



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Biología Molecular
Área de Bioquímica y Biología Molecular**

**Selección *in vitro* de microorganismos
con potencial probiótico**

Tesis Doctoral presentada por

Andrea Monteagudo Mera

Noviembre, 2010

A mis padres y hermana

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que habeis permitido, contribuido o participado en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer a mis Directores de Tesis D. Miguel Ángel Ferrero García, D. Leandro Rodríguez Aparicio y Dña. M^a Rosario García Armesto la oportunidad brindada para iniciar mi labor investigadora, así como su gran ayuda en la elaboración de esta Tesis y por tratarme siempre con una enorme paciencia y cariño. Igualmente deseo expresar mi gratitud a la Dres. Honorina Martínez Blanco, Javier Rúa e Irma Caro por su gran ayuda y dedicación a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Vega Villar y a su grupo de investigación por su gran amistad y haberme dejado “colonizar” su laboratorio prestándome su ayuda en todo momento.

A los Dres. Jose María Luengo y Dolores Arriaga y sus respectivos grupos de investigación, por su ayuda y amistad, siempre que lo he necesitado.

A todos mis compañeros del laboratorio: Elías, Joaquín, Cristina, Fany, Pepelu, Álvaro e Iñiqui y a los que ya se fueron: Vanesa, Sagrario, Mario, Marta, Sofía, Patricia y Rodrigo. A todos vosotros os doy las gracias por los momentos inolvidables compartidos a lo largo de estos años, por vuestro cariño y comprensión, y porque además de compañeros me llevo muchos amigos. Espero que a todos os vaya muy bien porque os lo mereceis.

A todos los estudiantes que habeis pasado por nuestra Área en especial a Sandra, Nicole, Noelia e Irene, porque además de aprender, me habeis ayudado mucho a lo largo de este trabajo. ¡Gracias!

A todos los miembros del P.A.S. en especial a Toñi, Eduardo y Charo por los buenos momentos pasados con vosotros y hacerme la vida más fácil en el laboratorio.

Al resto de miembros del Área de Bioquímica y Biología Molecular por el apoyo brindado y vuestras conversaciones. ¡Gracias a todos!

Al Servicio de Microscopía y al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, especialmente a Antonio, Benjamin y Paquita, por haber contribuido en diversas partes de este trabajo.

A los Dres. Juan Anguita y Marcelo C. Sousa así como a sus grupos de investigación porque además de haberme acogido con un gran cariño en sus laboratorios en mis periodos de “estancia en el extranjero”, han contribuido también a mi formación.

A Sonia, María e Irene por vuestro apoyo incondicional en todo momento y los buenos momentos que hemos pasado juntas, que espero que se sigan repitiendo. Al resto de mis amigos, que sin estar metidos en “esto” habeis estado siempre ahí, ayudándome a desconectar e interesándoos por mi trabajo. ¡Muchas gracias a todos!

A mis padres y mi hermana por haber confiado siempre en mí y por vuestra paciencia con mi mal humor en momentos de nervios. Por haberme convertido en lo que soy, por ayudarme en todo lo que podeis y hacerme la vida tan fácil. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. ¡Os quiero!

A toda mi familia, la leonesa y la gallega. A todos vosotros por ser una gran familia. También a mi abuelo Ramón que aunque ya no está aquí, sé que se hubiera sentido orgulloso. Gracias por los valores de esfuerzo transmitidos. Esta Tesis también es tuya.

A todas aquellas personas que no he nombrado pero que también han contribuido a esta tesis. Muchas gracias a todos.

Por último, pero no menos importante, a Nico. Gracias por TODO. Por estar ahí, por tu paciencia, tu cariño y tus charlas. Por hacerme tan feliz. Lo mejor de esta tesis ha sido conocerte a ti.

Finalmente quiero agradecer a la Junta de Castilla y León la concesión de una beca que me ha permitido realizar este trabajo, así como reconocer la subvención de los diferentes proyectos concedidos por la Dirección General de Investigación (AGL2007-62428), la Junta de Castilla y León (JCyL LE44/04 y JCyL LE032A08) y la Exma. Diputación Provincial de León (UXXI2006/00071).

Introducción.....	7
1.Los alimentos funcionales	9
2.La microbiota intestinal	11
3.Los probióticos	16
3.1. Contexto histórico	16
3.2. Las bacterias probióticas empleadas en alimentación	17
3.2.1. Las bacterias ácido lácticas (BAL)	18
3.3. Características deseables de las bacterias probióticas	21
3.3.1. Características de la cepa	22
3.3.1.1. Origen	22
3.3.1.2. Bioseguridad	23
3.3.2. Características funcionales de la cepa bacteriana	24
3.3.2.1. Resistencia al tránsito gastrointestinal	24
3.3.2.2. Adherencia al epitelio intestinal	25
3.3.2.3. Actividad antimicrobiana	26
3.3.2.4. Modulación del sistema inmune	27
3.3.2.5. Efectos beneficiosos para la salud del consumidor	27
3.3.3. Aspectos tecnológicos de la cepa	29
3.4. Los alimentos probióticos	31
3.4.1. Aspectos legales en la comercialización de alimentos probióticos	33
4.Los prebióticos	34
4.1. Tipos de prebióticos	35
4.1.1. Los galacto-oligosacáridos (GOS)	37
4.1.2. Los fructo-oligosacáridos (FOS)	37
4.2. Efectos beneficiosos de los prebióticos	39
4.2.1. Estimulación del sistema inmune y efecto bifidogénico	39
4.2.2. Aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y prevención del cáncer de colon	39
4.2.3. Disminución del colesterol sérico y aumento en la absorción de calcio	40
5. Los simbióticos	41

Objetivos.....	43
Materiales y Métodos.....	47
1. Materiales	49
1.1. Material biológico	49
1.2. Reactivos	52
1.3. Medios de cultivo	54
2. Métodos	56
2.1. Mantenimiento de las cepas	56
2.2. Inoculación y condiciones generales de crecimiento	56
2.3. Determinación del crecimiento bacteriano	57
2.4. Determinación del número de microorganismos viables	57
2.5. Cálculo de los parámetros de crecimiento “ X_{max} ” y “ μ ”	57
2.6. Identificación de las cepas	58
2.7. Determinación de la actividad antimicrobiana	58
2.7.1. Técnica de <i>Spot test</i>	58
2.7.2. Técnica de difusión en agar	60
2.7.3. Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	
2.7.3.1. Método cualitativo	60
2.7.3.2. Método cuantitativo	61
2.8. Estudios genéticos	61
2.8.1. Obtención de ADN genómico	61
2.8.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	61
2.8.3. Visualización de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	63
2.9. Valoración de la resistencia al tránsito gastrointestinal	64
2.9.1. Resistencia al tránsito gástrico	64
2.9.2. Resistencia al tránsito intestinal	64
2.9.3. Resistencia en presencia de sales biliares	65
2.10. Caracterización tecnológica de las cepas de BAL	65
2.10.1. Valoración del perfil enzimático	65
2.10.2. Valoración de la capacidad acidificante de las cepas de BAL en leche	66

2.10.3. Valoración de la actividad proteolítica de las cepas de BAL en leche	67
2.10.4. Estudio de viabilidad a 4°C en las cepas de BAL	67
2.11. Estudios de bioseguridad en las cepas de BAL	68
2.11.1. Valoración de la actividad hemolítica	68
2.11.2. Valoración de la actividad gelatinásica	68
2.11.3. Valoración de la actividad hialuronidásica	68
2.11.4. Valoración de la actividad mucinolítica	69
2.11.5. Valoración de la producción de ácido D/L- láctico	69
2.11.6. Valoración de la resistencia a antibióticos	70
2.12. Valoración de la adhesión a células epiteliales intestinales de origen humano	71
2.12.1. Mantenimiento de la línea celular Caco-2	71
2.12.2. Ensayo de adhesión	72
2.12.3. Visualización de la adhesión de las cepas de BAL a las células Caco-2 mediante microscopía de barrido	73
2.12.4. Valoración de la producción de interleucinas	73
2.13. Valoración de la adhesión a mucus	74
2.14. Estudios de la formación de biofilms	75
2.14.1. Cuantificación	75
2.14.2. Visualización de biofilms mediante microscopía confocal	76
2.15. Crecimiento de las BAL con compuestos con potencial prebiótico	76
2.16. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	77
Resultados y Discusión.....	79
1. Identificación de las cepas bacterianas seleccionadas	82
2. Cinética de crecimiento	85
3. Actividad antimicrobiana	89
3.1. Valoración de la actividad antimicrobiana por <i>Spot test</i>	89
3.2. Producción de bacteriocinas	93
3.3. Producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	95
4. Resistencia al tránsito gastrointestinal	98
4.1. Resistencia al tránsito gástrico	98

4.2. Resistencia a las sales biliares	103
4.3. Resistencia a la pancreatina	106
5. Características tecnológicas	108
5.1. Actividades enzimáticas	108
5.2. Actividad acidificante	113
5.3. Actividad proteolítica	116
6. Estudios de bioseguridad en cepas de BAL con potencial probiótico	118
6.1. Actividad hemolítica	118
6.2. Actividad gelatinásica	119
6.3. Actividad hialuronidásica	121
6.4. Actividad mucinolítica	122
6.5. Producción de ácido D-láctico	124
6.6. Resistencia a antibióticos	127
7. Capacidad de adhesión	135
7.1. Adherencia a células epiteliales intestinales de origen humano	135
7.2. Adherencia a mucus	140
8. Formación de biofilms	141
9. Producción de citoquinas	147
10. Prebióticos y crecimiento bacteriano	151
11. Producción de ácidos grasos de cadena corta	154
12. Capacidad de crecimiento, producción de ácido láctico y viabilidad en leche	157
Conclusiones.....	165
Anexo.....	169
Bibliografía.....	173

ABREVIATURAS

a.	C.: antes de Cristo	FOS: Fructo-Oligosacáridos
	ADN: Ácido desoxirribonucleico	Glc: Glucosa
	ARN: Ácido ribonucleico	GOS: Galacto-Oligosacáridos
	AGCC: Ácidos Grasos de cadena corta	GRAS: “Generally regarded as safe”
	Apo-B: “Apolipoprotein B”	ICMSF: “International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
	ATCC: “American Type Culture Collection”	IL: Interleucina
	BAL: Bacterias Ácido Lácticas	IgA: Inmunoglobulina A
	BHIA: medio “Brain Heart Infusion Agar”	LDH: Lactato Deshidrogenasa
	BrET: Bromuro de Etidio	LDL: “Low Density Lipoprotein”
	BSA: Albúmina Sérica Bovina	MRS: medio de “Man, Rogosa y Sharpe”
	BSH: “Bile Salt Hidrolase”	MRSA: medio Agar de “Man Rogosa y Sharpe”
	Caco-2: “Human adenocarcinoma intestinal epithelial cells”	MSSA: Staphylococcus aureus sensible a la meticilina
	CCM: “Czech Collection of Microorganisms”	OMS: Organización Mundial de la Salud
	CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”	OND: Oligosacáridos No Digeribles
	CECT: Colección Española de Cultivos Tipo	PBS: “Phosphate Buffered saline”
	CIM: Concentración Inhibitoria Mínima	PBST: PBS suplementado con 0,05% de Tween 20
	DMSO: Dimetil sulfóxido	SFB: Suero Fetal Bovino
	dNTP_s: Desoxinucleótidos trifosfato	SLC: Sobrenadante Libre de Células
	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	TGI: Tracto gastrointestinal
	EFSA: “European Food Safety Authority”	TSA: medio “Tryptic Soy Agar”
	ELISA: “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”	TSB: medio “Tryptic Soy Broth”
	EMEM: “Eagle’s Minimum Essential Medium”	TSB-YE: medio “Tryptic Soy Broth” suplementado con 0,6% de extracto de levadura
	FAO: “Food and Agriculture Organization”	TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
	FID: “Flame Ionization Detector”	UFC: Unidades Formadoras de Colonia
		VLDL: “Very Low Density Lipoprotein”
		WGO: “World Gastroenterology Organization”

INTRODUCCIÓN

1. Los alimentos funcionales

La nutrición y los hábitos alimenticios son herramientas a través de las cuales se puede controlar y mejorar la salud del individuo. Actualmente se sabe que muchas de las enfermedades más comunes del hombre, se deben o están relacionadas con la dieta (hipertensión arterial, osteoporosis, obesidad,...). Esto, ha conllevado a que se produzca un cambio en el significado de nutrición y alimentación, pasando de ser considerados como meros conceptos que se refieren al aporte de los nutrientes necesarios en la dieta, a la idea de que los alimentos, además de nutrir, han de promover específicamente la salud. La vieja frase de Hipócrates “haz que tus alimentos sean tu medicina” vuelve a estar en boga casi 2500 años después, cuando la percepción de que es posible una mejora de la salud del individuo a través de la selección adecuada de los alimentos consumidos, ha conducido a una demanda cada vez mayor de alimentos que mejoren la salud de los consumidores.

Aunque la interacción entre alimentación y medicina ya era reconocida por los chinos desde el año 1000 a. C., es en estos últimos años cuando se ha producido una renovada atención. De este modo, el campo de la nutrición, cuya investigación ha aumentado recientemente de forma considerable, tiene como prioridades la identificación y utilización de alimentos que mejoren la salud, el bienestar y reduzcan el riesgo de padecer enfermedades (Arai, 1996): son los denominados alimentos funcionales.

El término de alimento funcional surge por primera vez en Japón en la década de los 80 del siglo pasado. Las autoridades sanitarias japonesas se percataron de que para controlar el gasto sanitario generado por la mayor esperanza de vida de la población, había que garantizar también una mejor calidad de vida. Se introduce, en este momento, un nuevo concepto de alimentos que, consumidos como parte de una dieta normal, contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de padecer enfermedades (Arai, 1996). Los alimentos funcionales han sido enriquecidos artificialmente con otros ingredientes naturales como vitaminas,

minerales, fibras, etc. con el fin de implementar los beneficios que éstos aportan a nuestro organismo (Hasler, 2000).

Dentro de los alimentos funcionales, destacan aquellos que contienen un determinado grupo de microorganismos denominados probióticos. En la actualidad, existe en el mercado una importante y variada oferta de productos suplementados con este tipo de microorganismos, principalmente bacterias, y cuyo principal vehículo de administración son los productos lácteos, especialmente las leches fermentadas, aunque también se pueden incluir en otros muchos productos.

En estos últimos años ha aumentado de forma considerable el interés por modular o modificar la microbiota intestinal, conjunto de microorganismos asociados al intestino de un individuo, mediante la ingesta de microorganismos beneficiosos (probióticos) o de compuestos que los potencien de manera selectiva (prebióticos). Este interés se debe a la gran influencia que las poblaciones microbianas del individuo en el intestino tiene sobre muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas del hospedador. Esta situación, ha provocado que, en general y principalmente desde la industria alimentaria, se hayan desarrollado y promocionado, en los últimos años, multitud de alimentos probióticos con efectos beneficiosos en la salud humana y animal.

Aunque es cierto que diversas especies de bacterias ácido lácticas forman parte de la dieta del hombre desde tiempos inmemorables y tienen diversos efectos beneficiosos en la salud del individuo, es necesario una selección restrictiva de microorganismos, potencialmente probióticos, para que, posteriormente, se estudie en profundidad la eficacia de los mismos en la prevención y/o en el tratamiento de determinadas patologías. Además, la idea de que los microorganismos probióticos introducidos a través de la dieta, deben de alcanzar los niveles de las poblaciones residentes, y que éstos no desaparezcan pronto tras el cese de su consumo para que sean eficaces, ha generado la necesidad de realizar nuevos estudios que traten de estudiar y establecer las modificaciones que se producen en la composición de la microbiota intestinal tras la ingesta de los mismos. En este sentido, el conocimiento de la interacción

que se establece entre los agentes probióticos y el huésped ha dado un salto cuantitativo importante. Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos por aclarar, por lo que la investigación en esta área, lejos de estar llegando a su fin, no ha hecho más que comenzar.

2. La microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) es el sistema con mayor actividad metabólica del cuerpo humano (Mattila-Sandholm *et al.*, 2005). Varios autores consideran que la actividad de la microbiota intestinal es comparable en su magnitud a la del hígado, además de ser mucho más diversa en funciones (Roberfroid *et al.*, 1995).

El TGI acoge un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies diferentes de microorganismos que se han adaptado a vivir en la superficie de la mucosa intestinal o dentro de la luz intestinal. Es por ello, por lo que el intestino humano y su microbiota no pueden ser considerados como entidades separadas sino que, por el contrario, ambos representan un sistema biológico diverso y dinámico que coevoluciona desde el nacimiento del individuo (O' Grady y Gibson, 2005).

Si descartamos la cavidad oral, expuesta al medio ambiente, la microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI dependiendo principalmente de la presión de O₂, del pH y del flujo del contenido digestivo (Figura 1). Así, en condiciones normales, y principalmente como consecuencia de la acidez del entorno, la microbiota del estómago es mínima o apenas existente; la concentración bacteriana no supera las 10³ bacterias por mililitro de contenido gástrico. A medida que avanzamos y a lo largo del intestino delgado, el número de bacterias va incrementando, desde 10⁴ bacterias por mililitro en el duodeno proximal, hasta 10⁷ bacterias por mililitro en el íleon terminal. Por último, en el colon, debido a que el tránsito intestinal es más lento y el pH es más neutro y apropiado para el crecimiento bacteriano, la población de microorganismos alcanza concentraciones de hasta 10¹² bacterias por mililitro,

siendo las bacterias anaerobias las predominantes en esta zona. (Lee *et al.*, 1999) (Figura 1).

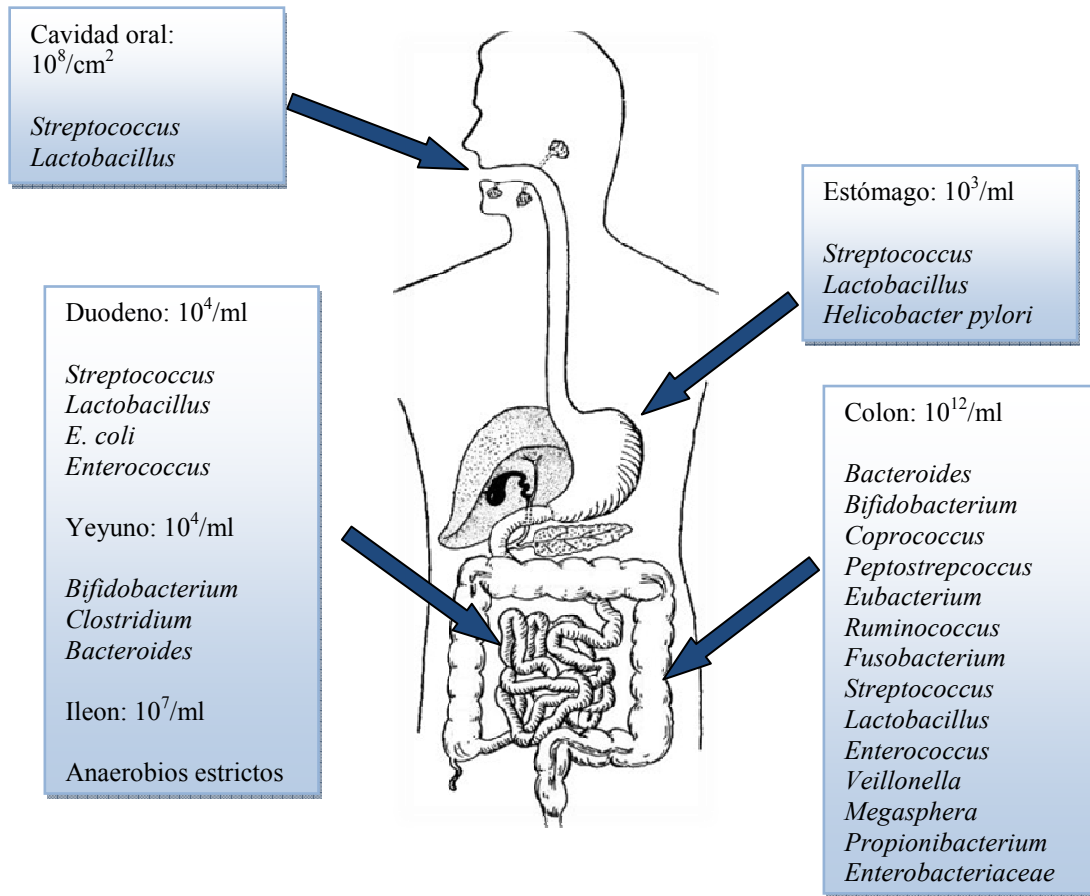


Figura 1: Distribución de los principales géneros bacterianos en el TGI. Adaptado de Pérez-Conesa, 2003.

El tipo de nacimiento, la alimentación del recién nacido y el genotipo del individuo son, entre otros, factores importantes y determinantes en la composición de la microbiota del individuo. El TGI es estéril hasta el nacimiento, cuando la colonización microbiana comienza como consecuencia del proceso del parto. En este sentido, el tipo de nacimiento determina el inóculo bacteriano inicial en el individuo, pudiendo proceder de la flora vaginal de la madre, en un parto convencional, o del entorno ambiental, en un parto por cesárea (Stark y Lee, 1982). En niños alimentados con leche materna, la microbiota intestinal está dominada por el género *Bifidobacterium* (hasta un 91%). En estos casos, se ha observado que existe una menor incidencia de infecciones gastrointestinales así como de otras enfermedades y se ha

relacionado con la presencia intestinal de este género bacteriano (Sanz *et al.*, 2006). Por el contrario, el intestino de niños alimentados con fórmulas infantiles está colonizado por una microbiota más heterogénea y similar a la del individuo adulto (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, etc.) (Sanz *et al.*, 2006).

Después del nacimiento y durante los primeros años de vida del niño, la flora bacteriana se normaliza y se mantiene en un equilibrio estable durante la vida adulta (eubiosis). Esta comunidad de microorganismos presentes en el TGI es única y específica de cada individuo, incluso los gemelos homocigóticos normalmente presentan distintos perfiles (Zoetendal *et al.*, 2001). En esta situación de equilibrio o eubiosis, la microbiota intestinal juega un papel importante en la prevención de enfermedades a través del desplazamiento de las poblaciones de microorganismos patógenos; individuos libres de bacterias son más susceptibles a las infecciones (Baba *et al.*, 1991).

El proceso de exclusión de los microorganismos patógenos por la microbiota se ve favorecida por diversos factores (Alderbeth *et al.*, 2000):

- La microbiota está mejor adaptada para competir por los nutrientes y emplazarse en el intestino que los microorganismos exógenos.
- La actividad metabólica de la microbiota previene el desarrollo o el crecimiento de otras bacterias.
- La capacidad de producir sustancias con actividad antibacteriana juega un papel importante en la reducción y control de la presencia de microorganismos patógenos.

Además, en este punto, es importante resaltar el papel que la microbiota intestinal desempeña sobre el sistema inmune. Como se ha indicado anteriormente, el TGI es estéril hasta el mismo momento del nacimiento, por lo que su exposición a agentes microbianos provoca una estimulación local y sistémica que actúa sobre el desarrollo y la maduración del sistema inmune. Posteriormente, y a lo largo de la vida del individuo la microbiota intestinal

estimula la producción de IgA, neutralizando bacterias exógenas y virus (Moreau, 2000).

La población microbiana intestinal también actúa a través de los productos generados por la fermentación de nutrientes. En algunas ocasiones los productos finales de la fermentación de carbohidratos pueden favorecer incluso la salud humana (MacFarlane y McBain, 1999). La mayor parte de los sustratos disponibles en el tracto intestinal para la fermentación microbiana, consisten en almidón que ha resistido la acción de amilasas pancreáticas y que podrá ser degradado por enzimas bacterianas, fibras de la dieta tales como pectinas y xilanos, y otras fuentes de carbohidratos disponibles en baja concentración como azúcares, y polialcoholes no absorbibles comúnmente denominados prebióticos. La degradación de estos azúcares da lugar a la formación de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tales como butirato, acetato y propionato que pueden ser metabolizados por determinados tejidos y órganos como el hígado, el músculo y el cerebro. La producción de AGCC da lugar a una bajada de pH que puede proteger contra microorganismos patógenos y además reducir la transformación de ácidos biliares primarios a ácidos biliares secundarios pre-carcinogénicos (Cummings y MacFarlane, 1997).

Otra acción importante de la microbiota es la producción de vitaminas, especialmente K y B. Existen estudios donde se demuestra que al comparar animales con microbiota estable con animales libres de bacterias intestinales, es necesario incrementar, en estos últimos, la ingesta en su dieta de alimentos hasta el 30% para mantener el peso y suplementos de vitaminas B y K (Hopper *et al.*, 2002).

Sin embargo, los efectos beneficiosos consecuentes de una situación de equilibrio de la microbiota intestinal pueden dejar de tener lugar cuando aparece una situación en la que se perturba dicho equilibrio (disbiosis). Como consecuencia puede producirse un aumento en el número de microorganismos oportunistas que alteran el balance de la flora intestinal. Diversos factores pueden contribuir a esta situación, entre los que se incluyen, modificaciones en la alimentación, el uso de medicamentos (especialmente los antibióticos de amplio

espectro) o un alto nivel de estrés (Fooks *et al.*, 1999). En estos casos de disbiosis, microorganismos como *Candida* spp. y *Clostridium* spp., que en situación de homeostasis son tolerados en bajas concentraciones, pueden incrementar notablemente su proporción y provocar efectos dañinos en la salud del individuo (O'Grady y Gibson, 2005).

Actualmente, el uso de antibióticos de amplio espectro a los que son sensibles algunas cepas bacterianas de la microbiota especialmente beneficiosas para el organismo, la supresión inmune anímica o medicamentosa y algunas enfermedades crónicas pueden comprometer seriamente el balance entre microorganismos beneficiosos y perjudiciales del TGI. Esta situación puede provocar en el hospedador un mayor riesgo de contraer enfermedades y permitir la presencia o el aumento en el número de patógenos oportunistas resistentes a dichas terapias (Rai y Sundeepa, 2002).

Este problema, desencadenado principalmente por el uso masivo de antibióticos y un estilo de vida estresante, en combinación con el interés y la demanda creciente de los consumidores por los suplementos alimenticios dirigidos a conseguir y mantener el equilibrio gastrointestinal, ha despertado en los científicos el interés por buscar nuevas alternativas terapéuticas. Se trata de conseguir sustituir el uso de antibióticos “contra la vida” por la utilización de probióticos “a favor de la vida”. Comienza, de esta manera, a tener una gran importancia en el mantenimiento de la salud humana y animal, la modificación y adecuación de la microbiota del TGI mediante la alimentación; a través de la utilización de productos enriquecidos con bacterias probióticas y con sustancias no digeribles para el individuo (prebióticos), que estimulan el crecimiento selectivo en el intestino de especies microbianas beneficiosas (Martí del Moral *et al.*, 2003).

3. Los probióticos

3.1. Contexto histórico:

La historia de los probióticos se remonta al año 1857 cuando las bacterias ácido-lácticas fueron descubiertas por Luis Pasteur. Hacia 1907, el inmunólogo ruso Elie Metchnikoff fijó su atención en que en Bulgaria existía un alto número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. Este científico observó que los búlgaros consumían una gran cantidad de productos lácteos fermentados, como parte de su dieta, que contenían bacterias ácido-lácticas. Así, Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur a la que denominó bacilo búlgaro y la utilizó para desarrollar una dieta con leche fermentada. Defendía el concepto de que la dieta puede proteger al cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida del individuo (Metchnikoff, 1907).

Por entonces, el pediatra francés Henry Tissier, trabajando en el Instituto Pasteur aisló, por primera vez, una bifidobacteria de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bifidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan la diarrea y recomendó la administración de esta bifidobacteria a lactantes que padecían de este síntoma (Tissier, 1906).

En 1965 Lilly y Stillwell introdujeron, por primera vez, el término de probiótico, para designar a las sustancias secretadas por algunos microorganismos capaces de estimular el desarrollo de otros microorganismos. Esta palabra deriva de dos vocablos, del latín *-pro-*, y del griego *-bios-* que quieren decir por o a favor de la vida (Lilly y Shillwell, 1965). Esta definición fue modificada posteriormente y se redefinió el término de probióticos para referirse a microorganismos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal.

En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped, definiéndolos finalmente como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino" (Fuller, 1989).

En la actualidad los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2002).

3.2. Las bacterias probióticas empleadas en alimentación

Para el desarrollo y elaboración de los alimentos probióticos, propuestos para el consumo humano, se emplean, en la gran mayoría de los casos, microorganismos pertenecientes al grupo de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) incluyendo, en un sentido amplio, a las bifidobacterias (Delgado, 2005). Sin embargo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, algunas cepas de *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus*, también son utilizadas como probióticos. En la Tabla 1 se muestran algunos de los microorganismos empleados de forma habitual como probióticos.

La utilización de las BAL como probióticos se remonta a principios del siglo XX (Rettger *et al.*, 1935). Desde entonces, ha despertado un interés creciente el uso de estos microorganismos en la industria alimentaria, y como consecuencia de las propiedades beneficiosas para la salud que han sido atribuidas a este grupo de bacterias a lo largo del tiempo, los alimentos que las contienen son muy solicitados y aceptados por el consumidor.

Tabla 1: Principales especies microbianas utilizadas como microorganismos probióticos. Adaptado de O’Grady y Gibson, 2005.

BAL				No BAL
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium Breve</i>			<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>			
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>			
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
<i>Lactobacillus johnsonii</i>				

3.2.1. Las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)

El término de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) comprende un heterogéneo grupo de géneros bacterianos taxonómicamente diferentes, pero que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas similares. Al ser utilizadas tradicionalmente en la fermentación de una gran variedad de productos, este grupo de bacterias ha tenido una gran importancia en la industria alimentaria a lo largo de la historia (Klein *et al.*, 1998; Giraffa y Neviani, 2000; Holzapfel *et al.*, 2001).

Las BAL son bacterias gram-positivas (Figura 2), normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas (aunque algunas cepas presentan una actividad pseudo-catalásica), con un bajo contenido en guanina y citosina, y productoras de ácido láctico como principal o único producto final de la fermentación de los carbohidratos (Axelsson, 1998). Todas las bacterias pertenecientes a este grupo pueden crecer en condiciones de anaerobiosis; sin

embargo, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo; siendo por tanto anaerobios aerotolerantes. Algunas cepas, pueden incluso, utilizar el oxígeno produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Kandler y Weiss, 1986).

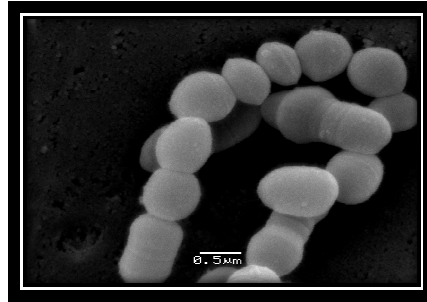


Figura 2: Fotografía de la cepa *Lc. lactis* ATCC 11454, estudiada en este trabajo y visualizada mediante microscopía electrónica de barrido.

La mayor parte de las BAL obtienen la energía a partir del metabolismo de azúcares por lo que sus hábitats están restringidos a lugares donde éstos están presentes (Kandler y Weiss, 1986). Dependiendo del tipo de catabolismo que lleven a cabo, podemos dividir este grupo de bacterias en dos subgrupos (Zamora, 2003):

- Fermentadores homolácticos: realizan la glucólisis y originan ácido láctico como producto final.
- Fermentadores heterolácticos: utilizan la vía de la 6-fosfogluconato/ fosfocetolasa, generando como producto final además del ácido láctico, etanol, acetato y CO_2 .

Históricamente, las BAL se incorporaban a los alimentos para prolongar la viabilidad de éstos, como consecuencia de su capacidad de inhibir el crecimiento tanto de microorganismos patógenos como de microorganismos causantes del deterioro de alimentos. Este efecto conservador ejercido durante la producción y almacenaje de los productos alimenticios se debe, principalmente, a la producción por parte de las BAL, de altos niveles de ácido láctico y otras sustancias inhibidoras de crecimiento como ácidos orgánicos, etanol, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Leroy y De Vuyst, 2004). Además de este

efecto conservador, la producción y liberación de ácido láctico y de otros compuestos como el ácido acético hacia el exterior, contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos (Leroy y De Vuyst, 2004). Principalmente, por estos motivos, muchas especies bacterianas pertenecientes a este grupo, han tenido y tienen un gran interés comercial utilizándose como *starter* en las fermentaciones industriales para la producción de yogur, kéfir, queso, embutidos, vino, etc. (McCartney, 2005).

Muchas de estas BAL forman parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria común de humanos y animales donde desempeñan un papel beneficioso tanto en el mantenimiento de la integridad intestinal como en los procesos que participan en la inmunomodulación y resistencia a microorganismos patógenos (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Como consecuencia de ello y debido a que este grupo de bacterias se encuentran en multitud de alimentos, se agrupan dentro del *status* de microorganismos saludables (GRAS, “Generally Regarded As Safe”) y sus efectos positivos sobre la salud se admiten de un modo generalizado (Klaenhammer *et al.*, 2005). Todo ello ha provocado que, en el último siglo, se haya producido un gran interés comercial tanto en la industria alimentaria como farmacéutica por el desarrollo de productos que contienen estos microorganismos.

Dentro de las BAL, las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas en la elaboración de productos probióticos en la industria alimentaria, puesto que son bacterias deseables de la microbiota intestinal (Berg, 1998) y se las considera responsables de los múltiples efectos beneficiosos que tienen las bacterias probióticas en la salud humana (Perdigon *et al.*, 1990; Benno *et al.*, 1996). Como consecuencia, algunas cepas bacterianas pertenecientes a estos géneros han sido estudiadas en mayor profundidad, produciéndose la explotación comercial mayoritaria de las mismas. Tal es el caso de *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus johnsonii* NCC533 y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Esta última cepa es una de las especies probióticas que mayor

atención ha recibido hasta la fecha: descubierta en 1985, además de tener una excelente capacidad de adhesión que no muestran otras cepas de lactobacilos usadas tradicionalmente en la fermentación de productos lácteos, se han observado en ella una serie de cualidades que la califican de óptima para su uso como cepa probiótica (Gupta y Garg, 2009).

3.3. Características deseables de las bacterias probióticas.

Las bacterias que se pueden utilizar en alimentación como probióticas se seleccionan en base a una serie de requisitos que deben cumplir y que han de evaluarse de forma individual para cada cepa. Los efectos beneficiosos de un microorganismo probiótico concreto, así como otras características deseables para la salud del consumidor, sólo pueden ser atribuidos a cada cepa analizada en cada estudio y no se puede generalizar a toda la especie, ni mucho menos a todo el grupo de las BAL (WGO, 1998).

Por ello, los microorganismos potencialmente probióticos deben de ser correctamente identificados a nivel de género y de especie mediante métodos genotípicos, aunque se recomienda también una caracterización fenotípica previa. Además, una vez que se ha seleccionado e identificado una cepa como probiótica, debería ser depositada en una colección de cultivos reconocida internacionalmente como sugiere la FAO/WHO, (2002).

Para seleccionar una cepa como probiótica se deberían realizar, en primer lugar, estudios *in vitro* apropiados para establecer los posibles beneficios de los probióticos para la salud antes de emprender ensayos *in vivo*. Es conveniente que, según el beneficio previsto para la salud, se lleven a cabo pruebas que revelen la capacidad para tolerar el medio ácido y la presencia de sales biliares, la potencialidad para producir sustancias antimicrobianas y capacidad para adherirse a las células del intestino humano, entre otras (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Collins *et al.*, 1998).

En la tabla 2 se señalan las características fundamentales, clasificadas en tres grupos, que se deben de tener en cuenta a la hora de seleccionar una cepa como probiótica (Delgado, 2005; Lee *et al.*, 1999).

Tabla 2: Criterios utilizados en la selección de cepas probióticas.

Características de la cepa	Origen Bioseguridad
Aspectos funcionales de la cepa	Actividad en condiciones intestinales Resistencia al jugo gástrico y pancreático, bajo pH y sales biliares Adherencia al epitelio intestinal y mucus Actividad antimicrobiana Modulación del sistema inmune Efectos beneficiosos para la salud del consumidor
Aspectos tecnológicos de la cepa	No deben producir aromas ni sabores no deseables Viabilidad en los alimentos

3.3.1. Características de la cepa

3.3.1.1. Origen:

Muchos autores consideran que la cepa bacteriana seleccionada para su uso probiótico en alimentación humana, debe ser de procedencia humana. Este criterio de selección, se basa en la idea de que las bacterias que estén presentes habitualmente en la microbiota intestinal del hombre, podrían implantarse y competir mejor frente a las bacterias autóctonas del intestino. De este modo, estos microorganismos podrían llegar a establecerse en un nivel numérico significativamente mayor en el hospedador, que las bacterias procedentes de otras fuentes (Morelli, 2000). Sin embargo, aunque esta premisa podría ser inicialmente válida, algunos probióticos, cuya procedencia no es humana, han mostrado una buena capacidad de viabilidad y de adhesión en simulaciones y en estudios *in vitro* (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010) pudiendo ser

utilizados de manera efectiva como probióticos. Es el caso de cepas bacterianas de la especie *Bifidobacterium animalis*, que son comercializadas actualmente en algunos productos lácteos (Sanders, 2008). Esto confirmaría la idea, cada vez más generalizada, de que lo importante en un probiótico es la especificidad de la acción, y no la fuente del microorganismo. De hecho, es muy difícil confirmar y establecer la fuente y procedencia de un microorganismo, ya que los individuos al nacer no tienen bacteria alguna en el intestino, y además, no se ha aclarado totalmente el origen de la microbiota intestinal del individuo que, como ya se ha mencionado, es específica de cada uno. Por lo tanto, es la capacidad de seguir siendo eficaz y viable en el lugar de destino y no la procedencia, lo que debería verificarse para cada cepa potencialmente probiótica (FAO/WHO, 2002).

3.3.1.2. Bioseguridad:

Una de las características imprescindibles que debe poseer una cepa bacteriana para poder ser empleada como probiótica, es que no sea patógena y que sea reconocida como GRAS. En general es aceptado que, con la excepción de algunos *Streptococcus* y *Enterococcus*, las BAL son raramente patogénicas en la especie humana y otros animales. No obstante, algunas BAL endógenas han sido implicadas aunque excepcionalmente, en casos de infecciones sistémicas incluyendo septicemia y endocarditis (Chomarat y Espinouse, 1991; Oakey *et al.*, 1995). Puede ocurrir que una cepa descrita como probiótica y segura para su consumo, en algunas circunstancias concretas, pueda causar problemas en grupos determinados de individuos, como por ejemplo en personas inmunodeprimidas (O'May y MacFarlane, 2005). Por esta razón, la seguridad debe ser verificada de forma individual, asegurándose de que cada cepa probiótica esté libre de factores de virulencia y de patogenicidad como características previas determinantes. También es importante evaluar la presencia de actividades enzimáticas perjudiciales para el hospedador, así como verificar la ausencia de resistencias a antibióticos transferibles (Salminen *et al.*, 1998; Ishibashi y Yamazaki, 2001).

3.3.2. Características funcionales de la cepa bacteriana

Para que los microorganismos probióticos tengan efecto sobre la salud del hospedador, han de ser capaces de sobrevivir durante el tránsito gastrointestinal para luego poder implantarse o, al menos, mantenerse viables durante un tiempo en el intestino. En general, los aspectos funcionales hacen referencia a las propiedades biológicas y beneficiosas de las cepas bacteriana, incluyendo aspectos de resistencia al tránsito gastrointestinal y supervivencia en el lugar de acción.

3.3.2.1. Resistencia al tránsito gastrointestinal

Las bacterias probióticas, una vez ingeridas, tienen en primer lugar que sobrevivir durante el tránsito gástrico. El bajo pH del estómago, los movimientos peristálticos y la acción antimicrobiana de la pepsina, proporcionan una efectiva barrera contra la entrada de bacterias en el tracto intestinal donde los microorganismos probióticos deben ejercer los efectos beneficiosos (Holzapfel *et al.*, 1998). La viabilidad de las bacterias en estas condiciones hostiles depende de varios factores, como el tiempo de exposición al entorno ácido y la variación del pH en función del alimento ingerido (Lankaputhra y Shah, 1995). Varios estudios han demostrado que la matriz de alimentos consumidos conjuntamente con los probióticos puede tener un efecto significativo sobre la acción protectora frente a los ácidos del estómago (Conway *et al.*, 1987; Charteris *et al.*, 1998b, Wang *et al.*, 1999; Zarate *et al.*, 2000).

Una vez superada esta primera barrera, las bacterias probióticas deberán resistir también la presencia del jugo pancreático y del efecto de las sales biliares en el intestino, ambos con capacidad antimicrobiana.

Actualmente, la capacidad de resistencia al tránsito gastrointestinal puede evaluarse tanto mediante sencillos ensayos *in vitro* como utilizando modelos más complejos en los que se simule el proceso dinámico de la digestión (Marteau *et al.*, 1997).

3.3.2.2. Adherencia al epitelio intestinal

Uno de los requisitos de un buen probiótico es la capacidad de adhesión al mucus y a las células epiteliales, factor imprescindible para que la colonización intestinal y la prolongación de los efectos beneficiosos en el hospedador pueda producirse (Savage, 1992). Los mecanismos que median en los procesos de adherencia no están del todo clarificados y parecen ser diversos. En general, se considera un fenómeno complejo en el que pueden estar implicados exopolisacáridos de superficie, fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, proteínas como las lectinas presentes en las fimbrias y los ácidos lipoteicoicos de la superficie celular (Granato *et al.*, 1999; Roos y Jonsson, 2002; Pridmore *et al.*, 2004).

Debido a la dificultad que implica investigar la capacidad de adhesión bacteriana *in vivo*, la adhesión a la superficie intestinal, frecuentemente se ha estudiado *in vitro*, usando superficies y líneas celulares intestinales de origen humano. Así, el mucus intestinal y las líneas celulares HT-29 y Caco-2 son los soportes actuales más empleados para evaluar *in vitro* la capacidad de adhesión de cepas potencialmente probióticas (Greene y Klaenhammer, 1994; Tuomola y Salminen, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999a).

Además de la adhesión, un factor importante asociado a la persistencia de las bacterias en el tracto intestinal es la formación de biofilms (Fakhry *et al.*, 2009). Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie abiótica o un tejido biótico. En cualquier caso, el primer paso para la formación de esta estructura en el intestino es la adhesión de las bacterias a las células epiteliales intestinales (Lasa *et al.*, 2005). Posteriormente, la formación de biofilms en el intestino por las bacterias probióticas les confiere una serie de ventajas en el lugar de acción. Esto es debido a que la matriz extracelular donde están embebidas les protege frente a condiciones hostiles del entorno lo que aumenta su capacidad de supervivencia (Lebeer *et al.*, 2007). Como consecuencia, el tiempo de permanencia en el intestino es mayor, afectando

positivamente al hospedador al prolongar los efectos beneficiosos que confieren las bacterias probióticas.

