

Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogurt

Jorge García Hernández

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A
LA CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA
SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS
LÁCTICAS DEL YOGUR**

**Tesis doctoral
Jorge García Hernández
Noviembre 2010**

**Directores
Manuel Hernández Pérez
Yolanda Moreno Trigos**



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

© Jorge García Hernández, 2012

Primera edición, 2012

© de la presente edición:
Editorial Universitat Politècnica de València
www.editorial.upv.es

ISBN: 978-84-8363-804-0 (versión impresa)

Ref. editorial: 5516

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

D. **Manuel Hernández Pérez**, profesor titular y Dña. **Yolanda Moreno Trigos**, técnico de laboratorio, pertenecientes al Departamento de Biotecnología (Área de Microbiología) de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS LÁCTICAS DEL YOGUR**”, que presenta D. **Jorge García Hernández** para optar al grado de **Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos adecuados para ser presentada como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente para su lectura y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado,

Valencia, 26 de noviembre de 2010

Fdo.: D. Manuel Hernández Pérez

Fdo.: Dña. Yolanda Moreno Trigos

A Cris y a mis padres

Agradecimientos

Una vez finalizada la redacción de mi Tesis Doctoral, tengo que enfrentarme a la complicada tarea de agradecer a muchas personas el apoyo y cariño proporcionado. Intentaré no olvidarme de nadie y pido disculpas por anticipado si ésto ocurriera.

No me cabe duda que, en primer lugar, debo expresar mis agradecimientos a Cris. Sin tus ánimos, tu paciencia y sobre todo, tu ayuda, ambos sabemos que jamás habría podido acabar este trabajo.

Gracias a mis directores. A Yoli por enseñarme todo lo que sé en cuanto a técnicas de laboratorio. A Manolo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en el Departamento. Ambos habéis estado siempre ahí y me habéis dado vuestro apoyo en los momentos en los que lo necesité. Pero sobre todo gracias por vuestra amistad. Tenéis en mí un amigo para siempre.

Quiero agradecer a D. Enrique la confianza que un día me dio para poder formar parte del área de Microbiología.

Gracias a Javier por haberse portado siempre tan bien conmigo y por sus buenos consejos en todo momento.

Quiero mandar un fuerte abrazo a todas las personas con las que felizmente trabajo todos los días: M^a Antonia, Salut, Rosa, M^a Angeles (gracias por tu ayuda con la estadística), Ana J., Rafa, Gonzalo y Ana G.

Me acuerdo especialmente de los amigos que pasaron un día por el C.A.M.A. y de los cuales guardo muchos recuerdos por los buenos momentos vividos: Patri, Irene, Lore, Gerard. Espero de corazón que a todos os vaya muy bien.

Mi cariño también para los que han pasado por el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Agrónomos: Paula, Albert, Claudia y tantos otros.

A todos mis amigos, en especial a los del Liceo, los de la Facultad, los de Denia los del Barrio y los de Campo Arcís.

Agradecimientos

Y como no a toda mi familia que siempre me ha apoyado en todas las decisiones tomadas. Muchas gracias a mis padres. Y un recuerdo especial a mis dos abuelas, Librada y Maruja, que están viviendo un momento de salud delicado.

Gracias a todos

***“La ignorancia afirma o niega rotundamente;
la Ciencia, duda”***

François-Marie Arouet (Voltaire) (1694-1778)

ÍNDICES Y RESÚMENES

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. ALIMENTOS FUNCIONALES	3
2. LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO COMPONENTES ALIMENTARIOS FUNCIONALES	6
3. EL CONCEPTO DE MICROBIOTA INTESTINAL EQUILIBRADA	11
4. PROBIÓTICOS Y PRODUCTOS LÁCTEOS	18
5. EL YOGUR Y EL YOGUR PASTEURIZADO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN. LA GUERRA DEL YOGUR	20
6. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS	27
7. FILOGENIA DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS	30
8. GÉNERO <i>Lactobacillus</i>	31
8.1. Antecedentes históricos	31
8.2. Taxonomía	32
8.3. Hábitats	33
8.4. Características morfológicas	34
8.5. Características fisiológicas y culturales	34
8.6. Características bioquímicas	35
8.7. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	35
9. GÉNERO <i>Streptococcus</i>	38
9.1. Antecedentes históricos	38
9.2. Taxonomía	38
9.3. Hábitats	39
9.4. Características morfológicas	39
9.5. Características fisiológicas y culturales	40
9.6. Características bioquímicas	40
9.7. <i>Streptococcus thermophilus</i>	40

10. TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN	43
10.1. Detección por cultivo	43
10.2. Detección por PCR tradicional	46
10.3. Caracterización mediante iniciadores aleatorios, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)	55
10.4. Detección mediante hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)	59
10.5. Detección de formas viables por DVC-FISH	64
<u>OBJETIVOS</u>	71
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	75
1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, RECuento Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>) PRESENTES EN YOGURES DE ONCE MARCAS COMERCIALES	77
1.1. Yogures analizados y cepas de referencia utilizadas	77
1.2. Muestreo, recuento y aislamiento de microorganismos	77
1.3. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas	78
1.4 Recuento e identificación de BAL mediante la utilización de sondas específicas (FISH)	79
1.4.1. Sondas	80
1.4.2. Hibridación <i>in situ</i> (FISH)	82
1.5 Caracterización genotípica	84
1.5.1 Aislamiento de ADN genómico	84
1.5.2 Amplificación del ADN mediante iniciadores aleatorios	85

("Random Amplified Polymorphic DNA" o RAPDs)	
1.6. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPDs	87
2. DETECCIÓN DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> MEDIANTE PCR TRADICIONAL Y PCR SEMINESTED	89
2.1. Cepas bacterianas utilizadas, condiciones de cultivo y conservación	89
2.2. Aislamiento del ADN genómico bacteriano	90
2.3. Detección de <i>L. delbrueckii</i> mediante PCR simple	90
2.4. Detección de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> mediante PCR seminested	91
2.5. Detección de <i>S. thermophilus</i> mediante PCR	92
2.6. Análisis de los productos de PCR	93
3. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN Y RECuento DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH)	94
4. PUESTA A PUNTO DE MÉTODO COMBINADO DVC-FISH PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	95
4.1. Puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	95
4.2. Puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de <i>Streptococcus thermophilus</i>	98

5. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA RESISTENCIA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i> A LAS CONDICIONES DE TRNSITO GASTROINTESTINAL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DVC-FISH	101
5.1. Estudio de la resistencia a la pepsina	102
5.2. Estudio de la resistencia a la pancreatina	105
6. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS CEPAS DE BAL DE UN PRODUCTO FERMENTADO (YOGUR)	107
6.1. Determinación del límite de detección de las diferentes técnicas empleadas para la detección de las BAL en heces	107
6.1.1. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en heces inoculadas artificialmente para determinar el límite de detección de las técnicas de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH	107
6.1.2. Detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> en heces inoculadas artificialmente para determinar el límite de detección de las técnicas de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH	108
6.1.3. Aplicación del DVC-FISH para la detección de células viables en heces y determinación del límite de detección del método	109
6.2. Estudio <i>in vivo</i> para determinar la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de BAL de un producto fermentado (yogur)	113
6.2.1. Diseño del estudio	113
6.2.2. Análisis de las muestras fecales	114
6.2.3 Estudio de la viabilidad por DVC-FISH y detección por PCR seminested de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en muestras de heces	115
6.2.4 Estudio de la viabilidad por DVC-FISH y detección por	117

PCR de <i>Streptococcus thermophilus</i> en muestras de heces	
6.3. Estudio de la evolución de la microbiota de las heces de las personas sometidas al ensayo <i>in vivo</i>	118
6.3.1. Recuentos de la población bacteriana presente en las heces a lo largo del ensayo	118
6.3.2. Análisis estadísticos	121
<u>RESULTADOS</u>	123
1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i>) PRESENTES EN 11 YOGURES COMERCIALES	125
1.1. Aislamiento y recuento en placa de BAL de las muestras de yogur analizadas	125
1.2. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas (sistema comercial API-50CHL)	128
1.3. Identificación y recuento de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	129
1.3.1. Identificación de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> mediante sondas fluorescentes. Especificidad de las sondas y recuento en productos comerciales	129
1.3.2. Identificación de <i>S. thermophilus</i> mediante sondas fluorescentes. Especificidad de la sonda y recuento en productos comerciales	137
1.4. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPDs	141
1.4.1. Caracterización molecular mediante RAPDs de las cepas de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> aisladas de productos comerciales	141
1.4.2. Caracterización molecular mediante RAPDs de las cepas de <i>S. thermophilus</i> aisladas de productos comerciales	146

2. DETECCIÓN DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i> MEDIANTE PCR TRADICIONAL y PCR SEMINESTED	151
2.1. Detección de <i>L. delbrueckii</i> mediante PCR	151
2.2. Detección de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> mediante PCR seminested	154
2.3. Detección de <i>S. thermophilus</i> mediante PCR	155
3. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO COMBINADO DVC-FISH PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i>	158
3.1. Detección de células viables de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	158
3.2. Detección de células viables de <i>S. thermophilus</i>	165
4. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA RESISTENCIA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i> A LOS JUGOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DVC-FISH	169
4.1. Acción de los jugos gástricos	170
4.2. Acción de los jugos intestinales	173
5. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> CON PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS CEPAS DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y <i>Streptococcus thermophilus</i>	179

5.1. Estudio de sensibilidad de métodos ensayados en heces humanas inoculadas artificialmente	179
5.1.1 Sensibilidad de los métodos de cultivo en placa, PCR, FISH y DVC-FISH para la detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en heces inoculadas artificialmente	179
5.1.2. Sensibilidad de los métodos de cultivo en placa, PCR, FISH y DVC-FISH para la detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> en heces inoculadas artificialmente	182
5.2. Estudio <i>in vivo</i> para determinar la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> de un producto fermentado	185
5.2.1 Detección y recuento de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en heces	185
5.2.2. Análisis de las muestras de heces mediante PCR y DVC-FISH para la detección de <i>S. thermophilus</i> en heces	186
6. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LAS HECES DE LAS PERSONAS SOMETIDAS AL ENSAYO <i>IN VIVO</i>	193
6.1. Recuentos de la población bacteriana presente en las heces a lo largo del ensayo	193
6.1.1. Recuentos de lactobacilos	193
6.1.2. Recuentos de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos	194
6.1.3. Recuentos de microorganismos aerobios	195
6.1.4. Recuentos de bifidobacterias	196
6.1.5. Recuentos de enterobacterias	196
<u>DISCUSIÓN</u>	199
<u>CONCLUSIONES</u>	221

