

**Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Odontología Mexicali
Cirujano Dentista**



**EFECTO DE LA INULINA SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE
CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* CON POTENCIAL PROBIÓTICO**

Tesis que presenta:

C.MARCO ANTONIO CASTAÑOS MARTINEZ

Para obtener el título de

Licenciado en Cirujano Dentista

Directora de tesis:

Dra. Silvia Viviana Pitones Rubio

Mexicali, Baja California, México

Mayo 2023

Resumen

La mayoría de las bacterias del género *Lactobacillus* se caracterizan por sus propiedades probióticas. Por lo anterior, se ha encontrado que pueden tener aplicación en el área odontológica contra enfermedades bucales. Adicional a estas cepas probióticas, existen los prebióticos que favorecen el crecimiento de las mismas y brindan un mejor efecto a la salud debido a la sinergia que tienen al actuar como un simbiótico. La curva de crecimiento microbiano brinda información de cómo crece la bacteria bajo las condiciones y el medio que se encuentre, lo que permite conocer los tiempos de ingreso a cada fase. Se ha reportado que la suplementación con inulina al medio de cultivo favorece al crecimiento de los *Lactobacillus*.

Por lo anterior, la finalidad de este trabajo fue exponer a variables como la adición de un prebiótico, en este caso un suplemento comercial de inulina a una cepa de *Lactobacillus* y determinar el tiempo en el cual ingresó a cada fase en su curva de crecimiento. Para ello, se activó una cepa previamente identificada como *Lactobacillus spp*, la cual se inoculó en medio de cultivo líquido para determinar su crecimiento bacteriano por densidad óptica con la presencia de inulina al 1% y con un control sin inulina. Se monitoreo el crecimiento durante 88 h. La captura de datos y gráficas se realizó en programa excel. Se calculó la media del tiempo como medida de tendencia central.

De la metodología aplicada, el medio suplementado con inulina al 1% no reduce el tiempo en el que ingresa a su fase estacionaria en comparación con un cultivo normal, y además presenta una menor cantidad de biomasa. Además, estos resultados demuestran que tanto la morfología macro y microscópica de la cepa de *Lactobacillus* no se ve alterada por la presencia de inulina, lo que no se ha reportado anteriormente.

Palabras clave: *Lactobacillus spp*; inulina; probiótico; prebiótico; curva de crecimiento

Abstract

Most of the bacteria of the *Lactobacillus* genus are characterized by their probiotic properties. Therefore, it has been found that they can have application in the dental area against oral diseases. In addition to these probiotic strains, there are prebiotics that favor their growth and provide a better health effect due to the synergy they have by acting as a symbiotic. The microbial growth curve provides information on how the bacteria grow under the conditions and the medium they are in, which allows knowing the time of entry to each phase. It has been reported that supplementing the culture medium with inulin favors the growth of *Lactobacillus*.

Therefore, the purpose of this work was to expose a *Lactobacillus* strain to variables such as the addition of a prebiotic, in this case a commercial inulin supplement, and to determine the time in which it entered each phase of its growth curve. For this purpose, a strain previously identified as *Lactobacillus* spp was activated and inoculated in liquid culture medium to determine its bacterial growth by optical density with the presence of 1% inulin and with a control without inulin. Growth was monitored for 88 h. Data capture and graphing was performed in excel. The mean time was calculated as a measure of central tendency.

From the methodology applied, the medium supplemented with 1% inulin does not reduce the time in which it enters its stationary phase compared to a normal culture, but it does have a lower amount of biomass. In addition, these results demonstrate that both the macro and microscopic morphology of the *Lactobacillus* strain is not altered by the presence of inulin, which has not been reported previously.

Keywords; *Lactobacillus* spp; inulin; probiotic; prebiotic; growth curve

Dedicatoria

A mis familiares, amigos, mentores y colegas que forman parte de mi vida, que me aceptaron con todos mis defectos, me ayudaron a crecer personal y profesionalmente y sobre todo me demostraron tener fe y a creer en mí mismo. Siempre tendrán un lugar en mi corazón y no olvidaré lo que hicieron por mí. **GRACIAS POR TODO.**

Agradecimientos

A la VII Convocatoria Interna Necesidades Regionales 2022 UABC con número de registro 107/2/N/130/7, por brindarme un apoyo a través de una beca otorgada.

A la UABC y a la Facultad de Odontología Mexicali, por el apoyo monetario que me brindaron para poder participar en los congresos realizados durante la etapa de mi servicio social.

A mi Directora de tesis y encargada directa de mi servicio social, Dra. Silvia Viviana Pitones Rubio, por todo el apoyo y consejos que me brindó durante esta etapa de mi vida, sobre todo la paciencia que me tuvo para poder comprender cada una de las cosas aprendidas en el laboratorio de microbiología, debido a que era una experiencia nueva en mi vida.

A mis padres, Marco A. Castaños Vázquez y Araceli Martínez Silva, así como a mi hermano, Alexis Castaños Martínez por todo el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi carrera y siempre estuvieron ahí para animarme durante mis momentos más difíciles de mi carrera.

A mis abuelos, José y Guadalupe, así como a mis tíos, Elizabeth y Omar, por el apoyo tanto emocional y económico que me brindaron en algún momento durante mi carrera.

A las Doctoras Elda Georgina Chávez Cortéz y Angélica Hurtado Camarena por compartir sus conocimientos durante mi servicio social, además de agradecer el apoyo que me brindaron tanto profesional como personalmente.

A los Doctores Miguel Ángel Mercado Machado, Luis Alberto Ortiz, Jorge Armando López Mendoza y José Luis Montoya Porras, por las oportunidades y consejos que me brindaron para poder crecer profesionalmente.

A la Doctora Carla Pilar Arias Espejel por sus conocimientos compartidos de urgencias médicas, sus consejos de vida y motivarme siempre para que aspire a algo mejor.

A todos los Doctores y Doctoras de la Facultad de Odontología Mexicali, por todo lo que me enseñaron durante mi trayecto universitario.

A mi mejor amigo, Ismael Aarón Ríos Flores, por siempre estar conmigo tanto en mis buenos y malos momentos, por cada uno de sus consejos y por siempre creer en mí.

A mis amigos y amigas, Eduardo Quintero, Sergio Luján, Martha Alvarado, Alexandra Gaxiola, Ivanna Valadez, Abraham Ulloa, Mauricio Landa, Naomi Amador, Raúl López, Diego Valderrain, Saúl Torres, Emiliano Mendoza, Arturo Carrillo, Yazmin Aylin, Serafín Magaña, David Salazar, Ángel Pescador, Lenine Carolina, Michell Andrea, Andrea Ortiz, Miguel Bojórquez, Ana Lupercio, Luis Navarro, Mónica Avilés, Manuel Patrón, Ramiro Morga, Saúl López, Aarón Guillén, Bernardo Ruiz y Alexis Vargas por haber estado presente en mi vida y agradezco cada momento que pase con ustedes.

GRACIAS DIOS POR ESTA EXPERIENCIA Y POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

Índice

Resumen.....	II
Abstract.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos.....	V
Índice.....	VI
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1. Probióticos y términos asociados.....	3
II.1.1. Probióticos.....	3
II.1.2. Prebióticos.....	3
II.1.3. Simbióticos.....	4
II.1.4. Aplicación de probiótico, prebiótico y simbiótico en odontología.....	5
II.2. Generalidades de <i>Lactobacillus</i>.....	5
II.2.1. Morfología colonial y microscópica.....	5

II.2.2. Metabolismo.....	6
II.2.3. Genética.....	7
II.2.4. Condiciones de crecimiento.....	7
II.3. Condiciones de crecimiento de especies del género <i>Lactobacillus</i> procedentes de productos lácteos fermentados....	8
II.4. Modelos de cinética de crecimiento.....	11
II.4.1. Inulina.....	12
II.4.2. Otros suplementos.....	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	14
V. HIPÓTESIS.....	15
VI. OBJETIVOS.....	16
VI.1. General.....	16
VI.2. Específicos.....	16
VII. METODOLOGÍA.....	17
VII.1. Cepa bacteriana.....	17