En este punto es importante señalar, que aunque la capacidad de adhesión es un factor importante que se tiene en cuenta en la selección de cepas probióticas, no tiene porque ser imprescindible o esencial para que el probiótico ejerza sus efectos beneficiosos en el hospedador. En este sentido, los microorganismos alóctonos, aquellos que se encuentran en tránsito, en el lumen intestinal, pueden ejercer también sus efectos positivos sobre la salud del consumidor desde la luz intestinal. En este caso, tiene una importancia fundamental unos tiempos largos de tránsito intestinal sin que la adhesión y la colonización sean un requisito imprescindible para promover efectos beneficiosos (Tannock, 2002).

3.3.2.3. Actividad antimicrobiana

Los probióticos pueden ejercer una actividad antimicrobiana específica sobre un microorganismo o un grupo de microorganismos. Las BAL producen, en general, una amplia variedad de sustancias antimicrobianas entre las que se incluyen los ácidos orgánicos, el ácido láctico, y los productos de reacción secundarios tales como el hipotiocianito, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (péptidos sintetizados ribosómicamente con capacidad bactericida), siendo estas últimas los compuestos más estudiados (Yildirim *et al.*, 1999). No sólo la producción de este tipo de sustancias es la responsable de la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos, sino que ésta, también puede deberse a otros factores diferentes. En este sentido, los microorganismos probióticos pueden bloquear los nichos de adhesión a patógenos en la superficie de las células epiteliales mediante un mecanismo de inhibición competitiva de los mismos (Goldin *et al.*, 1992; Fujiwara *et al.*, 1997). De la misma forma, las bacterias probióticas pueden consumir más eficientemente los nutrientes limitantes presentes en el intestino, evitando que sean utilizados por microorganismos potencialmente patógenos (Pérez-Conesa, 2003).

3.3.2.4. Modulación del sistema inmune

Varios autores han señalado la influencia de los probióticos sobre la respuesta inmune. Para ello, es esencial que estos microorganismos sobrevivan después de atravesar el TGI, y poder así expresar sus propiedades inmunomoduladoras (Marteau *et al.*, 1997). En este sentido, se ha observado que ciertas cepas probióticas, además de provocar un incremento en la producción de citoquinas tanto *in vivo* como *in vitro*, inducen un aumento en la capacidad fagocítica de las células inmunitarias, (Arunachalam *et al.*, 2000). Asimismo, en el ámbito de la inmunidad humoral, se ha descrito que algunas bacterias probióticas provocan un incremento en su actividad; parece que la presencia de microorganismos probióticos favorece la producción de anticuerpos, especialmente las IgA secretoras en el lumen intestinal que pueden inhibir la adherencia de las bacterias patógenas a la superficie de la mucosa (Cagigas-Reid, 2002).

Sin embargo, respecto a la inmunidad celular las consideraciones finales difieren enormemente, y están aún lejos de ser concluyentes: mientras que algunos autores aseguran que su capacidad disminuye en presencia de agentes probióticos, otros afirman que aumenta, y algunos incluso aseveran que no existe ninguna variación significativa en este área (Gill *et al* 2000).

3.3.2.5. Efectos beneficiosos para la salud del consumidor

Los microorganismos probióticos, para que sean considerados como tales, deben conferir algún efecto beneficioso en la salud del consumidor (Reid *et al.*, 2003). Aunque muchos de los mecanismos, por los cuales el uso de este tipo de agentes biológicos resulta positivo para la salud del consumidor, son desconocidos, estos efectos se han asociado con la producción de diferentes sustancias tales como vitaminas, ácidos grasos de cadena corta, péptidos bioactivos, sustancias antimicrobianas etc. (O'Connor *et al.*, 2005).

Por ello, en los últimos años, se han estudiado los efectos de los microorganismos probióticos sobre numerosas enfermedades humanas, observando, en determinados casos, que la presencia de los mismos provoca una disminución de los síntomas del proceso patológico en el hospedador. Sin embargo, en muchos casos, estos efectos hasta ahora solamente han sido reflejados de manera divulgativa por lo que deben de ser corroborados por estudios clínicos independientes y publicados en revistas de carácter científico contrastado para su aceptación real (Ouwehand *et al.*, 2002).

En este sentido, la mayor evidencia de los efectos beneficiosos de los probióticos contrastado hasta la fecha, sea probablemente, el tratamiento y prevención con *Lactobacillus rhamnosus* GG de la diarrea infantil, causada en la mayor parte de los casos por rotavirus, (Isolauri *et al.*, 1991; Majamaa *et al.*, 1995; Guarino *et al.*, 1997; Guandalini *et al.*, 2000; Szajewska *et al.*, 2001). Otro de los efectos beneficiosos más estudiados hasta la fecha, es la relación del uso de microorganismos probióticos con una mayor tolerancia a la lactosa en personas intolerantes o con mala absorción de la misma. En este caso, se ha demostrado que el efecto es consecuencia de la digestión de la lactosa por la actividad lactásica presente en estos microorganismos (Marteau *et al.*, 1990; de Vrese *et al.*, 2001). También existen fuertes evidencias en la mejora de individuos con diarrea asociada a antibióticos cuando ingieren probióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Sacharomices boulardi*, *Enterococcus faecium* SF68 y *Lactobacillus casei* DN- 114 001 (O'Grady y Gibson, 2005; WGO, 1998). El tratamiento con bacterias probióticas también parece ser efectivo en pacientes con pouchitis, una enfermedad caracterizada por la inflamación no específica del reservorio íleo anal, después de la anastomosis que se practica en situaciones de colitis ulcerosa. En este caso, la administración de una mezcla de probióticos multicepa (VSL#3) es significativamente eficaz en el tratamiento o prevención de esta enfermedad (O'May y MacFarlane, 2005; Gionchetti *et al.*, 2000; Puertollano *et al.*, 2008).

Aunque la mayor parte de los estudios sobre el efecto de probióticos en enfermedades estén focalizados en desórdenes gastrointestinales, la

administración de estos microorganismos, también es importante en el tratamiento de otras alteraciones en diferentes partes del cuerpo. Son los casos de dermatitis atópica e infecciones urogenitales tratados con *Lactobacillus rhamnosus* GG, donde se ha observado un alivio de los síntomas en pacientes con estas enfermedades (Isolauri *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001).

Pero aunque estos son ejemplos claros y demostrados de causa-efecto en el tratamiento de enfermedades con probióticos, se dispone aún de poca información científica. Los futuros estudios deberían estar centrados en examinar también efectos microbiológicos e inmunológicos con más detalle, e investigar la actividad de los microorganismos probióticos en el sitio de interés. El estudio de los probióticos en el tratamiento de enfermedades es todavía un campo emergente que aun no ha alcanzado su máximo potencial (O'Grady y Gibson, 2005).

3.3.3. Aspectos tecnológicos de la cepa

Dependiendo del producto que se quiera comercializar, los criterios tecnológicos a tener en cuenta en microorganismos probióticos pueden ser muy diferentes. En la industria alimentaria, es importante que el empleo de este tipo de bacterias mantenga buenas características organolépticas del producto final, tanto en la textura y sabor, como en el olor y aroma tras la fermentación o cualquier otro paso dentro del proceso de elaboración del mismo. Asimismo, el probiótico debe poseer una alta viabilidad y estabilidad en el producto durante su almacenamiento antes de su consumo. Aunque algunos estudios han mostrado que los probióticos no viables pueden tener efectos beneficiosos en el consumidor (Ouwehand y Salminen, 1998), una buena viabilidad se considera un prerequisite esencial para una óptima funcionalidad de los mismos. Varios factores como las características de la cepa, el tipo de alimento, la temperatura y el pH pueden afectar a la viabilidad del probiótico (Ouwehand y Salminen, 1998). La resistencia de las cepas a la congelación y a la liofilización son

también características importantes que han de ser consideradas para el desarrollo de los cultivos industriales (Delgado, 2005).

En el caso de los productos lácteos, también es importante tener en cuenta la interacción entre las cepas probióticas y otros microorganismos como los cultivos iniciadores empleados tradicionalmente para la fermentación de la leche, ya que puede tener influencia en el número de viables de los microorganismos probióticos al final de la vida media del producto. Un ejemplo claro sobre este hecho es la producción de yogur utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* como especies *starter* para que lleven a cabo el proceso de fermentación. Se ha observado que algunas cepas de estos cultivos iniciadores pueden afectar a determinadas cepas probióticas durante la fermentación y almacenaje del producto (Minelli *et al.*, 2004; Saito, 2004; Leroy y de Vuyst, 2004).

Por otro lado, el material de envasado y las condiciones de almacenamiento de los productos finales, son factores a tener en cuenta para mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos. La mayoría de las cepas bacterianas empleadas como probióticos son anaerobias o microaerófilas, por lo que la toxicidad del oxígeno sobre ellas es una consideración fundamental. En este sentido, el almacenamiento en envases de cristal o el incremento del grosor en los materiales de almacenamiento, es importante porque reduce la permeabilidad del oxígeno (Dave y Shah, 1997).

No obstante, la viabilidad de las cepas probióticas puede ser potenciada mediante técnicas de encapsulación, usando almidón o aceites vegetales como material protector. En este proceso, las células son conservadas dentro de una membrana con el fin de reducir el daño y la pérdida de viabilidad celular (Shah, 2000; Sultana *et al.*, 2000; Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

3.4. Los alimentos probióticos

Los alimentos probióticos se definen como aquellos que contienen bacterias probióticas vivas, en una matriz adecuada y en una concentración suficiente, de modo que, después de su ingesta tengan efectos beneficiosos en el consumidor más allá de su efecto nutricional (de Vrese y Schrezenmeir, 2001).

En la actualidad, aunque existe una gran diversidad de productos probióticos en el mercado, los de mayor aceptación son los que proceden de la leche y sus derivados.

Las últimas estadísticas revelan que éstos abarcan aproximadamente el 56% del mercado de los alimentos funcionales (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008a). Los productos lácteos son vehículos óptimos para aportar un elevado número de bacterias viables, además de tener un alto contenido en nutrientes. Además, y como consecuencia de la presencia y de la actividad de las bacterias probióticas en la leche, se puede producir la liberación de una gran variedad de péptidos bioactivos beneficiosos para la salud del consumidor, resultantes de la hidrólisis de las proteínas lácteas (Leclerc *et al.*, 2002).

Actualmente, se comercializa un amplio rango de productos lácteos probióticos, siendo las leches fermentadas, especialmente el yogurt, el principal vehículo de bacterias probióticas (García- Garibay, 2003). El éxito obtenido con la comercialización de productos lácteos fermentados, suplementados con microorganismos probióticos, ha provocado el desarrollo de nuevos productos probióticos que utilizan la leche o sus derivados como alimento base. De este modo, podemos encontrar en el mercado leche pasteurizada, helados, mantequillas e incluso fórmulas lácteas infantiles con diferentes especies de microorganismos probióticos (Tabla 3) (Tamime *et al.*, 1995). El queso es otro derivado lácteo que puede contener microorganismos probióticos e incluso ofrecer una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas como vehículo de los mismos. Un pH más elevado, una mayor consistencia, un mayor contenido en grasa y una mayor capacidad tamponante son factores que contribuyen a la protección de los microorganismos probióticos durante el

tránsito gastrointestinal, y facilitan, por lo tanto, la llegada al intestino de un mayor número de células viables cuando se encuentran formando parte de este alimento (Stanton *et al.*, 1998; Donnelly, 2003).

Hoy día, el éxito en el consumo de alimentos funcionales derivados de la leche es un hecho asumido que no necesita demostración alguna, puesto que, es palpable y observable en la vida cotidiana. Sin embargo, una parte importante de la población no puede o debe consumirlos por ser intolerantes a la lactosa, por su contenido en colesterol u otros motivos. Como consecuencia, en estos últimos años, ha crecido la necesidad de buscar nuevos alimentos o alternativas diferentes a la amplia gama de productos lácteos que ya se encuentran en el mercado, que sirvan de vehículo para los microorganismos probióticos. Así, ha incrementado la oferta y variedad de productos probióticos en el mercado, donde ahora también podemos encontrar desde cereales, productos derivados de la soja o zumos que contienen microorganismos probióticos, hasta suplementos donde los microorganismos se presentan en forma de comprimidos, cápsulas y preparaciones liofilizadas (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010).

Tabla 3: Especies de microorganismos probióticos más utilizados en los diferentes tipos de productos lácteos en el mercado Europeo. Adaptada de Tamime *et al.*, 2005.

Tipo de producto	Microorganismos probióticos
Productos lácteos fermentados no líquidos (ej. yogurt)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i>
Productos lácteos fermentados líquidos (ej. batidos)	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fortis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>
Productos lácteos no fermentados (ej. leche, helados)	<i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i>

3.4.1. Aspectos legales en la comercialización de alimentos probióticos

De acuerdo con la nueva regulación sobre alimentos funcionales (CE, n°. 1924/2006)), así como con las recomendaciones de la FAO/WHO sobre el caso específico de los probióticos, en la etiqueta de estos productos debe constar la cantidad aproximada y la pauta de consumo para conseguir el efecto beneficioso declarado. Sin embargo, los estudios relativos a las dosis efectivas de los probióticos son todavía muy limitados. Aunque la dosis necesaria puede variar enormemente según la cepa y el producto que sirve como vehículo, según algunos autores (Lee y Salminen, 1995; Saarela *et al.*, 2000), se considera necesario que entre 10^7 y 10^{10} organismos viables alcancen el intestino diariamente para que ejerzan su efecto. Por ejemplo, la eficacia de *Bifidobacterium infantis* 35264 ha sido documentada en 10^8 organismos viables/día, mientras que la dosis recomendada para VSL#3, producto farmacéutico que contiene una mezcla de ocho especies de bacterias probióticas diferentes, es de $1.8 \cdot 10^{12}$. Asimismo, la comisión de expertos de la FAO/WHO ha recomendado incorporar en el etiquetado de los alimentos que contienen probióticos los siguientes aspectos (FAO/WHO, 2002):

- Número mínimo de viables de cada cepa probiótica al final de la vida útil del producto.
- Forma y pautas de consumo recomendadas para que la dosis del probiótico sea efectiva en relación con la mejora de salud declarada.
- Efectos beneficiosos que puede proporcionar a la salud.
- Condiciones adecuadas de almacenamiento.

Además, la nueva regulación sobre alimentos funcionales (CE, n°. 1924/2006) incluye mencionar la importancia de mantener una dieta equilibrada y un estilo de vida saludable, así como los posibles riesgos derivados de su consumo en exceso o de su consumo por grupos de población específicos. Asimismo, sólo se permite hacer alegaciones sobre las propiedades saludables demostradas científicamente. Éstas deben estar incluidas en la lista comunitaria

de alegaciones generalmente admitidas en función de las evidencias científicas sobre dicha función biológica, o evaluarse y aprobarse por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Comisión Europea.

4. Los prebióticos

El intestino humano contiene una gran variedad de especies bacterianas, de las cuales algunas son beneficiosas para la salud (*Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*) y otras perjudiciales (*Clostridium*, *Shigella*, *Veillonella*). En este contexto, se ha trabajado para modular la composición de la microbiota intestinal mediante el desarrollo de alimentos funcionales que contengan compuestos prebióticos que favorezcan principalmente el crecimiento de las especies beneficiosas.

Un prebiótico se define como un ingrediente alimenticio que afecta beneficiosamente al consumidor mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995).

Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe cumplir, según Gibson, (1999) los siguientes requisitos:

- No ser hidrolizado ni absorbido en la parte anterior del TGI.
- Ser un substrato selectivo para una o un número limitado de bacterias comensales beneficiosas del colon, estimulando su crecimiento y/o metabolismo.
- Ser capaz de modificar la composición de la microbiota del colon, favoreciendo el desarrollo de especies bacterianas beneficiosas.
- Inducir efectos en el lumen que sean beneficiosos para la salud del hospedador.

4.1. Tipos de prebióticos

Aunque algunos péptidos y proteínas y ciertos lípidos pueden ser utilizados como prebióticos, son principalmente los oligosacáridos no digeribles (OND), los compuestos empleados para tal uso. El concepto de no digerible, se debe a la presencia de enlaces osídicos tipo β que le confieren la propiedad a estos compuestos de ser resistentes a las enzimas del tracto digestivo que son específicas exclusivamente para los enlaces α . Como consecuencia los OND a nivel nutritivo se comportan como fibras alimentarias solubles, que llegan íntegros al intestino grueso, donde son hidrolizados a pequeños oligómeros o monómeros que son metabolizados por la microbiota del colon, especialmente, por bifidobacterias y/o lactobacilos (Tsuji *et al.*, 1986; Tokunaga *et al.*, 1989; Molis *et al.*, 1996). Como resultado de esta fermentación, las bacterias producen gases (dióxido de carbono, metano, hidrógeno) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (butirato, acetato, propionato, lactato, etc.).

Los OND pueden ser obtenidos de diversas fuentes o procesos industriales (Swennen *et al.*, 2006):

- Fuentes naturales (ej. fructanos (inulina), oligosacáridos de soja...).
- Hidrólisis química o enzimática de polisacáridos (ej. xilooligosacáridos e isomalto-oligosacáridos).
- Síntesis química o enzimática, ésta última por transglucosilación y/o hidrólisis inversa usando hidrolasas y/o glicosiltransferasas a partir de sustratos como disacáridos (ej. la lactulosa y el lactinol que son derivados sintéticos de la lactosa).

En la Tabla 4, se presentan posibles agentes prebióticos OND, que cumplen dos criterios: 1) escapan de la digestión por las hidrolasas provenientes de las secreciones pancreáticas e intestinales, y 2) son fermentados (selectivamente o no) por las bacterias sacarolíticas de la microbiota colónica.

Aunque existen diversos compuestos con potencial prebiótico (Tabla 4), los más estudiados hasta el momento y que por lo tanto pueden proporcionar las mejores evidencias de sus efectos en humanos, son los galacto-oligosacáridos (GOS) y los fructo-oligosacáridos (FOS).

Tabla 4: Compuestos con potencial prebiótico que son añadidos o están presentes en la dieta. Adaptada de Marti del Moral *et al.*, 2003.

Clase de Compuesto	Ejemplos	Efecto ^a	Efecto sobre la microbiota colónica ^b	Efecto sobre AGCC/pH
Fructo-oligosacáridos (FOS)	Inulina, oligofructosa, fructano sintéticos	+++	+ bifidobacterias, lactobacilos - bacteroides, clostridios	Sí
Galacto- oligosacáridos (GOS)	Trans GOS, natural GOS de leche humana	++ (+)	+ bifidobacterias, lactobacilos	Sí
Oligosacáridos de glucosa	Dextranos y oligodextranos	++	+ bifidobacterias, lactobacilos	Sí
	Polidextrosa	++ (+)	+ bifidobacterias, lactobacilos - bacteroides	Sí
	Isomalto-oligosacáridos	++ (+)	+ bifidobacterias	Sí
Xilo- oligosacáridos		++	+ bifidobacterias	Sí
Oligosacáridos de soja	Rafinosa, estaquiosa	++ (+)		
Otros oligosacáridos	Arabinoxilanos	+	?	Sí
	Almidón resistente (Tipo 2 y 3: de judías, patata, plátanos y otros)	+	+ bifidobacterias (cerdos)	Sí
Otros	B-glucanos (de grano de avena)	+	?	Sí
	Polímeros de galactomanosa (de gomade guar)	++ (+)	+ bifidobacterias, lactobacilos	Sí
	Lactulosa (derivado de la lactosa)	N.E. ^c	N.E.	N.E.

^aCriterio para clasificar los nutrientes como prebióticos: (1) escapan a la digestión de hidrolasas, (2) son fermentados por bacterias colónicas, (2a) estimulan selectivamente la proliferación bacteriana, (2b) producen ácidos grasos de cadena corta y disminuyen el pH del ciego del colon. + Cumple criterio 1 y 2a o 2b, demostrado *in vitro*, ++ cumple 1,2a y 2b en estudios *in vivo*, +++ cumple todos los criterios ampliamente demostrado *in vitro* e *in vivo*.

^b (+) La presencia del prebiótico en el colon promueve el crecimiento del microorganismo. (-) El prebiótico previene el crecimiento del microorganismo en el colon.

^cN.E: No especificado.

4.1.1. Los galacto-oligosacáridos (GOS)

Los galacto-oligosacáridos (GOS) son OND derivados de la lactosa que se encuentran de forma natural en la leche materna humana, a una concentración de 1 g/L, y en la leche de vaca, en cantidades traza (Yamashita y Kobata, 1974; Reddy y Bush, 1991; Thurl *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1994). El papel protector que se les ha atribuido a estos compuestos contra infecciones en el TGI, principalmente durante el primer año de vida del individuo, ha despertado un enorme interés industrial y comercial por lo que varias empresas y laboratorios están actualmente implicados en su producción.

Para la producción a escala industrial de los GOS, se lleva a cabo una reacción enzimática empleando una solución de lactosa altamente concentrada como sustrato. Estos compuestos, son producidos por β -galactosidasas, glicosidasas que en condiciones apropiadas de reacción (pH, temperatura y altas concentraciones de sustrato) tienen actividades de transgalactosilación. Como resultado de dichas actividades, se origina la formación de trisacáridos 4' o 6'-galactosil-lactosa, además de oligosacáridos más largos (4 o más unidades) y algunos disacáridos transgalactosilados (Albayrak y Yang, 2002).

Diferentes estudios han demostrado que los GOS no poseen toxicidad o capacidad mutagénica por lo que han sido reconocidos e incluidos dentro de los ingredientes alimentarios GRAS (Generally Recognized as Safe). Así, este tipo de prebióticos son empleados en una gran variedad de alimentos tales como, fórmulas infantiles y bebidas para deportistas. Además y como consecuencia de su estabilidad a pH ácidos y a las temperaturas de procesamiento de pasteurización y de horneado (Crittenden y Playne, 1996), son utilizados también en productos lácteos, bebidas fermentadas, panadería y repostería.

4.1.2. Los fructo-oligosacáridos (FOS)

El término genérico de FOS hace referencia a todos los oligosacáridos de difícil absorción compuestos principalmente por fructosa. La inulina (Figura 3) y la oligofructosa son las formas más comunes de FOS, aunque la inulina puede

tener un grado de polimerización mayor que el de un oligosacárido, ya que puede estar comprendido entre 3 y 60 residuos (Gibson *et al.*, 1994).

Este tipo de prebióticos se encuentran en una gran variedad de alimentos que pueden formar parte de nuestra dieta habitual tales como, los espárragos, los plátanos, el ajo, la cebolla, la avena y la achicoria (van Loo *et al.*, 1995). Al igual que los GOS, los FOS también son producidos a escala industrial. En el caso de la producción de inulina (Figura 3) se procede simplemente a la extracción natural de este compuesto a partir de las raíces de achicoria, teniendo lugar posteriormente un proceso de refinamiento y secado; mientras que para la elaboración de otros tipos de FOS se pueden seguir dos métodos diferentes (Angus *et al.*, 2005):

- Producción de FOS a partir de la hidrólisis de la inulina, previamente extraída por acción de enzimas fúngicas.
- Síntesis a partir de sacarosa usando, en este caso, la enzima transfructosilasa.

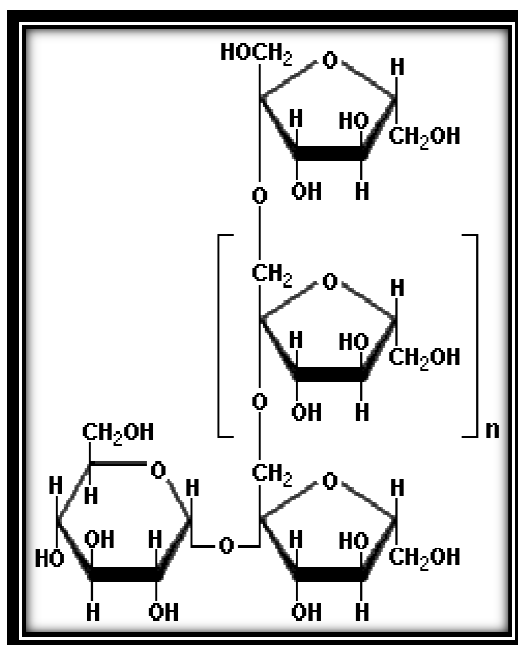


Figura 3: Estructura química de la inulina. n= aprox.35

Actualmente los FOS son considerados ingredientes con un importante valor comercial y que añadidos a algunos preparados lácteos, bebidas, alimentos infantiles, productos de repostería y complementos dietéticos, aumentan el valor añadido de los mismos.

Además de su papel como prebiótico, los FOS también pueden ser utilizados en alimentación para mejorar el sabor y la textura de los productos finales (Franck y Coussement, 1997).

4.2. Efectos beneficiosos de los prebióticos

La fermentación bacteriana de los compuestos prebióticos en el colon tiene múltiples efectos positivos para la salud del consumidor. Favorecen el crecimiento selectivo de un número limitado de bacterias beneficiosas en detrimento del crecimiento de patógenos, y juegan un papel importante en las funciones inmunes gastrointestinales, en la disponibilidad de minerales, en el metabolismo de lípidos y en la carcinogénesis colónica (Sarmiento-Rubiano, 2008).

4.2.1. Estimulación del sistema inmune y efecto bifidogénico

Se ha demostrado experimentalmente que los compuestos prebióticos son capaces de generar un efecto positivo en el sistema inmune gastrointestinal. Este efecto se ha atribuido a su capacidad para modificar la microbiota intestinal, con la consecuente interacción de antígenos bacterianos con el abundante tejido linfoide presente en el intestino. De este modo, se produce un aumento en la producción de inmunoglobulina A secretora, la cual interviene en la primera línea de defensa del sistema inmune. Asimismo, la ingesta de determinados prebióticos tiene un efecto estimulante, dosis dependiente, en el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino, provocando una mejora en la salud intestinal (Kolida y Gibson, 2007; Guarner, 2007; Arslanoglu *et al.*, 2007).

4.2.2. Aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y prevención del cáncer de colon

Los AGCC, como el ácido acético, propiónico y butírico, son generados como resultado de la fermentación de los prebióticos por las bacterias del colon. Se piensa que los AGCC, especialmente el butirato, son una importante fuente energética para las células del epitelio intestinal estimulando su crecimiento y diferenciación, la absorción de sales y agua y la motilidad intestinal (Cummings, 1981). A su vez, la proliferación y diferenciación de los colonocitos se ha asociado con una disminución significativa del riesgo de cáncer de colon (Brady *et al.*, 2000; Hughes y Rowland, 2001; Le Leu *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha sugerido que varias enzimas bacterianas, tales como la β -glucuronidasa, β -glucosidasa y nitroreductasa, pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis de colon, ya que favorecen la conversión de pre-carcinogénicos en carcinogénicos (Rowland, 1988). En este sentido, los GOS parecen estar relacionados con una disminución en el potencial carcinogénico ya que, ratas alimentadas con estos prebióticos muestran un descenso de la actividad glucuronidásica y nitroreductásica, así como una disminución significativa en el número de enterobacterias presentes en el intestino (Rowland y Tanaka, 1993).

4.2.3. Disminución del colesterol sérico y aumento en la absorción de calcio

La administración de prebióticos, sobre todo los de tipo fructanos, favorece la desconjugación de sales biliares, reduciendo la absorción de colesterol y la lipogénesis hepática. Como consecuencia, descienden los niveles de colesterol total, lipoproteínas LDL y VLDL; triglicéridos y ApoB (Sarmiento-Rubiano, 2008). En cuanto a la absorción de minerales, se ha observado en diversos experimentos que en ratas alimentadas con determinados prebióticos muestran un incremento en la absorción de calcio, así como en su posterior fijación en los huesos (Ohta *et al.*, 1995; Delzenne *et al.*, 1995).

5. Los simbióticos

Los simbióticos se definen como la mezcla en un único producto de probióticos y prebióticos que afectan beneficiosamente al hospedador, mediante la implantación de microorganismos vivos en el TGI añadidos en la dieta y la mejora de su supervivencia. Tal y como mencionan Gibson y Roberfroid (1995), dicha implantación promueve la estimulación selectiva del crecimiento y/o activación del metabolismo de uno o un número limitado de bacterias promotoras de la salud mejorando así el bienestar del hospedador.

Se ha podido comprobar que esta combinación puede ofrecer ventajas al mejorar la supervivencia de las bacterias probióticas durante el tránsito por el tracto digestivo superior. Además, como consecuencia de que el sustrato específico está disponible desde el mismo momento de la ingestión, la implantación en el colon es más eficiente y el efecto estimulante ejercido sobre el crecimiento de los probióticos y la microbiota bacteriana intestinal, en general, pueden contribuir a mantener más eficazmente la homeostasis intestinal y la salud del organismo (Peña, 2007; Tojo-Sierra y Leis-Trabazo, 2003).

Sin embargo, esta sinergia entre probiótico y prebiótico está poco estudiada y es necesario un mejor conocimiento de la misma para ayudar a esclarecer los mecanismos moleculares que tienen lugar en este proceso. De este modo, se podrá establecer la combinación y dosis adecuada de probiótico y prebiótico en cada caso; incrementando enormemente la eficacia del producto (Saarela *et al.*, 2002). En este sentido, algunos posibles simbióticos estudiados hasta el momento son la combinación de bifidobacterias con FOS y GOS y lactobacilos con lactitol (polialcohol sintético) (Collins y Gibson, 1999).

A pesar de que los productos probióticos han tenido una gran aceptación en el mercado por sus efectos saludables, continúa el desarrollo de numerosos trabajos experimentales que pretenden identificar y seleccionar nuevas cepas bacterianas más eficaces. Pero para ello, es necesario en primer lugar, incrementar el conocimiento y comprender en profundidad la ecología

microbiana del tracto gastrointestinal. Asimismo, el estudio del genoma de las bacterias probióticas abrirá nuevas expectativas en el conocimiento de su perfil biológico, en los mecanismos de acción, en las dianas terapéuticas y en la simbiosis que se establece entre la bacteria y el humano. También es necesario continuar trabajando para resolver los problemas relacionados con la seguridad de algunos microorganismos probióticos, así como con la viabilidad de las cepas probióticas en el producto final donde se incluyan.

Como consecuencia de estas investigaciones, el estudio y el uso de probióticos, está abriendo nuevos campos para su aplicación. Como ejemplos, resaltar su utilización como coadyuvantes en vacunas con escasa respuesta celular y en el tratamiento o prevención de enfermedades que tienen relación con la inmunidad como la artritis reumatoide. El conjunto de todos estos estudios nos permitirá acercarnos un poco más a la utopía con la que comenzaba su Historia: “Haz que tus alimentos sean tus medicinas”.

OBJETIVOS

En estos últimos años, se ha despertado el interés del consumidor por utilizar los alimentos como herramientas de salud (alimentación saludable). De este modo, se ha producido un incremento en la demanda de alimentos funcionales, siendo los productos probióticos los que tienen mayor peso dentro del mercado europeo. Este tipo de alimentos nutricionales son, actualmente, producidos en su mayoría por las industrias lácteas a partir, principalmente, de la leche de vaca. A pesar del valor nutricional inherente de la leche de oveja, no se ha generado aún un gran interés para la elaboración de productos probióticos a partir de la leche de esta fuente o de la mezcla de leche de vaca y oveja.

En la Comunidad de Castilla y León la producción ganadera ovina, posee una dilatada tradición histórica. Esta Comunidad aporta el 63% de la producción nacional de leche de oveja, la cual se dedica mayoritariamente a la fabricación de queso ($\approx 95\%$). En este sentido, los quesos de oveja y cabra se encuentran en una permanente expansión derivada, en gran parte, al auge que las denominaciones de origen han provocado sobre los hábitos de consumo.

Ante esta situación, nos hemos propuesto abarcar el estudio de la capacidad probiótica de 8 cepas bacterianas, seleccionadas por su actividad antimicrobiana a partir de productos lácteos elaborados con leche de oveja o de vaca o de una mezcla de las mismas con el objeto de conseguir un mejor crecimiento de la cepa probiótica en la matriz alimentaria y potenciar el valor añadido de los productos elaborados con estos tipos de leche.

Al utilizar especies bacterianas que también pueden formar parte de la microbiota intestinal habitual del individuo, se espera conseguir una mejor capacidad de colonización del tracto gastrointestinal. Este estudio se ha completado con otras cepas bacterianas obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) seleccionadas por su procedencia (heces humanas o productos lácteos), por su potencial probiótico y/o por su actividad antimicrobiana.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Identificar genéticamente, a nivel de especie, las cepas bacterianas ácido-lácticas previamente seleccionadas a partir de productos lácteos.
2. Evaluar la capacidad antimicrobiana de las cepas bacterianas ácido-lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos patógenos oportunistas y estudiar la viabilidad de las doce cepas bacterianas ácido-lácticas bajo condiciones enzimáticas y de pH que simulen el entorno gastrointestinal.
3. Estudiar y establecer las características metabólicas de las cepas seleccionadas para seleccionar específicamente aquellas que aseguren su inocuidad en la salud del consumidor.
4. Evaluar la capacidad de adhesión de las cepas seleccionadas a células epiteliales intestinales de origen humano y a mucus, así como la capacidad de formar biofilms que favorezca la permanencia de las cepas ácido-lácticas estudiadas en el intestino del individuo.
5. Establecer la capacidad de las cepas ácido-lácticas seleccionadas para estimular la secreción de determinadas citoquinas en células intestinales.
6. Establecer la cinética de crecimiento de cada una de las cepas ácido-lácticas investigadas y estudiar el efecto que sobre la misma ejerce la presencia de diferentes oligosacáridos no digeribles con potencial prebiótico. con el fin de seleccionar los más adecuados para cada cepa. Asimismo, se pretende determinar la producción de ácidos grasos de cadena corta en presencia de dichos compuestos.
7. Estudiar las diferentes propiedades tecnológicas de cada una de las bacterias seleccionadas con el fin de evaluar la posibilidad de su utilización como cepas de interés probiótico en productos lácteos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material Biológico

Para la realización de este trabajo se han estudiado doce cepas de bacterias ácido-lácticas cuyo origen y características se recogen en la Tabla 5. Ocho fueron obtenidas de la colección de cultivos bacterianos del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León y fueron seleccionadas en base a su actividad antimicrobiana. Las cuatro cepas bacterianas restantes fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATTC) y fueron seleccionadas en base a su origen (aisladas de heces humanas o productos lácteos), a su potencial como probiótico y/o a sus propiedades antimicrobianas.

A lo largo del trabajo también se emplearon en diferentes experimentos otros microorganismos como controles bacterianos o microorganismos indicadores en la determinación de la actividad antimicrobiana, que se recogen en la Tabla 6.

Además de las cepas bacterianas, en este trabajo se ha empleado en determinados experimentos células eucariotas Caco-2 (línea celular procedente de carcinoma de colon humano). Estas células fueron suministradas por la ATCC (Referencia HTB-37) y se seleccionaron por su capacidad de expresar elementos de diferenciación característicos de las células intestinales maduras.

Tabla 5: Origen y características de las cepas bacterianas estudiadas en este trabajo.

Cepas	Código	Origen	Otras características
Gram-positivas, catalasa-negativas, Oxidasa-negativas, aisladas de MRSA ¹ en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León.	34 ²	Queso de leche cruda de vaca	Actividad antibacteriana contra determinados agentes patógenos ⁵
	189	Mezcla de queso de leche cruda	
	297	Mezcla de queso de leche pasteurizada	
	660	Queso de leche cruda de oveja	
	875	Queso de leche cruda de oveja	
	888	Leche de oveja	
	1076	Leche de oveja	
	1354	Leche de oveja	
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC ³ 393	Productos lácteos (queso)	Biosíntesis de α -acetolactato
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	N.E. ⁴	Empleada en la fabricación de queso suizo para prevenir la formación de gas por <i>Clostridia</i> Produce nisina
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 27092	Heces humanas	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus</i> GG)	ATCC 53103	Heces humanas	Inhibe desórdenes en el colon y produce agentes antibacterianos

¹ MRSA: Medio de Man, Rogosa and Sharpe agar.

² Códigos asignados en la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León.

³ ATCC. American Type Culture Collection.

⁴ N.E. No especificado.

⁵ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria* spp. y/o *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 6: Cepas bacterianas comerciales y aisladas de alimentos por distintos grupos investigadores, empleadas a lo largo de este trabajo como microorganismos indicadores o control.

	Colección	Cepas	Código	Origen	Características
Aislamientos ("de campo")	Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León	<i>Staphylococcus aureus</i>	181	Leche de oveja	Productora de enterotoxina A
		<i>Staphylococcus aureus</i>	361	Leche de oveja	Productora de enterotoxina C
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	83	Leche de oveja	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	13	-	-
		<i>Listeria innocua</i>	-	-	-
		<i>Listeria monocitogenes</i>	-	-	-
	<i>Aeromonas spp.</i>	-	-	-	
	Hannah Research Institute cultura Collection	<i>B. cereus</i>	PI-1	Leche	-
Comerciales	CCM ¹	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2826	Leche cruda	Producción de proteasas resistentes al calor
	CECT ²	<i>Staphylococcus aureus</i>	59	N.E. ⁴	Comprobación de la eficacia de antibióticos y desinfectantes
	CECT	<i>Staphylococcus aureus</i>	5192	Brote de intoxicación alimentaria: pollo	Productora de enterotoxina E Sensible a la meticilina (MSSA) α y β hemolítica
	ATCC ³	<i>Escherichia coli</i> K92	35860	N.E.	Serotipo: O16:k92:H-
	ATCC	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	N.E.	-

¹ CCM: Czech Collection of Microorganisms;

²CECT: Colección Española de Cultivos Tipo;

³ATCC: American Type Culture Collection

⁴N.E.: No específica

1.2. Reactivos

- Pepsina, pancreatina, mucina, rafinosa, lactulosa, inulina, arabinogalactanos, tween 20, EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), peróxido de hidrógeno, o-dianisidina, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), ácido hialurónico, albúmina sérica bovina (BSA), cristal de violeta, agarosa, azul tripano, azul de bromofenol, bromuro de etidio, catalasa, peroxidasa de rábano y medio EMEM (“Eagle’s Minimum Essential Medium”) fueron suministrados por Sigma Chemical (Missouri, USA).
- Medio de cultivo M.R.S. (Man Rogosa Sharpe), *skim milk*, sangre de caballo desfibrinada, sobres generadores de condiciones anaeróbicas, tiras de antibióticos M.I.C.E. y las sales biliares nº3 se adquirieron en Oxoid Ltd. (Londres, UK).
- Medio de cultivo TSB (“Tryptone Soja Broth”), agar bacteriológico, agar nutritivo, extracto de levadura, extracto de carne, casitona, triptona, medio de cultivo BHI (“Brain Heart Infusion”) se obtuvieron de Pronadisa SA (Madrid, España).
- El colorante negro amido fue comprado a Difco (Detroit, Michigan, USA).
- D-(+)-glucosa, sacarosa, cisteína, resazurina, ácido acético glacial, ácido tricloroacético, glicerol, CaCO₃, ClZn, MgSO₄, MnSO₄, HCl, CaCl₂, NaCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaOH, KOH, se adquirieron de Panreac SA (Barcelona, España).
- La gelatina y el peróxido de hidrógeno fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).
- La Inulina (Raftilina HP) y oligofructosa (Raftilosa P95) fueron administradas por Orafiti (Oreya, Bélgica).

- Tris-(hidroximetil)-aminometano fue comprado a VWR Prolabo (Fantenay Sous Bois, Francia).
- El dimetil sulfóxido (DMSO) fue suministrado por Aldrich (Riedel-de Haën, Alemania).
- Los frascos de cultivo de 25 y 75 cm³ y las microplacas de 24 pocillos con fondo plano se adquirieron de Iwaki (Japón).
- Las placas *microtiter* de 96 pocillos de fondo plano fueron suministradas por Biotech SL (Madrid, España).
- Los estándares de la escala Mc Farland y las galerías Api-Zym con sus reactivos correspondientes Zym A y Zym B se obtuvieron de Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francia).
- El *kit* para la cuantificación de ácido D/L- láctico fue comprado a Biopharm GmbH (Darmstadt, Alemania).
- El *kit* B Puregene Yeast/Bact. para la obtención de ADN genómico fue adquirido a Quiagen (Hilden, Alemania).
- Los cubres thermanox para la visualización de las células Caco-2 mediante microscopía fueron suministrados por Labclinics (Barcelona, España).
- La taq polimerasa y desoxinucleótidos (dNTP_s) se obtuvieron de Biotools (Madrid, España)
- Los oligonucleótidos fueron solicitados a Roche (Basilea, Suiza).
- Los *kits* ELISAS para la cuantificación de IL-6 y IL-8 fueron suministrados por Ray Biotech (Norcross, GA, USA).
- El fluorocromo SYTO 9 se obtuvo del *kit Biofilm viability* obtenido de Invitrogen.
- La leche de oveja se obtuvo en las instalaciones de la Granja de la Universidad de León
- El resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica.
- En todos los experimentos se utilizó agua previamente destilada, o bien de grado Milli-Q.

1.3. Medios de cultivo

- Medio **TSB** (Tryptic Soy Broth) suplementado con 0,6% de extracto de levadura (**TSB-YE**) para el crecimiento en medio líquido en condiciones generales.

Composición del medio:

Peptona de caseína	16,0 g	K ₂ HPO	42,5 g
Peptona de soja	3,0 g	Glucosa	2,5 g
NaCl	6,0 g	H ₂ O destilada hasta	1,0 l

Se ajustó el pH a 7 con NaOH y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Para preparar medio sólido (Medio **TSA**) se añadió un 1,5% de agar y se esterilizó igualmente. Para el crecimiento de nuestras cepas de BAL este medio sólido, fue suplementado con un 0,2% de glucosa más.

- Medio **MRS** (Man Rogosa Sharpe) para el crecimiento de las cepas de BAL en determinados ensayos.

Composición del medio:

Peptona	10,0 g	Tween 80	1,0 ml
Lab-Lemco en polvo	8,0 g	Acetato sódico	5,0 g
Extracto de levadura	4,0 g	Citrato triamónico	2,0 g
K ₂ HPO	2,0 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
Glucosa	20,0 g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,05 g
		H ₂ O destilada hasta	1,0 l

Se ajustó el pH a 6,2 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Para preparar medio sólido (Medio **MRSA**) se añadió 1,5% de agar y se esterilizó igualmente.

- Medio **BHIA** (Brain Heart Infusion Agar) para el crecimiento de las cepas de BAL en el estudio de la actividad hialuronidásica.

Composición del medio:

Infusión de cerebro de ternera	7,5 g	Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Infusión de corazón de res	10,0 g	Dextrosa	2,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g	Agar	15,0 g
NaCl	5,0 g	H ₂ O destilada hasta	1,0 l

Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos.

- Medio **Agar-sangre** (Facklam y Wilkinson, 1981). Para la detección de actividad hemolítica.

Composición del medio:

TSA	40,0 g
Sangre desfibrinada de caballo	50,0 ml
H ₂ O destilada hasta	1,0 l

Para la realización de este medio, en primer lugar se preparó el TSA y se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se atemperó en un baño a 45°C y se añadió la sangre estéril.

