresponden a UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra).

Análisis de resultados

Se analizaron 14 muestras de yogures de diferentes texturas provistas por el laboratorio de control de calidad microbiológica de Danone. Todas las muestras fueron analizadas dos días pasada la fecha de vencimiento (final de vida+2). Dos muestras contenían únicamente las bacterias acidolácticas necesarias para el fermento (caso A), estas muestras pertenecían a yogures sin probióticos. Luego, se analizaron 6 muestras de yogur bebible y una de yogur batido con una única cepa probiótica y las bacterias del fermento (caso B). Finalmente, se analizaron 4 muestras de yogur firme y 1 de yogur batido con dos cepas de microorganismos probióticos y las bacterias del fermento (caso C). Cabe aclarar que no fue posible contar con mayor número de muestras y se entiende que los resultados obtenidos no son suficientes para obtener conclusiones estadísticas. La experiencia fue realizada con el objetivo de demostrar cómo una técnica bien ejecutada permite contabilizar los microorganismos de un yogur de forma individual y asegurar así la calidad del producto para los consumidores.

En todos los casos, se pudieron separar las cepas sin inconvenientes lo que permitió contabilizar las colonias de cada familia de microorganismos por separado y comprobar si cumplían con la normativa vigente. En el caso A, se evaluó la cantidad de microorganismos del fermento y ambas muestras demostraron tener valores por encima de 10^7 UFC/g tal como lo indica el Artículo 576 (Capítulo VIII) del CAA. En el caso B, se puede observar como las bacterias acidolácticas del fermento siguen dentro de la norma mencionada anteriormente mientras que, las colonias de probióticos respetan las pautas del Artículo 1389 (Capítulo XVII) del CAA que indica que el alimento con probióticos debe tener una carga de células viables comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima.

Uno de los grandes desafíos de los analistas que realizan recuentos de probióticos es separar no solo, las bacterias del fermento de los probióticos, sino lograr la separación de diferentes cepas de probióticos entre sí. Como bien se puede observar en los resultados del caso C, la técnica aplicada resultó ser muy eficiente a la hora de realizar el recuento en yogures con dos cepas de probióticos presentes.

En términos generales, la técnica fue muy útil sin importar la textura del yogur a evaluar. Se lograron aislar y realizar los recuentos de todos los microorganismos presentes en cada una de las muestras. Se demostró que todos los resultados presentaron valores dentro de las normas ya mencionadas.

Comparación con otras metodologías de análisis

La identificación y cuantificación de microorganismos probióticos en productos lácteos es un desafío para la industria. En los últimos años se han desarrollado diferentes metodologías que permiten ejercer esta práctica de forma eficiente y segura. En la sección experimental de este trabajo se aplicó la técnica que utiliza la empresa Danone basada en el crecimiento selectivo de

los microorganismos mediante medios diferenciados. Esta técnica abarca no solo el recuento de microorganismos probióticos, sino que también las bacterias acidolácticas provenientes del fermento (Protocolos confidenciales de Danone para el recuento de microorganismos probióticos en yogures).

Otra metodología de análisis es la citometría de flujo que se encuentra descrita en la norma ISO 19344:2015 [IDF 232:2015], "Milk and milk products - Starter cultures, probiotics and fermented products - Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry" ("Leche y productos lácteos - Cultivos iniciadores, probióticos y productos fermentados - Cuantificación de bacterias lácticas por citometría de flujo"). Esta norma internacional presenta un método estandarizado para la cuantificación de bacterias activas y/o totales de ácido láctico y cepas probióticas en cultivos iniciales utilizados en productos lácteos y lácteos fermentados. El principio en el que se basa esta técnica es muy simple, ya que analiza células individuales de una mezcla por medio de la dispersión de la luz o por mediciones de fluorescencia propia o adquirida. Es una técnica rápida, sencilla, suficientemente sensible y de fácil automatización para las necesidades de la industria alimentaria. Los datos que se obtienen a partir de la citometría de flujo son fisiología, morfología, genética y diversidad de microorganismos presentes en alimentos o superficies. Cabe subrayar que, a pesar de presentar muchas ventajas, la citometría de flujo es una técnica muy costosa lo que lleva a las empresas a buscar alternativas más convenientes.