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	227
<u>ANEXOS</u>	263
ANEXO I. Abreviaturas empleadas	265
ANEXO II. Lista actual de especies incluidas en el género <i>Lactobacillus</i> (datos obtenidos de List of Prokaryotic names with Sanding in Nomenclatura, agosto 2008, www.bacterio.cict.fr)	2267
ANEXO III. Lista actual de especies incluidas en el género <i>Streptococcus</i> (datos obtenidos de List of Prokaryotic names with Sanding in Nomenclatura, agosto 2008, www.bacterio.cict.fr)	273
ANEXO IV.	277
Medios de cultivo	
Soluciones, reactivos y material para identificación con PCR y FISH	284
Soluciones y reactivos para FISH	286
ANEXO V. Otros reactivos	289
ANEXO VI. Secuenciación parcial de los genes 16S y 23S de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> Y7	290
ANEXO VII. Recuentos de la microbiota en las heces de los individuos sometidos al ensayo <i>in vivo</i>	291
ANEXO VIII. Direcciones de interés en Internet	301

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Ejemplos de alimentos funcionales	5
Tabla 2. Propiedades deseables en los microorganismos probióticos	9
Tabla 3. Microorganismos utilizados como probióticos y efectos beneficiosos comprobados por ensayos clínicos	10
Tabla 4. Patologías relacionadas con disfunción de la flora intestinal	15
Tabla 5. Distribución y consumo de productos lácteos	20
Tabla 6. Características diferenciales de las bacterias acidolácticas	27
Tabla 7. Características de los lactobacilos homofermentativos obligados (grupo I), heterofermentativos facultativos (grupo II), heterofermentativos obligados (grupo III)	31
Tabla 8. Características fisiológicas y bioquímicas de las cuatro subespecies del <i>L. delbrueckii</i>	36
Tabla 9. Patrón de carbohidratos fermentados por las cuatro subespecies de <i>L. delbrueckii</i>	37
Tabla 10. Características bioquímicas más importantes de <i>Streptococcus thermophilus</i>	42
Tabla 11. Iniciadores específicos de especies normalmente disponibles	49
Tabla 12. Iniciadores múltiples empleados para la identificación de lactobacilos	53
Tabla 13. Algunos iniciadores de RAPDs empleados por distintos autores	57
Tabla 14. Sondas oligonucleótidas para la identificación de lactobacilos	62

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 15. Condiciones de reacción de amplificación por RAPDs para lactobacilos y estreptococos	86
Tabla 16. Cepas de referencia utilizadas	89
Tabla 17. Condiciones de PCR para <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	91
Tabla 18. Condiciones de PCR para <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i>	91
Tabla 19. Medios de cultivo, condiciones y tiempos de incubación para cada grupo de microorganismos estudiado	119

RESULTADOS

Tabla 20. Recuentos de la microbiota de los productos lácteos analizados.	126
Tabla 21. Alineamiento de secuencias de la sonda LDE16S	130
Tabla 22. Especificidad de la sonda LDE16S	131
Tabla 23. Alineamiento de secuencias de la sonda LDE23S	134
Tabla 24. Especificidad de la sonda LDE23S	134
Tabla 25. Recuentos de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> en los diferentes yogures naturales mediante FISH.	136
Tabla 26. Alineamiento de secuencias de la sonda STH23S	138
Tabla 27. Hibridación de cepas de LAB con la sonda STH23S	139
Tabla 28. Recuentos de células de <i>Streptococcus thermophilus</i> hibridadas en los diferentes yogures	140
Tabla 29. Porcentajes de homología genética entre la cepa de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y7 y el resto de lactobacilos de otras marcas comerciales obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD1	143

Tabla 30. Porcentajes de homología genética entre la cepa de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Y7 y el resto de lactobacilos de otras marcas comerciales obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD2	145
Tabla 31. Porcentajes de homología genética entre la cepa del <i>S. thermophilus</i> Y7 y el resto de estreptococos aislados de otras marcas comerciales obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD1	147
Tabla 32. Porcentajes de homología genética entre la cepa de <i>S. thermophilus</i> que Y7 y el resto de estreptococos aislados de otras marcas comerciales, obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD1	149
Tabla 33. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2	151
Tabla 34. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2 con <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	152
Tabla 35. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2 con <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	153
Tabla 36. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores LdelbF, LdelbR1 y LdelbR2	154
Tabla 37. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores TH1 y TH2	156
Tabla 38. Antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación evaluados en la puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LDY7 según longitud celular	159
Tabla 39. Antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación evaluados en la puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 según diámetro celular	166
Tabla 40. Media de los recuentos del producto Y7 realizados en placa y por DVC-FISH previos a la realización de las pruebas de resistencia a los jugos gastrintestinales	170
Tabla 41. Efecto <i>in vitro</i> del tránsito gástrico (pepsina) sobre la viabilidad de las cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y de <i>Streptococcus thermophilus</i> de un yogur natural comercial	172

Índice de tablas

Tabla 42. Efecto <i>in vitro</i> del tránsito intestinal (pancreatina) sobre la viabilidad de las cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y de <i>Streptococcus thermophilus</i> de un yogur natural comercial empleando la técnica del DVC-FISH para realizar los recuentos	175
Tabla 43. Viabilidad acumulada de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y de <i>Streptococcus thermophilus</i> tras superar tránsito gastrointestinal por recuento mediante DVC-FISH	176
Tabla 44. Comparación de los límites de detección de las distintas técnicas para la detección de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en muestras de heces inoculadas en u.f.c./g de heces	180
Tabla 45. Comparación de los límites de detección de las distintas técnicas para la detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> en muestras de heces inoculadas en u.f.c./g de heces	184
Tabla 46. Análisis de muestras fecales de las tomas T1 y T2 para la detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> mediante PCR seminested y DVC-FISH	186
Tabla 47. Análisis de muestras fecales de las tomas T3 y T4 para la detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> mediante PCR seminested y DVC-FISH	188
Tabla 48. Análisis de muestras fecales de las tomas T5 y T6 para la detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> mediante PCR seminested y DVC-FISH	189
Tabla 49. Recuentos de células viables de <i>Streptococcus thermophilus</i> mediante DVC-FISH en diferentes individuos durante la toma de muestras	192
Tabla 50: análisis de varianza simple (ANOVA) para lactobacilos según Tiempo (días)	193
Tabla 51. ANOVA para Anaerobios según Tiempo (días)	195
Tabla 52. ANOVA para Aerobios según Tiempo (días)	195
Tabla 53. ANOVA para Bifidobacterias según Tiempo (días)	196
Tabla 54. ANOVA para Enterobacterias según Tiempo (días)	197

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Géneros que dominan en número en el tracto gastrointestinal de un humano adulto	12
Figura 2. Colonización bacteriana del intestino	12
Figura 3. Los grupos de microbios más importantes, sus cantidades y división aproximada según su potencial de efectos dañinos y beneficiosos (Saxelin, 2002)	14
Figura 4. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (bacilo) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (coco) en yogur	21
Figura 5. Fabricantes de yogur tradicional	23
Figura 6. Morfología de algunas especies del género <i>Lactobacillus</i>	34
Figura 7. Morfología de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	36
Figura 8. Morfología de algunas especies del género <i>Streptococcus</i>	40
Figura 9. Representación esquemática de un ciclo de la PCR	47
Figura 10. Esquema de la técnica de hibridación in situ	59

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11. Puesta a punto del método DVC-FISH para <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	97
Figura 12. Puesta a punto del método DVC-FISH para <i>Streptococcus thermophilus</i>	100
Figura 13. Estudios de resistencia a la pepsina de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	104
Figura 14. Estudios de resistencia a la pancreatina de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	106
Figura 15. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria	108

Índice de figuras

Figura 16. Detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria	109
Figura 17. Estudio de la sensibilidad del método DVC-FISH para <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria	111
Figura 18. Estudio de la sensibilidad del método DVC-FISH para <i>Streptococcus thermophilus</i> en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria	112
Figura 19. Esquema de las tomas de muestras durante el estudio <i>in vivo</i>	114
 <u>RESULTADOS</u>	
Figura 20. Medio de Cultivo LS Diferencial. Colonia A: lactobacilos y Colonia B: estreptococo.	126
Figura 21. Estreptococos en agar M17	127
Figura 22. Lactobacilos en agar MRS	127
Figura 23. Perfil de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en tira API-50 CHL	128
Figura 24. Cultivo puro de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> hibridado con LDE16S marcada CY3 (rojo)	131
Figura 25. Acceso a la estructura secundaria del ARNr 16S	133
Figura 26. Cultivo puro de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> hibridado con LDE23S marcada CY3 (rojo)	135
Figura 27. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> en yogur natural hibridado con LDE23S marcada CY3 (rojo)	135
Figura 28. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Y7) hibridado con LDE23R marcada con CY3 (rojo)	137
Figura 29. Cultivo puro de <i>Streptococcus thermophilus</i> hibridado con STH23S marcada CY3 (rojo)	139
Figura 30. <i>Streptococcus thermophilus</i> en yogur Y7 hibridado con	139

STH23S marcada CY3 (rojo)