- Medio **B** (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995): Medio sólido utilizado para evaluar la degradación de mucina.

Composición del medio:

Triptona	7,5 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Casitona	7,5 g	Cisteina HCl	0,5 g
Extracto de levadura	3,0 g	Resazurina	0,002 g
Extracto de carne	5,0 g	Glucosa	30,0 g
NaCl	5,0 g	Mucina purificada	5,0 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	3,0 g	Agarosa	15,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	H ₂ O destilada hasta	1,0 l

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos.

- Medio **Agar-Leche**. Este medio, descrito por Smith *et al.*, (1952), se empleó para la detección de actividad proteolítica bacteriana.

Para 100 ml de medio se preparó por separado 40 ml de agar bacteriológico al 2% y 40 ml de agar nutritivo al 2,5% y se esterilizó en autoclave, durante 15 minutos.

Posteriormente se vertieron 10 ml de agar bacteriológico estéril en placas petri y se dejó solidificar. A continuación se mezclaron los 40 ml de agar nutritivo atemperado a 45°C con 20 ml de leche (*Skim milk* estéril reconstituida al 10% o leche de oveja desnatada tindalizada) y se vertieron 15 ml de la mezcla en cada placa petri sobre la capa de agar bacteriológico.

2. Métodos

2.1. Mantenimiento de las cepas

Con el fin de mantener puros los cultivos de las diferentes cepas de BAL y para que éstas conservaran su viabilidad durante periodos prolongados de almacenamiento, las cepas se crecieron en medio TSB con 0,6% de extracto de levadura (TSB-YE) a 30°C, sin agitación, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, se guardaron alícuotas de 250 µl, conteniendo un 50% de glicerol, en viales a -80°C

2.2. Inoculación y condiciones generales de crecimiento

A partir de los cultivos guardados a -80°C con glicerol, citados en el apartado anterior, se inocularon 20 µl en tubos con 4 ml de caldo TSB-YE que se mantuvieron 24 horas sin agitación a 30°C. Al cabo de este tiempo se realizó un segundo pase sembrando 5 µl de estos cultivos en un volumen de 5 ml del mismo medio, que se incubaron a 30°C durante 24 horas exceptuando las cepas *Lb. casei* y *Ln. mesenteroides* que se mantuvieron durante 36 y 72 horas respectivamente, al tener un crecimiento más lento. A lo largo de este trabajo haremos referencia a

estos últimos cultivos como cultivos en fase estacionaria, siendo las condiciones estándar que se utilizaron para la realización de los experimentos, mencionándose en cada apartado las modificaciones a este procedimiento general.

2.3. Determinación del crecimiento bacteriano

El crecimiento de los cultivos de las bacterias ácido-lácticas se determinó midiendo la absorbancia de las suspensiones bacterianas a 620 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro Beckman, modelo DU640.

2.4. Determinación del número de microorganismos viables

Para la determinación del número de microorganismos viables se tomó una alícuota del cultivo y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en agua estéril. Se dividieron placas de TSA con un 0,2% de glucosa en cuatro regiones, y se dejó caer en cada sector dos gotas de 20 μ l, utilizando cada sector para una dilución. Las placas se incubaron durante 48 horas en estufa a 30°C. Transcurrido este tiempo se procedió a contar el número de colonias y calcular las unidades formadoras de colonia (ufc/ml) teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen de la gota depositado (ICMSF, 1981).

2.5. Cálculo de los parámetros de crecimiento “ X_{max} ” y “ μ ”

En el estudio del crecimiento de las cepas de BAL en medio TSB-YE y leche de oveja y vaca, los parámetros evaluados fueron: concentración máxima de microorganismos (X_{max}) y velocidad específica de crecimiento (μ).

X_{max} corresponde al máximo número de células viables alcanzado por una cepa bacteriana durante el periodo de crecimiento. Este parámetro ha sido expresado en nuestro estudio como log ufc/ml. Para el cálculo de este parámetro se siguió el protocolo del apartado anterior determinando el log ufc/ml en los

diferentes tiempos durante el crecimiento de una cepa bacteriana, y siendo el mayor valor obtenido el correspondiente al parámetro X_{\max} .

La velocidad específica de crecimiento, denominada, μ es expresada como h^{-1} y fue obtenida a partir de la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento celular (log ufc/ml) establecida a lo largo del tiempo.

2.6. Identificación de las cepas

Para la identificación de las cepas se procedió a realizar un “ribotipado”, técnica que permite identificar y clasificar bacterias en función de los genes del RNA ribosomal. Para ello se utilizó el RiboPrinter Microbial Characterization System (DuPont-Qualicon, Wilmington, DE, USA) del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

Para la identificación en el equipo, las cepas de BAL fueron previamente crecidas en placas de TSA suplementadas con 0,2% de glucosa durante 48 horas.

Para la correcta identificación se siguieron las especificaciones técnicas del equipo establecidas por la casa comercial.

2.7. Determinación de la actividad antimicrobiana

2.7.1. Técnica de *Spot test*

Para determinar la presencia de actividad antimicrobiana mediante esta técnica se siguió el protocolo descrito por Schillinger y Lücke (1989) cuyo esquema gráfico se representa en la Figura 4.

Se obtuvieron cultivos, en TSB-YE, crecidos hasta alcanzar la fase estacionaria de las cepas de BAL cuya capacidad inhibitoria se pretendía estudiar. Asimismo, se prepararon placas de TSA suplementadas con 0,2% de glucosa que fueron divididas en dos sectores, depositándose en cada uno de ellos, una gota de 5 μ l de la cepa bacteriana a estudiar y de la cepa *E.coli* K92 (ATCC 35860), respectivamente. Esta última cepa se empleó como control negativo al no mostrar actividad antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos

indicadores estudiados. A continuación y una vez se secaron las gotas, se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, se vertió sobre las placas una cobertera compuesta por 5 ml de TSB con 0,5% de agar e inoculada al 0,1%, con el microorganismo indicador cuyo crecimiento se pretendió inhibir y que previamente había sido crecido en medio TSB durante 24 horas a 30°C. Posteriormente, se procedió a la incubación de las placas con la cobertera durante 24 horas a 30°C (Figura 4).

Finalmente, tras el tiempo de incubación, se observa el crecimiento en césped del microorganismo indicador y un halo de inhibición, de dicho microorganismo, alrededor del crecimiento de la cepa bacteriana que presente actividad antimicrobiana.

Esta actividad fue estudiada frente a las siguientes cepas bacterianas: *S. aureus* 192, *S. aureus* 9, *S. aureus* 181, *S. aureus* 361, *S. aureus* 13, *B. cereus*, *L. innocua*, *L. monocitogenes*, *P. fluorescens* 2826, *P. fluorescens* 86 y *Aeromonas* spp.

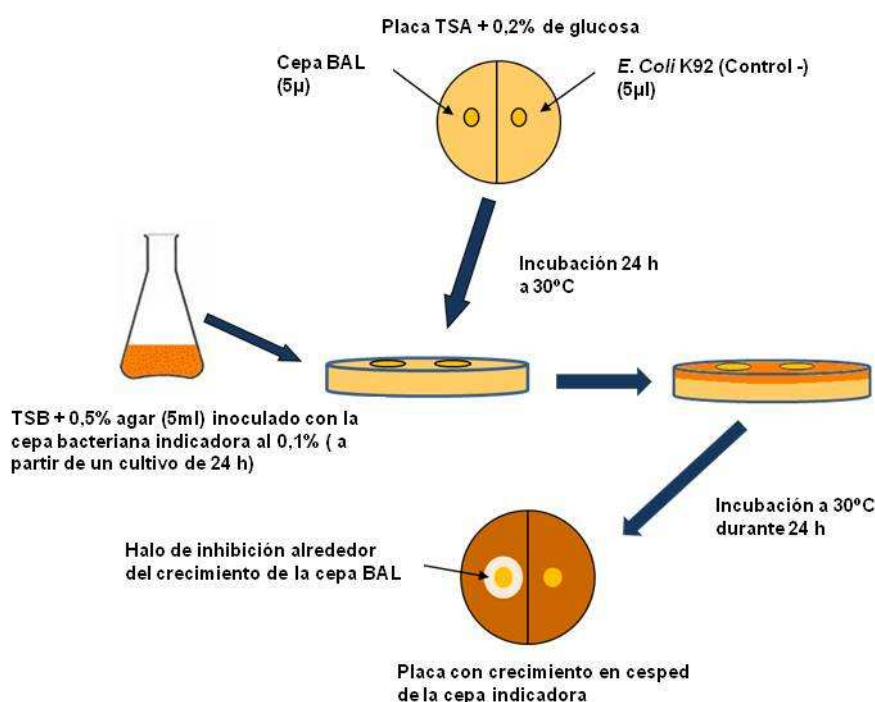


Figura 4: Esquema gráfico de la técnica “*Spot test*” (Schillinger y Lücke, 1989), utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana de una cepa bacteriana.

2.7.2. Técnica de difusión en agar

Mediante esta técnica se valoró la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC), obtenidos a partir de cultivos activos (en la fase final de la fase exponencial) en medio TSB-YE. La obtención del sobrenadante se llevó a cabo mediante la centrifugación de alícuotas de 1 ml de dichos cultivos a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C.

Mediante un sacabocados se realizaron pocillos en profundidad de 5 mm de diámetro en placas de TSA con 0,2% de glucosa inoculadas con el microorganismo indicador, crecido previamente en TSB durante 24 h, al 5% (V/V). Cada pocillo se rellenó con 50 µl del SLC a ensayar y se incubó durante 3 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo la placa se incubó a 37°C durante 24 h. La actividad antimicrobiana se puso de manifiesto por la aparición de halos de inhibición en el crecimiento en césped de la cepa bacteriana indicadora.

Asimismo, aquellos sobrenadantes en los que se detectó actividad antimicrobiana fueron tratados para descartar que la actividad antimicrobiana fuera provocada por la generación de ácidos o por producción de H₂O₂. Para ello se trataron por un lado con una solución de NaOH 2M que fue añadido gota a gota a los SLC con el fin de ajustar su pH a 7, y por otro, mediante la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, de los SLC con catalasa a una concentración final de 1 mg/ml.

2.7.3. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

2.7.3.1. Método cualitativo

Para determinar la producción de H₂O₂ de un modo cualitativo se siguió el protocolo descrito por Eschenbach *et al.*, (1989).

Las cepas de BAL se sembraron por agotamiento en placas de MRSA (véase apartado Medios de Cultivo) conteniendo por 100 ml de volumen final: 25 mg de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) y 1 mg de peroxidasa de rábano.

A continuación, se incubaron las placas durante 48 horas a 30°C con una atmósfera del 5% de CO₂. Si las cepas de BAL producen H₂O₂, las colonias se volverán de un color azulado tras el periodo de incubación, debido a la oxidación del TMB por la presencia del O₂ generado como consecuencia, de la reacción de la peroxidasa con el H₂O₂ producido.

2.7.3.2. Método cuantitativo

Para la cuantificación de H₂O₂ producido por las cepas de BAL en medio TSB-YE se siguió el método descrito por Villegas y Gilliland, (1998).

Se tomaron alícuotas de 7 ml a partir de cultivos de 10 ml en TSB-YE en fase estacionaria y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos.

A 5 ml del sobrenadante de cada cepa, se le añadió 1 ml de una solución acuosa de peroxidasa de rábano y 100 µl de una solución acuosa de o-dianisidina. La mezcla se mantuvo en un baño a 37°C durante 10 minutos y transcurrido este tiempo la reacción fue detenida con 200 µl de HCl 4N. Por último la absorbancia de cada muestra fue medida a 400 nm, determinándose la concentración de H₂O₂ por comparación con una curva patrón.

2.8. Estudios genéticos

2.8.1. Obtención de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el *Kit B Puregene Yeast/Bact* de la casa comercial Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica permite amplificar entre 10⁵ y 10⁹ veces un determinado fragmento de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986) utilizando dos oligonucleótidos (3' y 5') que hibridan en los extremos del fragmento a

amplificar y que actúan como cebadores de una actividad polimerásica termoestable (todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo aparecen en el Anexo).

A continuación se desarrolla el proceso experimental:

- En primer lugar, se prepara la siguiente mezcla de reacción en un tubo eppendorf:

Buffer (10x)	5µl
Oligonucleótido Directo (5µM)	5µl
Oligonucleótido Reverso (5µM)	5µl
dNTP's (5mM)	5µl
ADN molde	5µl
ADN polimerasa	1µl
H ₂ O milliQ estéril hasta	50µl

- A continuación, se introduce el tubo con la reacción en el “termociclador” programado con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	Amplificación			Extensión final
5 minutos 95°C	30 segundos 95°C	30 segundos “x” °C*	“x”** segundos 72°C	10 minutos 72°C
1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo

* Se determina la temperatura óptima según la temperatura de fusión de los oligonucleótidos calculada empíricamente.

** El tiempo de extensión varía en función del fragmento del tamaño esperado. Generalmente se utiliza 1 minuto/kilobase.

Para la reacción de PCR se empleó Taq polimerasa (de Biotools, España) obtenida de *Thermus aquaticus*. En todos los casos, se realizó un control negativo de cada reacción de PCR, en el que se sustituye la muestra de ADN por el mismo volumen de H₂O.

2.8.3. Visualización de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

El protocolo de electroforesis utilizado es básicamente el descrito por Maniatis *et al.*, (1982).

- Preparación del gel. Se utilizó agarosa disuelta por calentamiento en solución TAE*. La concentración de agarosa en el gel se estableció en función del tamaño del fragmento de ADN que se pretendió separar. Además se añadieron 0,5µg/ml de bromuro de etidio (BrEt)* para visualizar las bandas de ADN mediante un transiluminador de luz UV una vez que el desarrollo electroforético se había completado.
- Preparación de la muestra. Se mezcló la muestra de ADN con aproximadamente un décimo del volumen final de tampón de carga* concentrado antes de cargarlo en el gel.
- Desarrollo electroforético. La electroforesis se desarrolló en solución TAE* mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios/cm durante el tiempo adecuado para obtener una correcta resolución de las bandas de ADN.

*

Solución TAE (50x): Tris base 242g; ácido acético glacial 57 ml; EDTA 0,5M pH 8 100 ml; H₂O destilada hasta 1 l

Solución de bromuro de etidio (BrEt): se prepara una solución de 10 mg/ml en H₂O y se conserva a 4°C protegida de la luz.

Tampón de carga (6x): azul de bromofenol 2,5%; azul de xileno 0,25%; sacarosa 40%. Se conserva a 4°C.

2.9. Valoración de la resistencia al tránsito gastrointestinal

2.9.1 Resistencia al tránsito gástrico

Para la realización de este estudio se siguió el protocolo descrito por Charteris *et al.* (1998b) con pequeñas modificaciones.

Se partió de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria, de los cuales tomamos alícuotas de 1 ml que se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos. A continuación, se realizó un lavado de las células con solución amortiguadora fosfato salina (PBS)* pH 7,4. Este proceso se repitió tres veces. A 0,2 ml de la suspensión final de células se añadieron 0,3 ml de solución salina estéril (NaCl al 0,5%) y 1 ml de una solución que simula el jugo gástrico a pH 2, pH 2,5 o pH 3 (pepsina 3 g/l en solución salina, ajustado al pH correspondiente con HCl). Como control se sustituyó el mililitro de jugo gástrico preparado por 1 ml de PBS a pH 7,4. El conjunto (inóculo-reactivos) se mezcló suavemente en un agitador durante 5-10 segundos y se incubó a 37°C. Se tomaron alícuotas de la mezcla (0,1 ml) a tiempo 0, 45, 90 y 180 minutos para determinar el número total de microorganismos viables según el protocolo descrito en el apartado 2.4. (Determinación del número de microorganismos viables).

*

Buffer PBS (pH 7,4): NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1, 44 g, KH₂PO₄ 0,2 g, y H₂O destilada hasta 1 l.

2.9.2. Resistencia al tránsito intestinal

Para determinar la resistencia al paso por el intestino, se siguió un procedimiento similar al anterior, con la diferencia de que sustituimos el mililitro de jugo gástrico por 1 ml de una solución que simula el jugo intestinal (pancreatina 3 g/l en solución salina, ajustado a pH 8 con NaOH). Como control, al igual que en el apartado anterior, se sustituyó el mililitro de solución que

simula el jugo intestinal por 1 ml de solución amortiguadora fosfato-salina a pH 7,4.

Para determinar el total de microorganismos viables, las alícuotas de 0,1 ml se tomaron a tiempo 0, 120 y 180 minutos.

2.9.3. Resistencia en presencia de sales biliares

Para evaluar la capacidad de supervivencia en presencia de sales biliares se prepararon tubos que contenían 10 ml de MRS suplementados con diferentes concentraciones de sales biliares nº3 (Oxoid) (0,1%; 0,2% y 0,4%). Como control se preparó MRS sin la adición de sales biliares. El protocolo utilizado fue el descrito por Lee *et al.* (1999) con ligeras modificaciones.

Se inocularon los tubos con las cepas de BAL a una concentración de 10^8 ufc/ml, a partir de cultivos en MRS crecidos durante 24 horas a 30°C.

Se tomaron alícuotas de 0,1 ml a tiempo 0, 120 y 240 minutos para determinar el número total de microorganismos viables.

2.10. Caracterización tecnológica de las cepas de BAL

2.10.1. Valoración del perfil enzimático

Para evaluar la actividad enzimática de las cepas de BAL estudiadas se utilizaron las galerías Api-Zym (BioMérieux, S.A., Marcy l'Etoile, Francia).

Este sistema consiste en un método colorimétrico mediante el cual se pueden estudiar diecinueve actividades enzimáticas a través de veinte cúpulas preparadas con substratos enzimáticos tamponados. Cada pocillo de la galería se rellenó con 65 µl de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril con una densidad equivalente a 5-6 unidades de la escala de Mc Farland. Posteriormente se incubaron las galerías durante 4 horas y media en una estufa a 37°C. Transcurrido ese tiempo se añadió una gota del reactivo Zym A y una gota del reactivo Zym B en cada cúpula y se esperaron 5 minutos a que se desarrollara el

color (Figura 5). Para la lectura de los resultados se valoró cada actividad enzimática de 0 a 5 unidades, de acuerdo a la intensidad del color de la reacción.

Las enzimas valoradas, por orden numérico, se detallan a continuación:

- | | |
|----------------------------|----------------------------------------|
| 1. Fosfatasa alcalina | 11. Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa |
| 2. Esterasa (C4) | 12. α -Galactosidasa |
| 3. Esterasa lipasa (C8) | 13. β -Galactosidasa |
| 4. Lipasa (C14) | 14. β -Glucuronidasa |
| 5. Leucina arilamidasa | 15. α -Glucosidasa |
| 6. Valina arilamidasa | 16. β -Glucosidasa |
| 7. Cistina arilamidasa | 17. N-Acetil- β -glucosaminidasa |
| 8. Tripsina | 18. α -Manosidasa |
| 9. α -Quimotripsina | 19. α Fucosidasa |
| 10. Fosfatasa ácida | |



Figura 5: Galería Api-Zym, una vez finalizado el ensayo llevado a cabo con la cepa *Lb. paracasei* ATCC 27092. En la fotografía se visualiza las cúpulas coloreadas en mayor o menor grado, dependiendo de la intensidad de la reacción enzimática.

2.10.2. Valoración de la capacidad acidificante de las cepas de BAL en leche

El estudio de la capacidad acidificante de las BAL en leche, se llevo a cabo en leche desnatada de vaca, *Skim milk*, reconstituida al 10% con agua destilada y esterilizada durante 5 minutos a 120°C en el autoclave) y en leche de oveja desnatada y tindalizada. Para la valoración de esta actividad se siguió el protocolo descrito por Cogan *et al.* (1997).

Para determinar la acidificación, se inocularon 150 μ l de las cepas de BAL objeto de estudio (a partir de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria) en tubos que contenían 15 ml de leche (de vaca u oveja) y a continuación se incubaron a dos temperaturas diferentes: 30 y 42°C.

Para cada cepa bacteriana, cada temperatura y cada tipo de leche se tomaron alícuotas de 2 ml a las 6 horas y al final del periodo de incubación, a las 18 horas, y se procedió a la medida del pH con un pHmetro modelo (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain).

2.10.3. Valoración de la actividad proteolítica de las cepas de BAL en leche

Para evaluar la presencia de actividad proteolítica en las cepas de BAL, se dividieron placas de Agar-Leche (véase apartado de Medios de Cultivo) en sectores y se depositó en cada uno de ellos una gota de 25 μ l de cultivos de BAL en TSB-YE en fase estacionaria. Las placas se incubaron a 30°C durante 10 días.

Transcurrido ese tiempo se inundó la placa con HCl al 1%, observándose en caso de actividad proteolítica un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano.

2.10.4. Estudio de viabilidad a 4°C en las cepas de BAL

La determinación de la viabilidad de las cepas de BAL a 4°C, se llevó a cabo en medio TSB, leche de oveja desnatada y en leche de vaca desnatada reconstituida.

En primer lugar, se tomaron alícuotas de 2 ml, a partir de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria y se centrifugaron a 5000 xg durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con PBS. A continuación, se volvieron a centrifugar las alícuotas en las mismas condiciones y se resuspendieron los pellets en TSB o en leche dependiendo donde fuera a estudiarse la viabilidad.

Por último, se inocularon las cepas de BAL (en torno a 10^8 ufc/ml) en matraces que contenían 10 ml de TSB-YE, leche de oveja desnatada o *skim milk* y se mantuvieron durante 50 días en una cámara fría a 4°C. Para determinar el número de microorganismos viables (véase apartado 2.4 “Determinación del número de microorganismos viables”) se tomaron alícuotas a tiempo 0 y a los días 4, 11, 20, 35 y 50.

2.11. Estudios de bioseguridad en las cepas de BAL

2.11.1. Valoración de la actividad hemolítica

Para el estudio de esta actividad se siguió el método descrito por Facklam y Wilkinson, (1981). Se partió de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria de las cepas de BAL a estudiar. Las bacterias se sembraron por agotamiento en placas de agar-sangre (véase apartado de Medios de Cultivo) y se incubaron en anaerobiosis a 35°C durante 48 horas. Las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron almacenando las placas en una jarra de anaerobios en la que se depositó un sobre generador de condiciones anaeróbicas obtenido de la casa comercial Oxoid.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las placas. En aquellas cepas que poseían actividad β -hemolítica se observaron zonas translúcidas alrededor del crecimiento bacteriano.

2.11.2. Valoración de la actividad gelatinásica

Para valorar esta actividad se partió de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria de las cepas de BAL utilizando el protocolo descrito por Su *et al.*, (1991). Las bacterias se sembraron por agotamiento en placas de TSA que contenían un 3% de gelatina y se incubaron en estufa durante 48 horas a 35°C. Finalizado este tiempo, se procedió al revelado de las placas, para ello se inundaron con ácido tricloroacético al 30%. Transcurridos unos segundos las placas se volvieron opacas, como consecuencia de la precipitación de la gelatina, salvo en las zonas alrededor del crecimiento microbiano donde ésta fue degradada debido a la actividad gelatinásica de la cepa.

2.11.3. Valoración de la actividad hialuronidásica

Para estudiar la posible existencia de esta actividad en las cepas de BAL estudiadas, se partió de cultivos en TSB-YE en fase estacionaria. Se siguió

básicamente el protocolo descrito por Azeredo *et al.*, (2001). Las bacterias se sembraron por agotamiento en placas de BHIA que contenían 400 µg/ml de ácido hialurónico y un 1% de BSA y se incubaron durante 72 horas a 35°C.

Finalizado el periodo de incubación, se inundaron las placas con ácido acético 2 N, transcurridos unos minutos la placa se volvió opaca salvo en aquellas zonas donde existía actividad hialuronidásica, donde se observaron zonas translúcidas alrededor de las colonias por la degradación del ácido hialurónico del medio.

2.11.4. Valoración de la actividad mucinolítica

Para evaluar la degradación de mucina por las cepas de BAL estudiadas en este trabajo, se siguió el protocolo descrito por Zhou *et al.*, (2000). Se preparó medio sólido B (véase apartado de Medios de cultivo) al que se añadieron 0,5% de mucina parcialmente purificada (Zhou *et al.*, 2000) y 1,5% de agarosa. Se prepararon dos tipos de placas, con y sin un suplemento de glucosa al 3%.

10 µl de los cultivos en TSB-YE en fase estacionaria, fueron inoculados en la superficie de las placas con y sin glucosa, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. Como control positivo se creció en esas mismas condiciones 10 µl de una muestra fecal.

Para llevar a cabo el revelado de las placas, se procedió a inundar las placas con la solución colorante negro amido preparado al 0,1% en ácido acético 3,5 M, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron en las placas una serie de lavados con ácido acético 1,2 M, esperando observarse un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano de la cepa con actividad mucinolítica.

2.11.5. Valoración de la producción de ácido D/L láctico

La producción de ácido láctico [L(+) y D(-)] por las cepas de BAL estudiadas en este trabajo se determinó enzimáticamente usando un *kit* comercial

enzimático (Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) utilizando cultivos en fase estacionaria procedentes de incubaciones en TSB-YE y en leche (de vaca u oveja).

Las muestras empleadas para el estudio se obtuvieron recogiendo los sobrenadantes de los cultivos y centrifugándolos a 5000 xg durante 10 minutos. Posteriormente los sobrenadantes se colocaron en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos para detener las reacciones enzimáticas que pudieran interferir en el ensayo. Transcurrido este tiempo se cuantificó la producción de ácido D y L- láctico siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

2.11.6. Valoración de la resistencia a antibióticos

Se estudió la resistencia de las cepas de BAL a diversos antibióticos mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

La CIM es la concentración más baja de antibiótico a partir de la cual no se observa crecimiento bacteriano.

El ensayo se llevó a cabo con las tiras antibióticas M.I.C.E. de Oxoid. Estas tiras contienen el antibiótico en un gradiente de concentración que está comprendido entre 0,015 µg/ml y 256 µg/ml. Los antibióticos analizados fueron: eritromicina, ampicilina, vancomicina, gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y penicilina G. Para llevar a cabo el ensayo se siguieron las recomendaciones de la casa suministradora.

Las cepas de BAL fueron crecidas en medio sólido MRSA durante 48 horas a 30°C, a partir de las cuales se prepararon suspensiones en agua destilada estéril a una densidad de 0,5-1,0 unidades de la escala de McFarland. A continuación, con un hisopo estéril, se procedió a la siembra por toda la placa de TSA, de la cepa bacteriana a estudiar, y así, obtener un crecimiento homogéneo. Posteriormente, una vez la placa estuviera seca, se colocó la tira de antibiótico M.I.C.E en el centro de la placa. Finalmente, se incubó durante 48 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la placa donde se desarrolló el crecimiento en “césped” de crecimiento con una zona clara, libre de células,

alrededor de la tira, en el sitio en el cual el gradiente de concentración del antibiótico fue suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano.

Con el fin de asegurar el buen funcionamiento de las tiras antibióticas M.I.C.E., así como de la metodología empleada, se utilizó una cepa control (*E. faecalis* ATCC 29212) cuya CIM fue estudiada para cada uno de los antibióticos arriba mencionados. Los valores de CIM obtenidos para esta cepa con cada antibiótico fueron comparados con los rangos obtenidos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI).

2.12. Valoración de la adhesión a células epiteliales intestinales de origen humano

Para llevar a cabo el estudio sobre la capacidad de adhesión de las cepas de BAL a células epiteliales humanas, se empleó la línea celular Caco-2 procedente de carcinoma de colon humano (véase apartado Material Biológico).

2.12.1. Mantenimiento de la línea celular Caco-2

La línea celular Caco-2 se creció en monocapa en medio EMEM (“Eagle’s Minimum Essential Medium”) de Sigma, suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico antimicótico al 0,4% (Sigma), en frascos para cultivo de tejidos de 75 cm² (Iwaki, Japón). La incubación se realizó a 37°C en estufa con atmósfera enriquecida en un 5% de CO₂, cambiándose el medio cada 2 días aproximadamente. Al alcanzar la confluencia, las células se transfirieron a nuevos frascos previa lisis de las monocapas con una solución de 0,25% tripsina y 0,02% de EDTA durante 10 min a 37°C.

Tras el tratamiento con tripsina, se determinó el número de células viables mezclando la suspensión celular en EMEM con una solución de tinción de azul tripano al 0,4% (Sigma), a razón de 1:2 (v/v). Los recuentos microscópicos se realizaron en un hemocitómetro, teniendo en cuenta que las células muertas permiten la penetración del colorante y aparecen azules, mientras que las células viables se muestran refringentes al repeler el colorante.

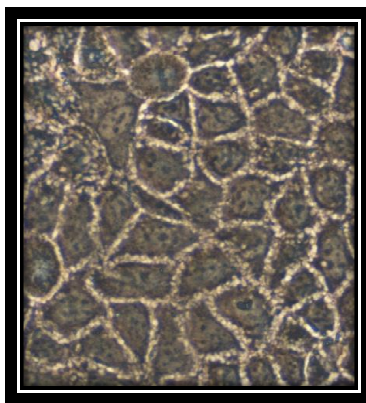


Figura 6: Fotografía mediante microscopía óptica de un cultivo en monocapa de la línea celular Caco-2 en medio EMEM.

2.12.2. Ensayo de adhesión

Los ensayos de adhesión se llevaron a cabo con los cultivos celulares en monocapa tras unos 20-30 pases de cultivo. El protocolo empleado fue el descrito por Deepika *et al.*, (2009) con ligeras modificaciones. Las células epiteliales se crecieron, entonces, en placas de 24 pocillos para el cultivo de tejidos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo en 1 ml de medio EMEM suplementado con SFB al 20% y antibiótico antimicótico al 0,4%. Normalmente, al cabo de 10 días en cultivo, las células están diferenciadas y han alcanzado el estado confluyente (Pinto *et al.*, 1983). En ese momento, las monocapas se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) (véase apartado 2.9.1) y se añadió 1 ml de EMEM (sin antibiótico ni suero fetal bovino) con 10^7 ufc/ml de la cepa bacteriana a estudiar. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C en estufa de CO₂. Tras la incubación, las monocapas se lavaron cuatro veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas.

Para solubilizar las células intestinales y las bacterias adheridas, las monocapas se despegaron con 200 µl de una solución de tripsina al 0,25% y 800 µl de agua destilada estéril. El número de bacterias adheridas en cada pocillo se determinó mediante recuentos por duplicado tras su crecimiento en placas de TSA con 0,2% de glucosa.

Para estudiar el efecto de las sales biliares en las cepas de BAL sobre su capacidad de adhesión sobre células Caco-2, el experimento se realizó siguiendo este mismo protocolo con la diferencia de que las cepas de BAL añadidas fueron pre-incubadas durante cuatro horas antes del inicio del experimento de adhesión en MRS suplementado con 0,4% de sales biliares a 37°C.

2.12.3. Visualización de la adhesión de las cepas de BAL a las células Caco-2 mediante microscopía electrónica de barrido

Para visualizar por microscopía electrónica de barrido la adhesión de las células de las cepas de BAL a las células Caco-2, se colocaron en el fondo de los pocillos de las placas de cultivo, unos cubres de plástico *thermanox* donde crecieron las células Caco-2 permitiendo la manipulación y el manejo de las muestras para su visualización en el microscopio.

A continuación, se llevó a cabo el mismo protocolo que en el apartado anterior hasta la obtención de la monocapa con las cepas de BAL adheridas. En este punto se añadió a cada pocillo 1 ml de tampón de fijación que contenía un 2% de glutaraldehído y 0,1 M de cacodilato sódico y se procedió a incubar la placa durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Después de la incubación se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con tampón cacodilato (0,1 M), y a continuación se llevó a cabo la post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato incubándose durante 15 minutos.

Posteriormente las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación con gradientes de etanol (30, 50, 70, 90, 96, 100%). Por último, las muestras se introdujeron en un aparato desecador por punto crítico y fueron recubiertas de oro para su posterior visualización por microscopía electrónica de barrido (equipo JEOL 6489, LW) en el Servicio de Microscopía de la Universidad de León.

2.12.4. Valoración de la producción de interleucinas

Para este estudio se partió de cultivos de células Caco-2 crecidos en placas de 24 pocillos durante 10 días hasta alcanzar la confluencia a una temperatura de 37°C con atmósfera enriquecida al 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se añadió a cada pocillo 1 ml de medio EMEM sin antibiótico antimicótico ni SFB. A continuación se inoculó en cada pocillo, cada una de las cepas de BAL a estudiar a una concentración de 10⁷ ufc/ml y en dos condiciones diferentes: activas e inactivadas por un tratamiento con calor (95°C durante 30 minutos). Como control se utilizaron pocillos con las monocapas de CaCo-2 en medio EMEM sin inoculación bacteriana. Se incubó la placa durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y finalmente, se recogió el medio de los pocillos y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron analizados mediante inmunoensayo utilizando los *kits* comerciales ELISA RayBio Human IL-6 /IL-8 y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.13. Valoración de la adhesión a mucus

Para evaluar la adhesión de las cepas de BAL a mucus, obtuvimos mucus intestinal de rata. Para ello seguimos el protocolo descrito por Sun *et al.* (2007). Una vez obtenido, purificado y liofilizado el mucus, se resuspendió a una concentración de 1 mg/ml en tampón carbonato sódico 50 mM pH 9,7. Del mismo modo se preparó una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en el mismo tampón y a la misma concentración para utilizarlo como control negativo.

Para la inmovilización del mucus y de la BSA en placas *microtiter*, se incubó en cada pocillo 150 µl de las soluciones con mucus y BSA durante 12 horas a 4°C. Después de la incubación, los pocillos fueron bloqueados con PBS suplementado con un 1% de Tween 20 durante 1 hora y a continuación fueron lavados cuatro veces con PBST (PBS con 0,05% Tween 20).

Una vez preparadas las placas *microtiter* con los pocillos recubiertos de mucus o BSA se añadieron a cada uno de ellos 150 μ l de las cepas de BAL crecidas durante 24 horas en TSB-YE, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en PBST hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 620_{nm} de 0,5. Añadidas las bacterias, se procedió a incubar la placa durante 12 horas a 4°C y transcurrido este tiempo se realizaron cuatro lavados con PBST para eliminar las bacterias que no se adhirieron. Finalmente se añadieron 150 μ l de safranina para medir la densidad óptica a 490_{nm} en un lector de ELISA.

2.14. Estudio de la formación de biofilms

2.14.1. Cuantificación

Para estudiar y cuantificar en las cepas de BAL la formación de biofilms se sembraron 20 μ l de las cepas de BAL guardadas en glicerol a -80°C en tubos que contenían 4 ml de TSB-YE y se incubaron durante 24 horas a 30°C sin agitación. Posteriormente se realizó un segundo pase de 5 μ l de los tubos anteriores a tubos con 5 ml del mismo medio suplementado con diferentes aditivos relacionados con la formación de biofilms: glucosa al 0,25% p/v y CaCl₂, ZnCl₂, MnCl₂ y MgCl₂ a una concentración de 5mM cada uno de ellos. Se incubaron los tubos otras 24 horas a 30°C sin agitación.

A continuación los preinóculos anteriores fueron subcultivados 1:50 en placas de poliestireno de 96 pocillos en un volumen final de 200 μ l con el mismo medio de cultivo que el preinóculo y se mantuvieron a 30°C sin agitación durante 72 horas para permitir la formación de biofilms.

Para cuantificar la formación de biofilms se siguió el método de tinción con cristal de violeta descrito por Kubota *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Para ello, se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se lavó tres veces con 200 μ l de PBS. Seguidamente, se dejó secar la placa invertida durante 10 minutos y se añadieron 200 μ l de solución de cristal de violeta al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron de

nuevo cada uno de los pocillos, tres veces, con PBS y se dejó secar la placa durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 200 μ l de etanol para disolver el colorante y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas *microtiter* (Anthos 2020).

2.14.2. Visualización de biofilms mediante microscopía confocal

Para el estudio, mediante microscopía confocal, se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior, sustituyéndose los 200 μ l de cristal de violeta al 0,1% por el fluorocromo Syto 9 preparado como nos indica la casa comercial (Invitrogen, UK) Se incubó la placa durante 30 minutos en oscuridad y transcurrido ese tiempo se llevaron a cabo tres lavados con agua destilada estéril. Finalmente los pocillos se visualizaron en un microscopio confocal (Radiance 2000, Biorad) del Servicio de Microscopía de la Universidad de León.

2.15. Crecimiento de las BAL con compuestos con potencial prebiótico

Para determinar el crecimiento de las cepas de BAL en presencia de prebióticos se siguió el protocolo descrito por Su *et al.* (2007) aunque con ligeras modificaciones. A partir de cultivos guardados en glicerol a -80°C se sembraron 20 μ l de BAL en tubos con medio MRS. Se incubaron durante 24 horas a 30°C sin agitación y a continuación se dio un segundo pase, sembrando 5 μ l en nuevos tubos que contenían 5 ml de MRS y se incubó en las mismas condiciones. Finalizada la incubación se inoculó cada cepa bacteriana al 0,1% en matraces que contenían 10 ml de MRS sin glucosa y suplementado al 1,5 % con el prebiótico que se deseaba estudiar. Asimismo, las cepas de BAL fueron crecidas en MRS con 1,5 % de glucosa para tener un control positivo de crecimiento. Los seis compuestos con potencial prebiótico utilizados y sus características se incluyen en la Tabla 7. El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia de los cultivos a 620nm.

Tabla 7: Compuestos con potencial prebiótico empleados en este trabajo para estudiar su efecto sobre el crecimiento de las cepas de BAL.

Tipo de compuesto	Producto comercial	Fabricante	Descripción
Fructooligosacáridos (FOS)	Raftilosa P95	Orafti, Bélgica	Contiene oligofructosa con un grado de polimerización (DP) entre 2 y 7.
Inulina	Raftilina HP	Orafti, Bélgica	Inulina obtenida de la Achicoria. Grado medio de polimerización (DP) de 23.
Inulina		Sigma Aldrich, USA	Inulina obtenida de los bulbos de la dalia.
Arabinogalactanos		Sigma Aldrich, USA	> 90% de carbohidratos extraídos del pino alerce.
D (+)-Rafinosa		Sigma Aldrich, USA	α - galactosacárido. Pureza > 99%.
Lactulosa		Sigma Aldrich, USA	Disacárido semi-sintético (1-4 galactósido-fructosa).

2.16. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Para la cuantificación de los AGCC producidos por las cepas de BAL, se tomaron como muestras, alícuotas de 1,5 ml de los cultivos obtenidos por crecimiento a término en presencia de los compuestos con potencial prebiótico, citados en el apartado anterior o en presencia de glucosa (control). Cada muestra fue centrifugada a 5000 xg durante 10 minutos y al sobrenadante libre de células se añadieron 25 μ l de HCl 2M y posteriormente se filtró mediante el empleo de filtros con un tamaño de poro de 0,22 μ m. A continuación, se determinó la concentración, mediante cromatografía de gases, de los siguientes AGCC: ácido

acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, hexanoico y heptanoico.

Para la cromatografía de gases se utilizó una columna TRB-FFAP (30 m x 0,53 mm x 1 μ m) de Teknokroma acoplada al Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL con detector FID. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron:

- Temperatura: 130°C 3 minutos con una rampa de 40°C/min y posteriormente 170°C 2 minutos
- Fase móvil: Helio a 13.8 psi.
- Temperatura del inyector: 250°C
- Detector FID: 250°C con flujo de aire de 500 ml/min y de hidrógeno de 50 ml/min
- Volumen de inyección: 2 μ l

Se hicieron rectas de calibración de cada uno de los ácidos a cuantificar con disoluciones de concentraciones comprendidas entre 10 y 500 ppm. Tanto a las muestras control como a las muestras problema, se les añadió el patrón interno 4-metilvalérico a una concentración final de 30 ppm. Por último, se inyectaron las muestras en el cromatógrafo utilizando el propio autoinyector del equipo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La FAO (Food and Agriculture Organization) en conjunto con la OMS (Organización Mundial de la Salud), publicaron en mayo de 2002 una guía para la evaluación de microorganismos probióticos en alimentos. En ella, se incluyen los siguientes aspectos necesarios: Identificación de la cepa probiótica a nivel de especie, pruebas *in vitro* para la selección de probióticos entre las que destacan la resistencia al tránsito gastrointestinal, adherencia al epitelio intestinal, actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y aspectos de seguridad de las cepas probióticas incluyendo la evaluación de resistencia a antibióticos.

En el presente trabajo hemos estudiado el potencial probiótico de doce cepas de BAL. Ocho de las doce cepas de origen lácteo fueron seleccionadas en trabajos previos realizados en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León en base a su actividad antimicrobiana. Mientras que las cuatro cepas restantes fueron obtenidas de la ATCC y fueron seleccionadas en base a su origen (humano o lácteo), por su potencial como probiótico y/o por sus propiedades antimicrobianas. De hecho, una de las bacterias obtenidas de la ATCC corresponde a la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), una de las más investigadas en el mundo por su potencial probiótico. De este modo, la inclusión de esta cepa en nuestro trabajo nos permitió corroborar algunas de sus propiedades que la hacen óptima como cepa probiótica, además de, utilizarla como cepa control a lo largo del estudio con respecto a las otras cepas cuya capacidad probiótica no ha sido todavía reconocida.

De acuerdo a las recomendaciones establecidas por la FAO hemos estudiado, *in vitro*, de forma secuencial, diversas características probióticas además de, algunas tecnológicas en estas doce cepas con el fin de seleccionar aquellas que posean las mejores propiedades probióticas de cara a su inclusión en productos alimenticios.

1. Identificación de las cepas bacterianas seleccionadas

La correcta identificación de cepas potencialmente probióticas es el primer paso crítico para su estudio. Es esencial que los microorganismos sean correctamente identificados a nivel de género y de especie para garantizar que se tratan de microorganismos presumiblemente inocuos y de grado alimentario GRAS. Por otro lado, los efectos beneficiosos no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que dependen de la cepa. Por este motivo, es necesario profundizar en su identificación a nivel de especie, mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica, con el fin de asociar un determinado efecto a una cepa concreta y poder realizar su seguimiento en estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos.

Con el fin de identificar correctamente las cepas bacterianas a estudiar en este trabajo, se llevó a cabo una caracterización genotípica mediante la técnica del ribotipado de las doce cepas de BAL (véase Tabla 5 en Materiales y Métodos).