La Federación Internacional de Lechería también plantea una técnica para el recuento de microorganismos en yogures. La Norma ISO 7889:2003 [IDF 117:2003], "Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count technique at 37 degrees C" (Yogur – Enumeración de microorganismos característicos – Técnica de recuento de colonias a 37 °C), es una de las técnicas más antiguas (1983) pero que sigue siendo aceptada hasta el día de hoy. Se trata de realizar diluciones seriadas e incubación en medios de cultivo diferenciales para poder realizar los recuentos. El principal problema es que no puede diferenciar microorganismos probióticos, solo permite contabilizar las bacterias del fermento (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Al igual que en la técnica de Danone, la norma citada utiliza medios de cultivo M17 para el recuento de *Streptococcus thermophilus* y MRS ácido para el recuento de *Lactobacillus bulgaricus*. (IDF, 2003).

El Sector de Lácteos y Agroalimentos del Instituto Nacional de Tecnología e Investigación (INTI) publicó en el trabajo: "Identificación y Cuantificación de Microorganismos Probióticos en Productos Lácteos: Bifidobacterias", una metodología que utiliza técnicas de microbiología tradicional de recuento y biología molecular con el fin de evaluar la viabilidad y estabilidad de las bifidobacterias durante la vida útil de diferentes productos lácteos del mercado. Esta técnica solo fue probada con bifidobacterias las cuales se caracterizaron mediante PCR (reacción de

cadena polimerasa) luego de haber sido incubadas en el medio TOS-MUP (mencionado en la sección experimental de este trabajo). Esta metodología resulta ser más laboriosa y costosa, pero aporta información sobre la viabilidad de los microorganismos (Vallejos Castro, 2017).

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha dado cuenta de qué se entiende por microorganismo probiótico, el porqué de su importancia y del gran potencial que presentan en el mantenimiento de la salud y el bienestar. Si bien el concepto se encuentra en continua revisión podemos concluir que la definición actual, según FAO/WHO (2001): *“microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”* es lo suficientemente conservadora para satisfacer los requerimientos del mercado actual. El surgimiento de conceptos como postprobióticos indudablemente obliga a replantear la cuestión sobre qué se considera hoy probiótico. A ello se suman los conceptos de prebiótico y simbiótico para los cuales, un tratamiento independiente es una estrategia aceptable, debido a que funcionan por mecanismos diferentes y son en esencia, distintos.

Efectivamente, ha quedado demostrado que hay un gran número de beneficios adjudicados a los probióticos, respaldados por evidencia científica, relacionados fundamentalmente con efectos beneficiosos sobre la salud intestinal y el sistema inmune de los seres humanos. Los probióticos han surgido como un ingrediente prometedor para uso en alimentos que, más allá de su valor nutricional intrínseco aporten beneficios adicionales para la salud y ayuden a prevenir algunas enfermedades. Por otro lado, queda clara la necesidad de contar con un método de recuento de microorganismos probióticos, ya que la cantidad de probióticos que contiene un alimento está directamente relacionada con los beneficios que este provee.

El presente trabajo adquiere gran relevancia considerando que la evaluación de probióticos es, sin lugar a duda, un requisito de calidad para la comercialización de productos que contengan dichos microorganismos. Actualmente no se cuenta con un protocolo de evaluación de probióticos armonizado a nivel internacional, con el avance del trabajo propuesto en el ámbito del Codex Alimentarius en 2017 se espera que todos los productos que contengan probióticos, que se comercialicen empleando esa denominación, o a los que se pretenda adjudicar determinados beneficios para la salud, hayan demostrado que cumplen los requisitos mínimos de inocuidad, calidad y etiquetado. Un enfoque razonable para hacer frente a esta cuestión es la necesidad de contar con métodos de recuento de microorganismos que permitan identificar y cuantificar los microorganismos probióticos presentes en el alimento.

Actualmente, no todos los laboratorios de microbiología cuentan con equipos sofisticados para realizar técnicas avanzadas como la citometría de flujo descrita en la norma ISO 19344

(IDF232), una solución más viable pueden ser los ensayos con medios de cultivo diferenciales, como el aplicado en la parte experimental de esta tesina. (ISO, 2015).

Finalmente, cabe destacar que uno de los factores más preocupantes tiene que ver con que las regulaciones sobre probióticos como ingrediente de alimentos difieren entre países y que resulta de vital importancia establecer una situación reglamentaria a nivel internacional. Argentina, por su parte, tiene su propia legislación con 14 años de antigüedad por lo que el mercado local cumple con la normativa vigente y presenta una rigurosidad excepcional respecto al marco normativo internacional.