Figura 31. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de las diferentes cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> con el iniciador RAPD1	142
Figura 32. Dendrograma de las cepas de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , empleando el iniciador RAPD1 y el coeficiente de similitud de DICE	143
Figura 33. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género <i>Lactobacillus</i> spp. con el iniciador RAPD2	144
Figura 34. Dendrograma de las cepas de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , empleando el iniciador RAPD2 y el coeficiente de similitud de DICE	145
Figura 35. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género <i>Streptococcus</i> con el iniciador RAPD1	146
Figura 36. Dendrograma de las cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> empleando el iniciador RAPD1 y el coeficiente de similitud de DICE.	147
Figura 37. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género <i>Streptococcus</i> con el iniciador RAPD2	148
Figura 38. Dendrograma de las cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> empleando el iniciador RAPD2 y el coeficiente de similitud de DICE.	149
Figura 39. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> aisladas de productos comerciales	152
Figura 40. 1) Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> , 2) Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> , 3) Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	153
Figura 41. Detección de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> por PCR seminested 1) marcador pesos moleculares (100pb), 2) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , 3-6) otros lactobacilos	155
Figura 42. Detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> por PCR 1) <i>Streptococcus thermophilus</i> aislado del producto Y7, 2) marcador pesos moleculares (100pb)	157
Figura 43. Control negativo del DVC-FISH para <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 mostrando el tamaño normal de la	160

Índice de figuras

célula (barra: 10 μm)

- Figura 44. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm) 160
- Figura 45. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm) 161
- Figura 46. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm) 161
- Figura 47. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm) 161
- Figura 48. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm) 162
- Figura 49. Control de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado en MRS (sin antibiótico) durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido 162
- Figura 50. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido. 162
- Figura 51. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido 163
- Figura 52. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* i LDY7 ncubado con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido 163
- Figura 53. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido 163

Figura 54. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de barrid	164
Figura 55. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido	164
Figura 56. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ciprofloxacino durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido	164
Figura 57. <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda STH23S marcada con FLUOS (barra: 10 µm)	167
Figura 58. <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda STH23S marcada con CY3 (barra: 10 µm)	167
Figura 59. <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 viables y no viables tras su incubación con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido (SEM)	168
Figura 60. Células viables y no viables de <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 tras la acción de la pepsina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)	171
Figura 61. Células viables y no viables de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 tras la acción de la pepsina (60 min) y tras el DVC-FISH con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)	171
Figura 62. Células viables y no viables de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 tras la acción de la pepsina (60 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3	171
Figura 63. Células viables y no viables de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 tras la acción de la pancreatina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3	173
Figura 64. Células viables de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> LDY7 tras la acción de la pancreatina (240 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3	173

Índice de figuras

Figura 65. Células viables y no viables de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 tras la acción de la pancreatina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3	174
Figura 66. Células viables y no viables de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 tras la acción de la pancreatina (240 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3	174
Figura 67. Lactobacilos y estreptococos del producto Y7 tras la acción de la pepsina y tras el DVC-FISH detectado mediante microscopía electrónica de barrido	174
Figura 68. Resistencia a la pepsina (evolución de su viabilidad) de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7	177
Figura 69. Resistencia a la pancreatina (evolución de su viabilidad) de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7	178
Figura 70. Viabilidad acumulada de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7 tras el tránsito gastrointestinal	178
Figura 71. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LDY7 mediante PCR en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^4 células/g de heces	180
Figura 72. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LDY7 mediante FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^6 células/g de heces empleando la sonda LDE23S (CY3)	181
Figura 73. Detección de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LDY7 mediante FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^5 células/g de heces empleando la sonda LDE23S (CY3)	181
Figura 75. Límite de detección de la PCR de <i>S. thermophilus</i> en heces inoculadas artificialmente (1: 10^6 u.f.c./g; 2: 10^5 u.f.c./g; 3: 10^4 u.f.c./g; 4: 10^3 u.f.c./ M: marcador de pesos moleculares)	183
Figura 76. Detección de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 mediante FISH en la dilución 10^4 empleando la sonda LDE23S (CY3)	184
Figura 77. Detección y determinación de viabilidad de <i>Streptococcus thermophilus</i> STY7 mediante DVC-FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^5 células/g de heces, empleando la	185

sonda LDE23S (FLUOS)

Figura 78. Detección de *S. thermophilus* STY7 en muestras de heces en T4 mediante PCR (1: N5T4; 2: N6T4; 3: N7T4; 4: N8T4; 5: N9T4; M: marcador de pesos moleculares) 190

Figura 79. DVC-FISH mostrando células viables de *S. thermophilus* STY7 en muestras N5T4 191

Figura 80. DVC-FISH mostrando células viables (derecha) y no viables (izquierda) de *S. thermophilus* STY7 en muestras N13T4 191

Un alimento puede ser considerado como funcional si se demuestra que afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales esperados, de manera que sea relevante para mejorar el estado de salud y de bienestar y/o para reducir el riesgo de enfermedad.

Los probióticos se incluyen dentro de los alimentos funcionales y la FAO los define como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped”.

Aunque es difícil precisar cuáles son las características más deseables que un microorganismo debe presentar para ser buen probiótico, los requisitos mínimos son: estar definido a nivel de género, especie y cepa; la cepa debe depositarse en una colección de cultivos internacional; deben realizarse evaluaciones *in vitro* y en animales para lograr un mejor entendimiento de los atributos fisiológicos de la cepa; antes de su uso, la seguridad de la cepa debe haber sido totalmente considerada; deben realizarse estudios controlados para documentar un beneficio para la salud; debe evaluarse su aptitud para mantener al probiótico vivo en los niveles requeridos hasta el final de la vida útil.

El empleo de productos lácteos funcionales permite combinar alimentos de amplio uso, aceptabilidad y tolerancia, con moléculas biológicamente activas. Varias especies de lactobacilos y bifidobacterias combinadas (o no) con *Streptococcus thermophilus* son las principales bacterias usadas como probióticos en yogures y otros productos lácteos fermentados.

Sin embargo, para que los microorganismos probióticos ejerzan su efecto beneficioso sobre el huésped, han de encontrarse en proporciones elevadas en el producto y ser capaces de sobrevivir en suficiente cantidad al tránsito gastrointestinal.

A mediados de los años 90, una importante marca comercial, se planteó entrar en el mercado de los yogures mediante el lanzamiento de un producto lácteo tratado térmicamente tras la fermentación que podía conservarse sin frío durante tres meses. Además, esta empresa defendía que su postre tenía el mismo efecto que el yogur tradicional puesto que los microorganismos vivos de éste no lograban llegar al intestino. Inició una larga ofensiva denominada en su día como la "guerra del yogur" con el objetivo de que la Administración española permitiera calificar su producto como yogur.

Resumen

En este contexto, se ha producido una cierta discrepancia entre diferentes líneas de investigación a la hora de afirmar los efectos beneficiosos del yogur tradicional. Algunas de ellas aseguran que sus bacterias no son capaces de sobrevivir al tracto gastrointestinal mientras que otras afirman lo contrario.

En base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se planteó desarrollar métodos rápidos alternativos a los tradicionales de cultivo para estudiar las posibles propiedades como probióticos de las bacterias contenidas en diferentes productos lácteos. Se procedió, en primer lugar, al aislamiento, identificación y caracterización molecular de las bacterias lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) presentes en yogures de 11 marcas comerciales. A continuación, se realizó la puesta a punto de las técnicas de PCR y FISH para la detección de ambos microorganismos. Se desarrolló la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que permitió determinar la resistencia de las cepas *in vitro* a los jugos gastrointestinales, demostrando la variabilidad de la misma a nivel de cepa. Finalmente, se hizo un estudio *in vivo* de la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de BAL de uno de los yogures comerciales mediante la aplicación de los protocolos desarrollados en muestras de heces, estudiando la evolución de la microbiota intestinal a lo largo del ensayo. Este ensayo permitió demostrar la presencia *Streptococcus thermophilus* viables en las heces tras la ingesta de producto.

La técnica DVC-FISH se mostró como el método más rápido y eficaz para la determinación de la viabilidad de LAB en matrices complejas como las heces humanas. Asimismo, se observó mediante cultivo que el consumo de yogur durante un periodo determinado produce un aumento de la microbiota endógena de lactobacilos así como una disminución de la población de enterobacterias.

Un aliment pot ser considerat com funcional si es demostra que afecta beneficiosament una o més funcions de l'organisme, més enllà dels efectes nutricionals esperats, de manera que siga rellevant per a millorar l'estat de salut i de benestar i/o per a reduir el risc de malaltia.

Els probiòtics s'inclouen dins dels aliments funcionals i la FAO els defineix com "microorganismes vius que, administrats en quantitats adequades, exercixen un efecte beneficiós sobre l'hoste".

Encara que és difícil precisar quines són les característiques més desitjables que un microorganisme ha de presentar per a ser bon probiòtic, els requisits mínims són: estar definit a nivell de gènere, espècie i cep; la cep ha de depositar-se en una col·lecció de cultius internacional; han de realitzar-se avaluacions *in vitro* i en animals per a aconseguir un millor enteniment dels atributs fisiològics del cep; abans del seu ús, la seguretat del cep ha d'haver sigut totalment considerada; han de realitzar-se estudis controlats per a documentar un benefici per a la salut; ha d'avaluar-se la seua aptitud per a mantindre al probiòtic viu en els nivells requerits fins al final de la vida útil.

L'ocupació de productes lactis funcionals permet combinar aliments d'ample ús, acceptabilitat i tolerància, amb molècules biològicament actives. Diverses espècies de lactobacils i bifidobacteris combinades (o no) amb *Streptococcus thermophilus* són els principals bacteris usats com probiòtics en iogurts i altres productes lactis fermentats.

No obstant, perquè els microorganismes probiòtics exercisquen el seu efecte beneficiós sobre l'hoste, han de trobar-se en proporcions elevades en el producte i ser capaços de sobreviure en suficient quantitat al trànsit gastrointestinal.

A mitjan dels anys 90, una important marca comercial, es va plantejar entrar en el mercat dels iogurts per mitjà del llançament d'un producte lacti tractat tèrmicament després de la fermentació que podia conservar-se sense fred durant tres mesos. A més, esta empresa defenia que el seu producte tenia el mateix efecte que el iogurt tradicional ja que els microorganismes vius d'este no aconseguien arribar a l'intestí. Va iniciar una llarga ofensiva denominada en el seu dia com la "guerra del iogurt" amb l'objectiu que l'Administració espanyola permetera qualificar el seu producte com a iogurt.

Resumen

En este context, s'ha produït una certa discrepància entre diferents línies d'investigació a l'hora d'afirmar els efectes beneficiosos del iogurt tradicional. Algunes d'elles asseguren que els seus bacteris no són capaços de sobreviure al tracte gastrointestinal mentres que altres afirmen el contrari.