En trabajos previos, realizados bajo la dirección de la Dra. García Armesto en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, se llevó a cabo una primera identificación de las ocho cepas, aisladas de productos lácteos en el propio Departamento y seleccionadas por su actividad antimicrobiana, mediante la observación de características fenotípicas y la utilización de tablas diagnósticas. Las ocho cepas fueron caracterizadas a nivel de género. Siete de estas ocho cepas mostraron una forma cocal, eran catalasa-negativas y oxidasa-positivas. Cuatro de estas siete cepas bacterianas (cepas 189, 297, 875 y 1076) fueron asignadas al género *Enterococcus* debido a que fueron capaces de crecer tanto a 10°C como a 45°C y en presencia de ClNa al 6,5% (P/V), asimismo eran productoras de CO₂ y L-láctico a partir de glucosa y no se observaron formaciones en tétradas a microscopía óptica. La cepa bacteriana con forma cocal (cepa 660) fue designada como *Lactococcus* al mostrar crecimiento a 10°C y producir L-láctico a partir de glucosa y, además por su incapacidad de crecer a 45°C o en presencia de 6,5% de NaCl, no producir CO₂ a partir de glucosa ni formar agrupaciones en tétradas. Por último, las dos cepas restantes con forma

cocal (cepas 888 y 1354) sólo se pudieron relacionar a los géneros *Enterococcus* o *Leuconostoc*.

Con respecto a la cepa restante (cepa 34) se observó que presentaba una forma bacilar y fue adscrita al género *Lactobacillus* al comprobar que se trataba de una bacteria Gram (+), catalasa y oxidasa negativa y no móvil. Además, fue identificada con el Api 50 CHL como *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* con un 96,8% de probabilidad.

Con objeto de corroborar los resultados previos obtenidos mediante la identificación fenotípica de las ocho cepas de BAL, además de las cuatro cepas de la ATCC, las doce cepas fueron identificadas a nivel de especie y de subespecie por ribotipado, técnica que consiste en la identificación y clasificación de cepas bacterianas en función de los genes del RNA ribosomal (rRNA). Para ello se utilizó el equipo automático “Riboprinter Microbial Characterization System (Dupont-Qualicon, Wilmington, DE, USA” (véase Materiales y Métodos).

Los resultados y los patrones de ribotipado obtenidos se muestran en la Tabla 8. De las ocho cepas aisladas de productos lácteos, cinco fueron identificadas como *Enterococcus faecalis* (cepas 189, 297, 888, 1076 y 1354), una como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (cepa 660), una como *Leuconostoc mesenteroides* (cepa 875) y la última como *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa 34). Todas estas cepas mostraron un coeficiente de similitud por encima de 0,88. Con respecto a las cuatro cepas obtenidas de la ATCC, el ribotipado confirmó el estatus taxonómico reconocido por la Colección de Cultivos Tipo Americana, aunque dos de las cepas *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103) y *Lb. casei* (ATCC 393) mostraron un coeficiente de similitud por debajo de 0,85 que es el valor mínimo para considerar nuestra identificación como fiable.

Como podemos observar en la Tabla 8 las dos cepas (888 y 1354) que sólo se pudieron relacionar a los géneros *Enterococcus* o *Leuconostoc* mediante la identificación fenotípica, resultaron ser ambas cepas *E. faecalis*, mientras que la cepa 875, designada como *Leuconostoc mesenteroides* por el ribotipado, había sido asignada al género *Enterococcus* en la identificación fenotípica previa.

Tabla 8: Caracterización fenotípica y genotípica de las doce cepas de BAL.

				DuPont ID Similarity	RiboPrint™ Pattern
Cepas de BAL		Caracterización fenotípica previa	Identificación ribotípica		1 kbp 5 10 15 50
Forma coccal	ATCC 11454	<i>N.D.</i> ²	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0.96	
	660	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	0.92	
	189	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.90	
	297	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.92	
	888	<i>Enterococcus / Leuconostoc</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.94	
	1076	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.94	
	1354	<i>Enterococcus / Leuconostoc</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.91	
	875	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.88	
Forma bacilar	ATCC 53103	<i>N.D.</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.80	
	ATCC 27092	<i>N.D.</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	0.94	
	34	<i>N.I.</i> ³	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	0.88	
	ATCC 393	<i>N.D.</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	0.79	

¹Caracterización fenotípica mediante el empleo de tablas diagnósticas (Cogan, 1996; Harrigan, 1998) en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León.

²N.D.: No determinado.

³N.I.: No identificado.

Este problema de identificación se ha encontrado en varios estudios donde se ha percibido que la caracterización fenotípica de las especies pertenecientes al género *Enterococcus* podría generar problemas debido a su gran diversidad fenotípica (Devriese *et al.*, 1993; Ogier y Serror, 2008). En este sentido, en el trabajo de Pimentel *et al.*, (2007) se observaron resultados contradictorios en la identificación de *Enterococcus* por métodos fenotípicos y genotípicos. De hecho, la identificación de BAL por métodos convencionales puede ser, en algunas ocasiones, complicada debido a que la expresión de fenotipos en condiciones de laboratorio podría llevar a errores.

Por lo tanto, dados los problemas en la identificación convencional y la alta fiabilidad de esta técnica, el presente trabajo se continuó aceptando los resultados de identificación obtenidos por ribotipado (Tabla 8).

2. Cinética de crecimiento

En este apartado se ha abarcado el estudio del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo de las doce cepas de BAL, cuando se incubaron en medio líquido (TSB-YE) a 30°C sin agitación (véase Materiales y Métodos). Los valores obtenidos a partir de las lecturas espectrofotométricas y los recuentos de las unidades formadoras de colonias en medio sólido (ufc/ml) se reflejan mediante representaciones gráficas en la Figura 7. Asimismo, se establecieron los siguientes parámetros de crecimiento: “ X_m ” concentración máxima de microorganismos expresado como log ufc/ml y “ μ ” velocidad específica de crecimiento en h^{-1} (véase Materiales y Métodos) (Tabla 9).

Como se muestra en la Figura 7, tanto las curvas obtenidas a partir de las lecturas espectrofotométricas de absorbancia a 620nm como las obtenidas por recuento de ufc/ml a lo largo del tiempo, presentaron una forma sigmoideal típica del crecimiento bacteriano, pudiendo diferenciarse en todas ellas las tres etapas: fase de latencia, crecimiento exponencial y fase estacionaria.

De acuerdo a la velocidad de crecimiento observada en este estudio en las cepas de BAL, pudimos clasificarlas en tres grupos:

- Cepas bacterianas con crecimiento rápido: Las cepas *Lc. lactis* (660 y ATCC 11454) obtuvieron los valores más altos de μ (0,85 y 0,89 h⁻¹ respectivamente) observándose un crecimiento más rápido que el obtenido por las cepas pertenecientes a las otras especies bajo las mismas condiciones de crecimiento. Asimismo, la X_{\max} de 9,5 log ufc/ml, se alcanzó a las 10 horas de crecimiento en ambas cepas.
- Cepas bacterianas con crecimiento intermedio: En este grupo se incluyeron a todos los lactobacilos, exceptuando la cepa *Lb. casei*, y a todas las cepas bacterianas pertenecientes a la especie *E. faecalis*. Como se muestra en la Tabla 9, los valores de μ obtenidos por estas especies fueron más bajos que los obtenidos por las cepas de la especie *Lc. lactis*.

Todas las cepas de *E. faecalis* (cepas 189, 297, 888, 1076 y 1354) mostraron un crecimiento muy similar en las condiciones arriba mencionadas. Por esta razón, en la Figura 7 se ha plasmado únicamente la curva de crecimiento de la cepa 1076 en representación de las demás cepas de *E. faecalis*.

Todos los enterococos estudiados alcanzaron la fase estacionaria antes que las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, sin embargo la X_{\max} alcanzada por las cepas del género *Enterococcus* al final del periodo de crecimiento fue menor que la de los *Lactobacillus* y no llegó en ningún caso a 9 ufc/ml. En cuanto a las cepas del género *Lactobacillus*, con la excepción de la cepa *Lb. casei* cuyo crecimiento fue más lento, todas ellas alcanzaron su X_{\max} a las 20 horas de incubación (Figura 7). Por otra parte, cabe señalar que no se detectaron grandes diferencias en el crecimiento a lo largo del tiempo entre las dos cepas de *Lb. paracasei* (34 y ATCC 27092) a pesar de su origen diferente (humano y lácteo respectivamente).

- Cepas bacterianas con crecimiento lento: En este grupo se incluyeron a las cepas *Lb. casei* (ATCC 393) y *Ln. mesenteroides* (cepa 875) ya que obtuvieron los valores de μ más pequeños (0,13 y 0,12 h⁻¹ respectivamente). Los valores de X_{\max} obtenidos por estas cepas (8,20 y 8,02 ufc/ml respectivamente) también

fueron los más bajos en comparación con el resto de cepas bacterianas estudiadas.

Por último, a lo largo del crecimiento bacteriano, se observó en todos los cultivos una disminución de pH desde un valor inicial de 7 hasta 5,6 aproximadamente, teniendo lugar esta acidificación durante la fase de crecimiento exponencial y manteniéndose constante este último valor durante la fase estacionaria.

Tabla 9: Parámetros cinéticos de crecimiento μ y X_{\max} de las doce cepas de BAL, calculados a partir de las curvas de crecimiento obtenidas en TSB-YE (Figura 7).

Cepas de BAL	X_{\max} (log ufc ml ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	9.50	0.85
660	9.50	0.89
<i>Enterococcus faecalis</i> 189	8.70	0.36
297	8.80	0.39
888	8.56	0.31
1076	8.85	0.35
1354	8.90	0.37
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 875	8.02	0.12
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 27092	9.30	0.28
34	9.80	0.31
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	9.80	0.34
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	8.20	0.13

Los resultados presentados corresponden a la media de dos experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 5%.

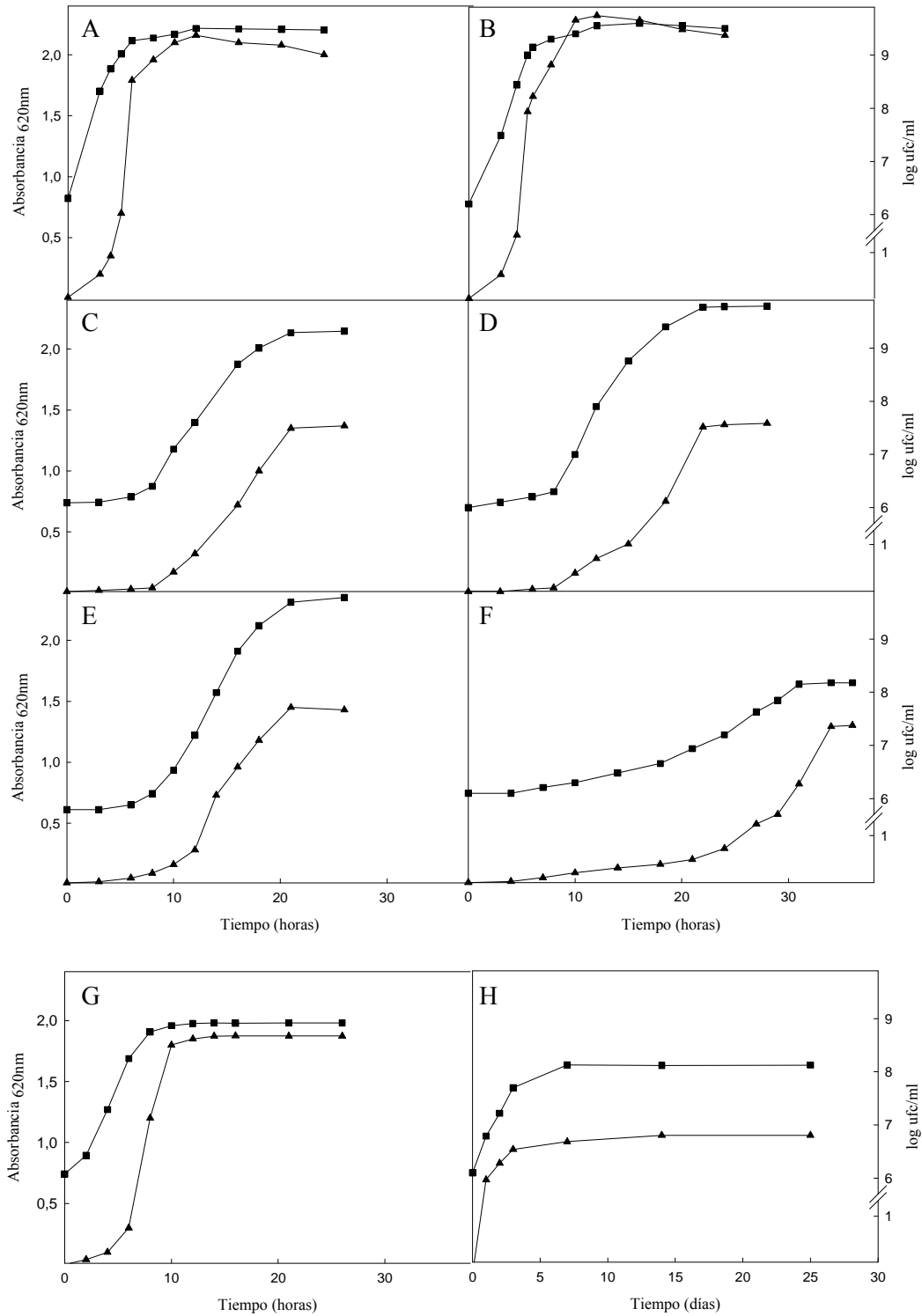


Figura 7: Curvas de crecimiento en medio TSB-YE donde se muestra la absorbancia a 620nm (▲) y el número de células viables ($\log \text{ufc/ml}^{-1}$, ■) de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, ATCC 11454 (A); *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, cepa 660 (B); *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, ATCC 27092 (C); *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, cepa 34 (D); *Lb. rhamnosus*, ATCC 5303 (E); *Lb. casei*, ATCC 393 (F); *E. faecalis*, cepa 1076 (G) y *Ln. mesenteroides*, cepa 875 (H).

Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 5%.

3. Actividad antimicrobiana

3.1. Valoración de la actividad antimicrobiana por *Spot test*.

Uno de los mecanismos mediante el cual las bacterias probióticas contribuyen a la protección del hospedador es la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Ouwehand *et al.*, 1999b). En esta actividad antimicrobiana de las BAL interviene la producción de diversas sustancias como son los ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etc. (Mishra y Lambert, 1996).

Dado que las cepas de BAL obtenidas del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos fueron seleccionadas por su actividad antimicrobiana para su estudio como bacterias potencialmente probióticas, en primer lugar fue necesario corroborar su actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos frecuentemente encontrados en alimentos, así como, evaluar dicha actividad en las cepas de BAL obtenidas de la ATCC. Para ello, se realizó un ensayo *in vitro* mediante la técnica *spot test* (véase Materiales y Métodos) (Figura 8) dónde se estudió la actividad antimicrobiana de las doce cepas de BAL frente a once cepas indicadoras pertenecientes a seis especies diferentes de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocitogenes*, *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas spp.*).

Como se puede observar en la Tabla 10 todas las cepas de BAL incluidas en este trabajo mostraron actividad antimicrobiana, al menos, frente a una de las cepas bacterianas patógenas ensayadas. Además, tres de las cepas de BAL [*Lc. lactis* (ATCC 11454 y 660) y *E. faecalis* (888)] mostraron actividad inhibitoria frente a cinco de las seis especies de microorganismos patógenos empleados como indicadores. *Lc. lactis* (ATCC 11454), descrita en la ATCC como productora de la bacteriocina nisina, fue la cepa que mayor actividad antimicrobiana mostró inhibiendo el crecimiento de siete de las once cepas de

microorganismos patógenos, siendo *B. cereus* la cepa más sensible a su actividad.

Cabe señalar que todas las cepas de BAL mostraron actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas fluorescens* (cepa 86) especie que está comúnmente asociada al deterioro de alimentos, particularmente si se mantienen en refrigeración antes de su consumo. Asimismo, la cepa *Ln. mesenteroides* (875) fue la más activa frente a esta especie al inhibir también el crecimiento de la otra cepa de *P. fluorescens* (2826).

Seis de las doce cepas de BAL [*Lc. lactis* (660 y ATCC 11454), *E. faecalis* (189, 888 y 1076) y *Leuconostoc mesenteroides* (875)] también mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocitogenes*, bacteria patógena que puede contaminar alimentos de origen animal como carnes y productos lácteos y es la responsable de las infecciones alimentarias más virulentas, llegando a alcanzar tasas de mortalidad de entre un 20 y 30% (Slutsker y Schuchat, 1999).

En cuanto a *B. cereus*, otro microorganismo patógeno conocido por su habilidad para deteriorar el alimento y su potencial para causar enfermedades humanas (Anderson Borge *et al.*, 2001) se observó que fue inhibido por cinco cepas de BAL [*Lc. lactis* (660 y ATCC 11454), *E. faecalis* (297 y 888) y *Lb. paracasei* (34)].

Por otra parte, todas las cepas pertenecientes a la especie *E. faecalis* mostraron actividad antimicrobiana frente *Aeromonas* spp, especie que se ha aislado de una gran variedad de alimentos entre los que se encuentran la leche y sus derivados y que puede actuar como agente causante de toxoinfecciones alimentarias (Abeyta *et al.*, 1986).

Por último, *S. aureus* fue la especie bacteriana patógena más resistente a la presencia de cepas de BAL, excepto la cepa 361 cuyo crecimiento fue inhibido por cuatro de las doce cepas de BAL, el resto de cepas de *S. aureus* o no fueron

sensibles frente a ninguna cepa de BAL o sólo fueron inhibidas en presencia de la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454).

De acuerdo a los resultados obtenidos, observamos que las cepas de BAL estudiadas tienen actividad antimicrobiana contra algún microorganismo potencialmente patógeno en productos lácteos. De hecho, dicha actividad ya ha sido descrita en algún trabajo (Schillinger *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 2005). La presencia de actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos en cepas de BAL nos permite poder utilizar estas cepas no sólo como posibles probióticos útiles en la prevención y control de patologías asociadas a la presencia de microorganismos no deseables, sino también, a la posibilidad de emplearlos como cultivos iniciadores y/o protectores de los alimentos. De este modo, se pretende inhibir o reducir directamente en los alimentos la presencia de microorganismos alterantes o patógenos que reduzcan su vida útil o que estén implicados en intoxicaciones alimentarias.

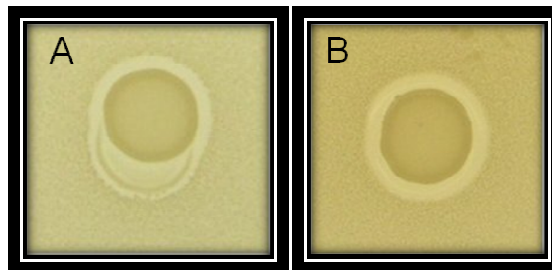


Figura 8: Fotografía de la actividad inhibitoria de las cepas *E. faecalis* (cepa 888) (A) y *Lb. casei* (ATCC 393) (B) frente a *S. aureus* 361 mediante la técnica *spot test*.

Tabla 10: Actividad antimicrobiana valorada mediante la técnica *spot test* de las doce cepas de BAL frente a diversos microorganismos patógenos encontrados frecuentemente en alimentos.

Cepas de BAL	Cepas Indicadoras										
	<i>S. aureus</i> 5192	<i>S. aureus</i> 59	<i>S. aureus</i> 5181	<i>S. aureus</i> 361	<i>S. aureus</i> 13	<i>B. cereus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocitogenes</i>	<i>P. fluorescens</i> 2826	<i>P. fluorescens</i> 86	<i>Aeromonas</i> spp. 49
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	+	+	-	+	-	++	+	+	-	+	-
660	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 189	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
297	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
888	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
1076	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
1354	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 875	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 27092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
34	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

La actividad antimicrobiana se valoró como (+) cuando se obtuvieron halos de inhibición con un radio entre 1 y 5mm; como (++) cuando el radio de los halos fue mayor de 5mm y como (-) cuando no se observó halo de inhibición.

Los resultados obtenidos corresponden a la media de tres experimentos independientes.

3.2. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido definidas como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, activas generalmente frente a especies bacterianas relacionadas con la especie que las produce (Jack *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 2001), y que pueden constituir un mecanismo de competencia al ayudar a la bacteria productora a imponerse en un determinado hábitat. Dado que las bacteriocinas no son efectivas frente a microorganismos Gram negativos (Arqués, 2003), en este trabajo se estudió la producción de estos péptidos en las cepas de BAL que, previamente, habían presentado actividad antimicrobiana frente a algún microorganismo patógeno Gram positivo. Para ello se utilizó la técnica de difusión en agar (véase Materiales y Métodos) por lo que fue necesario obtener los sobrenadantes libres de células (SLC) a partir de los cultivos de BAL. Como microorganismos indicadores se utilizaron todos los microorganismos indicadores empleados en el apartado anterior con excepción de las especies Gram negativas [*P. fluorescens* (cepas 2826 y 86) y *Aeromonas* spp (49)].

Cuando se probaron los SLC frente a los microorganismos indicadores sólo se observó un halo claro de inhibición, de unos 3mm de radio, de la cepa *B. cereus* cuando la cepa estudiada era *Lc. lactis* (ATCC 11454) (Figura 9). Cabe señalar que la mayor actividad inhibitoria de *Lc. lactis* (ATCC 11454) mediante la técnica del *spot test* fue también frente a *B. cereus*. Por otra parte, también se observó una pequeña actividad inhibitoria en las cepas *Lc. lactis* (660) y *E. faecalis* (1076) frente a *L. monocitogenes* y *L. innocua* respectivamente.

Es posible que la ausencia de contacto entre las células del microorganismo productor y el indicador, cuando se ensaya el SLC mediante el método de difusión en agar, explique la ausencia de actividad inhibitoria en la mayoría de las cepas de BAL frente a microorganismos patógenos cuando se utiliza esta técnica. Probablemente, el contacto entre ambos microorganismos sea necesario para que estas sustancias antimicrobianas actúen o para que se induzca su expresión en la bacteria productora (Toure *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2004).

No obstante, es posible que la actividad inhibitoria observada del SLC de las cepas de BAL fuera provocada por el bajo pH del sobrenadante o por la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Con objeto de descartar esta posibilidad se realizaron dos tratamientos, uno con NaOH para aumentar el pH del SLC a 7 y otro con catalasa para eliminar el H_2O_2 que se hubiera podido producir (véase Materiales y Métodos). En este caso, únicamente se continuó detectando actividad inhibitoria de la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) frente a *B. cereus* a pesar de los diferentes tratamientos realizados, lo que nos llevó a descartar la presencia de H_2O_2 o el bajo pH en el SLC como responsables de la inhibición en esta cepa.

Debemos recordar que la cepa *Lc. lactis* ATCC 11454 se ha descrito como productora de nisina, sin embargo una misma cepa bacteriana puede contener varios plásmidos que codifiquen distintas bacteriocinas (Quadri *et al.*, 1994). Por este motivo, se determinó mediante PCR (véase Materiales y Métodos), la presencia de otros genes que codifican para bacteriocinas específicas del género *Lactococcus*, como son las lactococinas A y B (genes *lcnA*, *lcnB* respectivamente) con potencial tecnológico en la industria láctea. Sin embargo, únicamente se detectó, mediante esta técnica, la presencia del gen *nis* que codifica para la nisina.

La nisina es la única bacteriocina con categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que el empleo de bacterias productoras de esta sustancia como microorganismos probióticos puede ser de gran importancia en la industria alimentaria ya que la producción de este compuesto puede contribuir a la prevención de la descomposición de alimentos ocasionada por bacterias Gram positivas.

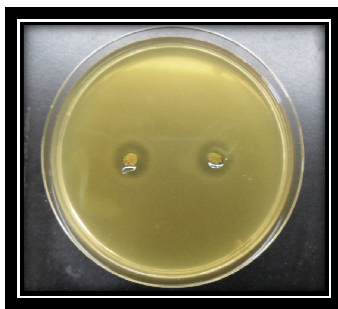


Figura 9: Fotografía de los halos de inhibición obtenidos en la cepa *B. cereus* mediante la técnica “difusión en agar” cuando se empleó como antimicrobano el SLC de *Lc. lactis* ATCC 11454.

3.3. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o peroxidasas NADH dependientes (Condon, 1987). La ausencia de catalasas, en este tipo de bacterias, que eliminen el H₂O₂ generado en presencia de oxígeno, provoca la acumulación del mismo en el medio, pudiendo ejercer una acción bactericida frente a otros microorganismos presentes en el mismo entorno. La acción inhibitoria del H₂O₂ se atribuye a su efecto altamente oxidante, produciendo la peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (Dahl *et al.*, 1989).

Dado que las doce cepas de BAL incluidas en este trabajo mostraron actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram negativos, como es el caso de la inhibición de *P. fluorescens* y *Aeromonas* spp., que no son sensibles a bacteriocinas, en este apartado se estudió la producción de H₂O₂, otro compuesto con actividad antimicrobiana frente a microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos. La identificación de bacterias productoras de H₂O₂ se realizó por una parte mediante un método cualitativo en el que simplemente consideramos a las cepas de BAL como productoras o no productoras de H₂O₂ y por otra se realizó un ensayo en el que se cuantificó la producción de H₂O₂ por las cepas de BAL en medio de cultivo TSB-YE. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Podemos observar que según el método cualitativo, descrito por Eschenbach *et al.*, (1989) (véase Materiales y Métodos), todas las cepas de BAL excepto dos [*E. faecalis* (1354) y *Lb. paracasei* (ATCC 27092)] fueron productoras de H₂O₂ (Tabla 11). Sin embargo, cuando se procedió a cuantificar el H₂O₂ producido por las cepas de BAL en medio TSB-YE al finalizar su periodo de crecimiento, constatamos que también la cepa *E. faecalis* (1354) produjo H₂O₂ en niveles similares al resto de las cepas. Este hecho podría deberse a las diferentes condiciones de cultivo (medio sólido

MRS y medio líquido TSB-YE) a las que se sometieron las cepas de BAL en los dos experimentos (cualitativo y cuantitativo respectivamente). Sin embargo, en la cepa *Lb. paracasei* (ATCC 27092) no se detectó producción de H₂O₂ en ninguna de las dos condiciones lo que implicaría que dicha producción es característica de esta cepa bacteriana y no de la especie a la que pertenece ya que la otra cepa de la misma especie *Lb. paracasei* (34) si generó H₂O₂.

En cuanto a los niveles de producción todas las cepas, excepto la no productora, generaron entre 6 y 8 µg/ml de H₂O₂, siendo la cepa *Ln. mesenteroides* (875) la que tuvo mayor producción. Estos valores de producción son similares a los observados por Aslim y Kilic (2006) en cepas del género *Lactobacillus*.

Con estos resultados no podemos confirmar que la actividad antimicrobiana observada en las cepas de BAL frente a los microorganismos patógenos utilizados sea exclusivamente por la producción de H₂O₂. No obstante la generación de este compuesto por cepas bacterianas probióticas puede ser beneficiosa. De hecho, además del papel que juega el H₂O₂ como conservante en los alimentos, datos clínicos indican su capacidad para erradicar la vaginosis bacteriana asintomática. Por todo ello la FAO/WHO, (2002) en la consulta sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, ha aconsejado la administración oral de lactobacilos productores de H₂O₂ como microorganismos probióticos.

Tabla 11: Producción de H₂O₂ por las cepas de BAL valorado por dos métodos, uno cualitativo en donde se define a la cepa como productora (+) o no productora (-) de H₂O₂ y otro cuantitativo en donde se cuantifica el H₂O₂ generado.

Cepas de BAL	Producción H ₂ O ₂	
	Método cualitativo	Método cuantitativo (µg/ml)
<i>Lactococcus lactis</i>		
ATCC 11454	+	6,79
660	+	6,40
<i>Enterococcus faecalis</i>		
189	+	6,79
297	+	6,79
888	+	6,73
1076	+	7,40
1354	-	6,81
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
875	+	8,00
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
ATCC 53103	+	7,03
<i>Lactobacillus paracasei</i>		
ATCC 27092	-	0,00
34	+	6,86
<i>Lactobacillus casei</i>		
ATCC 393	+	7,03

Los resultados presentados corresponden a la media aritmética de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

Como control negativo se valoró la producción de H₂O₂ por ambos métodos en medio sin inocular.

4. Resistencia al tránsito gastrointestinal

La capacidad de las bacterias para sobrevivir y crecer en un nicho determinado depende de las condiciones biológicas y físico-químicas del ecosistema en particular. En este sentido, la capacidad de resistencia a un pH bajo, al jugo intestinal y a las sales biliares es de gran importancia en la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal. Por este motivo, estas características se consideran un requisito esencial a la hora de seleccionar cepas bacterianas como probióticas.

Partiendo de estas premisas hemos realizado una serie de ensayos *in vitro* simulando condiciones del tracto gastrointestinal con objeto de evaluar la capacidad de supervivencia de las doce cepas de BAL estudiadas en este trabajo.

4.1. Resistencia al tránsito gástrico

En este apartado se procedió a estudiar la resistencia al jugo gástrico que es una de las primeras propiedades estudiadas al seleccionar cepas probióticas, ya que el bajo pH del estómago y la acción antimicrobiana de la pepsina proporcionan una barrera efectiva para la entrada de la bacteria en el tracto intestinal (Holzapfel *et al.*, 1998).

Con objeto de determinar el grado de supervivencia de las doce cepas de BAL al tránsito gástrico se llevó a cabo un estudio *in vitro* siguiendo el protocolo descrito por Charteris, (1998b) (véase Materiales y Métodos). El ensayo se realizó en soluciones, que simulan el jugo gástrico, preparadas a pH 2, 2,5 y 3 respectivamente, empleando como control una solución amortiguadora fosfato-salina a pH 7. Asimismo, se realizó un experimento en donde se adicionó leche desnatada de vaca (*Skim milk*, Oxoid) al jugo gástrico simulado a pH 2 con objeto de estudiar el posible efecto protector de la leche sobre la viabilidad de las bacterias a ese pH (véase Materiales y Métodos).

Los resultados de viabilidad obtenidos a diferentes tiempos, en las soluciones gástricas preparadas a los distintos valores de pH, se expresaron como log ufc/ml y han sido recogidos en la Tabla 12.

- A un pH 2, once de las doce cepas de BAL estudiadas mostraron un comportamiento idéntico y no tuvieron ninguna capacidad de resistencia en estas condiciones de acidez. A los 45 minutos de comenzar el experimento, únicamente la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) mostró tolerancia a este pH, incluso al cabo de 3 horas donde su viabilidad sólo disminuyó tres órdenes de magnitud con respecto al inicio del ensayo.

- Cuando el experimento se desarrolló a pH 2,5, se observó una mayor variabilidad de resultados dependiendo de la cepa estudiada. Exceptuando a la cepa *Ln. mesenteroides* (875) que no fue viable a este pH, podemos clasificar al resto de las cepas en tres grupos en función de su viabilidad a pH 2,5: alta, intermedia y baja.

- Con una alta viabilidad se incluyeron a las dos cepas pertenecientes a la especie *Lc. lactis* (660 y ATCC 11454) puesto que sólo en estas dos cepas se obtuvieron células viables a las 3 horas del inicio del experimento. En la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) únicamente se observó un descenso de medio orden de magnitud en su viabilidad durante todo el ensayo, mientras que en la cepa 660 la disminución de viabilidad al finalizar el experimento fue de unos cuatro órdenes de magnitud.

- Con una viabilidad intermedia se agrupó a todas las cepas bacterianas que presentaron células viables a los 90 minutos pero que no mostraron viabilidad a las 3 horas. Dentro de este grupo, la cepa con una mayor tolerancia a este pH fue la cepa *Lb. rhamnosus*, ya que a los 45 minutos su viabilidad descendió menos de un orden de magnitud aunque a los 90 minutos el descenso fue mayor (tres órdenes y medio de magnitud). Un comportamiento similar a esta cepa, aunque con un mayor descenso de células viables en los primeros 45 minutos, fue mostrado por tres cepas de *E. faecalis* (297, 888 y 1076). En este

caso, las tres cepas sufrieron una disminución de viabilidad entre cuatro y casi seis órdenes de magnitud a los 90 minutos.

▪ Dentro del grupo de baja viabilidad se incluyeron a las cepas que no mostraron células viables a los 90 minutos pero si a los 45 minutos. En este sentido, la cepa *Lb. paracasei* (ATCC 27092) fue la que mayor viabilidad mostró, al no observarse un descenso en el número de células viables en esos 45 minutos. La cepa *Lb. casei* (ATCC 393) también mostró una aceptable viabilidad a los 45 minutos ya que solo hubo un descenso de menos de dos órdenes de magnitud. El resto de cepas bacterianas pertenecientes a este grupo corresponde a dos cepas de *E. faecalis* (189 y 1354) y una cepa de la especie *Lb. paracasei* (cepa 34). En estos tres casos hubo una disminución en la viabilidad en los primeros 45 minutos de entre tres y medio y cuatro órdenes de magnitud.

• En cuanto el ensayo llevado a cabo a pH 3, pudimos observar en todos los casos una alta tolerancia a este pH, ya que en ningún caso se produjo en su viabilidad un descenso de un orden de magnitud durante las tres horas que duró el experimento.

Cabe destacar que la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) fue la cepa que sorprendentemente mejor resistió el medio ácido. De modo general, se asume que las cepas bacterianas del género *Lactococcus* no son capaces de sobrevivir en el sistema digestivo al no resistir las condiciones de bajo pH del estómago y la presencia de sales biliares. Sin embargo, nuestros resultados, similares a los obtenidos por Kimoto *et al.*, (1999) utilizando otra cepa de *Lc. lactis* con potencialidad probiótica, sugieren que algunas especies de *Lactococcus* son capaces de resistir esas condiciones hostiles y sobrevivir a bajos valores de pH. De este modo, estos resultados junto con los obtenidos en varios trabajos, sugieren que cepas bacterianas del género *Lactococcus* podrían estar presentes en el tracto gastrointestinal humano o animal (Gruzza *et al.*, 1992; Grahn *et al.*, 1994; Schlundt *et al.*, 1994; Klijn *et al.*, 1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos pensar que de manera general las cepas de BAL estudiadas podrían resistir su paso por el estómago.

Aunque, las cepas no muestren tolerancia a pH 2, exceptuando la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454), se ha descrito que el rango de pH más habitual en el que oscila el jugo gástrico está comprendido entre 2,5 y 3,5 (Holzapfel *et al.*, 1998). De hecho, aunque el pH del estómago en determinadas situaciones puede llegar a 1, en la mayoría de los ensayos se utiliza como referencia pH 3 (Lankaputhra y Shah, 1995). En este sentido, las doce cepas de BAL estudiadas presentaron una excelente viabilidad a pH 3 y aunque observemos distintos grados de supervivencia a pH 2,5 la presencia de componentes alimenticios en el estómago podría tener un efecto protector en los microorganismos actuando como amortiguadores de pH o como inhibidores de enzimas proteasas digestivas (Conway *et al.*, 1987; Charteris *et al.*, 1998b; Wang *et al.*, 1999; Zarate *et al.*, 2000). Así, cuando se adicionó leche al jugo gástrico preparado a pH 2 se produjo un aumento en el pH de 2 a 4,7 por su efecto amortiguador de pH. En este caso se observó una excelente viabilidad de todas las cepas de BAL, no habiendo ninguna disminución en el número de viables a lo largo de las 3 horas.

Puesto que todas las cepas bacterianas son viables a pH 3, ninguna de ellas debería ser excluida como posible microorganismo probiótico, aunque su supervivencia no sea muy alta a un pH inferior, ya que la viabilidad de las bacterias, a igualdad de pH, podría ser mayor en condiciones fisiológicas que en las soluciones *in vitro* en las que se llevan a cabo los ensayos (Conway *et al.*, 1987).

Tabla 12: Estudio de la viabilidad, en las doce cepas de BAL, expresada como log ufc/ml a distintos tiempos y a diferentes valores de pH durante la simulación del tránsito gástrico.

Cepas de BAL	Control				pH 2				pH 2.5				pH 3			
	0 min	45 min	90 min	180 min	0 min	45 min	90 min	180 min	0 min	45 min	90 min	180 min	0 min	45 min	90 min	180 min
<i>Lactococcus lactis</i>																
ATCC 11454	7,30	7,36	6,09	7,32	7,00	5,83	5,54	4,63	6,99	7,00	6,65	6,48	7,14	6,89	6,97	6,83
660	8,43	8,36	8,58	8,70	8,33	0	0	0	7,86	7,03	5,30	3,70	8,62	7,78	7,83	7,74
<i>E. faecalis</i>																
189	7,96	8,19	8,07	7,92	8,30	0	0	0	8,46	4,23	0	0	8,58	8,55	9,50	8,50
297	8,20	8,27	8,22	8,11	8,60	0	0	0	8,60	6,30	3,65	0	9,00	8,98	8,95	8,35
888	8,13	8,03	8,09	7,22	8,25	0	0	0	8,46	4,41	2,70	0	8,58	8,47	8,48	8,34
1076	8,08	8,07	8,09	8,15	8,04	0	0	0	8,65	5,24	4,72	0	8,57	8,38	8,44	8,47
1354	8,36	8,32	8,37	8,44	8,51	0	0	0	9,30	5,67	0	0	8,80	8,38	8,30	8,24
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>																
875	7,80	7,73	8,00	7,85	7,62	0	0	0	7,81	0	0	0	7,58	6,94	6,95	6,80
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>																
ATCC 53103	8,55	8,42	8,48	8,33	7,97	0	0	0	8,38	7,69	4,90	0	8,33	7,54	7,55	7,92
<i>Lactobacillus paracasei</i>																
ATCC 27092	8,35	8,19	8,37	8,33	7,34	0	0	0	8,05	8,24	0	0	8,30	7,62	7,92	8,00
34	7,83	8,00	7,90	7,96	8,30	0	0	0	8,56	3,70	0	0	8,11	8,29	7,93	7,62
<i>Lactobacillus casei</i>																
ATCC 393	8,60	8,51	8,49	8,57	8,10	0	0	0	8,56	6,80	0	0	8,53	8,54	8,38	8,34

Los resultados presentados corresponden a la media aritmética de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

4.2. Resistencia a las sales biliares

La acción enzimática y el pH ácido del estómago no son los únicos impedimentos con los que se encuentran los microorganismos para poder llegar vivos al intestino. Dado que las sales biliares son el obstáculo más importante para las bacterias una vez se encuentran en el intestino, la tolerancia a las mismas se considera un factor imprescindible para que las bacterias probióticas puedan ejercer su actividad metabólica y llevar a cabo la colonización en el intestino delgado del hospedador (Bezkorovainy, 2001).

Por este motivo, y con objeto de descartar de futuros estudios aquellas cepas bacterianas que no cumplieran este requisito por no poder ser empleadas como probióticas, nos propusimos estudiar la tolerancia de las doce cepas de BAL a diferentes concentraciones de sales biliares.

En la Tabla 13 se muestran los resultados de viabilidad obtenidos (expresados en log ufc/ml) cuando se incubaron las doce cepas de BAL en presencia de sales biliares al 0,1; 0,2 y 0,4% respectivamente (véase Materiales y Métodos).

En general, se observó que todas las cepas de BAL mostraron una buena tolerancia en presencia de sales biliares. Cuando el ensayo se llevó a cabo a una concentración de sales biliares del 0,1 %, la mayoría de las cepas bacterianas excepto las dos cepas de *Lc. lactis* (660 y ATCC 11454) y la cepa de *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103) no solo fueron viables al finalizar las tres horas que duró el ensayo sino que en todas ellas hubo un ligero crecimiento, aunque inferior a un orden de magnitud. Un comportamiento similar tuvo lugar en las cepas cuando se aumentó la concentración de sales biliares al 0,2%. Por último, se realizó el ensayo a una concentración de sales biliares del 0,4%, y aun a esta concentración, el descenso en su viabilidad no alcanzó un orden de magnitud excepto en las dos cepas de *Lc. lactis* (cepas 660 y ATCC 11454) cuya viabilidad disminuyó un orden y orden y medio de magnitud respectivamente. Incluso a esta concentración, en dos cepas, una de la especie *E. faecalis* (cepa 297) y otra

perteneciente a la especie *Lb. paracasei* (cepa 34) se detectó crecimiento al finalizar el ensayo.

Las sales biliares tienen una potente actividad antimicrobiana debido a su capacidad para disolver las membranas celulares. Sin embargo, algunos microorganismos pueden reducir los efectos de las sales biliares mediante la producción de enzimas hidrolíticas (BSH_s). Estas actividades enzimáticas han sido descritas en especies de bacterias que pueden formar parte de la microbiota intestinal (Tanaka *et al.*, 1999), por lo que una posible explicación en nuestro trabajo a la tolerancia de las sales biliares en las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Enterococcus*, géneros bacterianos habituales del intestino, podría ser la presencia de estas enzimas hidrolíticas aunque algunas de las cepas se hayan aislado de alimentos. Sin embargo, el hecho de que en el trabajo descrito por Tanaka *et al.*, (1999) se hayan encontrado cepas aisladas de intestino sin estas enzimas, plantea la existencia de otros mecanismos de resistencia a las sales biliares que permitan conseguir la supervivencia de los microorganismos en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, no se ha observado la presencia de estas enzimas en la especie *Lc. lactis* que no es una especie habitual en el tracto gastrointestinal. Este hecho podría explicar que en nuestro trabajo las dos especies de *Lc. lactis* sufran una disminución en su viabilidad un poco mayor que en el resto de las cepas. Sin embargo, para el género *Lactococcus* se ha descrito la existencia de otros mecanismos como sistemas de transporte dependientes de ATP que podrían ser los responsables de la tolerancia a las sales biliares por parte de este género bacteriano (Yokota *et al.*, 2000). De hecho, en un estudio llevado a cabo por Kimoto *et al.*, (1999) lactococos de origen lácteo mostraron una tolerancia a las sales biliares comparable a lactobacilos de origen intestinal.

Como consecuencia, a partir de los resultados obtenidos, se decidió no descartar ninguna de las cepas bacterianas como potencialmente probióticas al resistir concentraciones de hasta 0,4 % de sales biliares durante tres horas y se continuó con todas ellas el estudio de su supervivencia en el tracto intestinal.

Tabla 13: Estudio de la viabilidad en las doce cepas de BAL, expresada como log ufc/ml a distintos tiempos en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares.

Cepas de BAL	Tiempo (min)	Control	% de sales biliares		
			0,1	0,2	0,4
<i>Lactococcus lactis</i>					
ATCC 11454	0	8.24	8.20	8.10	7.95
	90	8.56	8.10	7.80	7.05
	180	9.00	8.07	6.72	6.47
660	0	8.17	8.27	8.23	7.97
	90	8.41	8.06	7.50	7.35
	180	8.61	7.96	6.95	6.92
<i>Enterococcus faecalis</i>					
189	0	7.66	7.70	7.68	7.66
	90	8.25	8.20	7.95	7.33
	180	9.00	8.11	8.06	7.24
297	0	8.33	8.23	8.31	8.34
	90	8.68	8.41	8.28	8.26
	180	9.42	8.99	8.58	8.83
888	0	7.48	7.81	7.78	7.90
	90	8.24	8.04	7.92	7.52
	180	8.58	7.98	8.00	7.78
1076	0	8.05	7.90	7.94	7.78
	90	8.40	8.23	8.04	7.46
	180	8.62	8.40	7.95	7.35
1354	0	8.43	8.42	8.52	8.31
	90	8.83	8.48	8.31	8.30
	180	9.26	9.00	8.34	8.09
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>					
875	0	8,10	8,16	8,22	8,06
	90	8,24	8,20	8,30	7,78
	180	8,38	8,35	8,38	7,66
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>					
ATCC 53103	0	7.44	8.00	7.90	8.01
	90	7.65	7.75	7.60	7.93
	180	8.26	7.86	7.40	8.05
<i>Lactobacillus paracasei</i>					
ATCC 27092	0	7.65	7.86	7.26	7.90
	90	7.98	8.13	8.00	7.55
	180	8.16	8.00	8.05	7.10
34	0	7.97	8.12	7.51	7.87
	90	8.01	8.12	8.22	7.94
	180	8.08	8.36	7.97	7.94
<i>Lactobacillus casei</i>					
ATCC 393	0	8.00	8.06	8.00	7.92
	90	8.06	8.18	8.00	7.88
	180	8.19	8.03	8.08	7.86

Los resultados presentados corresponden a la media aritmética de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

4.3. Resistencia a la pancreatina

Además de resistir la presencia de las sales biliares, los microorganismos probióticos necesitan sobrevivir al jugo pancreático en el intestino delgado para poder ejercer sus efectos beneficiosos en el hospedador.