VII.2.	Condiciones de crecimiento y espectrofotometría de la cepa.....	17
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
VIII.1	Crecimiento y activación de la cepa de <i>Lactobacillus spp</i>	19
.		
VIII.2	Efecto de inulina sobre cepas de <i>Lactobacillus spp</i>	21
.		
VIII.3	Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Lactobacillus spp</i>	22
.		
IX.	CONCLUSIONES.....	25
X.	PERSPECTIVAS.....	26
XI.	REFERENCIAS.....	27

Lista de figuras

Figura		Página
1	Morfología colonial de la cepa de Lactobacillus	20
2	Morfología microscópica de la cepa de Lactobacillus (Objetivo 40X)	20
3	Morfología colonial de la cepa de Lactobacillus cosechada de caldo MRS a las 48 hrs	21
4	Morfología microscópica de la cepa de Lactobacillus cosechada de caldo MRS a las 48 hrs (Objetivo 100x)	22
5	Curva de crecimiento de cepa de Lactobacillus. Condiciones de aerobiosis, 50rpm y a 30°C	23
6	Curva de crecimiento de cepa de Lactobacillus. Condiciones de aerobiosis, 50rpm, 30°C y concentración de inulina al 1%	23

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Especies de Lactobacillus con diferentes condiciones de crecimiento y tiempo de incubación	8

I. INTRODUCCIÓN

El género *Lactobacillus* está compuesto por una gran diversidad de especies y corresponde a bacterias Gram-positivas que se pueden encontrar en diferentes ambientes. Al someter diferentes factores de estrés ambiental o condiciones de cultivo, se generan cambios celulares en las bacterias, por lo que, se puede dar una adaptación para crecer sin ningún problema, aunado a su genética que permite la activación de genes que favorezcan su crecimiento (1).

La aplicación de estas bacterias en el área de la salud siempre es motivo de estudio por los beneficios que estas puedan brindar. En el área de la odontología, se ha reportado el efecto que se tiene contra la caries dental y enfermedad periodontal, que son las enfermedades bucales más comunes, aunque su estudio va dirigido al efecto que causa sobre los principales agentes etiológicos de estas patologías (2).

Por otro lado, un modelo de cinética de crecimiento es una herramienta de gran utilidad, ya que nos brinda información de cómo se va desarrollando la bacteria en el ambiente que se encuentre (3). Para poder establecer un modelo, se requiere aislar a la bacteria y exponerla a diferentes factores o variables para determinar sus condiciones de crecimiento (4). Se ha reportado que la suplementación con inulina a diferentes concentraciones en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) favorece al crecimiento y supervivencia de algunas cepas de *Lactobacillus* (5). Además, la adición de otros compuestos y/o la modificación de un factor o variable, optimiza los tiempos de crecimiento y producción celular de diferentes cepas o especies de *Lactobacillus* (6,7).

Por lo anterior, el género *Lactobacillus* debido a sus efectos probióticos puede favorecer a la salud bucal. Las condiciones en las que crecen estas células varía entre especies y subtipos, y la implementación de un factor que puede ser un suplemento o una variable física puede modificar su crecimiento. Por lo que, en este trabajo, se determinó el efecto de un suplemento como inulina a una concentración determinada para identificar si existen cambios morfológicos en las células y el tiempo en que ingresó a las fases exponencial y estacionaria en la curva de crecimiento de una cepa de *Lactobacillus spp.*

II. ANTECEDENTES

II.1. Probióticos y términos asociados

II.1.1. Probióticos

Los probióticos se definen como aquéllos microorganismos vivos, los cuales al consumirse en cantidades adecuadas brindan efectos favorables para la salud del huésped, como puede ser la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, el incremento de la barrera epitelial intestinal, el mejoramiento del sistema inmunológico debido a la producción de sustancias antimicrobianas, la producción de metabolitos secundarios como las bacteriocinas o enzimas con funciones biológicas, entre otros (8-10).

Algunos microorganismos empleados con efecto probiótico son los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, cepa de *Escherichia coli* Nissle 1917 y levaduras del género *Saccharomyces*. Comúnmente, se utilizan en ciertos productos que contienen una o más cepas microbianas, y algunos autores creen que el beneficio obtenido se debe a esta sinergia y no por un efecto individual de las cepas. Por ello, es importante identificar el objetivo que se quiere conseguir en cada paciente al momento de consumirlos (9-12).

II.1.2. Prebióticos

Los prebióticos de acuerdo con la FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud), son alimentos no digeribles que ofrecen efectos beneficiosos hacia la salud, pero está asociado a la

modulación de la microbiota (11). Se pueden considerar como una opción diferente a los probióticos o tener un papel como sustrato alimentario donde es usado de forma selectiva por ciertos microorganismos actuando como un apoyo, es decir, actúan como un alimento para aquellos microorganismos probióticos, estimulando su crecimiento y modificando la microbiota. Gran parte de los prebióticos procede de fuentes de hidratos de carbono no digeribles, como verduras, plátanos, espárragos, legumbres, avena, frutas, trigo, etc. (10,11).

Algunos prebióticos artificiales incluyen a lactulosa, lactosacarosa, galactooligosacáridos, maltooligosacáridos, xilooligosacáridos y fructanos (10-12).

II.1.3. Simbióticos

Los simbióticos son una combinación entre prebióticos y probióticos que fueron creados para mejorar la supervivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal (10). Se agregan en algunos alimentos y también son capaces de estimular la proliferación de microorganismos específicos presentes en la microbiota. Se toman en cuenta ciertos criterios al momento de realizar un compuesto simbiótico, el primero es que el probiótico y el prebiótico que se vayan a emplear deban ejercer por separado un efecto positivo a la salud, el segundo es determinar en el prebiótico propiedades específicas para mejorar al probiótico en cuestión y por último, el prebiótico debe estimular de forma selectiva el crecimiento de otros microorganismos beneficiosos (11).

II.1.4. Aplicación de probiótico, prebiótico y simbiótico en odontología

Algunas cepas de *Lactobacillus* se han reportado que tienen efecto probiótico contra patologías orales como son *L. brevis* CD2 y *L. Salivarius* WB21 (2). Un ejemplo de prebiótico como el glucomanano brinda beneficios a la higiene oral, como es la disminución de la presencia de bacterias cariogénicas y estimula al sistema inmune para contribuir en procesos de cicatrización (13). Se investigó la combinación de L-arginina (prebiótico) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (probiótico) para evaluar el efecto simbiótico contra *Streptococcus mutans* (14).

II.2. Generalidades de *Lactobacillus*

Este género fue propuesto por Beijerinck en el año 1901, son bacterias Gram-positivas, fermentativas, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas. De acuerdo con su taxonomía pertenece al filo *firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*, lo conforman más de 200 especies (1,15). Para su crecimiento necesitan un ambiente con los nutrientes suficientes y por lo general, los encuentran en alimentos fermentados o descompuestos. Usualmente están presentes en superficies de plantas o del suelo, además son parte de la microbiota normal de los seres vivos (16,17)

II.2.1. Morfología colonial y microscópica

El tamaño de cada colonia varía entre especies, pueden ser colonias planas o elevadas, medir un diámetro 0.5 a 11 mm, son de coloración blanquecina, grisáceas o amarillentas. Pueden ser opacas o translúcidas. Forma circular, regular o irregular, los bordes pueden ser regulares, irregulares, lisos o convexos. Su textura varía entre lisa o mucosa.

Presentar una depresión en el centro de la colonia o tener una ligera elevación como si fuera una punta (18-21).

Microscópicamente, tienen forma de bacilos, siendo alargados o cortos, se pueden observar en forma de cadena, en pares o solitarias, sin movilidad y no debe presentar esporas (18,20,22,23).

II.2.2. Metabolismo

De acuerdo con la vía por donde se fermentan los azúcares, se clasifican en tres grupos: el primero está constituido por los denominados homofermentativos, los cuales sólo producen ácido láctico a través de la glucólisis; el segundo lo representa los heterofermentativos facultativos, donde se produce una mezcla de ácido láctico y acético a través de la glucólisis o fosfocetolasa; y el último grupo que pertenece a los heterofermentativos, los cuales producen ácido láctico y acético o etanol y dióxido de carbono a través de la fosfocetolasa (22).

El metabolismo de las pentosas varía entre especie o cepa, debido a que no todas codifican los genes requeridos para metabolizar este monosacárido. Los lactobacilos son capaces de fermentar una gran variedad de carbohidratos y algunos pueden fermentar fructanos extracelulares, manitol, almidón o glucógeno. Por lo general, los *Lactobacillus* encontrados en el intestino son heterofermentativos (15,16).