Basant-se en l'anteriorment exposat, en este treball es va plantejar desenvolupar mètodes ràpids alternatius als tradicionals de cultiu per a estudiar les possibles propietats com probiòtics dels bacteris continguts en diferents productes lactis. Es va procedir, en primer lloc, a l'aïllament, identificació i caracterització molecular dels bacteris làctics (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) presents en iogurts d'11 marques comercials. A continuació, es va realitzar la posada al punt de les tècniques de PCR i FISH per a la detecció d'ambdós microorganismes. Es va desenvolupar la tècnica DVC-FISH per a la detecció de cèl·lules viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* que va permetre determinar la resistència dels ceps *in vitro* als suc's gastrointestinals, demostrant la variabilitat de la mateixa a nivell de cep. Finalment, es va fer un estudi *in vivo* de la supervivència al tracte gastrointestinal dels ceps de BAL del iogurt per mitjà de l'aplicació dels protocols desenvolupats en mostres d'excrements, estudiant l'evolució de la microbiota intestinal al llarg de l'assaig. Este assaig va permetre demostrar la presència de *Streptococcus thermophilus* viables en les excrements després de la ingesta de producte.

La tècnica DVC-FISH es va mostrar com el mètode més ràpid i eficaç per a la determinació de la viabilitat de LAB en matrius complexes com les excrements humanes. Així mateix, es va observar per mitjà de cultiu que el consum de iogurt durant un període determinat produïx un augment de la microbiota endògena de lactobacils així com una disminució de la població d'enterobacteris.

Food can be considered as functional if it can be demonstrated that it is beneficial for one or more functions of the human body, over and above the expected nutritional effects, being essential for improving health and well-being and/or for reducing the risk of illness.

Probiotics belong to the group of functional foods and FAO defines them as “Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host”.

Although it is difficult to specify which are the most desirable features that a microorganism must show for being a good probiotic, the minimum requirements are: genus, species and strain designation; strains should be deposited in an internationally recognized cultura collection; *in vitro* and animal assessment must be carried out in order to get a better understanding of the physiological properties of the strain; safety of the strain must be completely considered before its use; controlled studies must be undertaken for reporting some health benefit; its capability for keeping the minimum required numbers of viable bacteria by the end of shelf-life must be assessed.

The use of functional dairy products makes possible to combine widely used foods, successful and tolerance, with biologically active molecules. Some species of lactobacilli and bifidobacteria in combination (or not) with *Streptococcus thermophilus* are the main bacteria used as probiotics in yoghurt and other fermented milks.

However, microorganisms must be in high numbers in the final product and survive to the gastrointestinal passage for conferring a health benefit on the host.

In the mid-nineties, an important commercial brand, considered the idea of getting into the yoghurt market with the launching of a pasteurised after fermentation dairy product that could be preserved for three months without any refrigeration. In addition to this, the company defended that its product had the same effect as the traditional yoghurt since its live cultures could not reach the intestine. It started a fight called the yogurt war with the aim of getting the consent of the Spanish government for qualifying the product as yoghurt.

In this context, there is a discrepancy among the different research groups when confirming the beneficial effects of traditional yoghurt. Some of them maintain

Resumen

that its bacteria are not capable of surviving the passage through the gastrointestinal tract while others confirm the opposite.

Based on the previous arguments, this work considered the development of quick methods other than the traditional culture ones for studying the possible properties as probiotics of bacteria contained on different dairy products. Firstly, lactic bacteria present on 11 commercial yoghurts (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) were isolated, identified and molecularly characterized. Then, PCR and FISH techniques were developed for the detection of both microorganisms. DVC-FISH technique was developed for the detection of viable cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* that allowed to determine *in vitro* resistance to the gastrointestinal juice of the strains, demonstrating its variability on a strain level. Finally, an *in vivo* study of the survival to the gastrointestinal tract of BAL strains from yoghurt was undertaken with the application of the developed protocols on fecal samples, studying the evolution of intestinal microbiota all along the test. This test allowed to demonstrate the presence of viable *Streptococcus thermophilus* on feces after the intake of the product.

DVC-FISH technique showed to be the most quick and effective method for determining LAB viability on complex matrices such as human feces. Also, it was observed with culture media that yoghurt consumption for a determined period produces an increase on lactobacilli endogenous microbiota and a decrease on the enterobacteria population.

INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Hoy en día, la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de conceptos clásicos, como evitar las deficiencias de nutrientes y la suficiencia nutricional básica, a los conceptos de nutrición *positiva* u *óptima*. De esta forma, las investigaciones se han centrado más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales y/o de reducir el riesgo a contraer enfermedades. Se ha descubierto que muchos productos alimenticios tradicionales contienen componentes que pueden resultar beneficiosos para la salud pero, además, se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos componentes beneficiosos (página web del Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC); Farjas, 2003).

Los desarrollos tecnológicos en este campo han sido espectaculares y estos productos, que están irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales, serán probablemente la herramienta más importante de la Ciencia de la Nutrición en el futuro (Juárez, 2007).

El término alimento funcional nació en Japón. Así, a comienzos del decenio de 1980 se iniciaron tres programas de investigación a gran escala financiados por el gobierno de Japón sobre “análisis sistemático y desarrollo de los alimentos funcionales”, “análisis de la regulación fisiológica de la función de los alimentos” y “análisis de los alimentos funcionales y diseño molecular”. En un esfuerzo nacional por reducir el costo creciente de la atención de salud, se estableció en 1991 una categoría de alimentos potencialmente beneficiosos, denominados *alimentos de uso específico para la salud* (Foods for Specific Health Use, FOSHU en adelante) (Ashwell, 2004).

En Europa, no fue hasta mediados de los 90 cuando tuvo lugar la creación de un proyecto relativo a los alimentos funcionales, denominado Acción Concertada sobre Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (FUFOSE). Éste fue coordinado por el International Life Sciences Institute – European Branch (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, ILSI en adelante), y en él participaron de forma activa muchos de los expertos europeos más destacados de la ciencia de la nutrición y afines (www.consumer.es; Bañares, 2006).

La primera reunión plenaria del grupo de expertos, se celebró en Francia en 1996 y en ella se discutió el estado de la ciencia de los alimentos funcionales. A ella le siguió otra, celebrada en Helsinki en 1997 (www.consumer.es; Bañares, 2006).

Fruto de esas reuniones y de los documentos de trabajo elaborados en las mismas fue el *Documento de consenso sobre los conceptos científicos de los alimentos funcionales en Europa*, el cual se sometió a revisión en una tercera reunión plenaria celebrada en Madrid en 1998, que fue finalmente publicado en 1999 (Bañares, 2006).

De acuerdo con el Documento de Consenso del proyecto FUFLOSE, un alimento puede ser considerado como **funcional** si se demuestra de forma satisfactoria que afecta beneficiosamente a una o más funciones objetivo del organismo, más allá de los efectos nutricionales esperados, de manera que es relevante para mejorar el estado de salud y de bienestar y/o para reducir el riesgo de enfermedad. Además, estos productos deben presentarse en forma de alimentos ordinarios (no como comprimidos o cápsulas) y deben ser consumidos como parte de una dieta corriente y no como productos muy ocasionales asociados a síntomas específicos. La mayoría de los productos FOSHU actualmente aprobados contienen bien oligosacáridos, bien bacterias ácido lácticas para promover la salud intestinal (Diplock *et al.*, 1999; Ashwell, 2001; Ashwell, 2004).

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser (Diplock *et al.*, 1999; www.eufic.org):

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud por medios tecnológicos o biotecnológicos (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los

hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenidad).

- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

Además, y de acuerdo también con lo establecido en el documento de consenso, un alimento funcional debe ser funcional para todos los miembros de la población o para grupos particulares de la misma que deben ser previamente definidos.

La tabla 1 muestra algunos ejemplos de alimentos funcionales.

Tabla 1. Ejemplos de alimentos funcionales.

ALIMENTO FUNCIONAL	COMPONENTE ACTIVO	PROPIEDAD FUNCIONAL
Yogures, azúcar	Probióticos: Alimentos con cultivos vivos beneficiosos, como resultado de la fermentación, o que se han añadido para mejorar el equilibrio microbiano intestinal, como el <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bifidobacteria</i> sp. Prebióticos: Componente no digerible que tiene efectos beneficiosos, debido a que estimula el crecimiento de la microbiota intestinal, como la inulina y la oligofruetosa	Mejora de funcionamiento intestinal y equilibrio microbiano intestinal
Margarinas	Ésteres de esteroides y estanoles de origen vegetal añadidos	Reducen niveles de colesterol LDL (malo) Disminuyen el riesgo de padecer afecciones cardíacas
Huevos ricos en ácidos grasos esenciales omega-3	Ácidos grasos omega-3	Control de hipertensión, metabolismo de lípidos

Fuente: página web de Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC)

2. LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO COMPONENTES ALIMENTARIOS FUNCIONALES

Hace casi un siglo, Ellie Metchnikoff observó que en Bulgaria un número muy elevado de personas vivía más de 100 años. Este hecho lo relacionó con el gran consumo de bacterias en las leches fermentadas como una forma de modular la microbiota intestinal y así evitar enfermedades y alargar la vida de la gente. En 1907 afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la microbiota de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles". Sus investigaciones le valieron el premio Nobel de Medicina en 1908 (FAO/OMS, 2006; Figueroa *et al.*, 2006).

Por aquella época, el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias "bífidas" eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una microbiota intestinal sana.

Desde entonces, la ciencia ha trabajado para conocer más a dichos microorganismos llamados **probióticos** a las que Fuller definió en 1989 como "aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano de su microbiota intestinal". En 1930, Minoru Shirota aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei*, que posteriormente cultivó en leche, originando una bebida con características probióticas.

Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto al uso probiótico de bacterias, aun cuando la palabra probiótico no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Fuller (1989), con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal".

Havenaar y Huis in't Veld en 1992 propusieron una definición similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, al aplicarse a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la microbiota autóctona". Otra más reciente, es: "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables" (Guarner y Schaafsma, 1998).

Ya en 2001, los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization, 2001) como "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped".