Con objeto de determinar si nuestras cepas de BAL son resistentes al tránsito intestinal se realizó un experimento de acuerdo con el procedimiento descrito por Charteris *et al.*, (1998b) (véase Materiales y Métodos). Cabe señalar que los resultados obtenidos mediante este método podrían ser bastante próximos a la realidad ya que en el estudio llevado a cabo por del Piano *et al.*, (2008) en el que comparó la supervivencia de lactobacilos al jugo pancreático artificial con el obtenido directamente de humanos, no se observaron diferencias significativas en su tolerancia.

Los resultados de viabilidad expresados como log ufc/ml durante las cuatro horas que duró el ensayo se recogen en la Tabla 14. Como se puede observar, las doce cepas de BAL toleraron la presencia de pancreatina (mezcla de diversas enzimas digestivas) a pH 8 durante todo el ensayo. En la mayor parte de las cepas, la pérdida de células viables o no superó el medio orden de magnitud o bien mantuvieron el número de células viables a lo largo de las cuatro horas que duró el experimento. Únicamente en dos cepas pertenecientes a la especie *E. faecalis* (cepas 297 y 1354) su viabilidad disminuyó entre medio orden y un orden de magnitud respectivamente.

Todas las cepas de este trabajo toleraron la presencia de jugo pancreático y como se mostró en los apartados anteriores fueron ácido-tolerantes a pH 3 y a las sales biliares al 0,4%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores donde muy pocas de las cepas ácido-tolerantes aisladas de diferentes fuentes fueron excluidas como potenciales probióticos basándose en su tolerancia a las sales biliares y a las enzimas pancreáticas (Pennacchia *et al* 2004; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008a). De este modo, se procedió a continuar el estudio de la potencialidad probiótica con las doce cepas de BAL sin excluir ninguna por la falta de resistencia al tránsito gastrointestinal.

Tabla 14: Estudio de la viabilidad en las doce cepas de BAL, expresada como log ufc/ml a distintos tiempos en presencia de pancreatina.

Cepas de BAL	Tiempo (min)	Control	Pancreatina
<i>Lactococcus lactis</i>			
ATCC 11454	0	8.22	8.24
	120	8.33	8.00
	240	8.21	7.93
660	0	8.45	8.27
	120	8.36	8.34
	240	8.42	8.48
<i>Enterococcus faecalis</i>			
189	0	8.32	8.25
	120	8.37	8.39
	240	8.41	8.46
297	0	8.41	8.30
	120	8.37	8.16
	240	8.31	7.49
888	0	8.47	8.80
	120	8.45	8.94
	240	8.39	9.00
1076	0	8.26	8.12
	120	8.31	8.70
	240	8.48	8.75
1354	0	8.73	8.92
	120	8.76	8.62
	240	8.80	7.83
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
875	0	8.88	8.97
	120	8.86	8.27
	240	8.77	8.17
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			
ATCC 53103	0	7.55	7.71
	120	7.43	7.40
	240	7.60	7.10
<i>Lactobacillus paracasei</i>			
ATCC 27092	0	8.32	8.37
	120	8.35	8.21
	240	8.36	7.97
34	0	8.19	8.27
	120	8.21	8.24
	240	8.26	8.26
<i>Lactobacillus casei</i>			
ATCC 393	0	7.85	7.65
	120	7.96	7.63
	240	7.63	7.69

Los resultados presentados corresponden a la media aritmética de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

5. Características tecnológicas

Cuando se suplementan productos lácteos fermentados con microorganismos probióticos se debería estudiar, no solo los efectos beneficiosos potenciales que tienen esas cepas para la salud del consumidor, sino también, su uso como cultivos iniciadores o cultivos iniciadores adjuntos en la elaboración de alimentos. De este modo, se pretende que las bacterias probióticas, además de ejercer su efecto beneficioso en el interior del consumidor, modifiquen características de importancia tecnológica (organolépticas, textura, etc.) de los propios productos donde están incluidos con objeto de enriquecer y mejorar la calidad final de los mismos. Por esta razón, hemos realizado una serie de estudios (presencia de determinadas actividades enzimáticas, acidificación en leche y actividad proteolítica) en las doce cepas de BAL con potencialidad probiótica que nos permitan establecer algunas de sus características tecnológicas.

5.1. Actividades enzimáticas

La presencia de determinadas actividades enzimáticas en BAL incluidas en productos lácteos puede jugar un papel importante en la industria al contribuir en el proceso de elaboración de los propios productos. Por este motivo, en este apartado se estudiaron, en las doce cepas de BAL, distintas actividades enzimáticas, la mayoría con gran importancia tecnológica, implicadas en el metabolismo de los lípidos, aminoácidos, proteínas y carbohidratos. La presencia de algunas de estas enzimas, además de un interés tecnológico, puede contribuir de un modo beneficioso en la salud del consumidor favoreciendo la digestión de los alimentos en el intestino o por el contrario asociarse a una posible virulencia en el hospedador.

Los resultados del perfil enzimático de cada cepa bacteriana estudiada con el sistema semicuantitativo Api-Zym se muestran en la Tabla 15.

En primer lugar, se evaluó la presencia de enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos: Esterasa (C4), esterasa-lipasa (C8) y lipasa (C14). En todas las cepas estudiadas pertenecientes a la especie *E. faecalis* o al género *Lactobacillus* se detectaron la mayoría de estas actividades enzimáticas con valores entre 2 y 3 (Tabla 15). Únicamente todas las cepas de *E. faecalis* mostraron ausencia o muy baja actividad esterásica (C4) con unos valores comprendidos entre 0 y 1, hecho que se ha observado también en otros estudios de *E. faecalis* aislados de diferentes tipos de quesos (Ogier y Serror, 2008).

Con respecto a las cepas pertenecientes a la especie *Lc. lactis* (660 y ATCC 11454), mostraron valores para las actividades esterásicas algo más bajos que los mostrados por las especies anteriores y que estuvieron comprendidos entre 1 y 2. Por último, en la cepa *Ln. mesenteroides* (cepa875), sólo se detectó la presencia de la enzima esterasa lipasa (C8). Cabe destacar que los resultados obtenidos con estas dos especies (*Lc. lactis* y *Ln. mesenteroides*) para estas enzimas coinciden con los obtenidos en otros estudios (Herrerros *et al.*, 2003) en cepas bacterianas de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* también aisladas de productos lácteos, más concretamente de quesos elaborados con leche de cabra.

La presencia de este tipo de enzimas en nuestras cepas de BAL puede ser positivo a nivel tecnológico si dichas cepas se emplearan como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos, ya que como resultado de estas actividades enzimáticas se produce un incremento en la concentración de ácidos grasos libres, contribuyendo de este modo al desarrollo del aroma del producto final (McSweeney y Sousa, 2000).

Otras enzimas estudiadas mediante la tira Api-Zym fueron las proteasas tripsina y α -quimotripsina. La ausencia de actividad tripsinásica podría ser valorado como algo positivo para las cepas bacterianas que van a ser empleadas como cultivos iniciadores o probióticos en la industria alimentaria, debido a que esta proteasa podría estar implicada en la patogenicidad de algunos microorganismos (Tanner *et al.*, 1985). En este sentido, hay que resaltar que únicamente dos cepas de *E. faecalis* (cepas 189 y 297) y una cepa de *Lb.*

paracasei (cepa 34) expresaron actividad tripsinásica aunque a muy bajos o bajos niveles (valores entre 1-2).

Por el contrario, la presencia de actividad α -quimotripsinásica fue detectada a niveles intermedios y altos (entre 3-5) en la mayoría de las cepas estudiadas, con la excepción de la cepa de *Ln. mesenteroides* (cepa 875) y una cepa de *E. faecalis* (cepa 297) con valores de 1 y 0 respectivamente.

La presencia de actividades aminopeptidásicas, es una importante característica tecnológica para cepas de BAL que se pretenden usar como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos (Prost y Chamba, 1994). La acción de enzimas como leucina, valina y cistina arilamidasa puede contribuir a la generación de aromas en el queso como consecuencia de la liberación de determinados aminoácidos.

En este sentido, como podemos observar en la Tabla 15, en todas las cepas de BAL se detectó la presencia de las enzimas leucina y valina arilamidasa con unos valores comprendidos entre 1 y 3 excepto en las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* que mostraron la máxima actividad (5 unidades) para la enzima leucina arilamidasa.

En referencia a la actividad cistina arilamidásica, ésta o no fue detectada o si lo fue con valores de 1 unidad para la mayoría de las cepas incluidas en este trabajo.

La importancia que tienen estas enzimas en cuanto a la contribución al aroma de los quesos se ha visto reflejada en el trabajo descrito por Prost y Chamba, (1994) donde se observó que en procesos de maduración con lactobacilos deficientes en aminopeptidasas, los quesos fueron más amargos que aquellos elaborados con una cepa de *Lb. helveticus* que mostró valores de estas actividades similares a las que obtuvimos en este trabajo con nuestras cepas (Tabla 15).

Tabla 15: Actividades enzimáticas valoradas de 0 a 5 unidades de acuerdo a la intensidad de color obtenidos con las doce cepas de BAL mediante el sistema Api-Zym a 37°C.

Cepas de BAL	Enzimas testadas ^a																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Lactococcus lactis</i> ATTC 11454	2 ^b	1	2	0	5	3	3	0	2	5	2	0	0	0	0	4	0	0	0
660	2	1	2	0	5	2	2	0	2	5	2	0	0	0	3	4	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> 189	0	3	3	1	4	1	2	1	2	3	2	0	0	0	4	1	1	0	0
297	1	2	2	2	0	3	1	2	0	3	4	2	0	0	2	3	1	0	0
888	0	3	3	0	3	1	2	1	3	3	2	0	0	0	3	3	0	0	0
1076	0	2	2	0	4	1	3	1	3	3	2	0	0	0	3	3	0	0	0
1354	1	2	2	0	3	1	2	0	3	3	2	0	1	0	2	3	1	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 875	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	4	0	0	1	5	0	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	2	3	3	0	5	5	3	1	2	3	3	0	4	0	1	5	0	0	3
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 27092	2	2	3	0	5	5	2	1	1	3	4	0	4	0	4	2	0	0	0
34	2	2	2	2	5	5	2	1	1	3	3	0	4	0	5	4	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	3	3	3	0	5	5	2	1	5	5	4	0	5	0	5	0	0	5	0

Los resultados obtenidos corresponden a la media de dos experimentos independientes.

^aEnzimas estudiadas: 1-Esterasa (C4); 2-Esterasa lipasa (C8); 3-Lipasa (C14); 4-Tripsina; 5- α -Quimotripsina; 6-Leucina arilamidasa; 7-Valina arilamidasa; 8-Cistina arilamidasa; 9-Fosfatasa alcalina; 10-Fosfatasa ácida; 11-Naphtol-AS-BI-phosphohidrolase; 12- α -galactosidasa; 13- β -galactosidasa; 14- β -glucuronidasa; 15- α -glucosidasa; 16- β -glucosidasa; 17-N-acetil- β -glucosaminidasa; 18- α -manosidasa; 19- α -fucosidasa.

^bActividad: 5= muy alta, 4= alta, 3= intermedia, 2= baja, 1= muy baja, 0= ausente.

En este estudio también se investigó la presencia de las enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. La fosfatasa ácida es esencial para la hidrólisis de fosfopéptidos (Fox y McSweeney, 1996) detectándose en nuestro trabajo valores de actividad intermedios y altos para esta enzima (entre 3-5) en todas las cepas estudiadas. Los valores fueron más altos que los obtenidos para la fosfatasa alcalina en la mayoría de las cepas. En trabajos llevados a cabo por otros autores se obtuvieron resultados similares (Herreros *et al.*, 2003; Menéndez *et al.*, 2001).

En relación con la presencia de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos en nuestras cepas de BAL, hay que señalar que la actividad prácticamente no apareció, en cinco de las ocho enzimas investigadas (α -galactosidasa, β -glucuronidasa, N-acetyl- β -glucosaminidasa, α manosidasa y α -fucosidasa) en todas las cepas de BAL estudiadas.

La ausencia de actividad β -glucuronidásica puede ser beneficiosa en el uso potencial de estas cepas en productos lácteos bien como cultivos iniciadores, probióticos o ambas cosas, al haberse relacionado la presencia de esta actividad enzimática con el cáncer de colon al favorecer la conversión de precarcinogénicos en carcinogénicos (Gill y Rowland, 2002). En este sentido, hay que resaltar que esta enzima no fue detectada en ninguna de las cepas de BAL analizadas.

La ausencia de N-acetil- β -glucosaminidasa también podría considerarse como positivo, ya que su presencia se ha relacionado con la capacidad de degradación de glicoproteínas del mucus intestinal (hidrólisis de la mucina). (Hoskins y Boulding, 1981). Únicamente se detectó la presencia de esta enzima y a muy bajos niveles (1unidad) en tres cepas de *E. faecalis* (cepas 189, 297 y 1354).

En cuanto a las tres enzimas restantes de las cinco mencionadas anteriormente, la actividad α -galactosidásica únicamente se detectó en una cepa de *E. faecalis* (cepa 297) y en la cepa de *Ln. mesenteroides* (cepa 875). Las actividades α -manosidásica y α -fucosidásica se detectaron únicamente en las cepas *Lb. casei* ATCC 393 (5 unidades) y *Lb. rhamnosus* ATCC 5303 (3 unidades) respectivamente.

Otra de las enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, la β -galactosidasa, tiene una gran importancia en la industria láctea tanto en su uso como cultivos iniciadores o probióticos. Este hecho se debe a que esta enzima hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa contribuyendo por un lado a la acidificación de productos lácteos y aliviando, por el otro, la intolerancia a la lactosa en personas con deficiencia en esta enzima. Además, esta enzima, también puede llevar a cabo reacciones de transgalactosilación dando lugar a la formación de galactooligosacáridos (GOS) como producto final. Como se menciona en la introducción, los GOS no son digeridos por el hombre pero si por determinadas bacterias produciéndose una estimulación del crecimiento y colonización de bifidobacterias en el intestino humano (Mitsuoka, 1990; Sako *et al.*, 1999). En este sentido hay que resaltar que todas las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* mostraron una alta actividad de esta enzima (valores entre 4-5)

Por último, la mayoría de las cepas de BAL estudiadas mostraron actividad para la enzima β -glucosidasa en un rango entre 3 y 5. Sin embargo, se observó una mayor variabilidad en la actividad enzimática de la α -glucosidasa, enzima que cataliza el paso final de la digestión de los carbohidratos, detectándose valores altos (entre 4-5) para las cepas de *Lb. paracasei* (34 y ATCC 27092), *Lb. casei* y una cepa de *E. faecalis* (cepa 189).

5.2. Actividad acidificante

La capacidad de acidificación de las bacterias ácido lácticas es una de las propiedades más importantes a la hora de poder emplearlas como cultivos iniciadores en los productos lácteos. La producción de ácido contribuye a la formación de la cuajada, la expulsión del suero, la solubilización del calcio micelar y, además, a la textura del producto.

Por estas razones, se ha estudiado en las doce cepas su capacidad de acidificación tanto en leche desnatada de oveja como de vaca a 30 y 42°C, con objeto de determinar si podrían cumplir las funciones de cultivos iniciadores en

la elaboración de productos a partir de estos tipos de leche. Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 16.

De acuerdo a lo propuesto por Cogan *et al.*, 1997 para que una BAL presente buenas propiedades como *starter* debe reducir el pH de la leche de su valor normal (6,6) a 5,3 en 6 horas. En nuestro caso, ninguna de las cepas de BAL incluidas en este trabajo alcanzó ese valor de pH a ese tiempo en ninguno de los dos tipos de leche (oveja y vaca) ni a ninguna de las dos temperaturas ensayadas (30 y 42°C). No obstante, en la elaboración de la mayoría de quesos artesanales elaborados en España, una acidificación más lenta también es aceptable considerándose suficiente una bajada de pH hasta valores de 5,1 en 24 horas (Delgado *et al.*, 2002). En este sentido, siete de las doce cepas de BAL [*Lc. lactis* (660 y ATCC 11454), *E. faecalis* (297 y 1354), *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103), *Lb. paracasei* (ATCC 27092) y *Lb. casei* (ATCC 393)] alcanzaron valores inferiores a dicho pH en 18 horas cuando se incubaron a 30°C tanto en leche de oveja como en leche de vaca, aunque en este último tipo de leche la cepa *Lb. paracasei* (ATCC 27092) no alcanzó el pH 5,1 mencionado anteriormente.

Cuando el ensayo tuvo lugar a 42°C en leche de oveja, se pudo observar que únicamente una cepa de *E. faecalis* (189) mostró una acidificación algo mayor que a 30°C, que tres cepas [*E. faecalis* (297), *Ln. mesenteroides* (875) y *Lb. paracasei* (ATCC 27092)] tuvieron la misma capacidad acidificante que a 30°C y que en el resto de las cepas la acidificación fue menor a esa temperatura aunque a las 6 horas se detectaran en algunos casos una acidificación algo mayor que a 30°C.

En cuanto al ensayo realizado en leche de vaca a 42°C, solo dos cepas (*E. faecalis* (189) y *Ln. mesenteroides* (875)) mostraron una capacidad acidificante ligeramente mayor que a 30°C, mientras que en el resto de las cepas una menor acidificación tuvo lugar en este tipo de leche a esta temperatura al igual que ocurría en la leche de oveja.

En este sentido, dado que las cepas de BAL mostraron, de forma general, una mejor capacidad acidificante a 30°C que a 42°C nos lleva a pensar que en caso de emplearse como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos, éstos

no deberían ser sometidos a altas temperaturas de cocción, siendo recomendado su uso en la elaboración de quesos duros o prensados como Cheddar o Gouda (García-Ruiz, 1996).

Atendiendo a los datos obtenidos, tampoco se observaron grandes diferencias entre cepas bacterianas de origen humano y lácteo, en cuanto a capacidad acidificante se refiere. De hecho, cepas como *Lb. rhamnosus* (ATCC 5303) y *Lb. paracasei* (ATCC 27092), de origen humano, acidificaron mejor que otras cepas de origen lácteo en determinadas condiciones. Por ejemplo, si comparamos las dos cepas de *Lb. paracasei* (cepa ATCC 2702 de origen humano y cepa 34 de origen lácteo) cuando el ensayo se realizó en leche de oveja a 30°C se puede observar que la cepa de origen humano acidifica mejor que la de origen lácteo. Con este resultado, por tanto, podemos pensar que estas cepas de origen humano, quizás, podrían incluirse en productos lácteos sin presentar problemas de adaptabilidad durante las condiciones de fermentación de dichos productos.

En conclusión, dependiendo del tipo de producto en el que se quiera incluir las cepas y las condiciones que éste necesite para su elaboración, podríamos tener en cuenta a alguna de estas siete cepas de BAL [*Lc. lactis* (ATCC 11454 y 660), *E. faecalis* (297 y 1354), *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103), *Lb. paracasei* (ATCC 27092) y *Lb. casei* (ATCC 393)], que fueron las que mejor capacidad acidificante tuvieron a 30°C, para su empleo como cultivo iniciador o cultivos adjuntos en la fermentación de productos lácteos. En este sentido, cepas bacterianas de la especie *Lc. lactis* han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos (Delgado *et al.*, 2002). Sin embargo, a la hora de utilizar cepas como cultivos iniciadores no sólo se debe estudiar la capacidad acidificante sino que son necesarios un mayor número de estudios. Entre ellos, cabe destacar la producción de aromas deseables y en este sentido debemos recordar que todas nuestras cepas poseían actividad valina y leucina arilamidásica (Tabla 15) que al degradar aminoácidos pueden contribuir al aroma final del producto. Asimismo, todas las cepas del género *Lactobacillus* y *Enterococcus* presentaron actividad esterasa lipásica C8 y lipásica C14 que recordemos que podrían provocar un aumento en la concentración de ácidos

grasos libres contribuyendo al desarrollo del aroma en el producto. No obstante, una mayor profundización en ese tipo de estudios sería necesaria antes de emplear estas cepas como cultivos iniciadores o cultivos iniciadores adjuntos en la elaboración de productos lácteos.

5.3. Actividad proteolítica

Las BAL son capaces de hidrolizar proteínas de la leche y de liberar una gran variedad de péptidos, entre los que se encuentran los llamados péptidos bioactivos, que son aquellos que presentan actividades biológicas beneficiosas para la salud como pueden ser los opioides, inmunoestimuladores, antitrombóticos, etc. (Baqueiro, 2004).

Dado que la mayor aplicación de los microorganismos probióticos son los productos lácteos y que nueve de las doce cepas son de origen lácteo, se estudió la capacidad de proteólisis de las doce cepas de BAL tanto en leche de vaca como en leche de oveja. Para ello se crecieron las cepas de BAL en placas agar-leche (véase Materiales y Métodos) durante 10 días. Los resultados se recogen en la Tabla 16.

Como se puede observar, únicamente dos cepas pertenecientes a la especie *E. faecalis* (cepas 297 y 1354) mostraron actividad proteolítica, observándose halos con un radio de 2 cm en ambos casos. En el resto de las cepas no se detectó ningún signo de degradación de caseína durante los 10 días que duró el experimento. No obstante, debemos señalar que con anterioridad (véase apartado 5.1) se describió que todas las cepas poseían actividad valina y leucina arilamidásica por lo que aunque éstas no sean capaces de degradar caseína, podrían llevar a cabo una proteólisis secundaria de péptidos contribuyendo al sabor y al aroma de los alimentos. En el trabajo llevado a cabo por Bergamini, (2009) en el que estudió la actividad proteolítica de cepas probióticas en el proceso de elaboración de quesos, se observó que ninguna de las cepas de BAL empleadas como probióticas manifestaron una actividad proteolítica sobre las caseínas en la matriz alimentaria. Sin embargo, todas ellas manifestaron un

impacto significativo en la proteólisis secundaria incrementando el nivel de aminoácidos libres. Este estudio confirma la idea de que a pesar de la ausencia de actividad proteolítica sobre la caseína, la presencia de otras actividades proteolíticas, no estudiadas en profundidad en este trabajo, podrían contribuir a mejorar la calidad del producto y, de este modo podrían ser utilizadas como cultivos adjuntos a otras cepas bacterianas empleadas como cultivos iniciadores.

Tabla 16: Actividad acidificante expresada mediante el valor de pH, de las doce cepas de BAL, a las 6 y 18 horas a 30 y 42°C en leche de vaca y oveja. Actividad proteolítica de las mismas cepas en ambos tipos de leche a los 10 días de incubación a 30°C, se define a la cepa con actividad (+) o carente de ella (-).

Cepas de BAL	Leche de oveja				Leche de vaca				Actividad proteolítica	
	30°C		42°C		30°C		42°C		Leche de oveja	Leche de vaca
	6h	18h	6h	18h	6h	18h	6h	18h		
<i>Lactococcus lactis</i>										
ATCC 11454	6,25	4,89	6,18	6,05	6,45	4,83	6,55	6,29	-	-
660	5,90	4,49	5,93	5,62	6,51	4,48	6,63	4,93	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>										
189	6,43	6,06	6,56	5,80	6,53	6,06	6,60	5,96	-	-
297	6,31	5,00	5,65	5,02	6,43	4,90	6,31	5,13	+	+
888	6,18	5,35	5,77	5,41	6,36	5,31	6,30	5,41	-	-
1076	6,16	5,34	5,75	5,42	6,33	5,29	6,30	5,40	-	-
1354	6,24	4,60	5,60	5,00	6,30	4,48	6,07	4,83	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>										
875	6,56	5,55	6,45	5,54	6,42	5,50	6,37	5,38	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>										
ATCC 53103	6,48	4,61	6,44	6,46	6,42	4,43	6,47	6,33	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>										
ATCC 27092	5,82	4,45	5,98	5,60	6,44	5,33	6,38	5,94	-	-
34	6,11	5,36	5,74	5,36	6,37	5,38	6,28	5,43	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>										
ATCC 393	6,51	5,05	6,42	6,53	6,42	4,43	6,37	5,12	-	-

Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 5%.

6. Estudios de bioseguridad en cepas de BAL con potencial probiótico

El hecho de que un gran número de cepas de BAL se hayan empleado a lo largo de la historia en la elaboración de alimentos sin entrañar riesgos en la salud humana y animal permite aceptar, de modo general, a las BAL como microorganismos raramente patogénicos y, en algunos casos incluso, especies que pertenecen a determinados géneros como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* han alcanzado el estatus GRAS. No obstante, en contadas ocasiones y bajo determinadas condiciones, algunas cepas de *Lactobacillus* han sido asociadas a casos de bacteremia (Saxelin *et al.*, 1996). Además, se ha descrito que algunos géneros de BAL, como *Enterococcus*, podrían poseer factores de virulencia perjudiciales para la salud humana (Jett *et al.*, 1994) aunque su consumo regular en alimentos fermentados no ha demostrado entrañar riesgos para la salud.

La utilización de estas bacterias, empleadas como probióticas en altas dosis, ha dado lugar a la necesidad de reevaluar minuciosamente la seguridad de estas cepas en el consumo humano o animal. De este modo y con objeto de establecer la bioseguridad de nuestras cepas para su uso como probióticas, se realizaron una serie de estudios encaminados a determinar la posible patogenicidad de las mismas.

6.1. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica que poseen determinados microorganismos es considerada un factor de virulencia bastante frecuente entre microorganismos patógenos. La presencia de esta actividad constituye un mecanismo del microorganismo para conseguir disponibilidad de hierro, causando, por consiguiente, anemia en el hospedador.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 17, únicamente tres cepas de BAL (cepas 189, 888 y 1076) todas ellas pertenecientes a la especie *E. faecalis*, mostraron actividad β -hemolítica (Figura 10). En varios estudios se ha

comprobado que la mayoría de cepas bacterianas con actividad β -hemolítica del género *Enterococcus*, pertenecen a las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Jett *et al.*, 1994; Mundy *et al.*, 2000). No obstante, Semedo *et al.*, (2003a) han descrito que la actividad β -hemolítica parece ser una característica bastante común en todo el género *Enterococcus* al encontrarse cepas con dicha actividad en otras especies, tales como, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. raffinosus*.

Aunque las especies del género *Enterococcus* son habituales del tracto gastro-intestinal de humanos y animales, se ha establecido que la actividad hemolítica de estos microorganismos podría ser considerada como un factor potencial de virulencia.

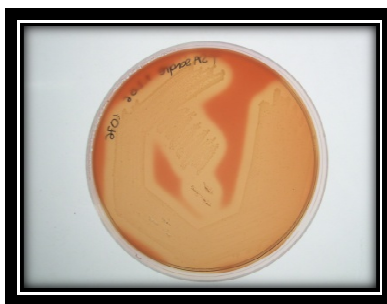


Figura 10: Fotografía que muestra la actividad β -hemolítica correspondiente a la cepa *E. faecalis* (1076) en medio sólido agar sangre (véase Materiales y Métodos).

6.2. Actividad gelatinásica

La gelatinasa es una enzima metaloproteasa dependiente de zinc que tiene la capacidad de hidrolizar colágeno entre otros sustratos proteicos.

Dado que se ha sugerido que la presencia de esta actividad en microorganismos probióticos, podría ser perjudicial para la salud del hospedador por el posible daño que puede provocar en las matrices proteicas extracelulares del tejido intestinal (Ouwehand y Salminen, 2003), nos propusimos estudiar la presencia o ausencia de esta actividad en nuestras doce cepas de BAL.

Como se observa en la Tabla 17, solamente dos cepas (cepas 297 y 1354) presentaron actividad gelatinásica (Figura 11). Al igual que en el estudio de la

actividad hemolítica, las cepas que presentaron esta actividad también pertenecen a la especie *E. faecalis*, aunque ninguna de las cepas β -hemolíticas mostraron actividad gelatinásica.

Este factor de virulencia se ha encontrado principalmente en enterococos aislados de infecciones en humanos, no siendo frecuente la presencia de la actividad gelatinásica en enterococos aislados de diferentes alimentos (Ben Omar *et al.*, 2004; Mannu *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2001). No obstante, existen algunos estudios que, al igual que en nuestro caso, se detecta la presencia de dicha actividad en enterococos de origen alimenticio (Eaton y Gasson, 2002; Semedo *et al.*, 2003b). En este sentido, en el trabajo llevado a cabo por Lopes *et al.*, (2006) con enterococos aislados de productos lácteos se observó que un 90% de las cepas bacterianas eran productoras de gelatinasa, hecho que no debería ser sorprendente debido a que la presencia de esta enzima capacita a la bacteria para degradar caseína en alimentos ricos en esta proteína, como la leche y quesos. De hecho si se recuerdan los resultados obtenidos en el apartado 5.3. (Actividad Proteolítica) las cepas de *E. faecalis* (297 y 1354) con actividad gelatinásica positiva fueron las únicas en las que se detectó actividad proteolítica en leche de oveja y de vaca.

En este sentido, aunque la producción de gelatinasa se considere como un factor de virulencia en diversos microorganismos, los estudios epidemiológicos realizados, únicamente han sugerido la asociación entre la producción de la enzima y la virulencia de los enterococos (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003).

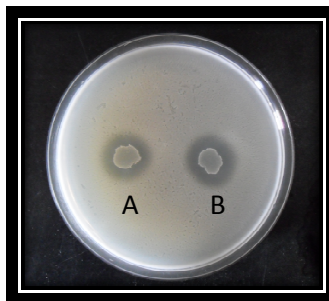


Figura 11: Fotografía que muestra la actividad gelatinásica de las cepas *E. faecalis* 1354 (A) y 297 (B) en medio TSA suplementado con gelatina al 3% (véase Materiales y Métodos).

6.3. Actividad hialuronidásica

El ácido hialúronico es un mucopolisacárido con función estructural presente en los tejidos corporales (Lanyi, 1987). La presencia de hialuronidasas en algunos microorganismos facilita la invasión de tejidos por los mismos, por lo que, al igual que con las gelatinasas, la presencia de esta enzima también puede ser considerada como un factor potencial de virulencia (Ouwehand y Salminen, 2003). Con objeto de seleccionar que cepas son seguras para el consumo, es necesario evaluar la presencia o ausencia de actividad hialuronidásica en nuestras doce cepas de BAL.

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran que ninguna de las doce cepas de BAL estudiadas manifestó actividad hialuronidásica alguna (Tabla 17). De hecho, dos cepas (cepas 660 y 875), pertenecientes a las especies *Lc. lactis* y *Ln. mesenteroides* respectivamente no fueron capaces de crecer en el medio de cultivo utilizado, cuando se suplementó con un 3% de ácido hialurónico (véase Materiales y Métodos), incluso cuando el medio de cultivo fue MRSA o TSA y no el BHIA empleado inicialmente.

Aunque la presencia de actividad hialuronidásica no es muy conocida entre *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Ouwehand y Salminen, 2003), es una característica relativamente común entre el género *Enterococcus* (Franz *et al.*, 1999). De hecho, a pesar de que diversos estudios llevados a cabo por diferentes autores no han podido mostrar evidencias de que la actividad hialuronidásica juegue un papel en la patogénesis de enterococos, la comparación con otros microorganismos patógenos permite especular que esta enzima también podría tener un papel en la virulencia en cepas bacterianas de este género, contribuyendo a su diseminación por el tejido conectivo. (Jett *et al.*, 1994; Mundy *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001; Kayser, 2003). No obstante, cabe reseñar que en nuestro caso, ninguna de las cepas correspondientes a la especie *E. faecalis* manifestaron esta actividad.

6.4. Actividad mucinolítica

La superficie de la mucosa intestinal está cubierta por una capa de mucus de aspecto gelatinoso que está constituida principalmente por una glicoproteína denominada mucina. La función principal de esta capa mucoide es la protección de las células epiteliales intestinales frente a agentes tales como, la acidez del medio, la pepsina del jugo gástrico o la invasión de microorganismos patógenos (Smith y Podolsky, 1986; Smith *et al.*, 1995). Por este motivo, la producción de enzimas con capacidad para degradar la mucina, en algunas bacterias se ha considerado como un posible factor de virulencia para un gran número de microorganismos patógenos como *Vibrio cholerae*, *Bacteroides fragilis*, *Shigella spp.*, *Helicobacter pylori* y *Yersinia enterocolitica*.

En nuestro caso, las doce cepas de BAL estudiadas en este trabajo no mostraron capacidad para degradar mucina (Tabla 17) en ninguna de las condiciones estudiadas, con o sin glucosa al 3% (véase Materiales y Métodos). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Ruseler-van Embden, 1995; Norin *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2000) ya que ninguno de ellos encontró actividad mucinolítica en las cepas de BAL estudiadas.

Con objeto de valorar la fiabilidad del método se empleó una muestra bacteriana fecal como control positivo. En este caso se observó un halo de degradación alrededor del crecimiento bacteriano en las placas sin glucosa pero no en las placas suplementadas con un 3% de glucosa. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Zhou *et al.*, 2000 que sólo observó actividad mucinolítica, en la muestra fecal empleada como control positivo, cuando la mucina era la única fuente de carbono, mientras que en presencia de glucosa al 3% no detectó dicha actividad enzimática.

Dado que la capacidad de los microorganismos para degradar mucina puede facilitar la invasión a la mucosa por otros microorganismos patógenos o agentes tóxicos, la presencia de esta actividad enzimática es desaconsejable en cepas de BAL que se vayan a emplear como probióticas aunque éstas no tengan ningún otro factor de virulencia.

Tabla 17: Estudio en las cepas de BAL de la presencia de actividades enzimáticas con potencial virulento implicadas en la seguridad de la salud humana. Se define a la cepa con actividad (+) o carente de ella (-).

Cepas de BAL	Actividad				
	hemolítica	gelatinásica	hialuronidásica	mucinolítica	
				+ Glc ¹ (3%)	- Glc (3%)
<i>Lactococcus lactis</i>					
ATTC 11454	-	-	-	-	-
660	-	-	N.C ²	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>					
189	+	-	-	-	-
297	-	+	-	-	-
888	+	-	-	-	-
1076	+	-	-	-	-
1354	-	+	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>					
875	-	-	N.C	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>					
ATCC 53103	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>					
ATCC 27092	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>					
ATCC 393	-	-	-	-	-

¹Glc: Glucosa

²N.C. No hubo crecimiento de la cepa de BAL en el medio empleado.

Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente.

6.5. Producción de ácido D-láctico

Mediante el proceso de la fermentación, las BAL producen ácido láctico (isómeros D o L) por la acción de enzimas lactato deshidrogenasas (LDH). Aunque la presencia de D-láctico en alimentos, generalmente no provoca efectos adversos en la mayor parte de la población humana adulta, si lo puede hacer en determinados grupos de individuos. Se ha descrito que la ingestión de alimentos que contienen altas cantidades de D-láctico por parte de personas con una mala absorción intestinal asociada al síndrome del intestino corto o al fallo intestinal entre otros, puede desencadenar una acidosis metabólica que como consecuencia puede dar lugar a encefalopatía (Stolberg *et al.*, 1982; Uribarri *et al.*, 1998). Por otra parte, los recién nacidos cuyo hígado no está suficientemente desarrollado, tampoco pueden metabolizar eficazmente el ácido D-láctico ingerido o internamente generado por la microbiota intestinal.

Por estas razones, aunque la producción de este isómero D no sea un verdadero factor de virulencia si puede ser un factor de riesgo potencial implicado en la salud del consumidor, y ha de ser valorada en la caracterización de bacterias con potencial probiótico.

En la Tabla 18 se recogen los valores obtenidos en la producción de cada una de los isómeros (D y L- láctico) y en la producción de ácido láctico total por nuestras cepas de BAL.

Como se puede observar todas las cepas de BAL estudiadas, a excepción de la cepa *Lb. casei*, generaron ácido láctico en cantidades iguales o superiores a 1,5 g/l durante su periodo de crecimiento en el medio de cultivo TSB con extracto de levadura (véase Materiales y Métodos). La mejor productora de ácido láctico con 5,44 g/l fue la cepa 297 que pertenece a la especie *E. faecalis*, seguida a continuación, de la cepa 34 de *Lb. paracasei* con 3,11 g/l. A excepción de la cepa 34, en general todas las cepas de *E. faecalis* generaron más cantidad de ácido láctico que las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

En cuanto a la producción de los isómeros L o D, hay que destacar que todas nuestras cepas con excepción de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* (cepa 875) produjeron L-láctico como forma principal. La ratio D/L fue en todos los casos, exceptuando la cepa 875, menor de 0,15 y por tanto favorable al isómero L. Sin embargo, la cepa *Leuconostoc mesenteroides* (cepa 875) cuya ratio D/L fue 3,43, generó D-láctico como forma primaria. Este resultado coincide con lo descrito en diferentes publicaciones en los que se define a *Leuconostoc mesenteroides* como una especie productora de ácido D-láctico (Garvie, 1986; Carr *et al.*, 2002).

La razón por la cual las cepas bacterianas producen ácido D o L-láctico como forma primaria podría deberse a que dos lactato deshidrogenasas (D- y L-LDH) pueden estar presentes en las bacterias y que la actividad de uno u otro tipo de enzima varía entre especies. De este modo, es posible que en el caso de nuestra cepa *Ln. mesenteroides* (cepa 875) se genere el ácido D-láctico desde piruvato por la acción de una D-lactatodeshidrogenasa (D-LDH), mientras que por el contrario, en el resto de cepas de BAL se genere L-láctico por la acción de una L-lactatodeshidrogenasa (L-LDH). Una actividad racemásica podría ser la responsable de las cantidades residuales de L- láctico en la cepa *Ln. mesenteroides* y de D-láctico en el resto de las cepas de BAL (Malleret *et al.*, 1998).

Sorprendentemente, la especie *Ln. mesenteroides* se encuentra en un gran número de productos lácteos y que juega un papel importante en las fermentaciones de diferentes tipos de alimentos, por lo que la alta producción de D-láctico que presenta nuestra cepa 875 como forma primaria de fermentación, hace que se nos planteen una serie de dudas en cuanto a su uso adecuado como microorganismo probiótico ya que, tal y como hemos explicado anteriormente, éste no puede ir dirigido a la población en general (Mack, 2004). De ahí que, en el informe del grupo de trabajo conjunto FAO/OMS para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos que tuvo lugar en el 2002, aconseja tener en cuenta

en el estudio de posibles factores de virulencia, la producción de ácido D-láctico por la bacteria con interés probiótico (FAO/WHO, 2002).

Tabla 18: Producción de ácido láctico en medio de cultivo TSB-YE en las cepas de BAL valorado mediante kit enzimático al inicio de la fase estacionaria (véase Materiales y Métodos).

Cepas de BAL	Producción de ácido láctico (g/l)			
	Ácido láctico total (D+L)	Ácido L-láctico	Ácido D-láctico	Ratio (D/L)
<i>Lactococcus lactis</i>				
ATCC 11454	1.463	1.390	0.073	0.052
660	1.734	1.517	0.217	0.143
<i>Enterococcus faecalis</i>				
189	2.760	2.720	0.040	0.015
297	5.443	5.370	0.073	0.014
888	2.868	2.800	0.068	0.024
1076	2.080	2.000	0.080	0.040
1354	2.843	2.770	0.073	0.026
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>				
875	2.040	0.460	1.580	3.435
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>				
ATCC 53103	1.482	1.450	0.032	0.022
<i>Lactobacillus paracasei</i>				
ATCC 27092	1.537	1.500	0.037	0.025
34	3.130	2.850	0.280	0.098
<i>Lactobacillus casei</i>				
ATCC 393	0.519	0.490	0.029	0.059

Los resultados presentados corresponden a la media de dos experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 15%.

6.6. Resistencia a antibióticos

La presencia de determinantes de resistencia a antibióticos genéticamente transferibles es una característica indeseable en las bacterias y, sobre todo, en aquellas que se pretenden incorporar en la cadena alimentaria, ya que una vez en el intestino, éstas pueden transmitir las resistencias a otros microorganismos (Netherwood *et al.*, 1999; Teuber *et al.*, 1999). Por esta razón, el estudio de la resistencia de las doce cepas de BAL frente a diferentes antibióticos es una prueba fundamental para la selección de microorganismos probióticos. En nuestro estudio, los antibióticos empleados incluyeron inhibidores de la síntesis de la pared celular (penicilina G, ampicilina y vancomicina), inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclina, gentamicina y eritromicina) e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (ciprofloxacina). Los resultados de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM_s), expresados en µg/ml, obtenidos en las doce cepas de BAL se muestran en la Tabla 19.

Algunos de estos resultados se han podido comparar con los denominados puntos de corte microbiológicos establecidos por la European Food Safety Authority (EFSA, 2008) (Tabla 20), obtenidos al estudiar la distribución de las CIM_s de determinados antibióticos en poblaciones bacterianas pertenecientes a una unidad taxonómica específica (especie o género). De este modo, la parte de la población que muestra valores superiores a los de la población normal se cataloga como resistente.

En lo que concierne a los inhibidores de la síntesis de la pared celular, todas las cepas mostraron sensibilidad a la ampicilina (CIM ≤ 1 µg/ml), valores inferiores al punto de corte microbiológico establecido por la EFSA (Tabla 20). Con respecto a la penicilina G, observamos que tres de las cepas de *E. faecalis* (cepas 189, 297 y 1354) registraron unos valores de CIM en torno a 2-3 µg/ml y que en el resto de las cepas de BAL los valores de CIM no superaron la concentración de 1 µg/ml. A pesar de que en este caso no se ha concretado el punto de corte microbiológico para estas especies, los valores bajos de resistencia

observados en todas las cepas de BAL, nos permiten deducir que las bacterias seleccionadas podrían ser sensibles a este antibiótico.