II.2.3. Genética

Las características genómicas son diferentes entre especies; *Lb. johnsonii* NC553 carece de vía biosintética y *Lb. acidophilus* NCFM posee una estructura única llamada Unidad Autónoma Potencial (PAU, por sus siglas en inglés). El tamaño del genoma varía entre especies, este oscila de 1.23 Mbp a 4.91 Mbp. Son 73 genes que se encargan del crecimiento y replicación celular. De 41 genes específicos se predice que 13 codifican para proteínas ribosómicas (16). La cantidad de guaninas y citocinas que contienen en el ADN varía entre especies, este oscila entre el 31.93% y 57.02%. Se considera este género como polifilético ya que engloba su descendencia de varios ancestros comunes tales como *Pediococcus*, *Weissella* y *Fructobacillus* (24).

II.2.4. Condiciones de crecimiento

Se caracterizan por tener altos requerimientos nutricionales y eso se debe a su escasa capacidad para sintetizar aminoácidos y vitaminas del grupo B, por lo que su medio debe ser rico en carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas del complejo B y entre otros minerales. Además, su crecimiento se ve afectado por diferentes factores como son temperatura, pH y oxigenación. La temperatura oscila entre 2 y 53°C, siendo entre 30 a 40°C la óptima, así como el pH oscila entre 4.5 a 6.5, siendo entre 5.5 a 6.2 el óptimo (4).

En el caso de la oxigenación, de acuerdo con la especie pueden crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, y algunas pueden crecer en ambas condiciones. (25). También hay especies microaerófilas que son capaces de crecer en niveles bajos de oxígeno (26).

II.3. Condiciones de crecimiento de especies del género *Lactobacillus* procedentes de productos lácteos fermentados

Se tiene evidencia que el consumo de productos lácteos fermentados brinda beneficios para la salud, esto se debe principalmente a que contienen probióticos y prebióticos. Por lo que el queso, yogurt, kumis y kéfir son algunos ejemplos que ejercen un efecto en la microbiota y de esta manera se contribuye a la generación de resultados positivos a la salud de la persona (27). El kéfir es una bebida fermentada con bajo contenido en alcohol, este se obtiene de la fermentación de gránulos de kéfir con leche o agua (28). Su composición comprende agua, azúcares, proteínas, vitaminas, grasas y cepas microbianas (29,30).

A continuación, se presenta una tabla donde se menciona algunas especies de *Lactobacillus* encontradas en productos lácteos fermentados y las condiciones de crecimiento que se han reportado para su activación (30,31):

Tabla 1. Condiciones de crecimiento y tiempo de incubación para la activación de especies de *Lactobacillus*.

Espece	Condiciones de crecimiento	Tiempo de incubación
<i>L. kefiranofaciens</i>	Caldo MRS modificado el pH a 5.5, 30°C y 200rpm (32).	24h (32).
	Caldo MRS a 37°C (33).	72h (33).
	Agar KPL modificado el pH a 5.5, 30°C y en condiciones de anaerobiosis (34).	240h (34).

	Agar MRS, primero se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C para después incubar en condiciones de aerobiosis a la misma temperatura(8).	En condiciones de anaerobiosis fue de 72 a 96h y en condiciones de aerobiosis fue de 48 h (8).
<i>L. kefirgranum</i>	Caldo MRS a una temperatura de 30°C y después se cultivaron en agar MRS a la misma temperatura, pero en condiciones de anaerobiosis (35).	36h en el caldo y 72h en el agar (35).
	Caldo MRS con un pH entre 5.2 a 7 en condiciones de anaerobiosis (36).	96h (36).
	Caldo MRS a una temperatura 30°C en condiciones de anaerobiosis (37).	72h (37).
<i>L. parakefiri</i>	Caldo MRS a una temperatura 30°C en condiciones de anaerobiosis (37).	72h (37).
	Caldo MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis y las colonias obtenidas se cultivaron otra vez en caldo MRS, pero a una temperatura de 25°C (38).	48h el de temperatura de 37°C y 18h el 25°C (38).
<i>L. acidophilus</i>	Caldo MRS con un pH de 6.5 a 37°C y presencia de 10% de dióxido de carbono (39).	24h (39).
	Agar MRS a 37°C y presencia de 5% de dióxido de carbono (40).	18-20h (40).
	Caldo MRS suplementado con 0.05% de hidrocloreuro de cisteína a 37°C en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (41).	48h (41).
<i>L. amylovorus</i>	Caldo MRS a 37°C en condiciones microaerófilas (42).	24h (42).
	Agar extracto de malta a 40°C en condiciones microaerófilas (43).	48h (43).
	Agar MRS a 37°C en condiciones de aerobiosis (44).	24-48h (44).
	Agar MRS5 a 30°C (45).	48h (45).

<i>L. brevis</i>	Caldo MRS a un pH de 6.2 y a 30°C (46).	24-48h (46).
	Medio MRS a 37°C en condiciones microaerófilas (26).	24-48h (26).
	Caldo BHI a 30°C (47).	48h (47).
	Agar MRS a 26°C (48).	72h (48).
<i>L. buchneri</i>	Caldo MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (49).	30h (49).
	Agar MRS a 30°C en condiciones anóxicas y después en condiciones de anaerobiosis (21).	96-120h en condiciones anóxicas y 48-72h en condiciones anaeróbicas (21).
	Caldo MRS a 37°C en condiciones de aerobiosis (50).	48h (50).
<i>L. casei</i>	Agar MRS a 37°C y presencia de 5% de dióxido de carbono (51).	24h (51).
	Caldo MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (52).	24h (52).
	Caldo MRS a 37°C (53).	24-48h (53).
	Caldo WM en un pH de 6.8 a 37°C (54).	16h (54).
<i>L. crispatus</i>	Agar columbia a 37°C con presencia del 5% de dióxido de carbono y después se pasó a caldo MRS en las mismas condiciones (55).	48h tanto en agar como en el caldo (55).
	En medio MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (56).	48h (56).
<i>L. gallinarum</i>	Agar MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (57).	48h (57).
	Caldo MRS o BHI a 37°C en condiciones de aerobiosis (58).	No reportado (58).
<i>L. helveticus</i>	Medio MRS a 37°C (59).	18h (59).
	Caldo MRS a 37°C (60).	24h (60).
	Caldo MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (61).	48h (61).
<i>L. plantarum</i>	Caldo MRS a 37°C (62).	18h (62).

	Caldo MRS a 37°C en condiciones de aerobiosis (63).	24h (63).
	Caldo MRS a 30°C y 80rpm (64).	No reportado (64).
<i>L. rhamnosus</i>	Caldo MRS 37°C (65).	24h (65).
	Medio MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis (66).	48h (66).
<i>L. kefir</i>	Caldo MRS a 30°C en condiciones de aerobiosis (67).	24h (67).
	Caldo MRS suplementado con sacarosa al 4% a 37°C en condiciones de anaerobiosis (68).	48h (68).
	Caldo MRS a 37°C en condiciones de aerobiosis (69).	48h (69).

MRS (Man, Rogosa y Sharpe), KPL (Lactobacilos productores de Polisacáridos en grano de Kéfir), BHI (Infusión Cerebro Corazón), WM (Medio Weissella).

II.4. Modelos de cinética de crecimiento

Un modelo de cinética es un instrumento útil que se diseña con la finalidad de obtener información respecto al comportamiento de crecimiento microbiano, donde se realizan de forma precisa una serie de experimentos repetibles, se emplean modelos matemáticos para después graficarlos y obtener la curva de crecimiento del microorganismo en cuestión donde se registran 4 fases que son: fase de retardo, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (3). En la fase de retardo (rezago o lag) el microorganismo duplica sus cromosomas, sintetiza la maquinaria necesaria para transcribir y traducir su material genético. Durante la fase exponencial (logarítmica) el microorganismo crece y se divide, una vez agotado sus nutrientes o se acumulan suficientes metabolitos inhibidores que inhiben el crecimiento, entra a la fase estacionaria, el microorganismo no se divide, se detiene la duplicación del ADN y

sintetizan otras proteínas para sobrevivir. Al no tener los nutrientes suficientes para sobrevivir disminuye el número de células, por lo que entran a su fase de muerte (letal) (70).