Cada día se conoce más acerca del papel de los microorganismos sobre la salud y sobre la multitud de efectos beneficiosos asociados al consumo del tipo adecuado de microorganismos probióticos. De hecho, en los 20 últimos años la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos concretos y la justificación de las declaraciones de propiedades saludables en relación con su consumo.

Las investigaciones sugieren que los microorganismos probióticos pueden:

- Ayudar a reducir el riesgo de ciertos tipos de diarreas (Thomas *et al.*, 2001; Cremonini *et al.*, 2002; de Vrese and Marteau, 2007; Van Niel *et al.*, 2007).
- Ayudar a las personas con intolerancia a la lactosa en la digestión de la misma (Roberfroid, 2000; de Vrese *et al.*, 2001).
- Reforzar la función inmune (Roberfroid, 2000; Rolfe, 2000; Nova *et al.*, 2006; Corthésy *et al.*, 2007).

Algunos estudios preliminares también ponen de manifiesto que ciertos probióticos pueden jugar un importante papel en la reducción del desarrollo de alergias en niños (Kalliomäki *et al.*, 2001; Furrie, 2005), en la disminución de la colonización del estómago por *Helicobacter pylori* (Lionetti *et al.*, 2006; Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007), en ayudar a los pacientes a sobreponerse de los efectos secundarios de la terapia con antibióticos, en la recuperación de procesos inflamatorios del intestino (Sheil *et al.*, 2007), en reducir el riesgo de algunos tipos de

cáncer (Rolfe, 2000; Aso *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2005; Roller *et al.*, 2007), en disminuir el crecimiento de los microorganismos causantes de las caries en la boca (Näse *et al.*, 2001), en reducir los niveles elevados de colesterol en sangre (Roberfroid, 2000; Pereira y Gibson, 2002), en las vaginosis (Reid *et al.*, 2001; Anukam *et al.*, 2006) y en mantener saludable a la gente sana (Saran *et al.*, 2002; Turchet *et al.*, 2003; Tubelius *et al.*, 2005; Weizman *et al.*, 2005).

La mayoría de los productos probióticos contienen bacterias de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aunque otros géneros como *Escherichia*, *Enterococcus* y *Bacillus* se han comercializado como probióticos.

Es difícil de precisar cuáles son las características más deseables que un microorganismo debe presentar para ser buen probiótico (Mayo y Delgado, 2003). Pese a esto, un informe de la FAO acerca de las “Directrices para la evaluación de probióticos en alimentos”, considera en profundidad cuáles son los requisitos mínimos que un probiótico debe cumplir:

- Un probiótico debe estar definido a nivel de género, especie y cepa, usando las técnicas fisiológicas y moleculares más adecuadas.
- La cepa debe depositarse en una colección de cultivos internacional, para que los científicos puedan replicar las investigaciones publicadas sobre la cepa.
- Deben llevarse a cabo evaluaciones *in vitro* y en animales para lograr un mejor entendimiento de los atributos fisiológicos de la cepa.
- Antes de su uso, la seguridad de la cepa debe haber sido totalmente considerada.
- Deben realizarse estudios controlados para documentar un beneficio para la salud.
- Aptitud para mantener al probiótico vivo en los niveles requeridos hasta el final de la vida útil.

Durante los últimos años las ventas de probióticos han aumentado notoriamente en muchos países. Su producción industrial exige la búsqueda del

microorganismo y su validación científica, la optimización de su producción industrial, la formulación del alimento adicionado del probiótico y su validación clínica (Vidal, 2006).

En la tabla 2 se relacionan algunas de las características que a priori se consideran más interesantes, así como su posible función.

Tabla 2. Propiedades deseables en los microorganismos probióticos

Características	Razón
Origen humano	Interacción especie-específica con el huésped
Seguridad	Sin riesgos de salud para el consumidor, no patógeno ni inflamatorio, sin resistencias a antibióticos
Resistencia al pH del estómago, gastrointestinal a los enzimas pancreáticos y a los ácidos biliares	Supervivencia al tránsito
Adhesión a la mucosa intestinal	Inmunomodulación, exclusión de patógenos, incremento del sellado de la mucosa, colonización prolongada
Actividades enzimáticas deseables	Inmunoestimulación, actividad antimutagénica y anticarcinogénica
Producción de sustancias antimicrobianas	Inactivación de patógenos, normalización de la microbiota intestinal
Efectos beneficiosos documentados	Validación clínica de los efectos "reales", dosis mínima, relación dosis/efecto, aplicaciones específicas
Buenas propiedades tecnológicas	Buena estabilidad, producción a gran escala, tolerancia al oxígeno

Fuente: B. MAYO Y S. DELGADO, 2003 (Compilado de Collins y cols., 1998; Salminen et al., 1998a; Svenson, 1999; Vaughan y Mollet, 1999; Ouwehand et al., 2002).

En la actualidad, se utilizan bacterias con distintas propiedades en la prevención o el tratamiento de enfermedades (tabla 3), de modo que no es necesario que un único microorganismo presente todas las características deseables. Las actividades positivas podrían, por tanto, ser aportadas no por una bacteria aislada sino por una mezcla microbiana (Mayo y Delgado, 2003).

Tabla 3. Microorganismos utilizados como probióticos y efectos beneficiosos comprobados por ensayos clínicos

Género y especie	Cepa	Efecto saludable
<i>Bacillus cereus</i>	Tojoy	–
<i>Bacillus subtilis</i>	Varias	–
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	–	Mejora la diarrea por rotavirus, mejora el equilibrio intestinal
<i>Bifidobacterium breve</i>	Varias	Reduce los síntomas de las enfermedades inflamatorias crónicas
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb12	Mejora el tratamiento de alergias, acorta la infección por rotavirus, reduce la incidencia de diarrea del viajero, mejora el efecto de vacunación oral
<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536	–
<i>Enterococcus faecium</i>	SF68	–
<i>Escherichia coli</i>	Nissle 1917	Reduce las recaídas en las enfermedades inflamatorias crónicas
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La5	Reduce la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos, mejora el equilibrio intestinal
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFO 1748	Reduce actividades enzimáticas fecales dañinas, previene la diarrea por radiación, alivia el estreñimiento
<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea por rotavirus, estimula la respuesta inmune, reduce la recurrencia de cáncer de vejiga
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Numerosas	Mejora el equilibrio intestinal, reduce la diarrea asociada a los tratamientos antibióticos, alivia la intolerancia a la lactosa
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La1	Mejora la respuesta a la vacunación oral, reduce la colonización por <i>H. pylori</i> , alivia la inflamación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v	Alivia el síndrome de intestino irritable, reduce los niveles del colesterol LDL
<i>Lactobacillus reuteri</i>	SD2112	Acorta la diarrea por rotavirus
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	Acorta la diarrea por rotavirus, estimula la respuesta inmune, alivia la inflamación crónica del intestino, ayuda en el tratamiento y la prevención de alergias
<i>Lactobacillus salivarius</i>	UCC118	Reduce los síntomas de las enfermedades inflamatorias crónicas
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	JS	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Boulardii</i>	Reduce las recaídas en las enfermedades inflamatorias crónicas, inhibe la proliferación de <i>Clostridium difficile</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Numerosas	Mejora el equilibrio intestinal, reduce la diarrea asociada a los tratamientos antibióticos, alivia la intolerancia a la lactosa

Fuente: B. MAYO Y S. DELGADO, 2003 (Compilado de Salminen y cols., 1998a, Dunne y cols., 2001; Ouwehand y cols., 2002).

3. EL CONCEPTO DE MICROBIOTA INTESTINAL EQUILIBRADA

Para entender las bases del desarrollo de probióticos como componentes alimentarios funcionales es necesario familiarizarse un poco con las características del intestino y su microbiota (ILSI, 2002).

El primer investigador que señaló que la especie humana tiene aliados dentro del intestino que ayudan a combatir las infecciones fue Metchnikoff, quien dijo que la composición de la microbiota es esencial para el bienestar del huésped.

La microbiota intestinal es el término que define al ecosistema microbiano del intestino, que incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través de alimentos, bebidas, etcétera (Guarner, 2006).

Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores e insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas. Más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 u.f.c/ml jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g (Berg, 1996; Salminen *et al.*, 1998a; Tannock, 1999; Guarner y Malagelada, 2003). La figura 1, recoge algunos de los géneros que predominan en número en el tracto gastrointestinal de un humano adulto.

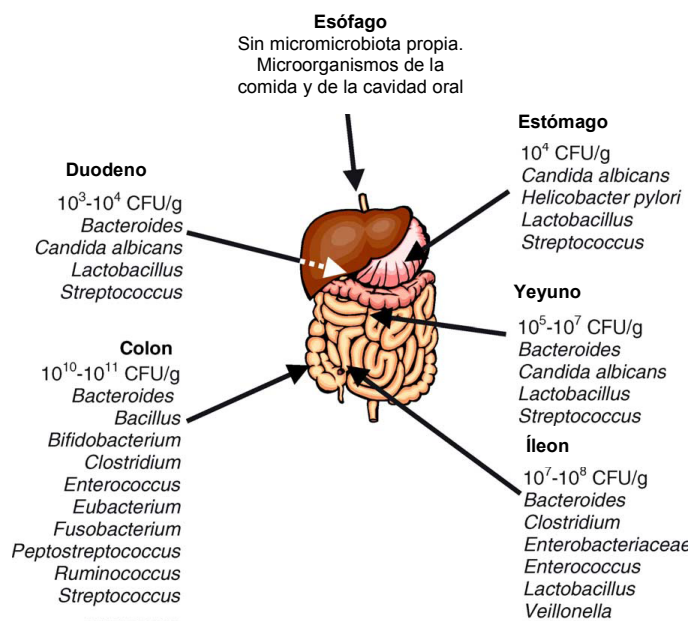


Figura 1. Géneros que predominan en número en el tracto gastrointestinal de un humano adulto (Fuente: Isolauri et al., 2004)

En términos cuantitativos, los géneros de bacterias intestinales más importantes en los humanos son los bacteroides y las bifidobacterias, que representan alrededor de 35% y 25%, respectivamente, de las especies conocidas (ILSI, 2002).