En cuanto a la vancomicina, las cepas pertenecientes al género *Lactococcus* y *Enterococcus* con la excepción de la cepa 1354 de *E. faecalis* fueron sensibles a este antibiótico al mostrar valores de CIM inferiores o iguales, al punto de corte establecido para estos microorganismos. Únicamente la cepa 1354 podría considerarse resistente al mostrar un valor ligeramente superior al punto de corte (Tablas 19 y 20). Aunque en nuestro caso, todas las cepas de *Enterococcus* estudiadas responden a la vancomicina con mayor o menor sensibilidad, en este género, se ha descrito que aunque no posean resistencia a este antibiótico podrían adquirirla al estar ésta codificada en plásmidos o transposones. Por este motivo, y ya que las cepas resistentes a este antibiótico se han relacionado con infecciones nosocómicas hospitalarias (Leclercq y Courvalin, 1997; Woodford *et al.*, 1995), antes de que estas cepas puedan ser seleccionadas como potenciales probióticas e incluirlas en alimentos, se debe demostrar que no son capaces de adquirir o transferir la resistencia a dicho antibiótico (FAO/WHO, 2002).

En cuanto al efecto de la vancomicina en las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, observamos que éstas fueron capaces de crecer en la mayor concentración de antibiótico probada ($CIM \geq 256 \mu\text{g/ml}$). La resistencia de estas bacterias a la vancomicina coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Danielsen y Wind, 2003; Coppola *et al.*, 2005) y puede responder a la ausencia de la diana molecular sobre la que actúa este antibiótico. En este sentido, se ha descrito que varias especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* poseen una resistencia intrínseca a este antibiótico como consecuencia de la modificación natural del dipéptido D-alanina-D-alanina, del peptidoglicano (diana molecular de la vancomicina en estos microorganismos) por D-alanina-D-lactato (Elisha y Courvalin, 1995). De hecho, esta variabilidad en la diana molecular, considerada como intrínseca y no transferible, ha provocado que la EFSA no haya definido el punto de corte microbiológico frente

a la vancomicina para el género *Leuconostoc* y para las especies de *Lactobacillus*.

Con respecto a los inhibidores de la síntesis de proteínas, todas las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* fueron sensibles a la eritromicina y tetraciclina. En todos los casos se obtuvieron valores de CIM ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 19) que fueron inferiores a los puntos de corte establecidos por la EFSA (Tabla 20). Entre las cepas de *E. faecalis* observamos una mayor variabilidad en los resultados obtenidos al estudiar el efecto de estos antibióticos. Las cepas 888 y 1076 fueron sensibles a la eritromicina y a la tetraciclina, ya que los valores de CIM obtenidos (CIM ≤ 3 $\mu\text{g/ml}$ y ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) fueron inferiores a los puntos de corte establecidos en 4 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabla 20). Sin embargo, las cepas 297 y 1354 fueron altamente resistentes a la eritromicina y a la tetraciclina. En ambas cepas, los resultados de sensibilidad (CIM ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ y CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) superaron ampliamente los valores de corte establecidos para cada uno de estos antibióticos (Tabla 20). Los resultados obtenidos en el estudio de la cepa 189 revelaron que es sensible a la eritromicina, aunque, en este caso, su CIM coincidió con el punto de corte establecido, y resistente a la tetraciclina mostrando una CIM ocho veces mayor que el punto de corte (Tablas 19 y 20).

En cuanto al estudio de resistencia frente a la gentamicina, la utilización de distintas concentraciones de antibiótico, reveló que las cepas de *Lc. lactis* y *Ln. mesenteroides* son sensibles ya que en todos los casos se obtuvieron valores CIM inferiores al punto de corte (Tablas 19 y 20). Sin embargo, las cepas de *E. faecalis*, y todas las cepas del género *Lactobacillus*, con una CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ se pueden considerar resistentes a este antibiótico ya que son superiores a los puntos de corte establecidos por la EFSA (Tabla 20).

En este punto debemos resaltar que, la presencia de una mayor resistencia frente a antibióticos aminoglucósidos, como la gentamicina, por especies de *Lactobacillus*, es común y ha sido también descrita por otros autores (Coppola *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). La ausencia, en estas bacterias, de sistemas de

transporte específicos para estos antibióticos puede estar detrás de este efecto (Condon, 1983).

Por último, se estudió, en las doce cepas de BAL la resistencia a ciprofloxacina, un inhibidor de la síntesis de los ácidos nucleicos. Como se muestra en la Tabla 19, las cepas pertenecientes al género *Lactococcus* y *Enterococcus* mostraron valores bajos de CIM frente a este antibiótico (≤ 2 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, todas las cepas de *Lactobacillus* mostraron unos valores altos de CIM (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) excepto la cepa de *Lb. casei* (ATCC 393) que tuvo una CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$. Aunque los resultados obtenidos no se pudieron comparar con ningún punto de corte al no haber sido establecido por la EFSA, hemos observado que nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en otros estudios (Charteris 1998a; Katla *et al.*, 2001). En este sentido, se ha sugerido que los altos valores de resistencia observados en las especies bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* podría ser debido a la presencia resistencias intrínsecas frente a quinolonas, como la ciprofloxacina, desarrollados por mecanismos todavía desconocidos (Hummel *et al.*, 2007).

No es común la utilización de bacterias del género *Enterococcus*, como bacterias probióticas. Como diversos autores han descrito, es frecuente la existencia de resistencia a diferentes antibióticos en cepas bacterianas pertenecientes a este género así como su capacidad para transferirla a especies patógenas (Eaton y Gasson, 2001; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Mathur y Singh, 2005). En este sentido, una de las resistencias transferidas más comúnmente por los enterococos y que destaca por su implicación en clínica es la resistencia a vancomicina (DeLisle y Perl, 2003). Así, se ha descrito la transferencia de esta resistencia desde los enterococos a la especie patógena *S. aureus* (Pfeltz y Wilkinson, 2004). En este sentido, y, a pesar de que únicamente una de nuestras cepas de *E. faecalis* (cepa 1354) mostró resistencia a este antibiótico (Tabla 19), los resultados obtenidos, permiten concluir que todas las cepas pertenecientes a la especie *E. faecalis* deberían ser descartadas para su uso como potencial probiótico tanto a nivel humano como animal ya que presentan resistencias frente a dos o tres antibióticos diferentes.

En cuanto a las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, se observaron resistencias frente a diferentes antibióticos: la vancomicina frente a las cepas del género *Lactobacillus* y la cepa del género *Leuconostoc*; y la ciprofloxacina y gentamicina frente a todos los lactobacilos. No obstante, estas resistencias, como ya hemos comentado, parecen ser intrínsecas a estos grupos de bacterias, por lo que “a priori”, no existe peligro de una transferencia horizontal a otros microorganismos. Además, ninguna de estas cepas mostraron resistencia frente a la eritromicina, que es la resistencia más extendida entre bacterias Gram (+) (Weisblum, 1995; Jensen *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999).

Ante esta situación y dado que las cepas de *Lactococcus lactis* son las que han mostrado sensibilidad frente a todos los antibióticos probados (Tabla 19), podemos concluir que las cepas pertenecientes a estos tres géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, podrían continuar estudiándose como potenciales probióticas, descartando las cepas de *Enterococcus*, al menos desde el punto de vista de su sensibilidad a los antibióticos.

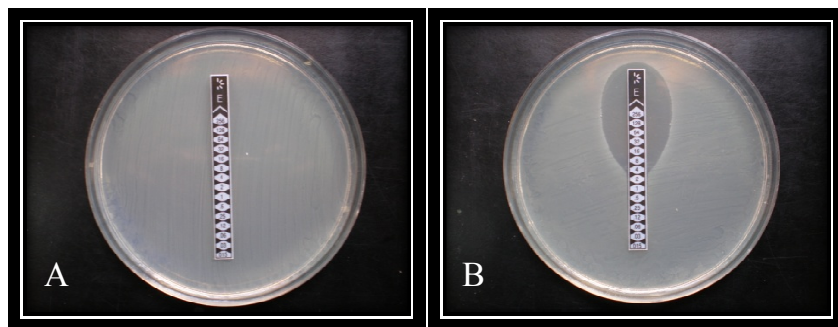


Figura 12: Fotografías del crecimiento bacteriano durante 48 h a 30°C en placas MRSA con la tira antibiótica gentamicina (M.I.C.E., Oxoid) para el estudio de resistencia a antibióticos (véase Materiales y Métodos). En las imágenes se puede observar el crecimiento de la cepa 1354 de *E. faecalis* (A) por toda la placa, lo que indicó su capacidad de crecimiento en la mayor concentración antibiótica probada (256 µg/ml). En la fotografía de la derecha se muestra el crecimiento de la cepa 189 de *E. faecalis* (B). En este caso se observó un halo de inhibición alrededor de la tira antibiótica, mostrando una CIM de 4 µg/ml.

Tabla 19: Concentración inhibitoria mínima (CIM) en µg/ml de las doce cepas de BAL a diferentes antibióticos obtenida mediante las tiras M.I.C.E.

Cepas de BAL	Antibióticos						
	Ampicilina	Penicilina G	Vancomicina	Gentamicina	Tetraciclina	Eritromicina	Ciprofloxacina
<i>Lactococcus lactis</i>							
ATCC 11454	0.5	0.5	2	16	0.12	1	2
660	0.5	0.5	2	8	0.12	0.25	2
<i>Enterococcus faecalis</i>							
189	0.75	3	3	96	16	4	0,75
297	1	2	4	64	48	≥ 256	0,375
888	0.5	1	4	64	0.06	3	0.5
1076	0.5	0.75	3	40	0.09	2	0.5
1354	0,75	3	6	64	32	≥ 256	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>							
875	0.12	0.03	≥ 256	2	0.5	0.5	≥ 32
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>							
ATCC 53103	0.5	0.12	≥ 256	32	0,25	0.5	≥ 32
<i>Lactobacillus paracasei</i>							
ATCC 27092	0.25	0.12	≥ 256	32	0.5	0.12	≥ 32
34	0.25	0.12	≥ 256	96	0.75	0.25	≥ 32
<i>Lactobacillus casei</i>							
ATCC 393	0.5	0.12	0.5	48	0.75	0,25	16

Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 15%,

Tabla 20: Puntos de corte microbiológico establecidos por la EFSA para los géneros y/o especies estudiadas en este trabajo frente a los antibióticos aquí valorados. Los valores aparecen expresados en µg/ml.

Cepas	Antibióticos				
	Eritromicina	Ampicilina	Gentamicina	Tetraciclina	Vancomicina
<i>Lc. lactis</i>	2	2	32	4	4
<i>Enterococcus</i>	4	4	32	2	4
<i>Leuconostoc</i>	1	2	16	8	N.D ²
<i>Lb. paracasei</i>	1	2	32	4	N.D
<i>Lb. rhamnosus</i>	1	4	16	8	N.D.
<i>Lactobacillus</i> (fh) ¹	1	4	16	8	N.D

¹Lactobacillus heterofermentativo facultativo. Dado que la cepa *Lb. casei* no aparece como tal en la tabla y puesto que pertenece al grupo de *Lactobacillus* facultativos heterofermentativos; los puntos de corte para esta especie fueron tomados de este grupo.

²No determinado. Punto de corte no establecido por la EFSA.

A pesar de que las doce cepas de BAL seleccionadas y estudiadas en el presente trabajo fueron capaces de sobrevivir *in vitro* bajo condiciones que simulaban el tránsito gastrointestinal, algunas de ellas no cumplieron todos los aspectos de seguridad aquí estudiados.

Aunque el beneficio probiótico de algunas cepas del género *Enterococcus* ha sido bien establecido, el uso de este género en alimentación sigue siendo un problema sujeto a polémica. El incremento de las enfermedades enterocócicas asociadas con la salud humana y la resistencia a múltiples antibióticos ha levantado preocupación en su uso como probiótico. El miedo de que genes de resistencia a agentes antimicrobianos o genes que codifican para factores de virulencia puedan ser transferidos a otras bacterias del tracto gastrointestinal contribuye a esta controversia (Franz *et al.*, 2003).

El hecho de que las cinco cepas de enterococos hayan presentado resistencia al menos frente a uno de los antibióticos probados (Tabla 21) y que además todas ellas hayan mostrado actividad hemolítica o gelatinásica (Tabla 21), nos ha obligado a descartar estos microorganismos como potencialmente prebióticos.

Por otra parte la cepa 875 perteneciente a la especie *Ln. mesenteroides* también fue descartada del estudio. En este caso, la cepa 875 produjo ácido D-láctico como forma primaria de ácido láctico. El hecho de que los alimentos probióticos que contengan este microorganismo no puedan ir dirigidos a la población en general ya que no es recomendado en lactantes y ancianos (véase apartado 6.5 “Producción de ácido D-láctico”), nos hace pensar que la utilización de este microorganismo como probiótico, podría poner en peligro la salud del consumidor.

Una vez descartadas las cepas pertenecientes al género *E. faecalis* (cepas 189, 297, 888, 1076 y 1354), además de la cepa 875, perteneciente a la especie *Ln. mesenteroides*, el trabajo de investigación, encaminado a conocer las capacidades y propiedades óptimas en el uso de estas bacterias como agentes prebióticos, se continuó con las cinco cepas más seguras para su consumo detalladas a continuación: *Lc. lactis* (ATCC 11454), *Lc. lactis* (660), *Lb. paracasei* (ATCC 27092), *Lb. paracasei* (34) y *Lb. casei* (ATCC 393), además de la cepa control *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103).

Tabla 21: Tabla resumen de los aspectos de seguridad incumplidos por algunas de las doce cepas de BAL estudiadas.

Cepas de BAL descartadas del estudio	Aspectos de seguridad			
	Resistencia a antibióticos	Actividad hemolítica	Actividad gelatinásica	Producción de ácido D-láctico como forma primaria
<i>E. faecalis</i>				
189	*Te, G	Si	No	No
297	E, Te, G	No	Si	No
888	G	Si	No	No
1076	G	Si	No	No
1354	Va, E, Te, G	No	Si	No
<i>Ln. mesenteroides</i>				
875	-	No	No	Si

*Te: Tetraciclina; G: gentamicina; E: eritromicina; Va: vancomicina

7. Capacidad de adhesión

7.1. Adherencia a células epiteliales intestinales de origen humano

Una de las propiedades más importantes que debe poseer un microorganismo con potencial probiótico es la capacidad de adherirse al tejido epitelial intestinal del hospedador, puesto que se considera un factor necesario para que pueda producirse la colonización en el intestino (Guarner y Schaafsma, 1998; Dunne *et al.*, 2001). En general, para llevar a cabo estudios de adhesión *in vitro* con microorganismos potencialmente probióticos se usa de forma habitual la línea celular Caco-2 (Bernet *et al.*, 1994) ya que expresa las características morfológicas y fisiológicas de los enterocitos humanos maduros (Zweibaum *et al.*, 1991). En este sentido, los resultados obtenidos con esta línea celular, en el estudio de la capacidad de adhesión de cepas bacterianas, muestran una alta correlación con los ensayos *in vivo* (Crociani *et al.*, 1995).

En nuestro estudio de caracterización de microorganismos probióticos se examinó la capacidad de adhesión de las seis cepas de BAL, seleccionadas en el apartado anterior, frente a células Caco-2 bajo dos condiciones: sin y con tratamiento previo con sales biliares (véase Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

El análisis microscópico de las células Caco-2 mostró que cuando se incubaban en presencia de cada una de las cepas de BAL utilizadas, éstas aparecían adheridas a la superficie celular (Figura 14). La cuantificación de la adhesión (véase Materiales y Métodos) confirmó que aunque con diferentes porcentajes, todas las cepas de BAL incluidas en este estudio fueron capaces de adherirse a la línea celular Caco-2 (Figura 13).

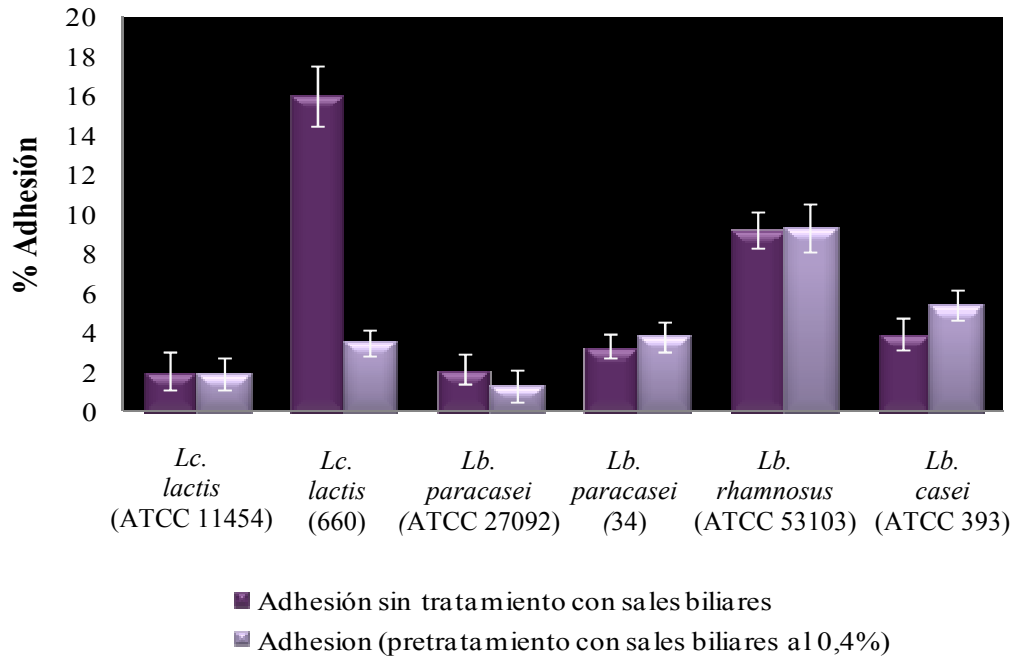


Figura 13: Capacidad de adhesión sobre la línea intestinal CaCo-2 de las seis cepas de BAL seleccionadas en el apartado anterior (7), previamente tratadas (■) o no (■) con sales biliares al 0,4% durante 4 horas. Los resultados obtenidos fueron la media de cinco experimentos independientes.

Como cepa control se utilizó la cepa ATCC 53103 de *Lb. rhamnosus* ya que corresponde a la conocida *Lb. rhamnosus* GG que es empleada habitualmente en estos estudios por su buena capacidad de adhesión (Alander *et al.*, 1999). En este sentido, los valores de adhesión obtenidos con esta cepa (9,24%) fueron muy similares a los descritos en otros trabajos (9,7%) cuando se utilizó esta misma bacteria (Elo *et al.*, 1991; Tuomola y Salminen, 1998; Botes *et al.*, 2008). Con respecto a las otras cepas de BAL utilizadas en este estudio, resalta la capacidad de adhesión de la cepa 660 de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, aislada en este trabajo, que mostró una capacidad de adhesión incluso mayor a la de *Lb. rhamnosus* y alcanzó un porcentaje de hasta el 16% sin previo tratamiento con sales biliares (Figura 13). En este sentido, Lehto y Salminen, (1997) también observaron que otra cepa de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* aislada de productos lácteos, como es nuestro caso, mostró una capacidad de adhesión mayor que la cepa *Lb. rhamnosus* GG utilizada como control. Estos resultados junto con los obtenidos en el apartado 4 (Resistencia al tránsito gastrointestinal) reafirma la

idea de que cepas bacterianas del género *Lactococcus*, habitualmente encontradas en productos lácteos, no solo pueden resistir las condiciones hostiles gastrointestinales, como hemos observado *in vitro* con nuestras cepas, sino que también pueden llegar a adherirse a células epiteliales intestinales.

Con respecto al resto de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* (*Lb. paracasei* ATCC 27092; *Lb. paracasei* 34 y *Lb. casei* ATCC 393) todas mostraron una menor capacidad de adhesión con porcentajes que oscilan entre el 2% y el 4%. Estos resultados se encuentran dentro del rango registrado para este género de bacterias que está comprendido entre el 2,3% y el 10% (Tuomola y Salminen, 1998; Forestier *et al.*, 2001; Gopal *et al.*, 2001; Bertazzoni-Minelli *et al.*, 2004; Baccigalupi *et al.*, 2005; Schillinger *et al.*, 2005; Pennacchia *et al.*, 2006).

Curiosamente, la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) fue la que menor capacidad de adhesión mostró: 2,04%, un valor muy cercano al 2,15% obtenido en la cepa *Lb. paracasei* (ATCC 27092) (Figura 13). Que las cepas con mayor y menor capacidad de adhesión (*Lc. lactis* 660 y ATCC 11454, respectivamente) pertenezcan a la misma especie, corrobora la idea de que la capacidad de adhesión es una característica particular de cada cepa bacteriana; una propuesta que ya se ha puesto de manifiesto en otros trabajos (Crociani *et al.*, 1995; Tuomola y Salminen, 1998; He *et al.*, 2001).

Al relacionar el origen de las cepas con la capacidad de adhesión, podemos establecer que nuestros resultados no revelan una mayor capacidad de adhesión en cepas bacterianas de origen humano con respecto a las de origen lácteo. De hecho, como acabamos de mencionar, el mayor porcentaje de adhesión en este estudio se ha obtenido con una cepa de origen lácteo (*Lc. lactis*, 660). Este resultado no coincide con los obtenidos en otros trabajos (Barrow *et al.* 1980; Mayra-Makinen *et al.* 1983) donde describen una especificidad en la capacidad de adhesión dependiente del origen de la cepa bacteriana. En este sentido, Mayra-Makinen *et al.*, (1983) observaron que cepas bacterianas aisladas de productos vegetales no tuvieron capacidad de adhesión en células intestinales de cerdo o ternero. Sin embargo, en estos últimos años se han descrito resultados

similares a los nuestros (Lehto y Salminen, 1997; Kimoto *et al.*, 2007) de tal modo que, cepas bacterianas de origen lácteo han mostrado una buena capacidad de adhesión sobre células epiteliales humanas.

Dado que existen estudios que indican que el paso de las bacterias por el tracto intestinal puede alterar su capacidad de adhesión (Ouwehand *et al.*, 2001) hemos estudiado, en este apartado, el efecto que las sales biliares (véase Materiales y Métodos) ejercen sobre la capacidad de adhesión de estas bacterias en las células Caco-2. Como podemos observar en la Figura 13, excepto en *Lc. lactis* (cepa 660), cuando las bacterias fueron tratadas previamente con las sales biliares, la capacidad de adhesión no se modificó significativamente. Curiosamente, la cepa 660 de *Lc. lactis* que fue la que mayor capacidad de adhesión mostró de todas las estudiadas, fue la única que se vió afectada por el tratamiento de sales biliares, disminuyendo su adhesión hasta en un 21,8 %). Este comportamiento específico observado *in vitro*, podría ser utilizado para desarrollar estrategias *in vivo* en las que modulando la acción/secreción de las sales biliares, se pueda controlar la capacidad de adhesión de esta bacteria y adaptarla, como potencial probiótico, a las necesidades específicas de cada momento.

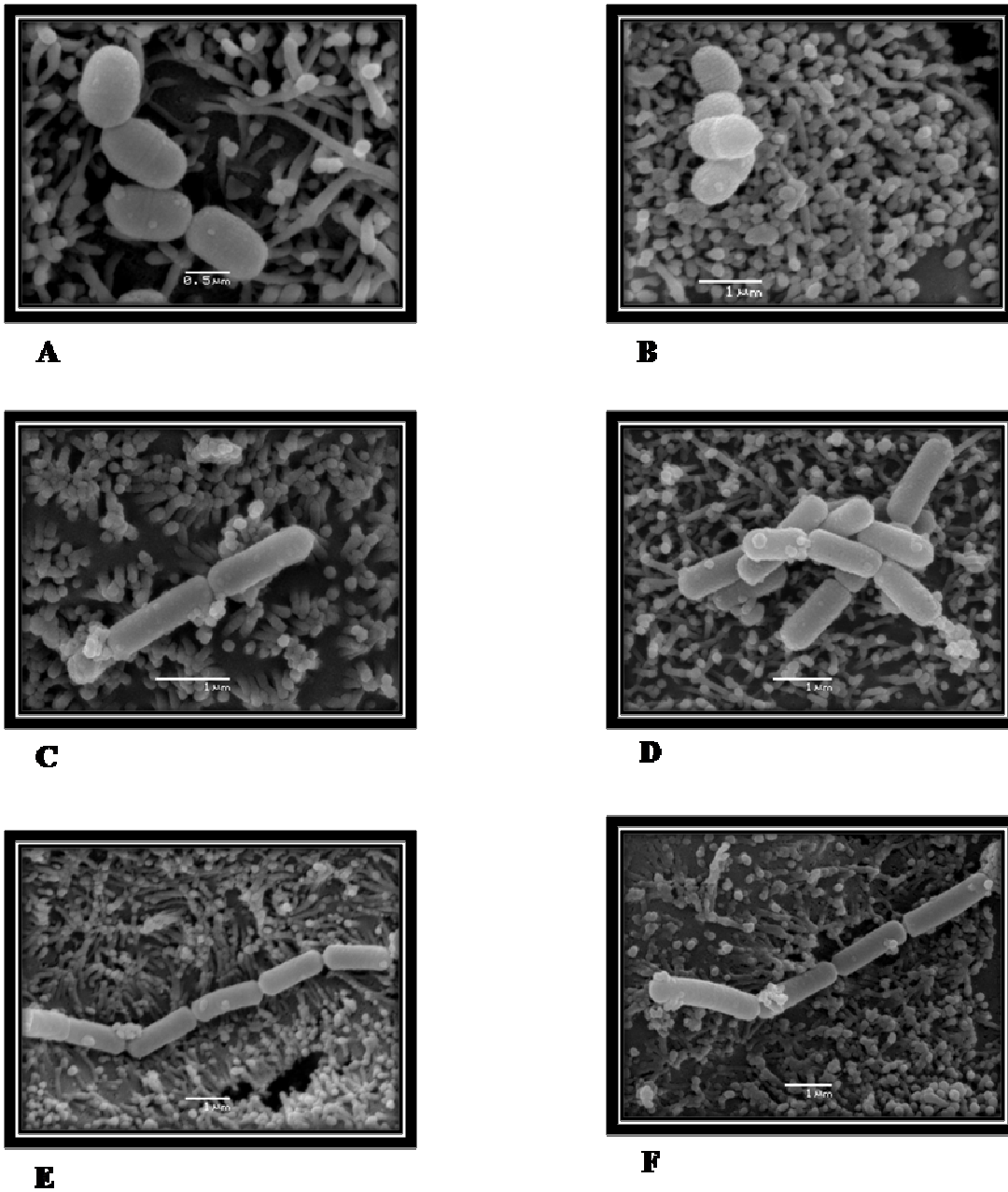


Figura 14: Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido de las cepas de BAL adheridas a las microvellosidades de las células Caco-2: A) *Lc. lactis* ATCC 11454; B) *Lc. lactis* 660; C) *Lb. paracasei* ATCC 27092; D) *Lb. paracasei* 34; E) *Lb. rhamnosus* ATCC 5303; F) *Lb. casei* ATCC 393.

7.2. Adherencia a mucus

Aunque de modo general se empleen líneas celulares de origen intestinal para el estudio de la capacidad de adhesión bacteriana, la capa de mucus que recubre los enterocitos también puede ser un sitio potencial para la colonización (Nielsen *et al.*, 1994; van der Waaij *et al.*, 1996; Mikelsaar *et al.*, 1998).

Por esta razón y con motivo de completar los estudios de adhesión intestinal, hemos investigado la capacidad de adhesión de las seis cepas de BAL a mucus obtenido del intestino de rata. También se estudio la adhesión a albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo (véase Materiales y Métodos).

Atendiendo a los resultados obtenidos en la Figura 15, se puede observar que ninguna de las seis cepas de BAL, ni siquiera la cepa *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 utilizada como control por su óptima capacidad de adhesión, mostraron una capacidad de adhesión específica a mucus de rata ya que, se adhirieron de forma prácticamente idéntica a la BSA utilizada como control negativo. En este sentido, algunos autores han descrito interacciones inespecíficas iniciales en el proceso de adhesión a mucus que podrían explicar estos resultados (Beachey, 1981).

Estos resultados difieren con los obtenidos en el apartado anterior (Adherencia a células epiteliales humanas), donde si se ha observado la adhesión específica a células Caco-2 especialmente cuando se utilizaron las cepas *Lc. lactis* 660 y *Lb. rhamnosus* lo que indica que se presentan diferencias en cuanto al tipo de adhesión de estas bacterias a mucus y células Caco-2. La existencia de receptores diferentes en las células Caco-2 y en el mucus intestinal a los que se unen las proteínas de superficie tipo adhesinas de las bacterias (Ouweland *et al.*, 1999a), puede justificar este diferente comportamiento.

No obstante, debemos resaltar que, a diferencia de los ensayos bien establecidos de adhesión a líneas celulares, los modelos actuales de estudio de adhesión a mucus son más complejos, puesto que, diferentes factores como, la edad o el estado de salud del individuo del que se obtiene el mucus, puede alterar los resultados (Kirjavainen *et al.*, 1998).

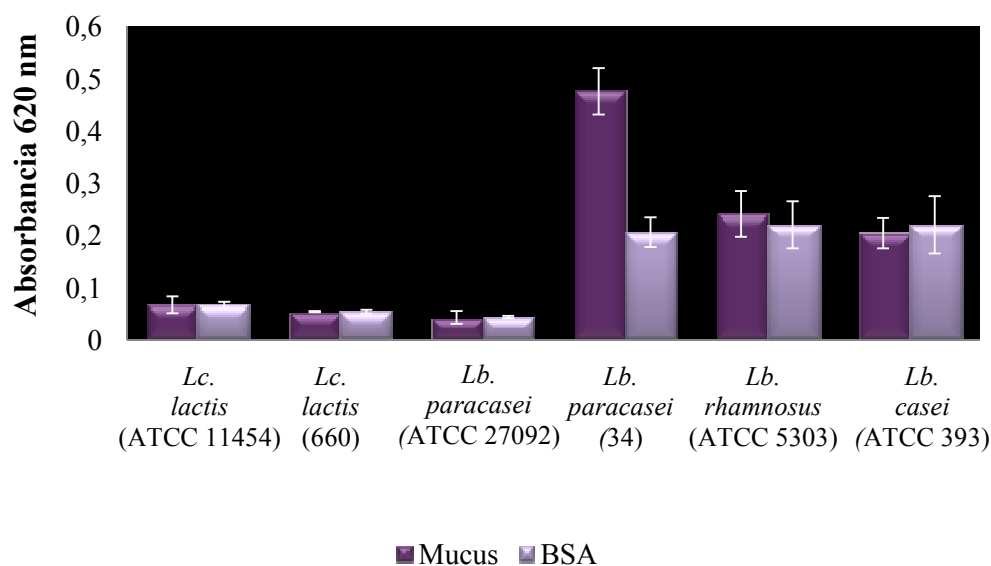


Figura 15: Adhesión de las seis cepas de BAL a mucus de rata y albúmina sérica bovina. Los valores obtenidos corresponden a los valores de absorbancia obtenidos a 450 nm de las cepas de BAL adheridas a los distintos sustratos (mucus o BSA) con una tinción de safranina (véase Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos son la media de tres experimentos independientes.

8. Formación de biofilms

Después de producirse el reconocimiento y la adhesión del microorganismo a la superficie intestinal, éste ha de utilizar otras estrategias para asegurar su anclaje de forma constante y resisitir el tránsito intestinal habitual de elementos digestivos que, dependiendo de la alimentación modifican los factores físico-químicos del entorno como pH, molaridad, etc. En este sentido, el mecanismo que tienen las bacterias para persistir a lo largo del tiempo en el intestino es la formación de biofilms. Los biofilms consisten en comunidades de diferentes microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacaridos y adheridos a una superficie, confiriendo a las bacterias una serie de ventajas que las hacen más resistentes a las condiciones hostiles del entorno que aquellos microorganismos que se encuentran en libre flotación (planctónicos) (Lasa *et al.*, 2005).

El estudio de la capacidad de formación de biofilms en las seis cepas de BAL seleccionadas y que previamente mostraron capacidad de adhesión en

células Caco-2, se llevó a cabo *in vitro* utilizando placas *microtiter* en las que se cuantificó la formación de biofilms después de tres días de incubación a 30°C en medio TSB-YE (véase Materiales y Métodos).

Atendiendo a la Figura 16 observamos que las seis cepas de BAL fueron capaces de formar biofilms, siendo las cepas *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* las que mayor capacidad mostraron.

Desde hace tiempo se ha demostrado que la formación de biofilms puede verse claramente influenciada por determinados elementos medioambientales, como por ejemplo, la composición del medio de crecimiento y en concreto la fuente de carbono (McEldowney y Fletcher, 1986, Lebeer *et al.*, 2007). En este sentido, cuando adicionamos un aporte extra de glucosa al medio (0,25%), tres de las cepas de BAL manifestaron de forma notoria una mayor formación de biofilm en presencia de glucosa, siendo este aumento mayor de 2 unidades en *Lc. lactis* (ATCC 11454) y algo inferior a 1 unidad en las cepas *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* (Figuras 16 y 17). Sin embargo, en las tres cepas de BAL restantes [*Lc. lactis* (660), *Lb. paracasei* (34) y *Lb. paracasei* (ATCC 27092)] no se detectó ningún cambio en su capacidad para formar biofilms al incrementar la concentración de glucosa con respecto a cuándo se crecieron únicamente en TSB-YE. Estos resultados, reflejados en la Figura 16, también fueron confirmados por microscopía (Figura 17) donde se observó claramente un mayor tapizado de bacterias al incrementar la concentración de glucosa en la cepa *Lc. lactis* ATCC 11454, así como una mayor intensidad de color que indica una mayor densidad bacteriana en las cepas *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*.

Una posible explicación a estos resultados podría ser que las tres cepas de BAL con una mayor capacidad de formación de biofilm, al aumentar la concentración de glucosa, empleen ésta en la formación de exopolisacáridos necesarios para constituir la matriz del biofilm y que de este modo se produzca un aumento del mismo.

Dado que ninguna de las cepas disminuyó su capacidad de formar biofilms en presencia de glucosa y que además en tres de ellas se optimizó esa capacidad, los experimentos llevados a cabo a continuación se realizaron siempre en medio

TSB-YE con 0,25% de glucosa y suplementado con el aditivo que se quiere estudiar.

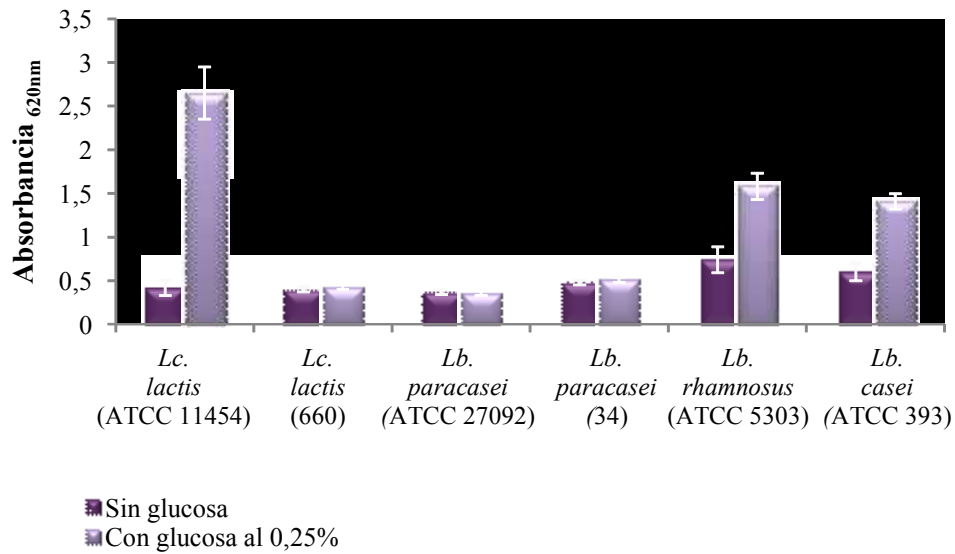


Figura 16: Formación de biofilm en las seis cepas de BAL crecidas en medio TSB-YE (■) y efecto de la adición de de glucosa (0,25%) al medio (■) después de 72 horas a 30°C de incubación. Los valores corresponden a la media de cinco experimentos independientes.

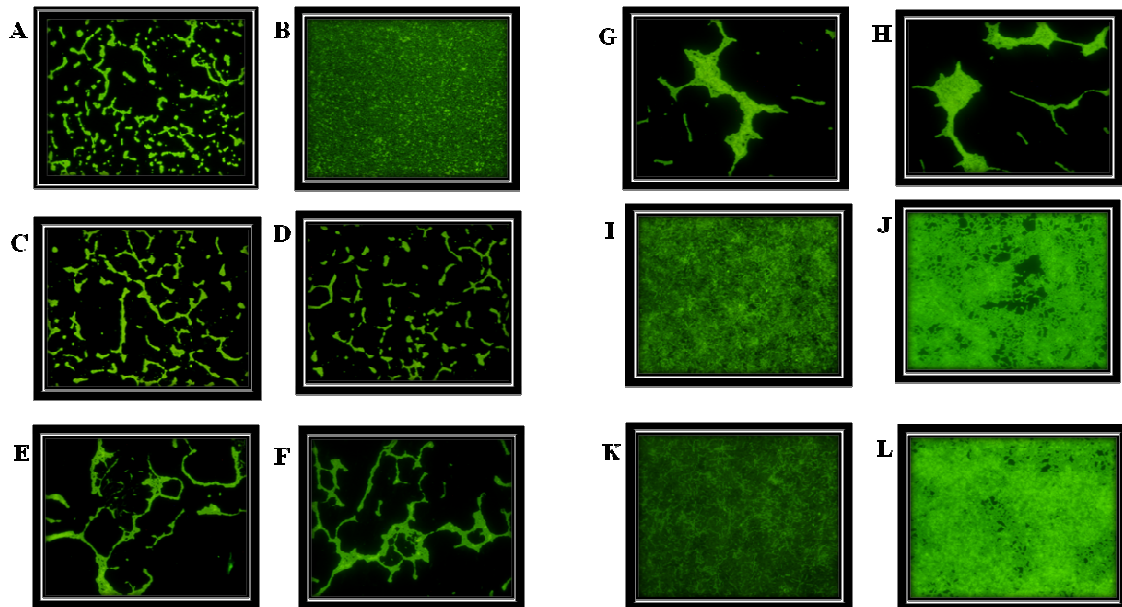


Figura 17: Fotografías obtenidas por microscopio confocal de los biofilms, marcados con el fluorocromo Syto 9, formados por las cepas de BAL en dos condiciones, con y sin el suplemento de glucosa al medio después de 72 horas de incubación en medio TSB-YE a 30°C: A y B) *Lc. lactis* ATCC 11454 sin y con glucosa respectivamente; C y D) *Lc. lactis* 660 sin y con glucosa; E y F) *Lb. paracasei* ATCC 27092 sin y con glucosa; G y H) *Lb. paracasei* 34 sin y con glucosa; I y J) *Lb. rhamnosus* ATCC 5303 sin y con glucosa; K y L) *Lb. casei* sin y con glucosa.

Determinados cationes divalentes como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} , pueden influir en la formación de biofilms a través de su efecto sobre las interacciones electrostáticas que se generan. En este estudio, se valoró la posible influencia sobre la formación de biofilms de cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} en forma de sales de cloruro cuando se suplementaron al medio TSB-YE con glucosa (Figura 18).

La presencia del ion Ca^{2+} sólo afectó a dos de las cepas (*Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*) produciendo una disminución en la formación de biofilms de más de 0,8 unidades. El ion Mg^{2+} produjo una disminución en la formación de biofilm, similar a la provocada por el Ca^{2+} , en la cepa *Lb. casei*, mientras que en la cepa de *Lb. rhamnosus* se produjo un ligero aumento en presencia de este ion. En cuanto al ion Mn^{2+} solo afectó a esta formación en dos de las seis cepas y de modo opuesto provocando un aumento en la cepa *Lb. casei* y una disminución en la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454).

En general se ha descrito que un aumento en la concentración de iones divalentes provoca un aumento en la formación de biofilms bacterianos (Turakhia y Characklis, 1989; Huang y Pinder, 1995). Sin embargo, nuestros resultados, mostraron en algunos casos, una disminución en la formación de biofilms. Un efecto negativo similar al observado en este trabajo, ha sido descrito en *Staphylococcus aureus* cuando se añadió $CaCl_2$ y $MnCl_2$ en la misma concentración que la que nosotros empleamos. En ese estudio, se observó que una proteína de superficie implicada en la formación de biofilm (proteína BAP) estaba regulada por la presencia de calcio en el medio (Arrizubieta *et al.*, 2004). El mismo efecto fue observado con $MnCl_2$ pero no con $MgCl_2$. Quizás mecanismos similares a los descritos en este microorganismo pudieran tener lugar en alguna de nuestras cepas bacterianas, de tal forma que, estos iones ejerzan su efecto a través de proteínas específicas implicadas en la formación de biofilms.

Dado que en el entorno intestinal, donde las bacterias deberán formar los biofilms, es rico en mucus y a su vez éste está compuesto mayoritariamente por glicoproteínas responsables de la viscosidad del moco, denominadas mucinas, se

evaluó la influencia de esta glicoproteína sobre la formación de biofilm. Como se muestra en la Figura 18, cinco de las seis cepas estudiadas aumentaron la formación de biofilm; *Lb. rhamnosus* con un aumento de casi cuatro veces mientras que las otras tres cepas [*Lc. lactis* (660), *Lb. paracasei* (34 y ATCC 27092) y *Lb. casei* (ATCC 393) con un ligero aumento (entre 1,2 y 1,6 veces) cuando la mucina se encuentra presente. En este sentido, resultados similares a los que nosotros observamos con la cepa *Lb. rhamnosus* (cepa control) en presencia de mucina fueron obtenidos por Lebeer *et al.*, (2007). Sin embargo, la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) mostró una disminución en la formación de biofilm en presencia de mucina. En estudios previos llevados a cabo por otros autores ya se había descrito el papel dual que puede jugar la mucina estimulando o inhibiendo la formación de biofilm en función de la cepa bacteriana estudiada (Bollinger *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 2004).

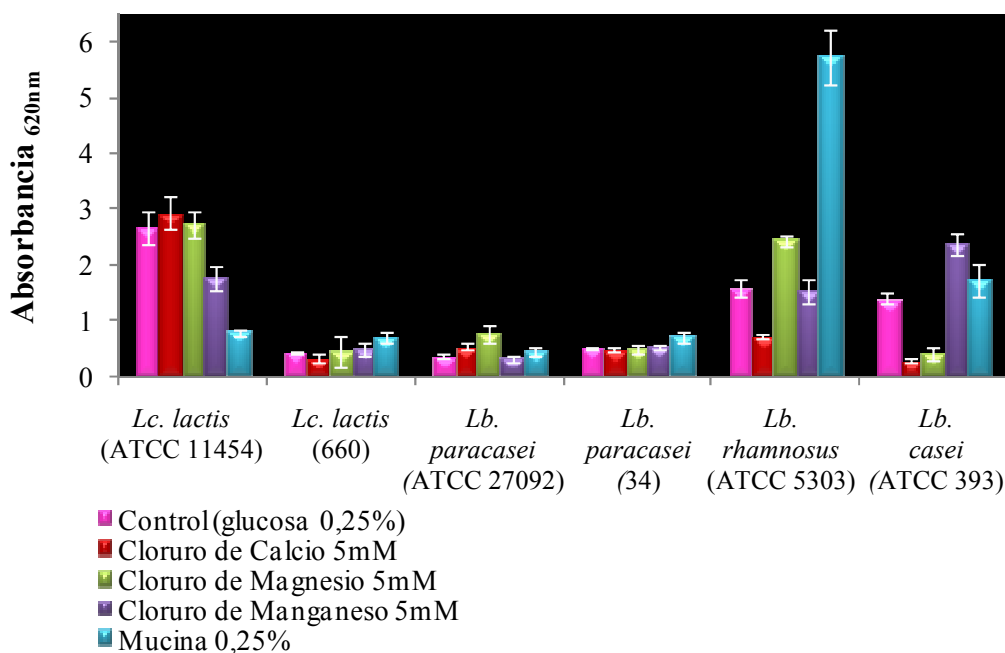


Figura 18: Efecto de la presencia de Ca^{2+} (■), Mg^{2+} (■), Mn^{2+} (■) y mucina (0,25%) (■) sobre la formación de biofilms en las cepas de BAL crecidas en medio TSB-YE durante 72 horas a 30°C. Los resultados obtenidos corresponden a la media de cinco experimentos independientes.