VI. CONCLUSIONES

Este trabajo deja el campo abierto a la investigación de las diferencias y similitudes entre mecanismos de acción y potenciales beneficios de probióticos, paraprobióticos, prebióticos y simbióticos sobre la salud humana. Al igual que muestra la necesidad de un mayor conocimiento de los efectos atribuibles a bacterias no viables y a sus componentes estructurales.

Esta investigación genera preguntas que la comunidad científica debe resolver con el objeto de apoyar al sector industrial a demostrar que, sus productos con probióticos pueden ser comercializados con alegaciones que les permitan adjudicarles determinados beneficios para la salud del consumidor.

Los resultados experimentales obtenidos podrían tomarse como punto de partida para analizar otras matrices alimentarias y corroborar la aplicabilidad de los métodos disponibles.

Se abren nuevas posibilidades que requieren aún investigación básica y clínica para comprobar el amplio abanico de posibilidades de aplicación que poseen los probióticos, no sólo en el área de los alimentos. Futuros profesionales que se desempeñen en el área farmacéutica, cosmética y de salud animal contarán con una base para investigar sobre potenciales efectos positivos sobre la salud.

Otras líneas de investigación que podrían proponerse están relacionadas con beneficios específicos de cada cepa y el porcentaje de éxito dentro de un grupo de estudio; investigación complementaria sobre el papel que juegan las propiedades organolépticas de los productos en el desarrollo de los probióticos; o la evaluación de nuevas técnicas de análisis que faciliten la armonización de las normas internacionales.

Un interrogativo queda abierto sobre si la tarea del Codex Alimentarius podrá ser la respuesta a la disparidad de regulaciones entre países y a la falta de normativa internacional actual.

Hipócrates, médico de la Antigua Grecia, expresó: “todas las enfermedades comienzan en el intestino”. Hoy, 2000 años después, se ha podido entender la mayoría de los complejos mecanismos involucrados en los beneficios para la salud aportados por la microflora intestinal y se ha demostrado que una dieta que contenga probióticos es crucial para la salud y el bienestar general gracias al cuidado de la salud intestinal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Andersson, H., Asp, N.-G., Bruce, Åke, Roos, S., Wadström, T., & Wold, A. E. (2001). *Health Effects of Probiotics and Prebiotics A Literature Review on Human Studies*. Food & Nutrition Research, 58-75. <https://doi.org/10.3402/fnr.v45i0.1790>.

Disposición N° 7730 de 2011. [Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica]. Dispone la creación de la Comisión Evaluadora para la autorización de declaraciones de propiedades saludables de alimentos. 18 de noviembre de 2011.

Bakhtiar, S.; LeBlanc, JG.; Salvucci, E.; Ali, A.; Martin, R.; Langella, P.; Chatel, JM.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Bermudez-Humaran, L. 2013. *Microbiome in Human Health and Disease*. FEMS Microbiology, 342:10–17.

Biocodex Microbiote Institute (2020). *La microbiota intestinal*. Recuperado de <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/intestinal>.

Codex Alimentarius. (2018). *Norma Regional para el Doogh*. (CXS 332R-2018). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>.

Código Alimentario Argentino [CAA]. Anexo I del Decreto N° 2126 de 1971 reglamentario de la Ley 18.284. Artículos 576 y 1389. 30 de Junio de 1971 (Argentina).

CCNFSDU. (2019). *Documento de Debate sobre las Directrices Armonizadas sobre el Uso de Probióticos en Alimentos y Complementos Alimenticios*. CX/NFSDU 19/41/11. Tema 11 del programa. Cuadragésima primera reunión del Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales.

Danone. (2005). *Alimentación Funcional*. Recuperado de http://www.institutodanone.es/assets/tendencias_en_alimentacion.pdf.

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., & Masoumi, S. et al. (2019). *Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications*. Foods, 8(3), 92. doi:10.3390/foods8030092.