Un método que se emplea para la graficación de curvas de crecimiento, es por medio de la absorbancia (Abs) o conocido también como densidad óptica (D.O), donde se emplea un espectrofotómetro que mide la turbidez del cultivo líquido, al pasar un haz de luz a través de la suspensión bacteriana y de esta manera registrar la absorbancia (71).

Las condiciones del medio donde se cultiva, como son factores de temperatura y oxigenación, así como la adición de suplementos como inulina o cloruro de sodio (NaCl), deben considerarse al momento de establecer su curva de crecimiento, ya que pueden acelerar o retrasar su ingreso a alguna de las fases, por la adaptación de las células al medio (4).

II.4.1. Inulina

Es un polisacárido que se almacena de manera soluble en agua y forma parte del grupo de hidratos de carbono no digeribles conocidos como fructanos. Comúnmente, se puede encontrar en las plantas, tales como el agave y la achicoria. Es considerado un prebiótico y en conjunto con algunas bacterias puede denominarse simbiótico. Se ha reportado que las bajas dosis de inulina suplementadas en la leche descremada alteran la cinética bacteriana de los *Lb. acidophilus* y *Lb. rhamnosus* haciendo que estas tengan un aumento en su crecimiento y sostenibilidad (72).

De acuerdo con la concentración que se emplea en el medio de cultivo, este afecta la cinética de crecimiento de la especie en cuestión, teniendo un efecto favorable o desfavorable en su crecimiento y/o supervivencia. Se ha puesto a prueba la inulina en diferentes concentraciones para determinar dicho efecto (5,7), pero además se ha combinado con otros factores como la adición de otros azúcares (5), la agitación y las condiciones de oxigenación (6).

II.4.2. Otros suplementos

Por otra parte, la adición de sales como es el caso del cloruro de sodio (NaCl) lo han implementado de igual forma en diferentes concentraciones. (73,74). Aunado al ajuste del pH del medio (73,74). Se han agregado al medio otras fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, fructosa, fructooligosacáridos y almidón, para determinar y observar los efectos que producen en el crecimiento de algunas cepas o especies de *Lactobacillus* (5,75).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Lactobacillus* ha tenido diversas aplicaciones en muchos ámbitos. En el área odontológica se ha reportado que al administrarse en cantidades adecuadas contra algunas patologías orales puede brindar efectos favorables, modulando la microbiota oral. Actualmente, se busca la manera de aislar y fermentar *Lactobacillus*, y que puedan emplearse en la mejora de la salud oral. La cinética de crecimiento microbiano brinda información de cómo crece un microorganismo de acuerdo con las condiciones a las que este se encuentre expuesto y en qué momento entra a cada fase de su curva de crecimiento. Sin embargo, al día de hoy los métodos reportados muestran tiempos prolongados, condiciones de anaerobiosis e implemento de otros materiales que implica un costo monetario alto, y hacen que el procesamiento sea tardado para su producción.

IV. JUSTIFICACIÓN

La finalidad de realizar este trabajo fue analizar el efecto que tiene en la curva de crecimiento de una cepa de *Lactobacillus spp*, la adición de un prebiótico en una concentración determinada, donde se espera que el tiempo de crecimiento se modifique. Disminuir los tiempos de crecimiento de la bacteria, y determinar en qué momento están cerca de su pico máximo de producción por medio de la densidad óptica, será de utilidad al momento de su cosecha, además de corroborar que la célula no presente cambios morfológicos.

V. HIPÓTESIS

La adición de una concentración de inulina al medio de cultivo donde crece *Lactobacillus spp*, disminuye el tiempo de ingreso a su fase estacionaria.

VI. OBJETIVOS

VI.1.General

Determinar el efecto de inulina en el crecimiento microbiano de una cepa de *Lactobacillus spp.*

VI.2. Específicos

1. Estandarizar las condiciones de cultivo de una cepa de *Lactobacillus spp* con y sin la adición de inulina al medio.
2. Identificar el efecto en la morfología de una cepa de *Lactobacillus spp* con y sin la adición de inulina al cultivo, mediante tinción de Gram.
3. Determinar el tiempo de ingreso a las fases exponencial y estacionaria del crecimiento microbiano de una cepa de *Lactobacillus spp*, a través de densidad óptica con y sin la adición de inulina al cultivo.

VII. METODOLOGÍA

VII.1.Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *Lactobacillus*, que se tenía resguardada en el laboratorio de microbiología en la Facultad de Odontología Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California. Esta fue sembrada en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), para colocarse en la incubadora VWR modelo 1500E a 30°C, durante 72h, que son condiciones que ya se tienen establecidas para su crecimiento. Una vez pasado el tiempo se realiza una tinción de Gram para verificar que se tiene una cepa pura de *Lactobacillus*.

VII.2.Condiciones de crecimiento y espectrofotometría de la cepa.

Se realizaron tres experimentos con dos métodos diferentes, por duplicado y de manera independiente. El primer método consistió en cultivar la cepa activada en 30 ml de caldo MRS en matraces con capacidad de 50ml, y el segundo método, además de las condiciones anteriores, se le adicionó inulina comercial (Inulina orgánica comercial en polvo de la marca Microingredientes). Para ello, se realizó una solución stock del 10%, de la cual se añadió 3 ml a 27ml de caldo MRS, para obtener una concentración del 1%. Los matraces se colocan en una incubadora MAXQ 4450 Thermo Scientific a 30°C, con agitación de 50rpm durante 30h con condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se realizó el inóculo del cultivo en otros matraces de la misma capacidad, considerando un 10% del preinóculo y bajo las mismas condiciones durante 3h. Finalmente, se hizo otro inóculo, con la adición del 10% del inóculo anterior, modificando el volumen del medio líquido de los matraces con capacidad de 125ml para un volumen final de 75ml. Lo anterior, dió inicio a la curva de crecimiento de la cepa, donde, por medio de diluciones

(1:2, 1:5, 1:10, 1:20) se midió la absorbancia del cultivo con ayuda del espectrofotómetro SPECTRONIC 20D+ Spectronic instruments, durante un lapso de 88h. Cada lectura se registra en el programa Excel, se realizó la gráfica en el mismo programa para obtener la cinética de crecimiento microbiano de la cepa. Al final se analizó y determinó el efecto de la inulina. Hay que mencionar que durante las lecturas en el espectrofotómetro pasadas las 48h se cultivaron las cepas en agar MRS para verificar su pureza y que no hubo contaminación.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo presenta conocimientos básicos de cómo es el crecimiento bacteriano de cepas del género de *Lactobacillus spp* empleando prebióticos.

VIII.1. Crecimiento y activación de la cepa de *Lactobacillus spp*

Como ya se mencionó anteriormente, la activación de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* depende de la especie en cuestión. Para este trabajo, las cepas se activaron por un periodo de 72h para poder ser empleadas en los cultivos líquidos e iniciar la curva de crecimiento. En la figura 1, se muestra el crecimiento de la cepa en agar MRS donde se observaron colonias de color blanquecina, elevadas y algunas de forma circular. Como puede observarse en la figura 2, se muestra la tinción de Gram, donde se ve microscópicamente células Gram-positivas, con forma de bacilos alargados y algunos cortos, esto coincide con la morfología típica del género *Lactobacillus spp* tal y como se describe en el apartado de “Morfología colonial y microscópica” (pág.6) de este trabajo.

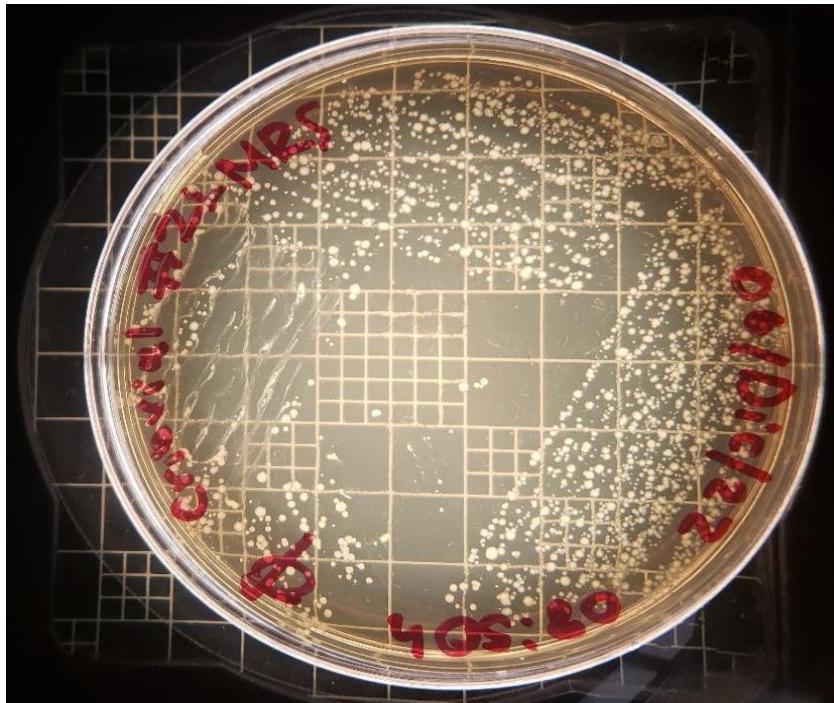


Figura 1. Morfología colonial de la cepa de *Lactobacillus* activada en agar MRS.