La colonización es la presencia de un microorganismo en un huésped, de acuerdo con ciertas condiciones: tiene que haber crecimiento y multiplicación; debe pasar desapercibido desde el punto de vista clínico y no debe provocar ninguna respuesta inmune al ser aislado (Moreno, 2001).

La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento y continúa durante toda la vida (Mitsuoka,

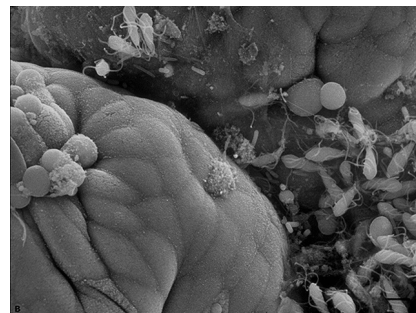


Figura 2. Colonización bacteriana del intestino
Fuente: web de la universidad de Wichita, EEUU.

1992).

Durante el embarazo, el lumen intestinal es estéril y tiene una baja tensión de oxígeno, porque recibe oxígeno a través de la placenta. El recién nacido empieza a adquirir una microbiota, que al final es propia de cada ser humano, a partir de la microbiota fecal materna e, incluso, de probióticos que la madre haya recibido (Collins y Gibson, 1999; Isolauri *et al.* 2004).

Las primeras bacterias que llegan al colon en el momento de nacer son enterobacterias microaerófilas, que consumen el escaso oxígeno restante en el lumen intestinal y producen un ambiente favorable para el desarrollo de los anaerobios. Este proceso es muy especial, porque varía si la vía del parto es vaginal o por cesárea, siendo el porcentaje de individuos colonizados mayor en el parto por vía vaginal (www.pediatraldia.cl; Grönlund *et al.*, 1999; Larsen y Monif, 2001). Las bacterias pioneras en esta colonización tienen la capacidad de modular la expresión de los genes de las células del epitelio intestinal para mejorar las condiciones ambientales y, así, incrementar la proliferación bacteriana (www.saludlandia.com; Isolauri *et al.*, 2004).

Después viene el efecto de la dieta, que determina un predominio de lactobacilos y bifidobacterias en los lactantes alimentados al pecho y microbiota diversa en los que reciben fórmula (Harmsen *et al.*, 2000). Esta microbiota cumple importantes funciones, entre las que destaca, por su importancia, la protección del lactante contra una serie de enfermedades como la diarrea aguda (www.pediatraldia.cl; Salminen *et al.*, 1998a; Sanders, 2003).

Por último, con el destete se produce una microbiota de transición y un paso paulatino hacia la microbiota del adulto, influenciada por factores intrínsecos (secreciones dentro del intestino) y extrínsecos (envejecimiento, dieta, estrés, ambiente étnico,...) (www.pediatraldia.cl; Benno *et al.*, 1986).

Las concentraciones de bacterias en diferentes partes del tracto intestinal varían en gran manera (Saxelin, 2002).

El intestino grueso tiene un extenso metabolismo bacteriano. Las bacterias descomponen los nutrientes que aún permanecen en la comida, como las proteínas parcialmente digeridas y los componentes fibrosos. Alrededor de la mitad de la mayoría de excrementos consiste en masa bacteriana. Se han reconocido entre 400

y 500 especies de bacterias en el intestino grueso y en los excrementos. Además, están presentes entre 100 y 1000 veces más bacterias anaeróbicas que aeróbicas. La figura 3 presenta los géneros o grupos de bacterias más comunes y su principal influencia en el metabolismo bacteriano del intestino (Saxelin, 2002).

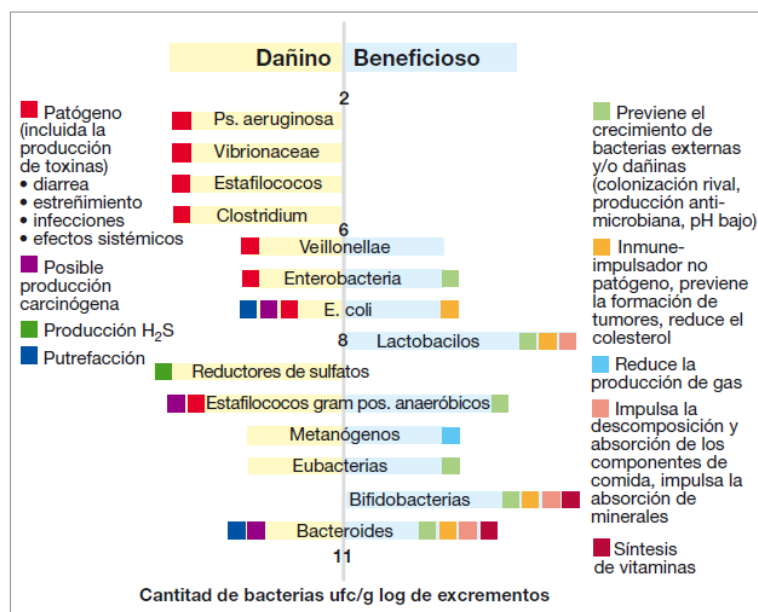


Figura 3. Los grupos de microbios más importantes, sus cantidades y división aproximada según su potencial de efectos dañinos y beneficiosos (Saxelin, 2002).

Se ha demostrado que la composición de la microbiota bacteriana varía mucho de un individuo a otro, pero en cambio sus funciones metabólicas son casi iguales (Guarner, 2002; Tejeda *et al.*, 2003; AFSSA, 2005). Además, cada individuo mantiene una microbiota relativamente estable (McCartney *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wilson y Blichington, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Zoetendal *et al.*, 1998; Guarner, 2002; Tejeda *et al.*, 2003), si bien el uso indiscriminado de antibióticos (Sullivan *et al.*, 2001) y los cambios dietéticos pueden producir modificaciones transitorias a lo largo de la vida, que suelen ser reversibles.

Las bacterias, que forman la denominada microbiota intestinal residente, no suelen tener efectos nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar de su huésped (Mitsuoka, 1992). De hecho,

tal y como recoge Guarner (2002), son varias las patologías que están relacionadas con la disfunción de la microbiota.

Tabla 4. Patologías relacionadas con disfunción de la microbiota intestinal

Encefalopatía hepática
Diarrea inducida por antibióticos
Diabetes tipo 2
Cáncer de colon
Atopia
Enfermedades inflamatorias intestinales

Fuente: Guarner, 2002.

Cabe citar como ejemplo de la función beneficiosa de la microbiota intestinal lo que se ha denominado "resistencia a la colonización" o "efecto barrera" (Falk *et al.*, 1998; Adlerberth *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2001; Guarner, 2006), en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para establecerse en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos ingeridos recientemente, incluidos patógenos. Además, la microbiota ejerce una influencia muy importante en el desarrollo y maduración del sistema inmune asociado al tubo digestivo (Guarner, 2002) estimulando la generación de anticuerpos y células de defensa (Cebra, 1999; Grönlund *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*, 2002). De hecho, existen estudios que demuestran que los mamíferos criados en condiciones experimentales de asepsia total no adquieren su microbiota natural y, por tanto, no se desarrollan normalmente (Tannock, 2001).

Además de su función de barrera contra la infección, la microbiota intestinal aporta energía mediante la fermentación de los hidratos de carbono no digeridos en el tracto gastrointestinal superior. Ésta también produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que cumplen varias funciones metabólicas importantes (Brouns *et al.*, 2002; ILSI, 2002; Guarner, 2006). Además, algunas especies sintetizan vitamina K, y varias de las vitaminas del grupo B, que son absorbidas en el colón (Hooper *et al.*, 2002).

Otra función importante de la microbiota intestinal es su capacidad para metabolizar y detoxificar componentes potencialmente nocivos tales como los carcinógenos (ILSI, 2002).

La microbiota intestinal es una comunidad interactiva compleja de organismos, cuyas funciones son consecuencia de las actividades combinadas de todos los componentes microbianos. Suele aceptarse que desempeña un importante papel en infecciones gastrointestinales, estreñimiento, síndrome de colon irritable, enfermedades inflamatorias intestinales y, quizás, cáncer colorrectal (ILSI, 2002).

Las especies bacterianas más frecuentes en el intestino humano se clasifican en tres grupos de bacterias: ácido-lácticas, anaerobias y aeróbicas (Moreno, 2001). El primer grupo (**ácido-lácticas**) es el más importante y está constituido por los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Las bacterias **anaerobias** son inocuas, pero cuando se rompe la continuidad de la superficie mucosa intestinal pueden causar problemas. El grupo de las bacterias **aerobias** está compuesto fundamentalmente por las enterobacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*, *Pseudomonas*, bacilos, *Staphylococcus*, hongos y levaduras diversas.

La modulación de la microbiota intestinal puede ser de gran beneficio para la salud. Así, en años recientes, el concepto de alimento funcional ha desplazado a los suplementos con vitaminas y minerales, pues mejora la funcionalidad de la microbiota intestinal (Tejeda *et al.*, 2003).

El actual ritmo de vida, la disminución de la actividad física, el estrés y malos hábitos en la dieta, deterioran el balance microbiano en nuestro organismo, situación que se asocia a enfermedades tales como la obesidad, diarrea, estreñimiento, enfermedad inflamatoria del colón, diabetes tipo II y cáncer de colon. Por todo esto, favorecer este equilibrio con el consumo de alimentos que contienen probióticos y prebióticos contribuye a una vida saludable (Fooks and Gibson, 2002; Isolauri *et al.*, 2004).

Actualmente, la mayor parte de trabajos de investigación sobre probióticos, se centra en la caracterización de la microbiota intestinal de cada individuo, evaluando las especies en cada parte del intestino. El objetivo es llegar a entender las interacciones de los microorganismos con el intestino, las interacciones entre microorganismos y microbiota intestinal y los efectos combinados para la salud de

estas interacciones. La meta es definir y caracterizar la microbiota como herramienta para el control nutricional en enfermedades específicas relacionadas con el intestino y como fuente de nuevos microorganismos para futuras aplicaciones en bacterioterapias con probióticos (Isolauri *et al.* 2004).