- De Almada, C., Almada, C., Martinez, R., & Sant'Ana, A. (2016). *Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods*. Trends in Food Science & Technology, 58, 96-114. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.011.
- Debré, P. (1998). *Louis Pasteur* (Cap.9). Baltimore, Md.: Johns Hopkins Univ. Press. Recuperado de <https://jhupbooks.press.jhu.edu/title/louis-pasteur>.
- De Paula, J., Vinderola, G., & Weill, R. (2018). *Probióticos: Su impacto en la nutrición y la salud Una visión desde el Cono Sur* (1st ed., p. Cap. 3). Buenos Aires: Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005). *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science (New York, N.Y.). 2005-06-10; 308.5728: 1635-8.
- FAO/WHO. (2001). *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid bacteria*. Cordoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.
- FAO/WHO. (2002). *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. 30 April – 1 May 2002.
- Food and Drugs Administration [FDA]. (2019). *GRAS Notification for the intended use of Bacillus coagulans SNZ 1969 spores preparation in Infant Formula*. GRAS Notice (GRN) No. 864. Recuperado <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>.
- Gest, H. (2004). *The Discovery of Microorganisms* by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of the Royal Society. Notes Rec. R. Soc. Lond.58187–201 <http://doi.org/10.1098/rsnr.2004.0055>.
- Gibson, G. R., Probert, H.M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. (2004). *Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics*. Nutrition research reviews, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>.
- Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., et al. (2017). *Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*. Nat. Rev. Gastroenterol. Amp Hepatol. 2017;14:491. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.

- Gill, Harsharn, Prasad, Jaya; (2008). *Probiotics, immunomodulation, and health benefits*. - PubMed - NCBI. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183940>.
- Goktepe, I., Juneja, V., & Ahmedna, M (2010). *Probiotics in Food Safety and Human Health*. [S.l.]: Taylor & Francis/CRC Press.
- Goldin, Barry R., (1998). *Health benefits of probiotics*. - PubMed - NCBI. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924285>.
- Greenwalt, C., Steinkraus, K., & Ledford, R. (2000). *Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects*. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976-981. doi:10.4315/0362-028x-63.7.976.
- Hayek, N. (2013). *Chocolate, gut microbiota, and human health*. *Frontiers In Pharmacology*, 4. doi:10.3389/fphar.2013.00011.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., & Pot, B. et al. (2014). *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Homayouni, Aziz & Roudbaneh, M. & Tabrizian, V. & Javadi, M. & Harati, Negar & Rad, H. & Kasaie, Z.. (2016). *Chocolate as a probiotic carrier food - a review*. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 11. 37-42.
- International Dairy Federation [IDF]. (2003). *Enumeration of Characteristic Microorganisms- Colony Count Technic at 37°C*. (IDF Standard 177:2003). <https://www.fil-idf.org>
- International Organization of Standardization. [ISO]. (2015). *Milk and milk products — Starter cultures, probiotics and fermented products — Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry*. (ISO 19344). <https://www.iso.org/home.html>.
- Kitazawa, H., Villena, J., & Alvarez, S. (2014). *Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics* (pp. 9-10). Boca Raton: CRC Press.
- Lilly, D.M., & Stillwell, R.H. (1965). *Probiotics: Growth-promoting Factors Produced by Microorganisms*. *Science* (New York, N.Y.), 147(3659), 747-748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>.
- Metchnikoff, E. (1907): *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183.
- Otleş, S. (2013). *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health* (pp. 1-9). CRC Press. Recuperado de

<https://books.google.com.ar/books?id=W8rMBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

Pérez Cano, D. (2020). *Probióticos en la leche materna y la lactancia*. Recuperado de <https://www.lactoflora.es/la-leche-materna-tambien-bacterias-probioticas/>.

Ray, R., & Montet, D. (2015). *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods* (pp. 4-8). Boca Raton, Fla: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17307>.

Resolução Da Diretoria Colegiada RDC Nº 241 de 2018. [Agência Nacional de Vigilância Sanitária]. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. 27 de Julho de 2018.

Tannock GW. (2006). *What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel*. Semin Immunol 2006; doi:10.1016/j.smim.2006.09.001.

Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). *The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept)*. Genes & Nutrition, 6(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>.

Team, G. (2020). *Información sobre la Microbiota Intestinal - Gut Microbiota for Health*. Recuperado de <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/sobre-la-microbiota-intestinal/>.

Tissier, H. (1906): Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. CR.Soc Biol, 60: 359-361.

Tuddenham, S., & Sears, C. (2015). *The Intestinal Microbiome and Health*. Current Opinion In Infectious Diseases, 28(5), 464-470. doi:10.1097/qco.000000000000196.

Vallejos Castro, C., Hostench, M., Kuba, D., Sarquis, S., & Alvarez, M. (2017). *Identificación y Cuantificación de Microorganismos Probióticos en Productos Lácteos: Bifidobacterias*. Jornadas Abiertas de Desarrollo, Innovación y Transferencia de Tecnología. Instituto Nacional De Tecnología Industrial, Buenos Aires.

Wegh, C., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C. (2019). *Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond*. International Journal of Molecular Sciences, 20(19), 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>.