Figura 2. Morfología microscópica de la cepa de *Lactobacillus* (Objetivo 40X). La imagen fue observada en un microscopio óptico convencional.

VIII.2. Efecto de inulina sobre cepas de *Lactobacillus spp*

El crecimiento colonial de las cepas que fueron cosechadas a las 48 h, tanto de inulina como sin inulina, presentó la morfología colonial típica de *Lactobacillus* descrita anteriormente (Figura 3). Se realizó tinción de Gram en ambas muestras, sin mostrar ninguna diferencia respecto a su morfología microscópica, tal como se puede observar en la figura 4. Por lo anterior, tanto macro y microscópicamente no hay diferencias, se presentan las características morfológicas típicas de *Lactobacillus*. Esto no se hace mención en los artículos reportados donde se suplementa con inulina (6,7).

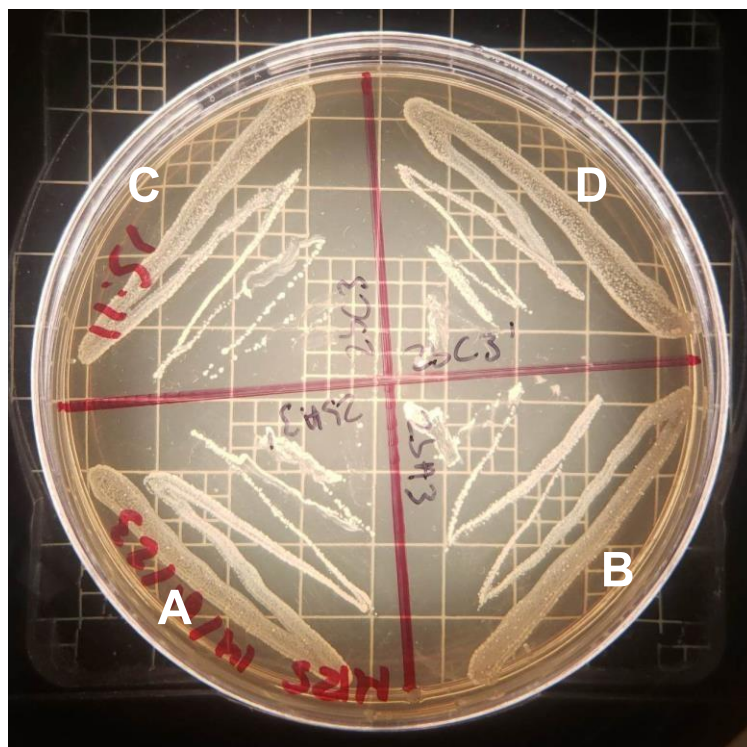


Figura 3. Morfología colonial de la cepa de *Lactobacillus spp* cosechada de caldo MRS a las 48 hrs. A) y B) sin inulina y C) y D) inulina al 1%.

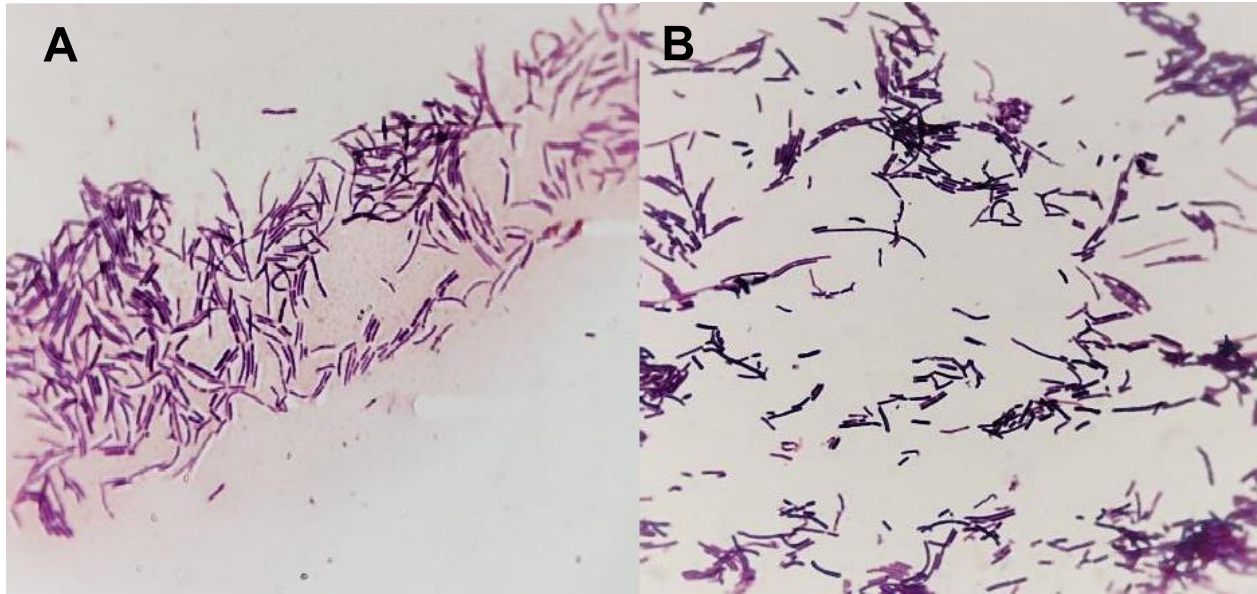


Figura 4. Morfología microscópica de la cepa de *Lactobacillus spp* cosechada de caldo MRS a las 48h (Objetivo 100x). La imagen fue observada en un microscopio óptico convencional. A) sin inulina B) con inulina 1%

VIII.3. Cinética de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus spp*

Con la finalidad de alcanzar el objetivo número 3 se realizaron curvas de crecimiento de la cepa. Las curvas de crecimiento de la cepa bajo las condiciones ya descritas anteriormente en el apartado de metodología mostraron que la cepa ingresa a su fase exponencial a las 24h y la estacionaria a las 48h en ambos casos (Figura 5 y 6). Se calculó la medida de tendencia central correspondiente a la media, con inulina al 1% y el control sin inulina, en ambos casos el valor fue 48h.