4. PROBIÓTICOS Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Algunas de las bacterias que habitualmente se utilizan en productos lácteos fermentados, encuentran también su hábitat en diferentes partes del cuerpo humano, incluyendo la boca, el tracto intestinal o la vagina. Algunos de estos microorganismos, por tanto, pueden jugar un doble papel transformando la leche en diversos tipos de productos lácteos (yogur, queso, kéfir,...) y contribuyendo al importante papel de bacterias colonizadoras (www.usprobiotics.org; Salminen *et al.*, 1998b; Crittenden *et al.*, 2001).

El empleo de productos lácteos funcionales proporciona la oportunidad de combinar alimentos de amplio uso, aceptabilidad y tolerancia, con microorganismos probióticos, como estrategia para corregir pequeñas disfunciones metabólicas que pueden conducir a enfermedades crónicas (Recio y López-Fandiño, 2005).

Los productos lácteos pueden ser un buen vehículo de transmisión de bacterias probióticas por varias razones (www.usprobiotics.org):

1. Pueden proteger a las bacterias probióticas al atravesar el tracto digestivo humano, donde el ácido gástrico y las secreciones pancreáticas (tales como enzimas digestivos y bilis) pueden producir daños e, incluso, la muerte de las bacterias probióticas ingeridas. Aunque algunas bacterias son más resistentes que otras a este estrés, el consumo de probióticos con los alimentos incluidos la leche, el yogur y otros derivados lácteos, neutraliza el ácido del estómago y puede aumentar las probabilidades de que las bacterias sobrevivan en el intestino.
2. Aunque el contenido de ácido láctico de un yogur puede suponer una barrera para la estabilidad del cultivo, el almacenamiento en refrigeración de los productos lácteos contribuye a promover la estabilidad de los probióticos.
3. Un producto lácteo con probióticos se convierte en un alimento saludable y funcional: además de las vitaminas, calcio, otros minerales y las proteínas obtenidas de los lácteos, las investigaciones recientes han sugerido la existencia de determinadas propiedades

saludables de los péptidos derivados de la fermentación y del ácido butírico encontrado en algunos lácteos.

5. EL YOGUR Y EL YOGUR PASTEURIZADO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN. LA GUERRA DEL YOGUR

La leche y los productos lácteos representan un grupo de alimentos de primera necesidad. El valor nutritivo y gastronómico de quesos, yogures y leches fermentadas responde a los gustos de cada cliente, aportando además una parte importante de la cantidad diaria recomendada (CDR) de proteínas, vitaminas A y B2, zinc y calcio (Castro, 2007).

La distribución y el consumo de productos lácteos en España, quedan recogidos en la tabla que sigue.

Tabla 5. Distribución y consumo de productos lácteos

	Consumo total (millones de litros)	Per cápita (kilo y año)
Total derivados lácteos	1693,61	39,58
Leches fermentadas	666,81	15,56
Yogures	484,81	11,33
Quesos	320,78	7,50
Otros	1026,80	24,02

Fuente: MAPA, 2005

La existencia del yogur se remonta a tiempos muy antiguos. Se desconoce exactamente dónde se originó, aunque algunos historiadores atribuyen su descubrimiento a la civilización sumeria, que vivía en el Suroeste de Asia por los años 4000 o 5000 aC. En Europa, comenzó a elaborarse en Bulgaria y Turquía por pueblos cuya riqueza principal eran sus rebaños.

En el momento actual, el yogur no es un alimento más, sino que es casi un alimento mítico, lo que se debe, además de a su valor nutritivo, a derivarse de otro alimento de gran prestigio como es la leche y al hecho de evocar etnias lejanas con una envidiable salud y longevidad (Albalat *et al.*, 1998).

Según la Norma de Calidad Española para el yogur, aprobada por el Real Decreto 179/2003, se entiende por «yogur» o «yoghourt» el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus*

bulgaricus y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche. Los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de $1 \text{ por } 10^7 \text{ u.f.c./ml}$.

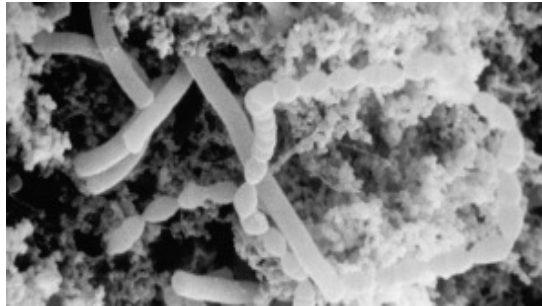


Figura 4: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (bacilo) y *Streptococcus thermophilus* (coco) en yogur
Fuente: INRA/M. Rousseau - PCD0668-IMG0017.PCD.

La FAO y la OMS dan una definición similar, si bien no precisan el número de microorganismos viables mínimo en el producto final, indicando tan sólo que deben ser abundantes.

De ellos, *Lactobacillus bulgaricus* se desarrolla bien entre 45 y 50°C, acidificando fuertemente el medio, mientras que *Streptococcus thermophilus* sobrevive a temperaturas de 65°C durante 30 minutos, aunque es mucho menos acidificante. Sin embargo, ambos soportan bien los medios ácidos (pH de 4 a 4,5) y en el yogur viven en estrecha simbiosis (Aleixandre y García, 1999).

Al comienzo de la elaboración, el pH de la leche es favorable al desarrollo de *Streptococcus thermophilus* que predomina y pone en marcha la fermentación láctica. Al aumentar la acidificación, el pH se vuelve desfavorable para este microorganismo que, progresivamente, irá siendo reemplazado por *Lactobacillus bulgaricus*. La leche cuaja cuando su acidez alcanza los 70 u 80 grados Dornic (Aleixandre y García, 1999). A partir de entonces, el producto se debe enfriar para detener el proceso fermentativo.

A lo largo de la elaboración del yogur se producen diversos cambios. El primero de ellos es la transformación de la lactosa en ácido láctico, aumentando su concentración y disminuyendo el pH de la leche, lo que provocará su coagulación.

En segundo lugar, destaca la acción de las bacterias sobre las proteínas de la leche, con la consiguiente liberación de ciertos aminoácidos y péptidos con actividad biológica importante. En tercer lugar, estas bacterias actúan sobre los lípidos, originando un aumento de ciertos ácidos grasos volátiles y no volátiles, proceso responsable del aroma y el sabor final característico del yogur. Finalmente, las vitaminas también se ven modificadas, como es el caso de las vitaminas del grupo B y en particular la B12, aumentando en concentración (www.institutotomas.pascual.es).

Como se ha indicado, uno de los campos de estudio más prometedores para el desarrollo de componentes alimentarios funcionales es el uso de probióticos capaces de modificar la composición y las actividades metabólicas y enzimáticas de la microbiota intestinal (ILSI, 2002).

Varias especies de lactobacilos y bifidobacterias combinadas (o no) con *Streptococcus thermophilus* son las principales bacterias usadas como probióticos en yogures y otros productos lácteos fermentados. Sus principales beneficios para la salud, demostrados en los seres humanos, son la disminución de la intolerancia a la lactosa y la estimulación del sistema inmunitario para reducir la incidencia o gravedad de infecciones gastrointestinales. También se ha demostrado que disminuyen la incidencia de lesiones precancerosas en animales tratados con carcinógenos, pero hacen falta estudios clínicos que confirmen la importancia de esta observación para los humanos (ILSI, 2002).

Otro mecanismo por el que las bacterias probióticas pueden favorecer la salud del tracto digestivo es la alteración de la respuesta inmunitaria local. La supervivencia de las bacterias durante el tránsito intestinal y la adhesión a las células intestinales parecen ser importantes para que las bacterias ejerzan su efecto sobre el huésped. En estudios animales y humanos se ha observado una modificación favorable de las respuestas inmunitarias después de la ingestión de probióticos o sus extractos.

En lo que se refiere al mercado español de los yogures, está indiscutiblemente dominado por la multinacional Danone, que acapara más del 50% de cuota de mercado. La inversión en promoción y en investigación es el elemento estratégico que permite mantener su posición de liderazgo en ese sector (Euromarket 2005).

Los restantes competidores se pueden agrupar en tres grupos estratégicos claramente diferenciados. Por un lado, existe un número reducido de importantes empresas que siguen unas estrategias similares a Danone en cuanto a inversión publicitaria y a investigación y desarrollo (formado principalmente por Nestlé y Central Lechera Asturiana). Por otro lado, existe un conjunto de empresas de pequeño y mediano tamaño que centran su estrategia en la imitación de los lanzamientos de las grandes empresas y que en la mayoría de los casos tienen una gama de productos más reducida e, incluso, una presencia geográfica limitada a algunas regiones. Y, finalmente, están los fabricantes de marcas blancas, que acaparan en torno al 30% del mercado principalmente dentro de la gama de yogures tradicionales (natural y de sabores), cuyos precios prácticamente no han subido desde mediados de los 90 (Euromarket 2005; Anónimo, 2006).

Danone es la marca más vendida, con una cuota de mercado del 49,1% en volumen de ventas (325.211 T) y el 63,7% en valor (1.018, 3 millones de euros). A continuación, figuran las marcas blancas, con el 39,6% del volumen (262.083 T) y el 24,5% del valor (391,2 millones). Destaca aquí Ibérica, filial de la matriz francesa, fundamentalmente como marca de la distribución para el grupo Mercadona. Nestlé, Central Lechera Asturiana (3,4% del volumen y 3,3% de las ventas) ocupan los siguientes lugares de la lista de marcas de yogures más adquiridas (Anónimo, 2006; www.elpais.com, Vidal Maté 18/02/2007).

La figura 5 recoge de forma esquemática las cifras anteriores.