La formación de biofilm es un proceso complejo en el que parecen estar implicados un gran número de productos génicos. Los resultados obtenidos en el

estudio del efecto de la presencia de cationes divalentes ya sugiere la posible existencia de proteínas como BAP que podrían estar implicadas en este proceso.

Como una primera aproximación, en este estudio hemos analizado en las seis cepas de BAL la presencia o ausencia de algunos de los genes, mediante amplificación por PCR (véase Materiales y Métodos) que han sido relacionados con la formación de biofilms y en concreto:

- El gen *prtP* que codifica para una proteasa anclada en la superficie de las células. Se ha descrito que la presencia de esta proteína en la pared celular bacteriana es responsable de una mayor hidrofobicidad celular y capacidad de adhesión (Habimana *et al.*, 2007).
- El gen *cluA* que codifica para un factor sexual de agregación celular en el proceso de conjugación en *Lc. lactis*. Se ha descrito que el proceso de conjugación y la formación de biofilm, está directamente relacionada (Luo *et al.*, 2005).
- Los genes *wzb*, *epsB* y *epsC* implicados en la formación de exopolisacáridos los cuales parecen estar relacionados con la capacidad de formación de biofilm (Lebeer *et al.*, 2007).
- El gen *luxS* que codifica para la enzima S-ribosilhomocisteína liasa. Se ha observado que mutantes en este gen, se ven afectados negativamente en su capacidad de formación de biofilm (Lebeer *et al.*, 2007).
- El gen *lsp* que codifica para una proteína de alto peso molecular que está relacionada con otras proteínas de bacterias Gram (+) implicadas en la formación de biofilm, tales como la proteína Bap de *S. aureus* (Walter *et al.*, 2005).

Atendiendo a los resultados presentados en la Tabla 22, podemos establecer que todas las cepas de BAL estudiadas presentaron los genes *PrtP*, *epsB* y *luxS*. En cuanto a los genes *wzb* y *epsC* sólo fueron detectados en las cepas del género *Lactobacillus*. Sin embargo, en ninguna cepa se detectó la presencia de los genes *cluA* y *lsp*. Estos resultados abren una nueva vía de estudio molecular para establecer el papel que juegan los genes *prtP*, *epsB* y *luxS* en las seis cepas de BAL además de *wzb* y *epsC* en las cepas del género *Lactobacillus* sobre la formación de biofilm.

Tabla 22: Análisis mediante amplificación por PCR de la presencia de diferentes genes relacionados con la formación de biofilm en cepas bacterianas.

Cepas de BAL	Genes						
	<i>prtP</i>	<i>cluA</i>	<i>wzb</i>	<i>epsB</i>	<i>epsC</i>	<i>luxS</i>	<i>lsp</i>
<i>Lc. lactis</i> 660	+	-	-	+	-	+	-
ATCC 1454	+	-	-	+	-	+	-
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 5303	+	-	+	+	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092	+	-	+	+	+	+	-
34	+	-	+	+	+	+	-
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	+	-	+	+	-	+	-

(+) Presencia del gen en la cepa de BAL estudiada. (-) Ausencia del gen en la cepa bacteriana. El experimento se repitió de forma independiente dos veces.

9. Producción de citoquinas

Una de las propiedades atribuidas a los microorganismos probióticos es la modulación del sistema inmune del hospedador. Se ha descrito que las BAL contribuyen a la respuesta inmune de la mucosa intestinal, sin efectos perjudiciales. Es más, se atribuye a esta modulación microbiana el 60% de la producción diaria de inmunoglobulinas en el individuo (Perdigon *et al.*, 2001). Además, que las cepas de BAL empleadas como probióticas sean seguras para el consumo humano ha provocado también el interés por su aplicación como adyuvantes o vectores vivos en la elaboración de vacunas orales (Mercenier *et al.*, 2000; Boersma *et al.*, 2000).

Por todo ello, en este apartado, hemos estudiado la capacidad de las seis BAL seleccionadas para estimular la secreción de las citoquinas, en concreto IL-6 y IL-8 utilizando como modelo la línea celular Caco-2. Para llevar a cabo este estudio se valoró la liberación de citoquinas tras la adición de las bacterias tanto activas como inactivadas por calor (véase Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos y reflejados en las Figuras 19 y 20 nos muestran que de modo general las seis cepas de BAL inducen la producción de IL-6 e IL-8. Además la producción de IL-8 inducida por estas bacterias, cuando están vivas, es mayor que la producción de IL-6.

Los valores de producción de IL-6, cuando las bacterias están activas, se encuentran en un rango de entre 10 y 26 pg/ml, siendo *Lb. rhamnosus* (ATCC 5303) la cepa de mayor capacidad de inducción y *Lc. lactis* (ATCC 11454) la de menor. Además se observa que la viabilidad de las bacterias en cuanto al efecto sobre la liberación de citoquinas es dependiente de la cepa. Ya que, mientras que con la mayoría de las cepas disminuye la producción cuando se inactivan por calor (entre un 20 y 34% para las dos cepas de *Lb. paracasei* y *Lb. casei* y un 87% para *Lc. lactis* ATCC 11454), con *Lb. rhamnosus* se detectó un ligero aumento y con la cepa 660 de *Lc. lactis* no se observaron diferencias (Figura 19).

En cuanto a la IL-8 (Figura 20), los niveles de producción obtenidos, cuando las bacterias están activas, estuvieron comprendidos entre 87,19 pg/ml (cepa *Lb. paracasei* 34) y 134,32 pg/ml para *Lb. rhamnosus* (ATCC 5303), que al igual que ocurrió con la valoración de IL-6, fue la cepa con mayor capacidad de inducción. Además a diferencia de la IL-6, en este caso todas las cepas inactivadas por calor indujeron una menor producción de la IL-8 (disminución comprendida entre un 40 y 60%) con valores de concentración finales muy próximos a los obtenidos en el control (células Caco-2 sin presencia de bacterias). Estos resultados sugieren que, exceptuando a la cepa *Lc. lactis* ATCC 11454, los antígenos de superficie de las cepas de BAL implicados en la estimulación de las células CaCo-2 para la liberación de IL-6 y IL-8 podrían ser diferentes. Así, los antígenos implicados en la estimulación y liberación de IL-8 parecen ser más termolábiles que los antígenos implicados en la estimulación de IL-6; puesto que, la inactivación de las bacterias por calor no afectó o provocó una disminución de no más del 34% en la liberación de IL-6 (exceptuando *Lc. lactis* ATCC 11454). Mientras que, con esta misma inactivación la producción de IL-8 bajó a niveles similares a los obtenidos en ausencia de bacterias.

La IL-6 es una citoquina multifuncional implicada en diversos procesos biológicos y aunque se la ha considerado tradicionalmente como una citoquina producida por células proinflamatorias, actualmente se ha descrito que posee varias funciones antiinflamatorias. La liberación de esta citoquina estimula la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos B actuando como factor de crecimiento de células B activadas dando lugar a su diferenciación en células plasmáticas productoras de IgA. En este sentido, se ha observado que la producción de IL-6 en presencia de bacterias probióticas es menor que en presencia de bacterias patógenas, por lo que se deduce que los niveles de IL-6 alcanzados son suficientes para producir la diferenciación de los linfocitos B sin alcanzar los niveles necesarios para la inflamación (Vinderola *et al.*, 2005). En estudios con ratones a los que se les administró oralmente una cepa probiótica de *Lb. casei* se observó que las principales células inmunes activadas fueron las implicadas en la respuesta inmune innata. Se observó también un aumento en las células productoras de IL-6 y IG-A pero no se detectaron anticuerpos específicos contra el microorganismo probiótico por lo que se ha sugerido que el empleo de este tipo de bacterias probióticas ayuda a mejorar el sistema inmune de mucosas (Maldonado-Galdeano y Perdigón, 2006).

En el caso de IL-8, (citoquina pro-inflamatoria) una vez es secretada por las células intestinales recluye y activa neutrofilos y monocitos en la lamina propia. La liberación en altas concentraciones de esta citoquina podría, por tanto, ser perjudicial en personas que poseen alguna enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo en personas sanas, la liberación de esta citoquina podría ayudar a mantener el sistema inmune alerta y en condiciones para reaccionar más rápidamente con una respuesta inflamatoria ante la presencia de microorganismos patógenos (Vizoso-Pinto *et al.*, 2007).

Atendiendo a estos resultados, el consumo regular de alguna de las seis cepas de BAL, estudiadas en el presente trabajo, podrían ser útiles en la estimulación del sistema inmune en individuos sanos. No obstante, otros estudios *in vivo* son necesarios para establecer la utilidad real de estas bacterias en la estimulación del sistema inmune.

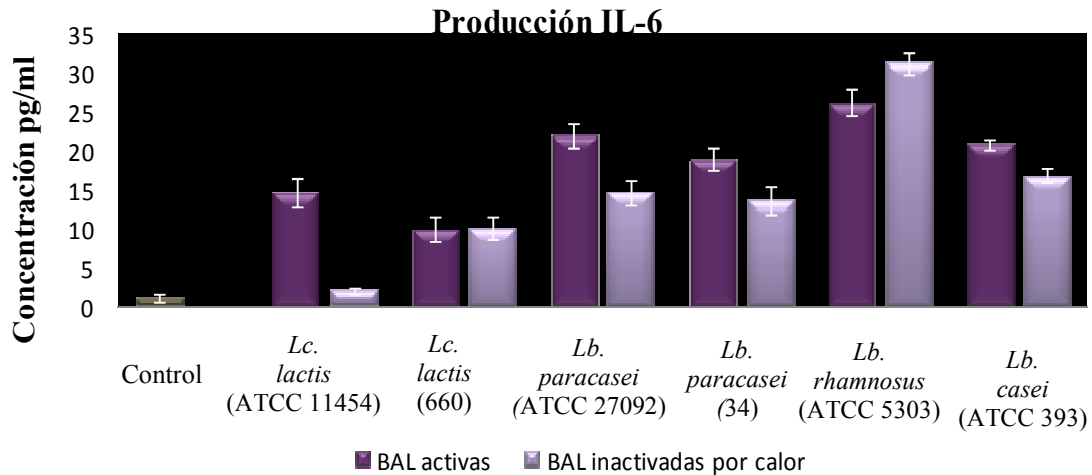


Figura 19: Valores de producción IL-6 por las células Caco-2 en medio EMEM, estimuladas durante 24 horas a 37°C con las cepas de BAL (activas e inactivadas por calor a 65°C). La cuantificación se llevó a cabo mediante el kit ELISA de “Ray Biotech”. Los resultados obtenidos corresponden a la media de tres experimentos independientes.

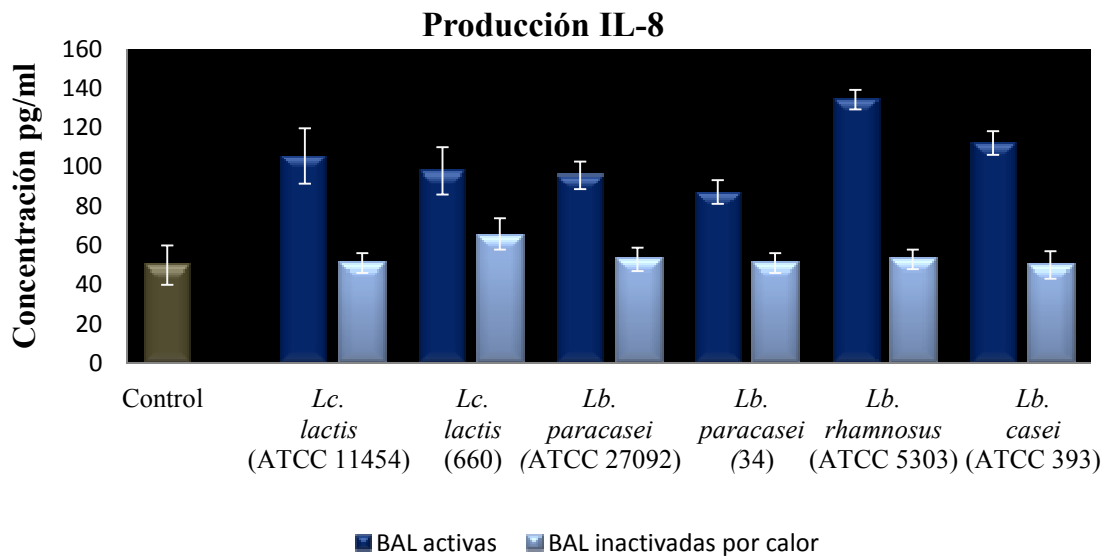


Figura 20: Valores de producción IL-8 por las células Caco-2 en medio EMEM, estimuladas durante 24 horas a 37°C con las cepas de BAL (activas e inactivadas por calor a 65°C). La cuantificación se llevó a cabo mediante el kit ELISA de “Ray Biotech”. Los resultados obtenidos corresponden a la media de tres experimentos independientes.

10. Prebióticos y crecimiento bacteriano

Los alimentos pueden contener componentes que no son digeridos por el intestino y que, sin embargo, pueden ser útiles para su salud. En este grupo se incluyen los denominados compuestos prebióticos, generalmente hidratos de carbono complejos que atraviesan el tracto gastrointestinal sin ser atacados por las enzimas digestivas y que en el colon son utilizados como sustratos por las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal. Como ya se mencionó en la Introducción, la utilización de estos compuestos por las bacterias colónicas, principalmente por el grupo de cepas de BAL, puede dar lugar a múltiples efectos metabólicos que contribuyen a la mejora de la salud del hospedador (Simmering y Blaut, 2001).

Dentro del proceso de caracterización probiótica de nuestras seis cepas de BAL, se estudió la capacidad de utilizar diferentes compuestos con potencial prebiótico como fuente de carbono: oligofruktosa, lactulosa, inulina, rafinosa y arabinogalactanos (véase Materiales y Métodos).

Para ello se inocularon las cepas de BAL en medio MRS sin fuente de carbono [MRS(-C)] suplementado en cada caso con cada uno de los prebióticos seleccionados al 1,5% e incubados a 30°C (véase Materiales y Métodos).

Como podemos observar en la Figura 21, las seis cepas de BAL fueron capaces de crecer en el medio MRS (-C) alcanzando unos valores de absorbancia, a 620 nm, comprendidos entre 0,6 y 1, excepto en la cepa *Lb. paracasei* (34) que su crecimiento llegó a alcanzar valores de absorbancia de hasta 1,4.

A suplementar el MRS (-C) con glucosa al 1,5% como control positivo de crecimiento, se observó que todas las cepas crecieron por encima del crecimiento basal mostrado en el medio MRS (-C) alcanzando unos valores de absorbancia, a 620nm, entre 5 y 7 para las cepas del género *Lactobacillus* y de 2,4 para las cepas del género *Lactococcus* (Figura 21).

La sustitución de glucosa por los diferentes compuestos con potencial prebiótico reveló que las seis cepas de BAL estudiadas fueron capaces de crecer con oligofruktosa como fuente de carbono principal. Las dos cepas pertenecientes

a la especie *Lc. lactis* y la cepa 34 de *Lb. paracasei* mostraron un crecimiento muy similar al obtenido cuando utilizaron glucosa como fuente de carbono. En ambos casos alcanzaron una densidad óptica idéntica o muy similar. Las tres cepas restantes; *Lb. paracasei* (ATCC 27092), *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei*; también crecieron en oligofruktosa aunque la densidad óptica alcanzada fue un poco inferior (dos unidades de absorbancia menor) a la obtenida con glucosa.

Excepto las cepas *Lb. paracasei* (ATCC 27092) y *Lb. rhamnosus*, las cuatro cepas restantes también utilizaron la lactulosa como fuente de carbono. En este caso todas las cepas que crecieron con este compuesto, alcanzaron valores de densidad óptica muy similares a los obtenidos con glucosa, siendo sólo un poco inferiores los alcanzados por *Lb. casei*.

Además una cepa (*Lb. paracasei* 34) también fue capaz de crecer en los dos tipos de inulina y cabe destacar que en los dos casos su crecimiento fue algo mayor que el obtenido cuando creció con glucosa.

La obtención de resultados diferentes con las dos cepas de *Lb. paracasei* estudiadas sugiere que la capacidad de utilizar diferentes compuestos como fuente de carbono no es una característica específica de especie sino de la cepa.

Con respecto a los otros dos compuestos prebióticos estudiados (arabinogalactanos y rafinosa) el crecimiento de las cepas fue en todos los casos muy similar al obtenido cuando se crecieron en MRS (-C) por lo que podemos pensar que ninguna de estas cepas fue capaz de utilizar estos compuestos como fuente de carbono.

Cabe reseñar, que los tres compuestos con potencial prebiótico utilizados por todas o algunas de nuestras cepas de BAL (oligofruktosa, lactulosa e inulina) han revelado en múltiples trabajos *in vivo* los múltiples beneficios para la salud del consumidor a través de su efecto en las cepas de BAL.

De este modo, estos tres tipos de compuestos junto a los galactooligosacaridos (GOS), han mostrado, tras su consumo regular, ser efectivos en la prevención de enfermedades tales como la osteoporosis y la anemia (Teitelbaum y Walker, 2000; Kaur y Gupta, 2002; Roberfroid y Delzenne, 1998; Gibson *et al.*, 1995; Hirayama, 2004; Scholz-Ahrens *et al.*, 2001).

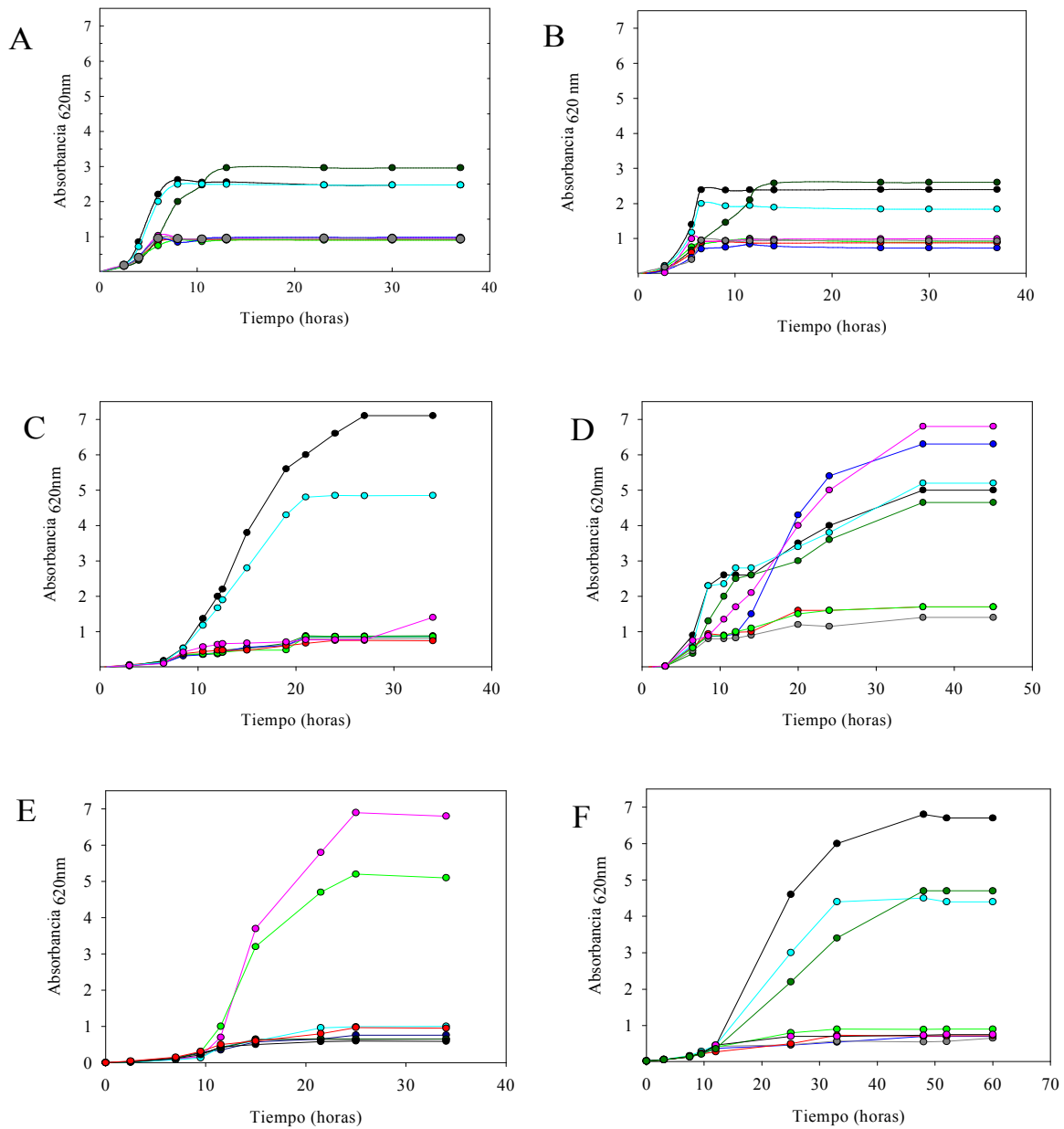


Figura 21: Curvas de crecimiento de A) *Lc. lactis* ATCC 11454, B) *Lc. Lactis* 660; C) *Lb. paracasei* ATCC 27092; D) *Lb. paracasei* 34; E) *Lb. rhamnosus* ATCC 5303 y F) *Lb. casei* (ATCC 393) incubadas a 30°C en medio MRS-C (■) o suplementado al 1,5% con glucosa (■), oligofructosa P95 (■), Lactulosa (■), Inulina –extraída de achicoria-(■), inulina –extraída de dalia-(■), Rafinosa (■) y Arabinogalactanos (■). Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

11. Producción de ácidos grasos de cadena corta

Muchos de los efectos beneficiosos que provocan en el huésped las bacterias ácido-lácticas del tracto intestinal son como consecuencia de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC pueden actuar directa o indirectamente sobre las células intestinales participando en el control de varios procesos como la inflamación, carcinógenesis colorectal, absorción de minerales, etc. (Rossi *et al.*, 2005; Probert *et al.*, 2004).

Por esta razón, se cuantificaron mediante cromatografía de gases, en los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a partir de los medios de cultivo suplementados o no con prebióticos, seis tipos de AGCC: ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico, hexanóico y heptanóico.

El análisis se llevo a cabo en aquellos medios de cultivo suplementados con compuestos prebióticos que las cepas de BAL fueron capaces de utilizar como fuente de carbono y en el medio suplementado con glucosa con el fin de tomarlo como referencia.

Como se muestra en la Tabla 23, las seis cepas de BAL estudiadas produjeron ácido acético como AGCC principal durante su crecimiento y sólo en algunos casos se observó un ligero aumento en la concentración de ácido acético dependiendo del compuesto prebiótico empleado. Las cepas *Lc. lactis* (ATCC 11454) y *Lb. casei* mostraron un aumento en la concentración de ácido acético de entre 1 y 1,5 g/l cuando crecieron en lactulosa, con respecto al producido en presencia de glucosa, mientras que las cepas *Lb. paracasei* (ATCC 27092 y 34), *Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* mostraron un aumento en la concentración de ácido acético entre 1 y 1,8 g/l, en presencia de oligofruktosa.

El siguiente AGCC que más se generó durante el crecimiento de algunas de las BAL y principalmente con los distintos agentes prebióticos, fue el ácido valérico. Aunque las cantidades producidas fueron mucho más pequeñas que las obtenidas de ácido acético, cabe destacar la cepa *Lb. paracasei* (ATCC 27092) que produjo en torno a 20 veces más ácido valérico cuando creció en presencia de oligofruktosa que en presencia de glucosa. *Lc. lactis* (ATCC 27092) también triplicó la producción de ácido valérico en presencia de oligofruktosa y la cepa 34

de *Lb. paracasei* aumentó la concentración de este AGCC hasta cinco veces cuando creció con lactulosa.

En la producción de ácido isovalérico, aunque las concentraciones finales fueron pequeñas, inferiores en todos los casos a 32 mg/l, también se observaron incrementos en función del prebiótico utilizado. Todas las cepas de BAL, con excepción de *Lb. rhamnosus*, incrementaron la producción de este AGCC cuando crecieron con lactulosa. Además la cepa *Lc. lactis* ATCC 11454 también incrementó su producción cuando creció en oligofruktosa.

En cuanto al resto de AGCC, los valores de producción, si es que se generaron, del ácido hexanóico, heptanóico, propiónico y butírico fueron en su mayoría inferiores a 5mg/l. No obstante, se observó un aumento en la producción de ácido propiónico cuando la cepa *Lc. lactis* (660) creció en lactulosa y un ligero aumento de ácido isobutírico y butírico cuando la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) creció en oligofruktosa.

Puesto que lo que se quería comprobar era la influencia del compuesto prebiótico sobre la capacidad de producción de AGCC, los valores obtenidos, excepto los del ácido acético, no han sido altos, quizás, debido al medio de crecimiento donde se ha realizado el análisis. No obstante, estos resultados demuestran que estas bacterias son capaces de producir AGCC como ácido acético, valérico e isovalérico y es muy probable, que la presencia de estas bacterias en un entorno más rico como el intestinal o la matriz alimentaria produzcan una mayor liberación de AGCC.

La producción de ácido acético u otros AGCC puede contribuir de un modo beneficioso al huésped. Como consecuencia de esta producción se produce una disminución del pH en el lumen intestinal que puede, por una parte, tener un efecto antimicrobiano por la creación de un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer ni desarrollarse (Fooks *et al.*, 1999), y por otra, dicha disminución en el pH del lumen provoca una mayor solubilidad del calcio, favoreciendo su absorción en el intestino (Van den Heuvel *et al.*, 1999). También se ha estudiado la posible participación de los AGCC en el control de varios procesos como la proliferación mucosal e inflamación del intestino, así como la eliminación de compuestos nitrogenados (Martí del Moral *et al.*, 2003).

Tabla 23: Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por las cepas de BAL crecidas en MRS suplementado con glucosa o un compuesto con potencial prebiótico al 1,5%*. Los valores obtenidos por análisis del medio fermentado mediante cromatografía de gases son expresados en mg/ml.

Cepas	Fuente de carbono	Ácidos grasos de cadena corta							
		Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Hexanoico	Heptanoico
<i>Lc. lactis</i> ATCC 11454	Glucosa	2958	<5	<5	5	<5	39	<5	<5
	Oligofruktosa	2926	<5	11	15	18	133	<5	<5
	Lactulosa	4100	<5	<5	<5	14	68	<5	<5
<i>Lc. lactis</i> 660	Glucosa	3717	<5	<5	5	<5	44	<5	<5
	Oligofruktosa	3655	<5	<5	8	<5	23	<5	<5
	Lactulosa	3425	27	<5	7	32	49	<5	<5
<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092	Glucosa	3218	<5	<5	5	<5	30	<5	<5
	Oligofruktosa	5561	<5	<5	6	<5	693	<5	<5
<i>Lb. paracasei</i> 34	Glucosa	800	5	<5	5	<5	9	<5	<5
	Oligofruktosa	1179	<5	<5	5	5	16	<5	<5
	Lactulosa	1162	<5	<5	5	10	49	<5	<5
	Inulina	1376	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	Inulina hp	1000	5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 5303	Glucosa	3886	7	6	10	8	6	<5	<5
	Oligofruktosa	4511	5	<5	6	<5	<5	<5	<5
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	Glucosa	3559	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	Oligofruktosa	4204	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	Lactulosa	5000	6	5	8	21	<5	<5	<5

* El análisis sólo se llevo a cabo con los compuestos prebióticos que las cepas de BAL fueron capaces de emplear como fuente de carbono y con glucosa como control.

Los resultados presentados corresponden a la media de dos experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 15%.

12. Capacidad de crecimiento, producción de ácido láctico y viabilidad en leche

Aunque son numerosos los ensayos *in vitro* dirigidos a adquirir un conocimiento más profundo sobre las cepas bacterianas con potencial probiótico, no son tantos los estudios encaminados a intuir su potencial tecnológico para su posterior incorporación en productos lácteos. De este modo, con los resultados expuestos en este apartado, además de otros presentes a lo largo del trabajo (véase apartado 5) se ha intentado hacer una primera aproximación del comportamiento de estas bacterias en leche (oveja y vaca); ya que este alimento y sus derivados son frecuentemente suplementados con este tipo de bacterias para incrementar su valor añadido.

Como se puede observar en la Figura 22, las seis cepas de BAL fueron capaces de crecer en ambos tipos de leche (vaca y oveja) a lo largo del tiempo. Al igual que en el apartado 1.2 donde se estudió la cinética de crecimiento de las cepas de BAL en medio TSB-YE, en este apartado también se han calculado los parámetros de crecimiento: velocidad específica de crecimiento “ μ ” y concentración máxima de microorganismos “ X_{\max} ” (Tabla 24) (véase Materiales y Métodos).

Las dos cepas de *Lc. lactis* (ATCC 11454 y 660) fueron las cepas que mayor rapidez de crecimiento mostraron en ambos tipos de leche al igual que se observó en medio TSB-YE (véase apartado 1.2). Los valores de μ fueron en torno a 0,50 para la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) y de 0,33-0,39 para la cepa 660 de *Lc. lactis* (Tabla 24). Los valores de X_{\max} fueron, para ambas cepas, mayores en leche de vaca que los obtenidos en leche de oveja, a pesar de que la cepa *Lc. lactis* (660) sea de origen ovino.

En cuanto a la cepa *Lb. rhamnosus*, a pesar de que su X_{\max} fue similar en ambos tipos de leche, su velocidad específica de crecimiento fue el doble en leche de vaca que en leche de oveja. Hay que destacar que esta cepa es de origen humano y sin embargo su valor de μ en leche de vaca es similar a los obtenidos por la cepa *Lc. lactis* (660) de origen lácteo.

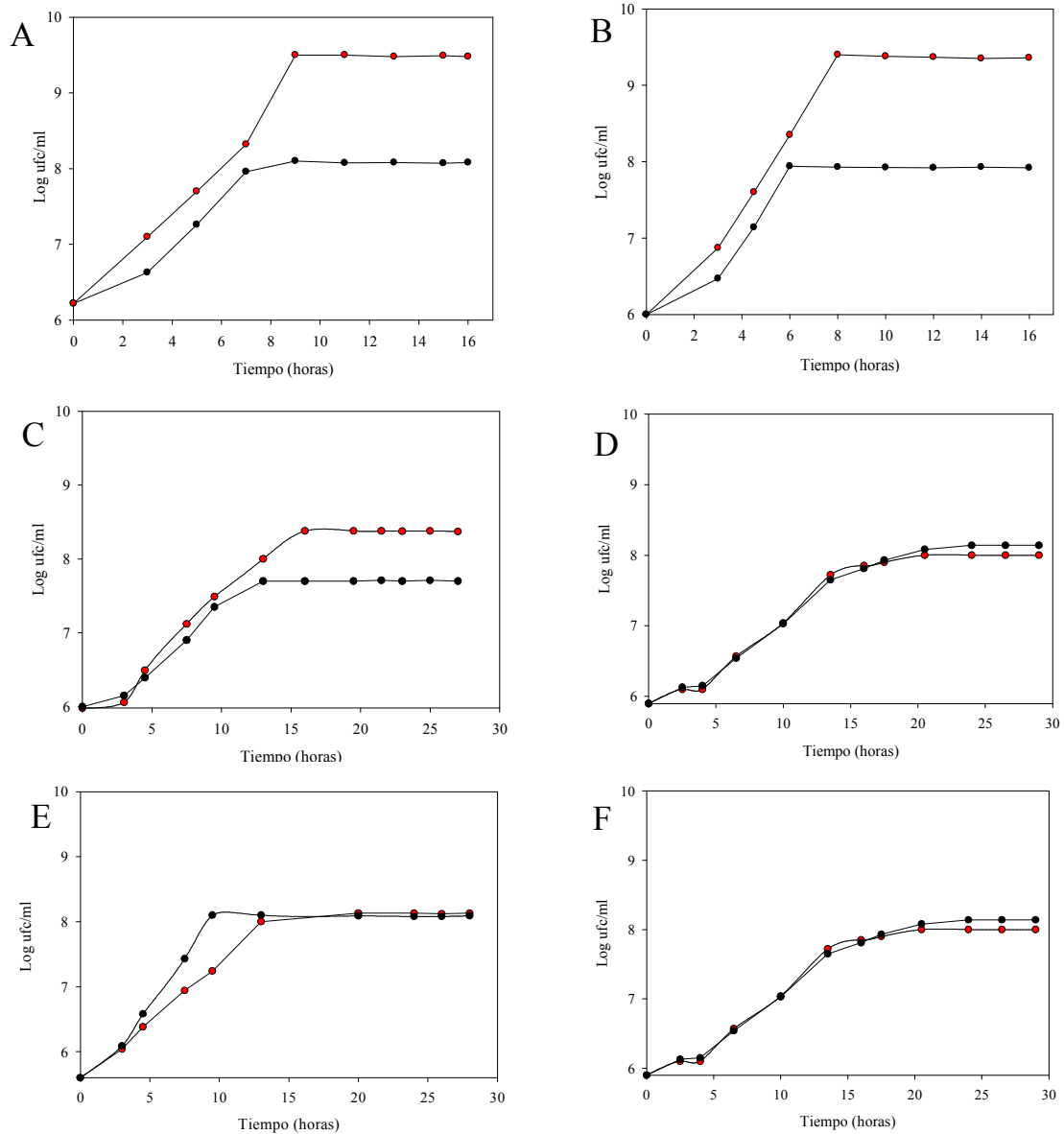


Figura 22: Curvas de crecimiento en leche de vaca (●) y oveja (●) a 30°C representadas como el logaritmo de las células viables por mililitro a lo largo del tiempo (log ufc/ml) de: A) *Lc. lactis* ATCC 11454; B) *Lc. lactis* 660; C) *Lb. paracasei* ATCC 27092; D) *Lb. paracasei* 34; E) *Lb. rhamnosus* ATCC 5303 y F) *Lb. casei* ATCC 393.

Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 10%.

Por último, las tres cepas restantes: *Lb. paracasei* (ATCC 27092 y 34) y *Lb. casei* (ATCC 393), mostraron un crecimiento más lento en ambos tipos de leche en comparación con las cepas de *Lc. lactis* o *Lb. rhamnosus* en leche de oveja. Los valores de μ obtenidos estuvieron comprendidos en torno a 0,16-0,17 h^{-1} y los valores de X_{max} próximos a 8,1.

Los valores de pH obtenidos durante la fase estacionaria, estuvieron comprendidos en todos los casos entre 4,3 y 4,4 con la excepción de la cepa *Lb. paracasei* 34 cuyos valores de pH fueron de 5,0 en los dos tipos de leche. Además, en todos los casos, excepto con la cepa 34 de *Lb. paracasei* se observó coagulación de la leche al finalizar el ensayo.

Tabla 24: Parámetros cinéticos de crecimiento μ y X_{\max} de las seis cepas crecidas en leche de oveja y vaca a 30°C.

Cepas de BAL	μ_{\max}		X_{\max}	
	Leche de oveja	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche de vaca
<i>Lc. lactis</i>				
ATCC 1154	0,49	0,51	8,10	9,50
660	0,33	0,39	7,94	9,40
<i>Lb. paracasei</i>				
ATCC 27092	0,16	0,17	7,71	8,38
34	0,17	0,17	7,92	8,11
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 53103	0,16	0,30	8,10	8,13
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	0,16	0,17	8,14	8,01

Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 5%.

En cuanto a la producción de ácido láctico (Tabla 25), cabe que destacar que al igual que ocurría en el medio TSB-YE cuando se crecieron estas seis cepas de BAL, (véase apartado 6.5) todas ellas produjeron ácido L-láctico como isómero mayoritario. No obstante, los valores de producción de ácido L-láctico fueron bastante mayores cuando las cepas crecieron en leche que cuando crecieron en TSB-YE. En este sentido la cepa *Lb. casei* produjo veinte veces más de ácido L-láctico en leche, mientras que el resto de las cepas produjeron entre tres y siete veces más que en TSB-YE, exceptuando a la cepa *Lb. paracasei* 34 que mantuvo los mismos niveles de producción en ambos casos. Esta última cepa, además fue la que menores niveles de ácido láctico generó en ambos tipos de leche, hecho que se podría relacionar con los valores de pH más altos que los obtenidos por el resto de las cepas estudiadas al alcanzar la fase estacionaria durante su crecimiento en leche.

No obstante la mayor producción de ácido láctico en leche que en medio TSB-YE por las cepas de BAL puede parecer un resultado sorprendente en aquellas cepas cuyo crecimiento fue más rápido en TSB-YE y que sin embargo produjeron una menor cantidad de este producto que en leche. Se ha descrito que

en condiciones de limitación de hexosas, la síntesis de ácido acético puede llegar a ser dominante, de forma que un microorganismo homofermentativo puede mostrarse como heterofermentativo (Thomas *et al.*, 1979 y de Vries *et al.*, 1970). Por lo tanto, una posible explicación a nuestro resultado, es que al ser estas cepas homofermentativas facultativas, en la leche pueden estar llevando a cabo una homofermentación estricta generando ácido láctico como producto final a partir de la lactosa por la vía Embden-Meyerhof. Mientras que en TSB-YE debido a su composición diferente con respecto a la leche (menos rico en hexosas), se puede estar llevando a cabo la ruta de las pentosas fosfato produciendo menos láctico que en el caso anterior y generando también otros productos como ácido acético, etanol y CO₂.

Por otra parte, aunque la producción de ácido láctico por estas seis cepas fue similar en ambos tipos de leche, hay que señalar que hubo dos cepas (*Lc. lactis* ATCC 11454 y *Lb. paracasei* ATCC 27092) que produjeron una mayor concentración de ácido L-láctico en leche de oveja que en leche de vaca. Mientras que por el contrario la cepa *Lc. lactis* 660 produjo algo más de ácido L-láctico en leche de vaca. Tampoco se observaron diferencias entre cepas de origen humano y lácteo en cuanto a una mayor producción de ácido láctico por éstas últimas.

Tabla 25: Producción de ácido láctico en leche por parte de las seis cepas de BAL; valorado mediante un kit enzimático al inicio de la fase estacionaria (véase Materiales y Métodos). Los valores son expresados en g/L

Cepas	Producción total de ácido láctico		Producción de ácido D-láctico		Producción de ácido L-láctico	
	Leche de oveja	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche de vaca
<i>Lc. lactis</i> ATCC 11454	7,04	4,18	0,71	0,205	6,33	3,97
660	9,92	12,3	0,70	0,250	9,22	12,05
<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092	11,53	4,478	0,91	0,128	10,62	4,35
34	3,44	3,01	0,56	0,00	2,88	3,01
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 11454	9,45	8,99	0,52	0,29	8,93	8,70
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	11,29	11,71	0,79	0,256	10,50	11,45

Los resultados obtenidos corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 15%

En cuanto a la viabilidad de las bacterias probióticas en el producto final, es generalmente aceptado, que para conseguir una óptima funcionalidad es necesario una buena viabilidad (Saarela et al., 2000), a pesar de, que varios estudios hayan mostrado que bacterias no viables también podrían ejercer algún efecto beneficioso en el consumidor (Ouwehand y Salminen, 1998).

Dado que la mayoría de productos lácteos se encuentran en refrigeración durante su almacenamiento se estudió la viabilidad de las cepas de BAL durante 50 días, incubadas a 4°C en leche de oveja y vaca, así como en TSB-YE (Tabla 26).

Las seis cepas de BAL estudiadas mantuvieron una excelente viabilidad a lo largo de los 50 días de incubación a 4°C tanto en el medio complejo TSB-YE como en ambos tipos de leche. En ningún caso se observó una disminución en la viabilidad de más de medio orden de magnitud al finalizar el ensayo. Cabe reseñar que la vida comercial de un producto refrigerado que contenga microorganismos probióticos es de tres a seis semanas (Kopp-Hoolihan, 2001), mientras que las cepas de BAL estudiadas en este apartado mantuvieron una alta viabilidad a lo largo de 7 semanas en leche refrigerada. Además, no fue necesario emplear ningún tipo de técnica como puede ser la microencapsulación para mejorar su viabilidad. Asimismo, tampoco se observaron diferencias en su viabilidad entre las cepas de origen humano y lácteo.

Tabla 26: Viabilidad de las cepas de BAL durante 50 días a 4°C en medio TSB-YE y en leche de oveja y de vaca. Los valores están expresados en log ufc/ml.

Cepas	Tiempo 0			4 días			11 días			20 días			35 días			50 días		
	Leche vaca	Leche oveja	TSB-YE	Leche vaca	Leche oveja	TSB-YE	Leche Vaca	Leche oveja	TSB-YE	Leche vaca	Leche oveja	TSB-YE	Leche vaca	Leche oveja	TSB-YE	Leche vaca	Leche oveja	TSB-YE
<i>Lc. lactis</i> ATCC 11454 660	8,72	8,68	8,54	8,73	8,54	8,48	8,65	8,53	8,47	8,60	8,53	8,47	8,63	8,50	8,49	8,60	8,51	8,47
	8,45	8,38	8,26	8,38	8,35	8,22	8,33	8,33	8,12	8,33	8,36	8,07	8,30	8,27	8,11	8,28	8,30	8,12
<i>Lb. paracasei</i> ATCC 27092 34	8,85	9,12	8,67	8,78	8,59	8,66	8,70	8,53	8,64	8,62	8,50	8,64	8,61	8,51	8,67	8,62	8,52	8,62
	8,68	8,33	8,45	8,70	8,42	8,38	8,65	8,39	8,40	8,63	8,41	8,42	8,59	8,37	8,39	8,59	8,38	8,37
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 5303	8,35	8,26	8,31	8,35	8,12	8,32	8,33	8,07	8,26	8,33	8,10	8,29	8,32	8,15	8,31	8,31	7,78	8,30
<i>Lb. casei</i> ATCC 393	8,05	8,27	7,83	8,00	8,26	7,70	8,01	8,26	7,72	8,00	7,98	7,64	7,98	7,98	7,56	7,90	7,90	7,40

Los resultados presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Los valores de desviación estándar fueron inferiores al 5%.