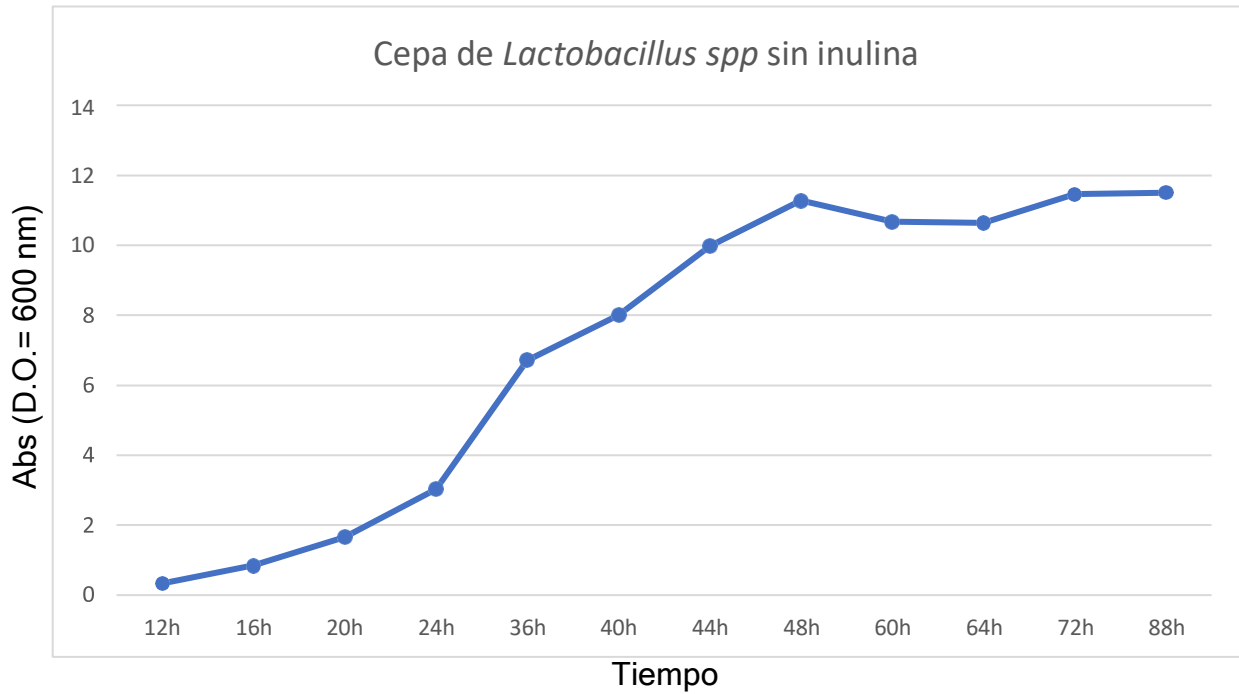


Figura 5. Curva de crecimiento de cepa de *Lactobacillus spp* Condición de aerobiosis, 50rpm y a 30°C.

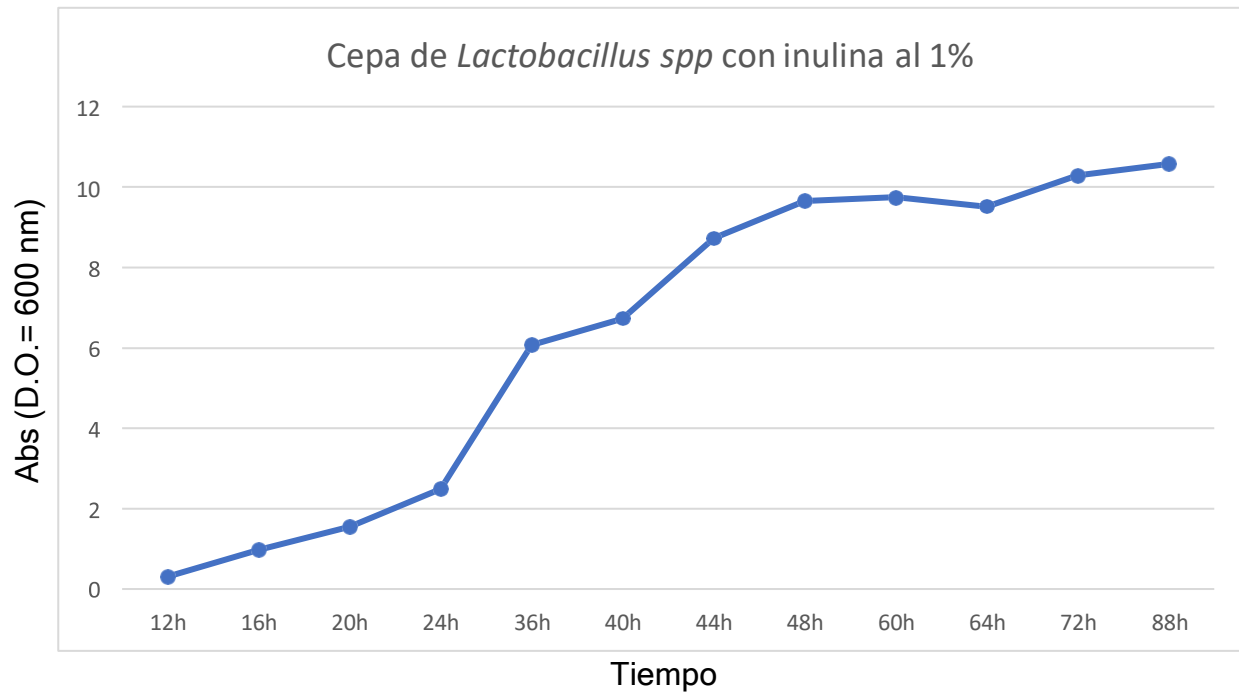


Figura 6. Curva de crecimiento de cepa de *Lactobacillus spp* Condición de aerobiosis, 50rpm, 30°C y concentración de inulina al 1%.

Los resultados de este trabajo difieren con los de Silva S. y colaboradores donde se realizó una curva de crecimiento bajo condiciones de agitación, 30°C, tanto en aerobiosis como anaerobiosis e inulina integrada al 1% de una cepa de *Lactobacillus plantarum* donde esta ingresó a su fase estacionaria alrededor de las 9 o 10h (6). De igual forma con el trabajo realizado por Iraporda C. y colaboradores, donde se realizó cuatro curvas de crecimiento de 4 diferentes especies de *Lactobacillus* (*paracasei*, *plantarum*, *acidophilus* y *casei*) las cuales alrededor de las 6 y 12h entran a sus fases estacionarias, pero las condiciones de crecimiento consistieron en una incubación a 37°C, suplementar solamente con inulina comercial de raíces de achicoria y/o inulina rica en carbohidratos extraído de tubérculos de patata (alcachofa) al 1% (7).

Una razón por la que hay tanta diferencia en los resultados, puede deberse a que el suplemento de inulina que se empleó es obtenido de diferente producto comercial o fuentes de donde se extrae dicho prebiótico. De igual forma, un cambio en algún factor como oxigenación, temperatura o pH condiciona un cambio a la cinética de crecimiento de la bacteria. Además, se debe considerar la especie o cepa que se está tratando, debido a que cada una puede diferir un poco en sus condiciones de crecimiento y su adaptabilidad a un medio diferente, lo que puede o no favorecer su desarrollo (4).

IX. CONCLUSIONES

- La morfología colonial y microscópica de las células vegetativas del cultivo corresponde a una cepa de *Lactobacillus spp* por las características típicas del género.
- La cepa de *Lactobacillus* cultivado en medio MRS con Inulina comercial al 1%, no reduce el tiempo en que ingresa a su fase estacionaria ni exponencial, además no aumenta la biomasa del cultivo, esto demuestra que esta concentración no es la ideal para la cepa estudiada en comparación a condiciones sin inulina.
- La morfología colonial y microscópica de la cepa de *Lactobacillus spp* del método con inulina es semejante con el control, demostrando que no hay cambios morfológicos aparentes en presencia del prebiótico.

X. PERSPECTIVAS

- Identificar la especie de la cepa de *Lactobacillus*.
- Comparar diferentes concentraciones de inulina y determinar cuál es la mejor para la producción de células para cepas de *Lactobacillus spp.*
- Determinar las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en las cosechas de cultivo en diferentes tiempos.
- Emplear otros suplementos y modificar un factor de crecimiento para estudiar el comportamiento de la cinética microbiana de cepas de *Lactobacillus spp.*
- Realizar ensayos *in vitro* contra las bacterias más comunes presentes en las patologías bucales más conocidas para evaluar actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus spp.*

XI. REFERENCIAS

1. Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2018 Oct 21;102(19):8135-43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9217-9>
2. Mishra S, Rath S, Mohanty N. Probiotics—A complete oral healthcare package. *J Integr Med* [Internet]. 2020 Nov;18(6):462-9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095496420300984>
3. Rezvani F, Ardestani F, Najafpour G. Growth kinetic models of five species of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2017 Apr;48(2):251-8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216313740>
4. Śliżewska K, Chlebicz-Wójcik A. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 27;9(12):423. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/12/423>
5. Parhi P, Song KP, Choo WS. Effect of inulin and fructooligosaccharide supplementation on the growth and survival of *Lactobacillus casei* in model sugar systems. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2021 Mar 16;45(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.15228>
6. da Silva Sabo S, Converti A, Todorov SD, Domínguez JM, de Souza Oliveira RP. Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in