Weill, R. (2017). *El Yogur, Un Alimento Milenario a la Luz del Siglo XXI*. Recuperado de <https://s3.amazonaws.com/idcs/idcs-dot-org/Libro-Yogur-un-alimento-milenario.pdf>.

VIII. Anexos

Anexo I: Evolución de Alimentos Fermentados (Ray, 2015).

Logro	Desarrollo/Ubicación
6000-4000 a.e.c.	Dahi-Leche ácida coagulada consumida como alimento en India.
7000 a.C.	Producción de queso en Irak, tras la domesticación de animales.
6000 a.C.	Producción de vino en el cercano este.
5000 a.C.	Valor nutricional y saludable de la leche fermentada y las bebidas descritas.
4000 a.C.	Los Egipcios descubren cómo usar levaduras para levar pan y hacer vino.
2000 a.e.c. - 1200 e.c.	Diferentes tipos de leches fermentadas de diferentes regiones.
1750 a.e.c.	Los Sumerios fermentaron la cebada en cerveza.
1500 a.e.c.	Preparación de salchichas de carne por los antiguos Babilonios.
500 a.e.c.	Cuajada de soja mohosa como antibiótico en China.
300 a.e.c.	Preservación de vegetales a través de fermentación por los Chinos.
500-1000 e.c.	Desarrollo de alimentos fermentados a partir de cereales o legumbres.
1276 e.c.	Primera destilería de whisky en Irlanda.
1500 e.c.	Fermentación de sauerkraut y yogurt.
1851 e.c.	Desarrollo de la pasteurización por Louis Pasteur.
1877 e.c.	John Lister encuentra <i>Bacterum lactis</i> (<i>Lactococcus lactis</i>) en leches fermentadas.
1881 e.c.	Literatura publicada sobre la fabricación de koji y sake.
1907 e.c.	Publicación del libro "Prolongación de la vida" de Eli Metchnikoff, el cual describe los beneficios terapéuticos de las leches fermentadas.
1900-1930 e.c.	Aplicación de la microbiología para la fermentación, uso de cultivos definidos.
1928 e.c.	Descubrimiento de nisina – antagonista de algunos lactococos a otras bacterias acidolácticas demostrado por Rogers y Whittier.
1970 e.c. - actualidad	Desarrollo de productos que contienen cultivos probióticos o bacterias amigables con el intestino.
1953 e.c.	La nisina se comercializa en el Reino Unido y desde entonces está aprobado para su uso en más de 50 países.
1990 e.c. - actualidad	Descifran el código genético de varias bacterias acidolácticas aisladas de alimentos fermentados.
2002 e.c.	IDF y EFFCA publican la primera lista autorizada de microorganismos que se utilizará en cultivos lácteos.
2012 e.c.	IDF y EFFCA publican la primera lista de cultivos de microorganismos alimentarios conocida como GRAS para su aplicación a todo tipo de alimentos fermentados.

NOTA: IDF (International Dairy Federation) – EFFCA (European Food & Feed Cultures Association)
Fuente: Ross et. al. (2002), Prajapati and Nair (2003) updated.