En este trabajo, se ha pretendido seleccionar aquellas cepas de BAL que no sólo posean potencialidad probiótica sino también una buena capacidad tecnológica. En este sentido, a pesar de que las cepas de BAL empleadas como probióticas suelen tener un mejor crecimiento en medios complejos como el TSB, las seis cepas de BAL también crecieron en leche de vaca y oveja independientemente del origen humano o lácteo de la cepa bacteriana.

Además, en general, las seis cepas de BAL mostraron también una aceptable capacidad acidificante en leche a 30°C (véase apartado 5.2), consecuencia principal de la producción de ácido L- láctico, metabolito que también contribuye al aroma y textura de los alimentos. Además, como ya se mencionó en el Apartado 5.1 todas las cepas de *Lactobacillus* también presentaron en TSB-YE actividades aminopeptidásicas que contribuyen al desarrollo del aroma en los productos lácteos. Por último, las seis cepas de BAL mostraron una excelente viabilidad durante 50 días a 4°C lo que nos permitiría mantenerlas viables en el producto final durante periodos largos de almacenamiento en refrigeración. La utilización de bacterias, que además de probióticas, pudieran ser empleadas como *starter* o que al menos fueran capaces de llevar a cabo una fermentación inicial para completarla finalmente con otros microorganismos, provocaría una optimización del proceso de fermentación a la vez que se mejora la calidad final del producto. No obstante, sería necesario completar este tipo de estudios en el producto final para conocer el comportamiento real de las cepas bacterianas cuando interaccionan con la matriz alimentaria. Atendiendo a todos los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, como resultado final disponemos de seis cepas de BAL (incluida la cepa control *Lb. rhamnosus*) que han presentado los criterios “*in vitro*” más reconocidos de los microorganismos probióticos, así como, algunos requisitos tecnológicos determinantes a la hora de su posible aplicación industrial. Pensamos que, de forma global, a pesar de preliminares los resultados y conocimientos que se derivan de este estudio pueden ser interesantes a la hora de predecir la funcionalidad de estas cepas *in vivo* antes de emprender los ensayos clínicos pertinentes, necesarios, para confirmar finalmente una cepa bacteriana como probiótica.

CONCLUSIONES

1. Las bacterias ácido-lácticas, aisladas de productos lácteos en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos fueron identificadas por ribotipado permitiendo establecer que se corresponden con las especies de: *E. faecalis* (cepas 189, 297, 888, 1076 y 1354), *Ln. mesenteroides* (cepa 875), *Lb. paracasei* (cepa 34) y *Lc. lactis* (cepa 660). En base a la cinética de crecimiento mostrada, se han agrupado en tres grupos: bacterias de crecimiento rápido (las dos cepas de *Lc. Lactis*: 660 y ATCC 11454), bacterias de crecimiento intermedio (las cepas de la especie de *E. faecalis* y tres de las cepas del género *Lactobacillus*: ATCC 11454, ATCC 27092 y la 34) y bacterias de crecimiento lento (la cepa ATCC 393 de *Lb. casei* y la 875 de *Ln. mesenteroides*). Se ha comprobado que todas ellas tienen actividad antimicrobiana frente al menos un microorganismo patógeno y se ha establecido que todas las cepas con la excepción de *Lb. paracasei* (ATCC 27092), son capaces de producir peróxido de hidrógeno. Además, la cepa *Lc. lactis* (ATCC 11454) secreta al medio de algún tipo de compuesto activo en sobrenadantes, aun después de ser neutralizados y tratados con catalasa, con actividad antimicrobiana.

2. Todas las cepas de bacterias ácido-lácticas estudiadas en este trabajo han mostrado una excelente viabilidad resistiendo la presencia de pepsina a pH 3 y de pancreatina a pH 8 durante 3 horas, así como a la presencia de sales biliares a una concentración de 0,4% durante 4 horas. No se han observado diferencias en la viabilidad, en estas condiciones entre las cepas de origen humano y las de origen lácteo. No obstante, las cinco cepas pertenecientes a la especie *E. faecalis* han sido descartadas en el presente estudio por presentar actividades enzimáticas consideradas nocivas para la salud del individuo (actividad hemolítica: cepas 189, 888 y 1076) y actividad gelatinásica: cepas 297 y 1354) además de poseer resistencias frente al menos uno de los antibióticos estudiados. Asimismo, se ha descartado del estudio la cepa *Ln. mesenteroides* por su capacidad para producir ácido D-láctico.

3. Las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, con las que se ha completado el estudio, han mostrado capacidad de adhesión a la línea celular Caco-2. En este caso, la cepa 660 de *Lc. lactis* es la que mayor capacidad de adhesión ha mostrado, incluso por encima de la cepa control *Lb. rhamnosus*, de origen humano.

Todas estas cepas también han mostrado capacidad para formar biofilms aunque en diferente grado dependiendo de la cepa y de la composición del medio. Además, estas bacterias ácido lácticas han estimulado la producción de citoquinas (IL-6 y IL-8) en las células Caco-2, lo que sugiere la posible utilidad de estas cepas en la estimulación del sistema inmune en individuos sanos.

4. Las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* son capaces de utilizar compuestos con potencial prebiótico como la oligofruktosa como fuente de carbono. También, cuatro de las seis cepas (con la excepción de *Lb. paracasei* ATCC 27092 y *Lb. rhamnosus* ATCC 53103) han sido capaces de utilizar la lactulosa. Además la cepa 34 de *Lb. paracasei* ha sido capaz de crecer en presencia de inulina como fuente de carbono. La utilización por parte de estas bacterias de compuestos prebióticos puede afectar a la producción de ácidos grasos de cadena corta.

5. Las cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* han mostrado un potencial tecnológico adecuado para su uso como microorganismos *starter* ya que, han presentado actividades aminopeptidásicas y una buena capacidad acidificante en leche de vaca y oveja a 30°C. Las cepas de *Lactobacillus* también han mostrado una alta actividad β -galactosidásica. Además todas las cepas han presentado una excelente viabilidad en leche resistiendo hasta 50 días a 4°C.

En resumen, disponemos de cinco cepas (*Lc. lactis* 660 y ATCC 11454; *Lactobacillus paracasei* 34 y ATCC 27092 y *Lb. casei* ATCC 393) con características probióticas demostradas *in vitro* con las que se pueden iniciar los ensayos clínicos encaminados a su posible utilización en la industria alimentaria.

ANEXO

ANEXO 1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Gen	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
<i>nis</i>	^a D: AAGATTTTAACTTGGATTTGG ^b R: TTCTTACTAAAACGGTTGAG
<i>lcnA</i>	D: CAATTAATTTTAAATATTGTTTCAG R: CTTAACTAATCCTCAATGGTGC
<i>lcnB</i>	D: CAATTAATTTTAAATATTGTTTCTG R: GAATGTTTTTCCCCATCCTTC
<i>prtP</i>	D: GGTCAACGCAAAACAACAATGG R: CGTCATTCCAGTCACCAAAAAG
<i>cluA</i>	D: GGGGTCAATTGTGGAGGGATAAC R: CCTGGCATGATTCAAAGACTTACC
<i>wzb</i>	D: CACATGAATGGACGGTATACGAATC R: CCACGCTTGCGAGTTAACCG
<i>epsB</i>	D: ATGGCGGATCAAGGAATTAAGG R: GGTGGAATATCAATCAAACAACATC
<i>epsC</i>	D: GGCCGGGTGATTCCAGAGTATAAC R: GGGTCGAACATCAACAAATTATCG
<i>luxS</i>	D: GATCACACTGCAGTTAAGGCGCC R: GGCAGCCAAACGGTGAACAATC
<i>lsp</i>	D: CCTGGTGGAAACATCTTACGTGC R: GCGCTACCATTTCCTTCCC

^aD: Oligonucleótido Directo

^bR: Oligonucleótido Reverso

BIBLIOGRAFÍA

Abeyta, C., Kaysner, C., Wekell, M., Sullivan, J. y Stelma, G. (1986) Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *J. Food Prot.* **49**: 643-646.

Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. y von Wright, A. (1999) Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 351-354.

Albayrak, N. y Yang, S.T. (2002) Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol. Bioeng.* **77**: 8-19.

Alderbeth, I., Cerquetti, M., Poilane, I., Wold, A.E. y Collignon, A. (2000) Mechanisms of colonization resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**: 223-239.

Anderson Borge, G.I., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T. y Granum, P.E. (2001) Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 237-246.

Angus, F., Smart, S. y Shortt, C. (2005) Prebiotic ingredients with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides. En: *Probiotic Dairy Products*, pp. 120-137. Ed: Tamime, A. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Arai, S. (1996) Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 9-15.

Arqués, J.L. (2003) Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, España.

Arrizubieta, M.J., Toledo-Arana, A., Amorena, B., Penades, J.R. y Lasa, I. (2004) Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 7490-7498.

Arslanoglu, S., Moro, G.E. y Boehm, G. (2007) Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J. Nutr.* **137**: 2420-2424.

Arunachalam, K., Gill, H.S. y Chandra, R.K. (2000) Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**: 263-267.

Aslim, B. y Kilic, E. (2006) Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**: 249-253.

- Axelsson, L.T.** (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, pp. 1-72. Eds: Salminen, S. y von Writh, A. Marcel Dekker Inc, NY, USA.
- Azeredo, L.A., Leite, S.G., Freire, D.M., Benchetrit, L.C. y Coelho, R.R.** (2001) Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. *J. Microbiol. Methods*, **45**(3): 207-212.
- Baba, E., Nagaishi, S., Fukata, T. y Arakawa, A.** (1991) The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. *Poult. Sci.* **70**: 1902-1907.
- Baccigalupi, L., Donato, A.D., Parlato, M., Luongo, D., Carbone, V., Rossi, M., Ricca, M. y De Felice, M.** (2005) Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolate strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res. Microbiol.* **156**: 830-836.
- Baqueiro, I.** (2004) Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.
- Beachey, E.H.** (1981) Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**(3): 325-345.
- Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R. y Newport, M.J.** (1980) The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* **48**: 147-154.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Perez-Pulido, R., Martinez-Canamero, M. y Galvez, A.** (2004) Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 118-130.
- Benno, Y., He, F., Hosoda, M., Hashimoto, H., Kojima, T., Yamazaki, K., Iino, H., Mykkanen, H. y Salminen, S.** (1996) Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutr. Today*, **31** (6) Suppl. 1: 9-11.
- Berg, R.D.** (1998) Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? *Trends Microbiol.* **6**: 89-92.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Candiotti, M.C. y Zalazar, C.A.** (2009) Multivariate analysis of proteolysis patterns differentiated the impact of six strains of probiotic bacteria on a semi-hard cheese. *J. Dairy Sci.* **92**: 2455-2467.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. y Servin, A.L. (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, **35**: 483-489.

Bertazzoni-Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H. y Dellaglio, F. (2004) Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional foods. *Int. Dairy J.* **14**: 723-736.

Bezkorovainy, A. (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 399-405.

Botes, M., Loos, B., van Reenen, C.A. y Dicks, L.M. (2008) Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch. Microbiol.* **190**: 573-584.

Boersma, J.A., Shaw, M. y Claassen, E. (2000) Probiotic bacteria as live oral vaccines. *Lactobacillus* as the versatile delivery vehicle. En: *Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics*, pp. 234-270. Eds: Fuller, R. y Perdigon, G. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Bollinger, R.R., Everett, M.L., Palestrant, D., Love, S.D., Lin, S.S. y Parker, W. (2003) Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*, **109**: 580-587.

Brady, L.J., Gallaher, D.D. y Busta, F.F. (2000) The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. A review. *J. Nutr.* **130**: 410-414.

Cagigas-Reig, A.L. (2002) Prebióticos y probióticos: una relación beneficiosa. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* **16**(1): 63-68.

Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. A review. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 281-370.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. (1998a) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **61**: 1636-1643.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. (1998b) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 759-768.

- Chomarat, M. y Espinouse, D.** (1991) *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in patients with prolonged aplasia receiving ceftazidime-vancomycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 44.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L.** (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernández, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., medina, M. y Rea, M.C. y Rodríguez, E.** (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* **64**: 409-421.
- Cole, S.P., Harwood, J., Lee, R., She, R. y Guiney, D.G.** (2004) Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **186**: 3124-3132.
- Collins, J.K., Thornton, G. y O'Sullivan, G.O.** (1998) Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8**: 487-490.
- Collins, M.D. y Gibson, G.R.** (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1052-1057.
- Condon, S.** (1983) Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol.* **7**: 15-25.
- Condon, S.** (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. A review. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 269-280.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. y Goldin, B.R.** (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**: 1-12.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. y Sorrentino, E.** (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, **85**: 193-204.
- Crittenden, R.G. y Playne, M.J.** (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. A review. *Trends Food Sci. Tech.* **7**: 353-361.
- Crociani, J., Grill, J.P., Huppert, M. y Ballongue, J.** (1995) Adhesion of different *bifidobacteria* strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 146-148.
- Cummings, J.H.** (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, **22**: 763-779.

Cummings, J.H. y MacFarlane, G.T. (1997) Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **21**: 357-365.

Dahl T.A., Midden, W.R. y Hartman, P.E. (1989) Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol.* **171**: 2188-2194.

Danielsen, M. y Wind, A. (2003) Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 1-11.

Dave, R.I. y Shah, N.P. (1997) Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **7**: 435-443.

Deepika, G., Green, R.J., Frazier, R.A. y Charalampopoulos, D. (2009) Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 1230-1240.

De Vrese, M. y Schrezenmeir, J. (2001) Pro and prebiotics. *Innov. Food Technol.* **May/June**: 49-66.

De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. y Schrezenmeir, J. (2001) Probiotics--compensation for lactase insufficiency. A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 421-429.

De Vries, W., Kapteijn, W.M.C., van der Beek, E.G. y Stouthamer, A.H. (1970) Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 333-345.

Del Piano, M., Strozzi, P., Barba, M., Allesina, S., Deidda, F., Lorenzini, P., Morelli, L., Carmagnola, S., Pagliarulo, M., Balzarini, M., Ballare, M., Orsello, M., Montino, F., Sartori, M. y Garello, E. (2008) In vitro sensitivity of probiotics to human pancreatic juice. *J. Clin. Gastroenterol.* **4**: 170-173.

Delgado, S., Delgado, T. y Mayo, B. (2002) Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* **65**: 1590-1596.

Delgado, S. (2005) Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Oviedo, España.

DeLisle, S. y Perl, T.M. (2003) Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, **123**: 504-18.

Delzenne, N., Aertssens, J., Verplaetse, H., Rocco, M. y Roberfroid, M. (1995) Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Sci.* **57**: 1579-1587.

Devriese, L.A., Pot, B. y Collins, M.D. (1993) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 399-408.

Donnelly, L. (2003) Gut feeling. A review. *Dairy Indust. Int.* **68**(5): 19-20.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins, J.K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 386-392.

Eaton, T.J. y Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1628-1635.

Eaton, T.J. y Gasson, M.J. (2002) A variant enterococcal surface protein Esp (fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**: 269-275.

EFSA. (2008) Technical guidance. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, **732**: 1-15.

Elisha, B.G. y Courvalin, P. (1995) Analysis of genes encoding D-alanine: Dalanine ligase related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacilli* spp. *Gene*, **152**: 79-83.

Elo, S., Saxelin, M. y Salminen, S. (1991) Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Let. Appl. Microbiol.* **13**: 154-156.

Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M. y Holmes, K.K. (1989) Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 251-256.

Facklam, R.R., y Wilkinson, H.W. (1981) The family Streptococcaceae (medical aspects). En: *The Prokaryotes. A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, pp. 1572-1597. Eds: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. y Schlegel, H.G. Springer-Verlag, NY, USA.

Fakhry, S., Manzo, N., D'Apuzzo, E., Pietrini, L., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M. y Baccigalupi, L. (2009) Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res. Microbiol.* **160**: 817-823.

FAO/WHO. (2002) Report on Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Disponible en: <http://www.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>

Fooks, J.L., Fuller, R. y Gibson, G.R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* **9**: 53-61.

Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. y Joly, B. (2001) Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* **152**: 167-173.

Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 1-24.

Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (1996) Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rew. Int.* **12**(4): 457-509.

Franck, A. y Coussement, P. (1997) Multi-functional inulin. *Food Ingred. Anal. Int.* **October**: 8-10.

Franz, C. M., Holzapfel, W.H. y Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? A review. *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.

Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4385-4389.

Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. y Holzapfel, W.H. (2003) Enterococci in foods--a conundrum for food safety. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 105-122.

Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. y Forstner, J.F. (1997) Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 506-512.

Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.

García-Garibay, M. (2003) La leche como alimento funcional. *3er. Simposio mexicano de probióticos*. México DF.

García-Ruiz, A. (1996) Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso manchego e identificación de la microbiota. *Tesis Doctoral*. Universidad de Castilla-LaMancha, España

Garvie, E.I. (1986) Genus *Leuconostoc*. En: *Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1071-1075. Eds: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. The Williams & Wilkins Company, Maryland, USA.

Gibson, G.R., Willis, C.L. y Van Loo, J. (1994) Non digestible oligosaccharides and bifidobacteria- Implications for health. A review. *Int. Sugar J.* **96**: 381-387.

Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. y Cummings, J.H. (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. A review. *Gastroenterology*, **108**: 975-982.

Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. A review. *J. Nutr.* **125**: 1401-1412.

Gibson, G.R. (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* **129**: 1438-1441.

Gill, C.I. y Rowland, I.R. (2002) Diet and cancer: assessing the risk. A review. *Br. J. Nutr.* **88** Suppl 1: 73-87.

Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J. y Gopal, P.K. (2000) Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* **83**: 167-176.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M. y Campieri, M. (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, **119**: 305-309.

Giraffa, G. y Neviani, E. (2000) Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. *Ital. J. Food Sci.* **4**: 403-423.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L. y Salminen, S. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* **37**: 121-128.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. y Gill, H.S. (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 207-216.

Grahn, E., Holm, S.E., Lilja, H. y Sellgren, K. (1994) Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine. *Scand. J. Nutr.* **38**: 2-4.

Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A. y Brassart, D. (1999) Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1071-1077.

Greene, J.D. y Klaenhammer, T.R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4487-4494.

Gruzza, M., Duval-Iflah, Y. y Ducluzeau, R. (1992) Colonization of the digestive tract of germ-free mice by genetically engineered strains of *Lactococcus lactis*: study of recombinant DNA stability. *Microb. Releases*, **1**: 165-171.

Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Dias, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J.S., Sandhu, B., Szajewska, H. y Weizman, Z. (2000) *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**: 54-60.

Guarino, A., Canani, R.B., Spagnuolo, M.I., Albano, F. y Di Benedetto, L. (1997) Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **25**: 516-519.

Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998) Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 237-238.

Guarner, F. (2007) Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation. *J. Nutr.* **137**: 2568-2571.

Gupta, V. y Garg, R. (2009) Probiotics. A review. *Indian J. Med. Microbiol.* **27**: 202-209.

Habimana, O., Le Goff, C., Juillard, V., Bellon-Fontaine, M.N., Buist, G., Kulakauskas, S. y Briandet, R. (2007) Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC Microbiol.* **7**(36).

Hasler, C.M. (2000) The changing face of functional foods. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 499-506.

Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1992) Probiotics: A general view. En *The lactic acid bacteria*, pp: 1327-1329. Ed: Wood, B.J.B. Chapman & Hall, NY, USA.

- He, F., Ouwehan, A.C., Hashimoto, H., Isolauri, E., Benno, Y. y Salminen, S.** (2001). Adhesion of *Bifidobacterium* spp. to human intestinal mucus. *Microbiol. Immunol.* **45**: 259-262.
- Hernández, D., Cardell, E. y Zárate, V.** (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 77-84.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González-Prieto, M.J. y Tornadijo, M.E.** (2003) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Int. Dairy J.* **13**: 469-479.
- Hirayama, M.** (2004) Novel physiological functions of oligosaccharides. A review. *Pure Appl. Chem.* **74**(7): 1271-1279.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. y Huis in't Veld, J.H.** (1998) Overview of gut flora and probiotics. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85-101.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. y Schillinger, U.** (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 365-373.
- Hopper, L.V., Midtvedt, T. y Gordon, J.L.** (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 283-307.
- Hoskins, L.C. y Boulding, E.T.** (1981) Mucin degradation in human colon ecosystems. Evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. *J. Clin. Invest.* **67**: 163-172.
- Huang, J. y Pinder, K.L.** (1995) Effects of calcium on development of anaerobic acidogenic biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 212-218.
- Hughes, R. y Rowland, I.R.** (2001) Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis*, **22**: 43-47.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzappel, W.H. y Franz, C.M.** (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 730-739.
- ICMSF** (1981) "International Commission on Microbiological Specifications for Foods". Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Vol. I. pp. 122. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Ishibashi, N. y Yamazaki, S.** (2001) Probiotics and safety. A review. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 465-470.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukea, P. y Koivula, T.** (1991) A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, **88**: 90-97.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. y Salminen, S.** (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy*, **30**: 1604-1610.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B.** (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. A review. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
- Jensen, L.B., Frimodt-Moller, N. y Aarestrup, F.M.** (1999) Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 151-158.
- Jett, B.D., Huycke, M.M. y Gilmore, M.S.** (1994) Virulence of enterococci. A review. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.
- Kandler, O. y Weiss, N.** (1986) Regular nonsporulating Gram-positive rods. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, pp. 1208-1234. Eds: Sneath P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. Williams and Wilkins Company, Maryland, USA.
- Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G. y Herikstad, H.** (2001) Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 147-152.
- Kaur, N. y Gupta, A.K.** (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. A review. *J. Biosci.* **27**: 703-714.
- Kayser, F.H.** (2003) Safety aspects of enterococci from the medical point of view. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 255-262.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S. y Okamoto, T.** (1999) Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 313-316.
- Kimoto, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Suzuki, I., Tsuji, N.M. y Kurisaki, J.** (2007) *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *JARQ* **41**: 181-189.
- Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. y Salminen, S.J.** (1998) The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 185-189.

Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A. y Altermann, E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 393-409.

Klare, I., Werner, G. y Witte, W. (2001) Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. A review. *Contrib. Microbiol.* **8**: 108-122.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. y Reuter, G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.

Klijn, N., Weerkamp, A.H. y de Vos, W.M. (1995) Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2771-2774.

Kolida, S. y Gibson, G.R. (2007) Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J. Nutr.* **137**: 2503-2506.

Kopp-Hoolihan, L. (2001) Prophylactic and therapeutic uses of probiotics. A review. *J. Am. Diet Assoc.* **101**: 239-241.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. y Uchiyama, H. (2008) Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.* **106**(4): 381-386.

Lankaputhra, W.E.V. y Shah, N.P. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* **30**: 2-7.

Lanyi, B. (1987) Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. En: *Methods in microbiology*, p. 35. Eds: Colwell, R.R. y Grigorova, R. Academic Press Ltd., London, UK.

Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penades, J.R. y Leiva, J. (2005) Bacterial biofilms and infection. *An. Sist..Sanit..Navar.* **28**: 163-175.

Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S. y Gorbach, S.L. (1999) Probiotics. En: *Handbook of Probiotics*, pp.1-4. Eds: Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S. y Gorbach, S.L. Wiley-Interscience Publication, NY, USA.

Le Leu, R.K., Hu, Y. y Young, G.P. (2002) Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis*, **23**: 713-719.

- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Perea Velez, M., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.** (2007) Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6768-6775.
- Leclerc, P., Gauthier, S., Bachelard, H. y Santure, D.** (2002) Antihypertensive activity of casein enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* **12**: 995-1004.
- Leclercq, R. y Courvalin, P.** (1997) Resistance to glycopeptides in enterococci. A review. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 545-56.
- Lee, Y.K. y Salminen, S.** (1995) The coming age of probiotics. A review. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 241-245.
- Lehto, E.M. y Salminen, S.** (1997) Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal caco-2 cell line. *Biosci. Microflora*, **16**: 13-17.
- Leroy, F., y de Vuyst, L.** (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Sci. Technol.* **15**: 67-78.
- Lilly, D.H. y Stillwell, R.H.** (1965) Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci.* **147**: 747-748.
- Lopes Mde, F., Simoes, A.P., Tenreiro, R., Marques, J.J. y Crespo, M.T.** (2006) Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 208-214.
- Luo, H., Wan, K. y Wang, H.H.** (2005) High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMBeta1 transmission by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2970-2978.
- MacFarlane, G.T. y McBain, A.J.** (1999) The human colonic microbiota. En: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*, pp. 1-25. Eds: Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mack, D.R.** (2004) D(-)-lactic acid-producing probiotics, D(-)-lactic acidosis and infants. *Can. J. Gastroenterol.* **18**: 671-675.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. y Vesikari, T.** (1995) Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **20**: 333-338.
- Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R. y Ruiz-Barba, J.L.** (2004) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with

specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.* **186**: 1556-1564.

Maldonado-Galdeano, C. y Perdígón, G. (2006) The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol.* **13**: 219-226.

Malleret, C., Lauret, R., Ehrlich, S.D., Morel-Deville, F. y Zagorec, M. (1998) Disruption of the sole *ldhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate. *Microbiology*, **144**: 3327-3333.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I. y Sechi, L.A. (2003) Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 291-304.

Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.F. y Rambaud, J.C. (1990) Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.* **64**: 71-79.

Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H. (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* **80**: 1031-1037.

Martí del Moral, A., Moreno-Aliaga, M.J. y Martínez, J.A. (2003) Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutr. Hosp.* **18**: 181-188.

Mathur, S. y Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 281-295.

Mattila-Sandholm, T., Saarela, M. y de Vos, W.M. (2005) Future development of probiotic dairy products. En: *Probiotic Dairy Products*, pp. 195-205. Ed: Tamime, A. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. y Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* **12**: 173-182.

Mayra-Makinen, A., Manninen, M. y Gyllenberg, H. (1983) The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. *J. Appl. Bacteriol.* **55**: 241-245.

McCartney, A.L. (2005) Enumeration and identification of mixed probiotic and lactic acid bacteria starter cultures. En: *Probiotic Dairy Products*, pp. 98-119. Ed: Tamime, A. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

McEldowney, S. y Fletcher, M. (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 460-465

McSweeney, P.L.H. y Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. A review. *Le Lait*, **80**: 293-324.

Menéndez, S., Hermida, M., Godínez, R., Centeno, J.A. y Rodríguez-Otero, J.L. (2001) Actividades enzimáticas de algunas cepas con interés tecnológico aisladas del queso Tetilla elaborado con leche cruda. *Alimentaria*, **326**: 49-55.

Mercenier, A., Muller-Alouf, H. y Grangette, C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**: 17-25.

Metchnikoff, E. (1907) Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. En: *The prolongation of Life: Optimistic studies*, pp. 161-183. Ed: Mitchel, C. William Heinemann Press, London, UK.

Mikelsaar, M., Mänder, R. y Sepp, E. (1998) Lactic acid microflora in the human microbial ecosystem and its development. En: *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, pp: 279-342. Eds: Salminen, S. y von Wright, A. Marcel Dekker, NY. USA.

Miller, J.B., Bull, S., Miller, J. y McVeagh, P. (1994) The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **19**: 371-376.

Minelli, E.B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenete, O., Ferrario, R., Hendricks, H. y Dellaglio, F. (2004) Assessment of a novel probiotic *Lactobacillus casei* strain for production of functional dairy foods. *Int. Dairy J.* **14**: 723-736.

Mishra, C.H. y Lambert, J. (1996) Production of anti-microbial substances by probiotics. A review. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **5**: 20-24.

Mitsuoka, T. (1990) *Bifidobacteria* and their role in human health. A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 263-268.

Molis, C., Flourie, F., Ouarne, F., Galling, M.F., Lartigue, S., Guibert, A., Bornet, F. y Galmiche, J.P. (1996) Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**: 324-328.

Moreau, M.C. (2000) Flore intestinale, prebiotique et effets sur la reponse immunitaire intestinale a IgA. *Arch. Pediatr.* **7**: 247-248.

Morelli, L. (2000) In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. A review. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1**: 59-67.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.

Mundy, L.M., Sahm, D.F. y Gilmore, M. (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. A review. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 513-522.

Netherwood, T., Bowden, R., Harrosin, P., O'Donnel, A.G., Parker, D.S. y Gilbert, H.J. (1999) Gene transfer in the gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5139-5141.

Nielsen, E.M., Schlundt, J., Gunvig, A. y Jacobsen, B.L. (1994) Epithelial, mucus and lumen subpopulations of *Escherichia coli* in the large intestine of conventional and gnotobiotic rats. *Microb. Ecol. Health Dis.* **7**: 263-273.

Norin, K.E., Persson, A.K., Saxerholt, H. y Midtvedt, T. (1991) Establishment of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1850-1852.

Oakey, H.J., Harty, D.W. y Knox, K.W. (1995) Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 142-148.

O'Connor, E.B., Barret, E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C. y Ross, R.P. (2005) Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocinas by probiotic bacteria. En: *Probiotic dairy products*, pp. 39-72. Ed: Tamime, A.Y. Blackwell publishing, Oxford, UK.

Ogier, J.C. y Serror, P. (2008) Safety assesment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 286-290.

O'Grady, B. y Gibson, G.R. (2005) Microbiota of the human gut. En: *Probiotic Dairy Products*, pp. 1-15. Ed: Tamime, A. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

O'May, G.A. y MacFarlane, G.T. (2005) Health claims associated with probiotics. En: *Probiotic dairy products*, pp. 139-165. Ed: Tamime, A.Y. Blackwell publishing, Oxford, UK.

- Ohta, A., Ohtsuki, M., Baba, S., Adachi, T., Sakata, T. y Sakaguchi, E.** (1995) Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr.* **125**: 2417-2424.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.M., Isolauri, E. y Salminen, S.J.** (1999a) Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* **9**: 623-630.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S.** (1999b) Probiotics: mechanism and established effects. A review. *Int. Dairy J.* **9**: 43-52.
- Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J.** (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. A review. *Int. Dairy J.* **8**: 749-758.
- Ouwehand, A.C., Tölkö, S. y Salminen, S.** (2001) The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *J. Food Sci.* **66**: 856-859.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. y Isolauri, E.** (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. A review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**: 279-289.
- Ouwehand, A.C. y Salminen, S.** (2003) Safety evaluation of probiotics. En: *Functional dairy products*, pp. 316-336. Eds. Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. y Villani, F.** (2004) Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* **67**: 309-317.
- Pennacchia, C., Vaughan, E.E. y Villani, F.** (2006) Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. *Meat Sci.* **73**: 90-101.
- Peña, A.S.** (2007) Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos. A review. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **99**: 653-658.
- Perdigon, G., Alvarez, S. y de Macias, M.E.N.** (1990) The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protect.* **53**: 404-410.
- Perdigon, G., Fuller, R. y Raya, R.** (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**: 27-42.
- Pérez-Conesa, D.** (2003) Adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia, España.

Pinto, M., Robine-Leon, S. y Appay, M.D. (1983) Enterocyte like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* **47**: 323-330.

Pfeltz, R.F. y Wilkinson, B.J. (2004) The escalating challenge of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **4**: 273-294.

Pimentel, L.L., Semedo, T., Tenreiro, R., Crespo, M.T., Pintado, M.M. y Malcata, F.X. (2007) Assessment of safety of enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheesemaking: virulence factors and antibiotic susceptibility. *J. Food Prot.* **70**: 2161-2167.

Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. y Schell, M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 2512-2517.

Probert, H.M., Apajalahti, J.H., Rautonen, N., Stowell, J. y Gibson, G.R. (2004) Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4505-4511.

Prost, F. y Chamba, J.F. (1994) Effect of aminopeptidase activity of thermophilic lactobacilli on Emmental cheese characteristics. *J. Dairy Sci.* **77**: 24-33.

Puertollano, E., Puertollano, M.A., de Cienfuegos, G.A, de Pablo, M. (2008) Probióticos: Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud. *Actualidad SEM.* **45**: 28-33.

Quadri, L.E., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1994) Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* **269**: 12204-12211.

Rai, R. y Sundeepa, R. (2002) Pseudomembranous colitis requiring surgical intervention following triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *ANZ J. Surg.* **72**: 917-919.

Reddy, G.P. y Bush, C.A. (1991) High-performance anion exchange-chromatography of neutral milk oligosaccharides and oligosaccharide alditols derived from mucin glycoproteins. *Anal. Biochem.* **198**: 278-284.

Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J. y Henning, B. (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30**: 49-52.

Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. y McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. A review. *Clin.Microbiol.Rev.* **16**: 658-672.

Rettger, L.F., Levy, M.N., Weinstein, L. y Weiss, J.E. (1935) *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application, pp. 16-25. Yale University Press, USA.

Rivera-Espinoza, Y. y Gallardo-Navarro, Y. (2010) Non-dairy probiotic products. A review. *Food Microbiol.* **27**: 1-11.

Roberfroid, M.B., Bornet, F., Bouley, C. y Cummings, J.H. (1995) Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr.Rev.* **53**: 127-130.

Roberfroid, M.B. y Delzenne, N.M. (1998) Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutr.* **18**: 117-143.

Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J. y Seppala, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2823-2830.

Roos, S. y Jonsson, H. (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiol.* **148**: 433-442.

Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. y Matteuzzi, D. (2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6150-6158.

Rowland, I. (1988) Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. A review. *Toxicol. Pathol.* **16**: 147-153.

Rowland, I. y Tanaka, R. (1993) The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human fecal microflora.. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 667-674.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Nevado, F.P. y de Guía-Córdoba, M. (2008a) Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.* **80**: 715-721.

Ruiz-Moyano, S., Martín-González, A., Hernández-León, A. y Casquete, R. (2008b). Un nuevo embutido probiótico de cerdo ibérico. En: Informe anual sobre la Agricultura y la Ganadería Extremeña, pp. 105-116. Ed. Caja Badajoz. Badajoz, España.

- Ruseler-van Embden, J.G., van Lieshout, L.M., Gosselink, M.J. y Marteau, P.** (1995). Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. J. Gastroenterol.* **30**: 675-680.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. y Mattila-Sandholm, T.** (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. A review. *J. Biotechnol.* **84**: 197-215.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S. y Mattila-Sandholm, T.** (2002) Gut bacteria and health foods. The European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 99-117.
- Saito, T.** (2004) Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from *Lactobacillus acidophilus* group and their application to functional foods. *Animal Sci. J.* **75**: 1-13.
- Sako, T., Matsumoto, K. y Tanaka, R.** (1999) Recent Progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. A review. *Int. Dairy J.* **9**: 69-80.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. y Sandholm, T.M.** (1998) Demonstration of safety of probiotics. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 93-106.
- Sanders, M.E.** (2008) Probiotics: definition, sources, selection, and uses. A review. *Clin.Infect.Dis.* **46** Suppl 2: 58-61.
- Sanz, Y., Collado, M.C. y Dalmau, J.** (2006) Contribución de la microbiota intestinal y del género "Bifidobacterium" a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr. Esp.* **64**: 74-78.
- Sarmiento-Rubiano, L.A.** (2008) Investigación de propiedades prebióticas de alimentos o componentes alimenticios. *Orinoquia.* **12**(1): 182-193.
- Savage, D.C.** (1992) Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1992-1995.
- Saxelin, M., Chuang, N.H., Chassy, B., Rautelin, H., Makela, P.H., Salminen, S. y Gorbach, S.L.** (1996). Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 564-566.
- Schillinger, U., Geisen, R. y Holzapfel W.W.H.** (1996) Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. A review. *Trends Food Sci. Tech.* **7**: 158-164.

Schillinger, U. y Lücke, F.K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1901-1906.

Schillinger, U., Guigas, C. y Holzapfel, W.H. (2005) In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* **15**: 1289-1297.

Schlundt, J., Saadbye, P., Lohmann, B., Jacobsen, B.B.L. y Nielsen, E.M. (1994) Conjugal transfer of plasmid DNA between *Lactococcus lactis* strains and distribution of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotics rats. *Microb. Ecol. Health Dis.* **7**: 59-69.

Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E.G. y Schrezenmeir, J. (2001) Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 459-464.

Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Tenreiro, R. y Barreto Crespo, M.T. (2003a). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2569-2576.

Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T. y Tenreiro, R. (2003b) Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? A review. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 13-22.

Shah, N.P. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. A review. *J. Dairy Sci.* **83**: 894-907.

Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C. y Gorbach, S.L. (1987) Antimicrobial substances from a human lactobacillus strain. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **31**: 1231-1233.

Simmering, R. y Blaut, M. (2001) Pro- and prebiotics--the tasty guardian angels? A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 19-28.

Slutsker, L. y Schuchat, A. (1999) Listeriosis in humans. *En: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, pp. 75-95. Eds: Ryser, E. T. y Marth, E. H. Marcel Dekker, New York, USA.

Smith, N.R., Gordon, R.E. y Clark, F.E. (1952) Aerobic Spore-Forming Bacteria. US Department of Agriculture, Monograph No. 16. Washington, DC, US.

Smith, A.C. y Podolsky, D.K. (1986) Colonic mucin glycoproteins in health and disease. A review. *Clin. Gastroenterol.* **15**: 815-837.

- Smith, C.J., Kaper, J.B. y Mack, D.R.** (1995) Intestinal mucin inhibits adhesion of human enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **21**: 269-276.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P.** (1998) Probiotic cheese. *Int. Dairy J.* **8**: 491-496.
- Stark, P.L. y Lee, A.** (1982) The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* **15**: 189-203.
- Stolberg, L., Rolfe, R., Gitlin, N., Merritt, J., Mann, L., Jr, Linder, J. y Finegold, S.** (1982) d-Lactic acidosis due to abnormal gut flora: diagnosis and treatment of two cases. *N. Engl. J. Med.* **306**: 1344-1348.
- Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Mäkinen, P., Fiedler, S., Wirth, R. y Clewell, D.B.** (1991) Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* **59**: 415-420.
- Su, P., Henriksson, A. y Mitchell, H.** (2007) Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe*, **13**: 134-139.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. y Kailasapathy, K.** (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* **62**: 47-55.
- Sun, J., Le, G.W., Shi, Y.H. y Su, G.W.** (2007) Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**: 79-85.
- Swennen, K., Courtin, C.M. y Delcour, J.A.** (2006) Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**: 459-471.
- Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M. y Mikolajczyk, W.** (2001) Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.* **138**: 361-365.
- Tamime, A.Y., Marshall, V.M. y Robinson, R.K.** (1995) Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* **62**: 151-187.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Korslund-Søndergaard, A., Mistry, V.V. y Shah, N.P.** (2005) Production and Maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. En: *Probiotic dairy products*, pp. 39-72. Ed: Tamime, A.Y. Blackwell publishing, Oxford, UK.

- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. y Mierau, I.** (1999) Screening of lactic acid bacteria for bile salt hidrolase activity. *J. Dairy Sci.* **82**: 2530-2535.
- Tanner, A.C., Strzempko, M.N., Belsky, C.A. y McKinley, G.A.** (1985) API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 333-335.
- Tannock, G.W.** (2002) Probiotics and Prebiotics: Where Are We Going? En: *Probiotics and Prebiotics Where Are We Going?* pp: 1-39. Ed. Tannock, G.W. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Teitelbaum, J.E. y Walker, W.A.** (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 107-138.
- Teuber, M., Meile, L. y Schwarz, F.** (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. A review. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 115-137.
- Thomas, T.D., Ellwood, D.C. y Longyear, V.M.C.** (1979) Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.* **138**: 109-117.
- Thurl, S., Offermanns, J., Muller-Werner, B. y Sawatzki, G.** (1991) Determination of neutral oligosaccharide fractions from human milk by gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.* **568**: 291-300.
- Tissier, H.** (1906) Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bacterienne de l'intestin. *CR. Soc. Biol.* **60**: 359-361.
- Tokunaga, T., Oku, T. y Hosoya, N.** (1989) Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharides, in rats. *J. Nutr.* **119**: 553-559.
- Tojo-Sierra, R. y Leis-Trabazo, R.** (2003) Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. A review. *Bol. Pediatr.* **43**: 376-395.
- Toure, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. y Fliss, I.** (2003) Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 1058-1069.
- Tsuji, Y., Yamada, K., Hosoya, N. y Moriuchi, S.** (1986) Digestion and absorption of sugars and sugars substitutes in rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **32**: 93-100.
- Tuomola, E.M. y Salminen, S.J.** (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 45-51.
- Turakhia, M.H. y Characklis, W.G.** (1989) Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: effect of calcium. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 406-414.

- Uribarri, J., Oh, M.S. y Carroll, H.J.** (1998) D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine (Baltimore)* **77**: 73-82.
- Van den Heuvel, E.G., Muijs, T., Van Dokkum, W. y Schaafsma, G.** (1999) Lactulose stimulates calcium absorption in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1211-1216.
- Van der Waaij, L.A., Limbug, P.C., Mesander, G. y van der Waaij, D.** (1996) In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut*, **38**: 348-354.
- van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G.** (1995) On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**: 525-552.
- Villegas, E. y Gilliland, S.E.** (1998) Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* at 5°C. *J. Food Sci.* **63**: 1070-1074.
- Vinderola, G., Matar, C. y Perdigon, G.** (2005) Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**: 1075-1084.
- Vizoso-Pinto, M.G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W.H. y Franz, C.M.** (2007) Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *J. Food Prot.* **70**: 125-134.
- Walter, J., Chagnaud, P., Tannok, G.W., Loach, D.M., Dal Bello, F., Jenkinson, H.F., Hammes, W.P. y Hertel, C.** (2005) A High-Molecular-Mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 979-986.
- Wang, X., Brown, I.L., Evans, A.J. y Conway, P.L.** (1999) The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 631-639.
- WGO.** (2008) Guías prácticas de la organización mundial de gastroenterología: Probióticos y prebióticos.
Disponibile en: <http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html>
- Weisblum, B.** (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 577-585.

Woodford, N., Johnson, A.P., Morrison, D. y Speller, D.C. (1995) Current perspectives on glycopeptide resistance. A review. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 585-615.

Yamashita, K. y Kobata, A. (1974) Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization of a new trisaccharide, 6'-galactosyllactose. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**: 164-170.

Yildirim, Z., Winters, D.K. y Johnson, M.G. (1999) Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 45-54.

Yokota, A., Veenstra, M., Kurdi, P., van Veen, H.W. y Konings, W.N. (2000) Cholate resistance in *Lactococcus lactis* is mediated by an ATP-dependent multispecific organic anion transporter. *J. Bacteriol.* **182**: 5196-5201.

Zamora, L.M. (2003) Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. *Tesis doctoral*. Universidad de Girona, España.

Zarate, G., Chaia, A.P., Gonzalez, S. y Oliver, G. (2000) Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Prot.* **63**: 1214-1221.

Zhou, J.S., Shu, Q., Rutherford, K.J., Prasad, J., Birtles, M.J., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000) Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *Int. J. Food Microbiol.* **56**: 87-96.

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2005) Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **98**: 211-217.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., Akkermans van Vliet, W.M., de Visser, R.A.G.M. y de Vos, W.M. (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **13**: 129-134.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E. y Louvard, D. (1991) Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. En: *Intestinal absorption and secretion. Handbook of Physiology*, vol, IV. pp. 223-225. Eds: Field, M. y Frizzell, R.A. Amer. Physiol. Soc. Bethesda, USA.