- stationary and shaken cultures. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Apr;50(4):864-70. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12711>
7. Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD, Abraham AG. Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT* [Internet]. 2019 Mar;101:738-46. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818310351>
 8. Jeong D, Kim D-H, Song K-Y, Seo K-H. Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 1;10(1):1472985. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2018.1472985>
 9. Silva DR, Sardi J de CO, Pitangui N de S, Roque SM, Silva ACB da, Rosalen PL. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *J Funct Foods* [Internet]. 2020 Oct;73:104080. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464620303042>
 10. Coccia A. Probióticos, una mirada objetiva sobre microorganismos beneficiosos para la salud [Internet]. Universidad de Belgrano; 2020. Available from:
<http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/9240>
 11. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2017 Sep 15;9(9):1021. Available from:

<https://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>

12. Gulzar N, Muqaddas Saleem I, Rafiq S, Nadeem M. Therapeutic Potential of Probiotics and Prebiotics. In: Oral Health by Using Probiotic Products [Internet]. IntechOpen; 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/books/oral-health-by-using-probiotic-products/therapeutic-potential-of-probiotics-and-prebiotics>
13. Tester RF, Al-Ghazzewi FH. Role of prebiotics and probiotics in oral health. Nutr Food Sci [Internet]. 2018 Feb 12;48(1):16-29. Available from: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-03-2017-0056/full/html>
14. Bijle MN, Neelakantan P, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. Effect of a novel synbiotic on *Streptococcus mutans*. Sci Rep [Internet]. 2020 May 14;10(1):7951. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64956-8>
15. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Int J Syst Evol Microbiol [Internet]. 2020 Apr 1;70(4):2782-858. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>
16. Stefanovic E, Fitzgerald G, McAuliffe O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. Food Microbiol [Internet]. 2017 Feb;61:33-49. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016306013>

17. Duar RM, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2017 Aug 1;41(Supp_1):S27-48. Available from: http://academic.oup.com/femsre/article/41/Supp_1/S27/3902999/Lifestyles-in-transition-evolution-and-natural
18. Shuhadha MFF, Panagoda GJ, Madhujith T, Jayawardana NWIA. Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus sp.* isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. Ceylon Med J [Internet]. 2017 Sep 25;62(3):159. Available from: <https://cmj.sjoi.info/article/10.4038/cmj.v62i3.8519/>
19. Nwamaioha NO, Ibrahim SA. A selective medium for the enumeration and differentiation of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. J Dairy Sci [Internet]. 2018 Jun;101(6):4953-61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218303102>
20. Ma L, Li F, Zhang X, Feng X. Biochemical characterization of a recombinant *Lactobacillus acidophilus* strain expressing exogenous FomA protein. Arch Oral Biol [Internet]. 2018 Aug;92:25-31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996918301377>
21. Daughtry K V., Johanningsmeier SD, Sanozky-Dawes R, Klaenhammer TR, Barrangou R. Phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus buchneri* strains isolated from spoiled, fermented cucumber. Int J Food Microbiol [Internet]. 2018

Sep;280:46-56. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518302113>

22. Rossi F, Amadoro C, Colavita G. Members of the *Lactobacillus* Genus Complex (LGC) as Opportunistic Pathogens: A Review. *Microorganisms* [Internet]. 2019 May 10;7(5):126. Available from:
<https://cmj.sljol.info/article/10.4038/cmj.v62i3.8519/>
23. Ali Khaled H, ward Shafer K. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA GENUS *LACTOBACILLUS* AND COUNTING THEIR NUMBERS FROM THE HONEY BEE APIS MELLIFERA STOMACHS. *PLANT Arch* [Internet]. 2021 Jan 15;21(Supplement-1):1746-50. Available from: [http://plantarchives.org/SPECIAL_ISSUE_21-1/277_\(1746-1750\).pdf](http://plantarchives.org/SPECIAL_ISSUE_21-1/277_(1746-1750).pdf)
24. Salvetti E, O'Toole PW. The Genomic Basis of Lactobacilli as Health-Promoting Organisms. Britton RA, Cani PD, editors. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2017 May 19;5(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.BAD-0011-2016>
25. Zhang M, Wu G, Wang L, Zhang B, Chen J, Liu Y, et al. Characteristics of *Lactobacillus plantarum* QZW5 and its effects on wheat silage under multigelation. *Chem Biol Technol Agric* [Internet]. 2021 Dec 26;8(1):52. Available from: <https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-021-00251-6>
26. Fang F, Xu J, Li Q, Xia X, Du G. Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain

- with potential oral probiotic properties. BMC Microbiol [Internet]. 2018 Dec 22;18(1):221. Available from:
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-018-1369-3>
27. García-Burgos M, Moreno-Fernández J, Alférez MJM, Díaz-Castro J, López-Aliaga I. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. J Funct Foods [Internet]. 2020 Sep;72:104059. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464620302838>
 28. Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, et al. Kefir and Its Biological Activities. Foods [Internet]. 2021 May 27;10(6):1210. Available from:
<https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1210>
 29. Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio M do CG. Milk kefir : nutritional, microbiological and health benefits. Nutr Res Rev [Internet]. 2017 Jun 22;30(1):82-96. Available from:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422416000275/type/journal_article
 30. Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2021 Jul;113:42-53. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421003010>
 31. Slattery C, Cotter PD, W. O'Toole P. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. Nutrients [Internet]. 2019 Jun 1;11(6):1252.

Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1252>

32. Dailin DJ, Elsayed EA, Malek RA, Hanapi SZ, Selvamani S, Ramli S, et al. Efficient kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* ATCC 43761 in submerged cultivation: Influence of osmotic stress and nonionic surfactants, and potential bioactivities. Arab J Chem [Internet]. 2020 Dec;13(12):8513-23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535220303646>
33. He X, Han N, Wang Y-P. Cloning, Purification, and Characterization of a Heterodimeric α -Galactosidase from *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2016 Jan 28;26(1):20-7. Available from: <http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1507.07013>
34. Georgalaki M, Zoumpopoulou G, Anastasiou R, Kazou M, Tsakalidou E. *Lactobacillus kefiranofaciens*: From Isolation and Taxonomy to Probiotic Properties and Applications. Microorganisms [Internet]. 2021 Oct 16;9(10):2158. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/10/2158>
35. Wang S-Y, Chen Y-P, Huang R-F, Wu Y-L, Ho S-T, Li K-Y, et al. Subspecies Classification and Comparative Genomic Analysis of *Lactobacillus kefiranofaciens* HL1 and M1 for Potential Niche-Specific Genes and Pathways. Microorganisms [Internet]. 2022 Aug 12;10(8):1637. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1637>
36. Seo MK, Park EJ, Ko SY, Choi EW, Kim S. Therapeutic effects of kefir grain *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles in mice with 2,4,6-trinitrobenzene

- sulfonic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Dairy Sci* [Internet]. 2018 Oct;101(10):8662-71. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218307392>
37. Vardjan T, Mohar Lorbeg P, Čanžek Majhenič A. Stability of prevailing lactobacilli and yeasts in kefir grains and kefir beverages during ten weeks of propagation. *Int J Dairy Technol* [Internet]. 2018 Mar;71:51-60. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.12463>
38. Duran FE, Özdemir N, Güneşer O, Kök-Taş T. Prominent strains of kefir grains in the formation of volatile compound profile in milk medium; the role of *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri* and *Lentilactobacillus parakefiri*. *Eur Food Res Technol* [Internet]. 2022 Apr 25;248(4):975-89. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00217-021-03936-2>
39. Gaspar C, Donders GG, Palmeira-de-Oliveira R, Queiroz JA, Tomaz C, Martinez-de-Oliveira J, et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* [Internet]. 2018 Dec 27;8(1):153. Available from: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-018-0679-z>
40. Alamdary SZ, Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and *shigella dysenteriae* following intestinal epithelial cells infection. *Microb Pathog* [Internet]. 2020 Dec;149:104543. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401020309098>