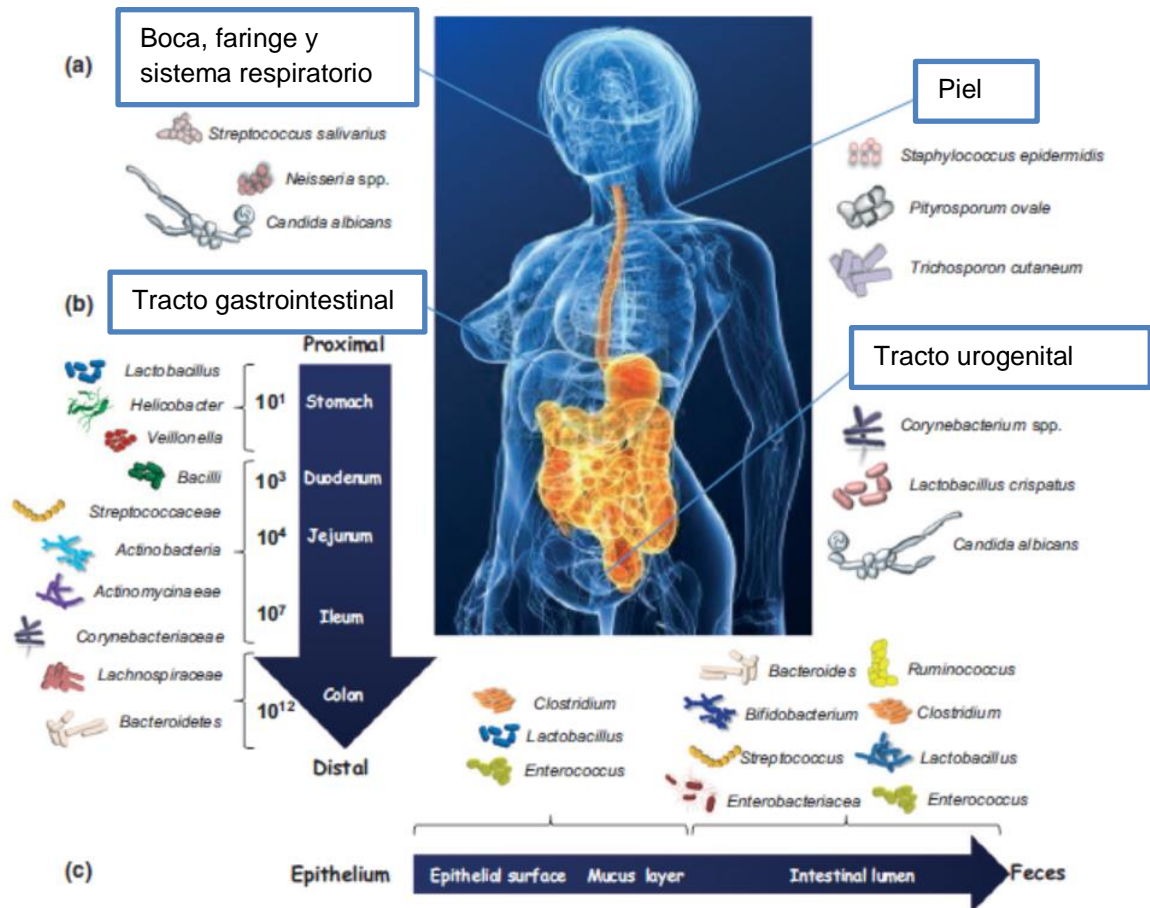
Anexo II: Definiciones Propuestas para el Término “Probiótico” (Otles, 2013)

S. No.	Definición	Referencia
1	Suplemento microbiano vivo que afecta la salud del huésped positivamente al mejorar el balance de su microbiota intestinal.	Fuller 1989
2	Microorganismos vivos, que por ingestión en cierto número, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica inherente.	Shaafasma 1996
3	Ingrediente alimentario microbiano vivo que es beneficioso para la salud.	Salminen et. al. 1998
4	Adyuvante alimenticio microbiano que afecta beneficiosamente a la fisiología del huésped modulando la inmunidad mucosa y sistémica, así como mejorando el equilibrio nutricional y microbiano en el tracto intestinal.	Naidu et. al. 1999
5	Preparado de o producto que contiene microorganismos viables y definidos en número suficiente, que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimento del huésped y que por eso ejercen efectos benéficos en la salud de este.	Schrezenmeir and de Vrese 2001
6	Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Aceptado por FAO/WHO (informe de Octubre de 2001).	Klaenhammer 2000, Sanders 2003, Guarner et. al. 2005

Anexo III: Microorganismos más comúnmente empleados (Ottles, 2013)

Bacterias acidolácticas	Bifidobacterias	Otras bacterias	Levaduras
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bf. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Bc. cereus</i>	<i>Saccharomyces</i> spp.
<i>Lb. casei/paracasei</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bc. coagulans</i>	
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Bf. breve</i>	<i>Bc. clausii</i>	
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bf. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>Bc. pumilus</i>	
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Bf. longum</i> subsp. <i>longum</i>	<i>Bc. subtilis</i>	
<i>Lb. gasseri</i>		<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>Propionibacterium</i>	
<i>Lb. plantarum</i>		<i>Pr. acidipropionici</i>	
<i>Lb. reuteri</i>		<i>Pr. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>Pr. jensenii</i>	
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Enterococcus faecium</i>			
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			
<i>Leuconostoc</i>			
<i>Le. citreum</i>			
<i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>			
<i>Oenococcus oeni</i>			
<i>Pediococcus</i>			
<i>Pd. acidilactici</i>			
<i>Pd. pentosaceus</i>			
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>			

Anexo IV: Microorganismos del Cuerpo Humano (Bakhtiar, 2013)



Nota: este gráfico no se tradujo en su totalidad debido a la complejidad que presenta.