41. Mosallaie F, Jooyandeh H, Hojjati M, Fazlara A. Biological reduction of aflatoxin B1 in yogurt by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. Food Sci Biotechnol [Internet]. 2020 Jun 23;29(6):793-803. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-019-00722-5>
42. Adetoye A, Pinloche E, Adeniyi BA, Ayeni FA. Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. BMC Microbiol [Internet]. 2018 Dec 30;18(1):96. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-018-1248-y>
43. Peyer LC, Zarnkow M, Jacob F, De Schutter DP, Arendt EK. Sour Brewing: Impact of *Lactobacillus Amylovorus* FST2.11 on Technological and Quality Attributes of Acid Beers. J Am Soc Brew Chem [Internet]. 2017 Jun 5;75(3):207-16. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-2017-3861-01>
44. Chumphon T, Sriprasertsak P, Promsai S. Development of rice as potential carriers for probiotic *Lactobacillus amylovorus*. Int J Food Sci Technol [Internet]. 2016 May;51(5):1260-7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.13079>
45. Belz MCE, Axel C, Arendt EK, Lynch KM, Brosnan B, Sheehan EM, et al. Improvement of taste and shelf life of yeasted low-salt bread containing functional sourdoughs using *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 and *Weisella cibaria* MG1. Int J Food Microbiol [Internet]. 2019 Aug;302:69-79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518303660>

46. Feyereisen M, Mahony J, O'Sullivan T, Boer V, Sinderen D. Beer spoilage and low pH tolerance is linked to manganese homeostasis in selected *Lactobacillus brevis* strains. J Appl Microbiol [Internet]. 2020 Nov 15;129(5):1309-20. Available from: <https://academic.oup.com/jambio/article/129/5/1309/6715333>
47. Shokri S, Terefe NS, Shekarforoush SS, Hosseinzadeh S. Ultrasound-assisted fermentation for enhancing metabolic and probiotic activities of *LactoBacillus brevis*. Chem Eng Process - Process Intensif [Internet]. 2021 Sep;166:108470. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270121001719>
48. Liu J, Deng Y, Soteyome T, Li Y, Su J, Li L, et al. Induction and Recovery of the Viable but Nonculturable State of Hop-Resistance *Lactobacillus brevis*. Front Microbiol [Internet]. 2018 Oct 15;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02076/full>
49. Xu R, Aruhan, Xiu L, Sheng S, Liang Y, Zhang H, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus buchneri* TCP016 Attenuate LPS- and d -GalN-Induced Liver Injury by Modulating the Gut Microbiota. J Agric Food Chem [Internet]. 2019 Oct 23;67(42):11627-37. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b04323>
50. Peter S, Gärtner MA, Michel G, Ibrahim M, Klopfleisch R, Lübke-Becker A, et al. Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. Sci Rep [Internet]. 2018 Apr 3;8(1):5473. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22856-y>

51. Peng M, Tabashsum Z, Patel P, Bernhardt C, Biswas D. Linoleic Acids Overproducing *Lactobacillus casei* Limits Growth, Survival, and Virulence of *Salmonella Typhimurium* and Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02663/full>
52. Bancalari E, Castellone V, Bottari B, Gatti M. Wild *Lactobacillus casei* Group Strains: Potentiality to Ferment Plant Derived Juices. *Foods* [Internet]. 2020 Mar 9;9(3):314. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/314>
53. Tarifa MC, Piqueras CM, Genovese DB, Brugnoli LI. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021 May;179:457-65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021005560>
54. Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Zotta T. Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2018 Sep;280:66-77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518302277>
55. Abdul-Rahim O, Wu Q, Price TK, Pistone G, Diebel K, Bugni TS, et al. Phenyl-Lactic Acid Is an Active Ingredient in Bactericidal Supernatants of *Lactobacillus crispatus*. O'Toole G, editor. *J Bacteriol* [Internet]. 2021 Sep 8;203(19). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00360-21>

56. Abramov VM, Kosarev I V., Priputnevich T V., Machulin A V., Abashina TN, Chikileva IO, et al. S-layer protein 2 of vaginal *Lactobacillus crispatus* 2029 enhances growth, differentiation, VEGF production and barrier functions in intestinal epithelial cell line Caco-2. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021 Oct;189:410-9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021018158>
57. Khan M. Effect of *Lactobacillus gallinarum* PL 53 Supplementation on Xylose Absorption and Intestinal Morphology in Broilers Challenged with *Campylobacter jejuni*. *Pak Vet J* [Internet]. 2019; Available from:
http://www.pvj.com.pk/in_press/19-336.pdf
58. Sugimura N, Li Q, Chu ESH, Lau HCH, Fong W, Liu W, et al. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut* [Internet]. 2022 Oct;71(10):2011-21. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2020-323951>
59. Yao C, Chou J, Wang T, Zhao H, Zhang B. Pantothenic Acid, Vitamin C, and Biotin Play Important Roles in the Growth of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jun 4;9. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01194/full>
60. Angelescu I-R, Grosu-Tudor S-S, Cojoc L-R, Maria G-M, Chirițoiu GN, Munteanu CVA, et al. Isolation, characterization, and mode of action of a class III bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2022 Dec 9;38(12):220. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11274->

022-03408-z

61. Ali E, Nielsen SD, Abd-El Aal S, El-Leboudy A, Saleh E, LaPointe G. Use of Mass Spectrometry to Profile Peptides in Whey Protein Isolate Medium Fermented by *Lactobacillus helveticus* LH-2 and *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Front Nutr* [Internet]. 2019 Oct 15;6. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2019.00152/full>
62. Manzoor A, Qazi JI, Haq I ul, Mukhtar H, Rasool A. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *J Biol Eng* [Internet]. 2017 Dec 5;11(1):17. Available from:
<http://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-017-0059-2>
63. Mahmoud M, Abdallah NA, El-Shafei K, Tawfik NF, El-Sayed HS. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon* [Internet]. 2020 Mar;6(3):e03541. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020303868>
64. Daranas N, Badosa E, Francés J, Montesinos E, Bonaterra A. Enhancing water stress tolerance improves fitness in biological control strains of *Lactobacillus plantarum* in plant environments. Jogaiah S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jan 5;13(1):e0190931. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190931>

65. Oleksy-Sobczak M, Klewicka E, Piekarska-Radzik L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains - Optimization of synthesis and extraction conditions. LWT [Internet]. 2020 Mar;122:109055. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820300438>
66. Liu Z-S, Lin C-F, Chen P-W. Transcriptome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG strain treated with prebiotic - bovine lactoferrin under a cold environment. J Food Drug Anal [Internet]. 2021 Sep 13;29(3):402-18. Available from: <https://www.jfda-online.com/journal/vol29/iss3/2>
67. Brandi J, Di Carlo C, Manfredi M, Federici F, Bazaj A, Rizzi E, et al. Investigating the Proteomic Profile of HT-29 Colon Cancer Cells After *Lactobacillus kefir* SGL 13 Exposure Using the SWATH Method. J Am Soc Mass Spectrom [Internet]. 2019 Sep 1;30(9):1690-9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1007/s13361-019-02268-6>
68. Riaz Rajoka MS, Mehwish HM, Fang H, Padhiar AA, Zeng X, Khurshid M, et al. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains. J Funct Foods [Internet]. 2019 Dec;63:103588. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619305122>
69. Zubiría M, Gambaro S, Rey M, Carasi P, Serradell M, Giovambattista A. Deleterious Metabolic Effects of High Fructose Intake: The Preventive Effect of *Lactobacillus kefir* Administration. Nutrients [Internet]. 2017 May 17;9(5):470. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/5/470>

70. Lamont R, Hajishengallis G, Jenkinson H. Microbiología e inmunología oral. 1a edición. México; 2015. 472 p.
71. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. 12a ed. 2017. 960 p.
72. Shoaib M, Shehzad A, Omar M, Rakha A, Raza H, Sharif HR, et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. Carbohydr Polym [Internet]. 2016 Aug;147:444-54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716303812>
73. Mannan SJ, Rezwana R, Rahman MS, Begum K. Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* species from Yogurt and Cheese samples in Dhaka Metropolitan Area. Bangladesh Pharm J [Internet]. 2017 Apr 5;20(1):27-33. Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/BPJ/article/view/32090>
74. Soni M, Shah HR, Patel SM. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Characteristics of *Lactobacillus spp* from Regional Yoghurts from Surendranagar District, Gujarat. Asian J Dairy Food Res [Internet]. 2021 Mar 30;(Of). Available from: <http://arccjournals.com/journal/asian-journal-of-dairy-and-food-research/DR-1631>
75. Luca L, Oroian M. THE IMPACT OF POTENTIAL PREBIOTICS INULIN, OLIGOFRUCTOSE AND POTATO STARCH ON THE GROWTH OF *Lactobacillus casei*. AgroLife Sci [Internet]. 2019;8:153-9. Available from: http://www.agrolifejournal.usamv.ro/pdf/vol.VIII_1/Art20.pdf