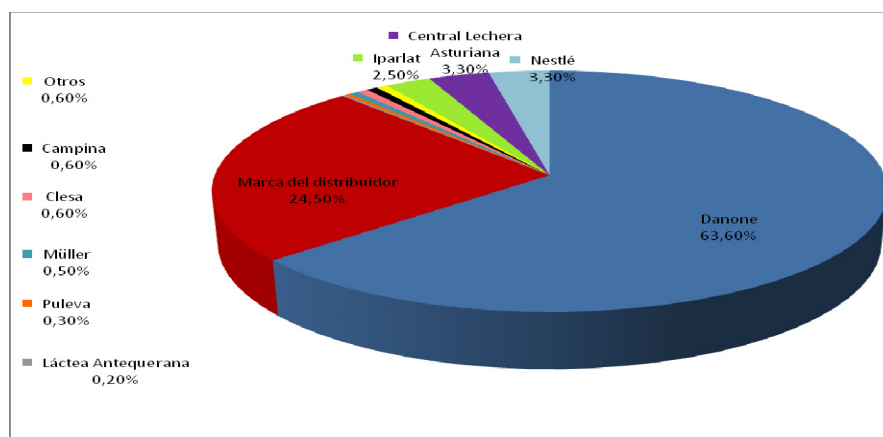


Figura 5. Fabricantes de yogur tradicional

La venta de leche líquida supone una actividad escasamente rentable para las industrias ante la fuerte presión de precios a la baja de la gran distribución. Por este motivo, la elaboración de productos de mayor valor añadido (funcionales, desnatados, enriquecidos, líquidos, cremosos, etc.), ha significado la principal alternativa de la industria para aumentar su facturación y, sobre todo, sus beneficios (Euromarket 2005; www.elpais.com, Vidal Maté 18/02/2007).

En su política de diversificación hacia los alimentos lácteos, el Grupo Leche Pascual, se planteó introducirse en el mercado de los yogures a mitad de los años 90, mediante el lanzamiento de una innovación radical que le permitiese acaparar una significativa cuota de mercado y poder luchar en condiciones adecuadas con Danone por el liderazgo del mercado. Se trataba de yogur al que, tras la fermentación, se le aplica un tratamiento térmico de pasteurización, de forma que, sin perder sus cualidades nutricionales, puede conservarse sin frío durante tres meses. Se trataba de un yogur de “larga vida” (Euromarket 2005).

Así, de acuerdo con el Real Decreto 179/2003, al que anteriormente se ha hecho alusión, se entiende por «yogur pasteurizado después de la fermentación» o «yoghourt pasteurizado después de la fermentación» el producto obtenido a partir del «yogur» o «yoghourt» que, como consecuencia de la aplicación de un tratamiento por calor posterior a la fermentación equivalente a una pasteurización, ha perdido la viabilidad de las bacterias lácticas específicas y cumple todos los requisitos establecidos para el yogur en esta norma, salvo las excepciones indicadas en ésta.

A partir de la obtención del yogur, el tradicional se envasa y tiene un periodo de duración de 28 días a una temperatura entre 1 y 8°C. En el caso de Pascual, el producto se pasteuriza y se puede conservar sin frío tres meses (www.instituotomaspascual.es).

El lanzamiento de esta nueva gama de producto no fue fácil y ha generado una dura y larga “guerra” de casi una década entre Pascual y el resto de fabricantes de yogures que, incluso, ha sobrepasado los límites del enfrentamiento puramente comercial (Euromarket 2005). Así, en 2000, el grupo Pascual inició una larga ofensiva denominada en su día como la “guerra del yogur” con el objetivo de que la Administración española permitiera calificar con esa denominación al producto pasteurizado después de la fermentación (www.elpais.com, Vidal Maté 18/02/2007).

La primera batalla se centró en el cambio en la normativa legal. Por la parte de las multinacionales (con Danone y Nestlé a la cabeza), se alegaba que el yogur tradicional es un producto históricamente implantado en la población. Sobre la base de estudios científicos, se defendía que el yogur sólo se puede llamar así si es un producto con fermentos vivos, algo además indispensable para que tenga un efecto beneficioso sobre el intestino y para la salud en general. Desde una perspectiva económica, se alegaba que si se cambiaba la normativa, se produciría una invasión de esos postres desde el exterior, atentando contra la industria láctea española.

Desde Leche Pascual se defendía, por el contrario, la necesidad de modificar una normativa que databa de los años 1987 y 1994 para adecuar la misma a las nuevas posibilidades tecnológicas. Pascual alegaba que su producto se hace con el mismo método que el yogur tradicional, pero sólo con leche de calidad, mientras para el yogur tradicional se admite hasta un 5% de leche en polvo. También con el soporte de científicos cualificados, Pascual defendía que su postre tiene el mismo efecto que el yogur tradicional y argumentaba que los microorganismos vivos del yogur no logran llegar al intestino, con escasos efectos sobre la salud (www.elpais.com).

En la disputa para lograr la denominación "yogur" se enfrentaron científicos, empresas y políticos para acabar finalmente con una disposición de Agricultura (el Real Decreto 179/2003) por la que se daba luz verde al producto con la nueva denominación de "yogur pasteurizado después de la fermentación".

En el conjunto del sector de la industria láctea, Pascual fue prácticamente el único grupo que optó por la producción de este tipo de alimento, mientras el resto de las industrias se posicionaron en contra o al margen de la medida (www.elpais.com, Vidal Maté 18/02/2007).

Esta denominación es también reconocida por las legislaciones de varios países, entre ellos Estados Unidos, Reino Unido, Holanda, Alemania, Canadá y Australia (Tecnifood, 2006).

Por el contrario, el Codex Alimentarius, que depende de Naciones Unidas y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), adoptó una norma que impide que los postres lácteos pasteurizados después de la fermentación puedan denominarse yogures, al menos en los países que no tienen legislación alguna sobre la materia (www.elpais.com, 2003; CODEX STAN 243-2003; Tecnifood, 2006).

La polémica norma de calidad para el yogur tuvo en 2006 dos nuevos capítulos, en forma de sentencias del Tribunal Supremo que, en dos decisiones adoptadas a finales de 2005, determinó que pueden recibir la denominación de "yogur pasteurizado después de la fermentación» los productos que, una vez fermentados con bacterias, se someten a un proceso de tratamiento térmico con la consiguiente muerte de estas bacterias. Un concepto, según ellos, que constituía una evolución propia del mercado en la comercialización de estos productos (Tecnifood, 2006).

El Tribunal Supremo llegó a esta decisión tras desestimar en noviembre un recurso contencioso-administrativo interpuesto por la Asociación Española de Yogur y Postres Lácteos Frescos (AEFY) integrada por empresas como (Danone, Corporación Alimentaria Peñasanta (Capsa), Nestlé o Puleva Food) contra la Norma de Calidad del Yogur, que admite la denominación de yogur para productos pasteurizado después de la fermentación (Tecnifood, 2006).

6. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas unidas por una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Entre sus rasgos comunes se encuentra el que son Gram-positivas, normalmente catalasa negativas y que crecen en condiciones de microaerofilia y de anaerobiosis estricta, con producción de ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos (Couret *et al.*, 2003).

La tabla 6 recoge las principales características diferenciales de las bacterias acidolácticas.

Tabla 6. Características diferenciales de las bacterias acidolácticas^a

	Bacilos		Cocos							
	<i>Carn</i>	<i>Lactob</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc</i>	<i>Lactoc Vagoc.</i>	<i>Leuco. Oenoc</i>	<i>Pedioc</i>	<i>Streptoc</i>	<i>Tetrag enoc</i>	<i>Weiss ella^b</i>
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir de glucosa ^c	^d	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento a 6.5% NaCl	ND ^e	±	+	+	-	±	±	-	+	±

Introducción

Crecimiento a 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	-	±
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-

^a +: positivo; -: negativo; ±: respuesta en varias especies; ND: no determinado.

^b Algunos tipos de *Weissella* también poseen forma bacilar.

^c Test para homo- o heterofermentadores de glucosa. Negativo y positivo denotan homofermentativo y heterofermentativo, respectivamente.

^d Pequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidas, dependiendo del medio.

^e Crecimiento nulo en 8% de NaCl

La clasificación de las bacterias acidolácticas, de Orla-Jensen aún se acepta como método estándar de identificación de estos microorganismos. Los de forma esférica (cocoidea) se conocen como *Streptococcus* y los bacilos se clasifican como *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Según la séptima edición del Bergey (1957), todas las bacterias acidolácticas se incluyen en la familia *Lactobacillaceae*, que a su vez se subdivide en *Streptococcaceae* (de forma esférica u ovoide) y *Lactobacillaceae* (de forma bacilar). Esta clasificación ha sido reorganizada en la octava edición del manual de Bergey (1994), que las considera dos familias separadas: *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*.

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia, pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son los más importantes. Las revisiones taxonómicas de este género y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias acidolácticas comprendan los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium*,

frecuentemente está considerado en el mismo contexto que las bacterias acidolácticas y posee algunas características comunes.

La clasificación de las bacterias acidolácticas en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido base. Las bacterias acidolácticas obtienen energía metabólica esencialmente mediante la fosforilación a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos, formando ácido láctico como principal metabolito. Además, poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de proteínas, en medios ricos en dichos constituyentes, si bien ésta es reconocidamente inferior a otros grupos bacterianos como *Bacillus*, *Proteus* o *Pseudomonas*, entre otros.

Uno de los primeros estudios bacteriológicos del yogur fue realizado por Grigoroff en 1905, quien observó la presencia de tres tipos distintos de microorganismos, unos denominados "*diplostreptococcus*", otros microorganismos de forma cocobacilar y otros de forma bacilar. Esta misma observación fue realizada por Lüerssen y Kühn (1908). No obstante, la popularidad alcanzada por el yogur se atribuye a Metchnikoff (1910), quien postuló la teoría de que la ingestión de una bacteria acidoláctica, denominada *Bulgarian bacillus*, prolongaba la vida. La presencia de este microorganismo en el yogur parecía inhibir el crecimiento en el intestino de los microorganismos responsables de la putrefacción. *Bulgarian bacillus* pasó a denominarse "*Thermobacterium bulgaricum*" (Orla-Jensen, 1931) y finalmente *Lactobacillus bulgaricus* (normalmente conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

7. FILOGENIA DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

Las verdaderas relaciones filogenéticas entre las bacterias se establecen mediante las comparaciones de las secuencias de ARNr (Woese, 1987). Inicialmente, estas comparaciones fueron realizadas mediante hibridaciones de ADN-ARNr. Los avances en las técnicas moleculares han encabezado los métodos de secuenciación de fragmentos largos de rARN, primero mediante el uso de la transcriptasa inversa (Lane *et al.*, 1988) y por la secuenciación directa por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los genes de rARN. Los bancos de datos genéticos disponibles para agrupar las grandes cantidades de secuencias hacen posible construir árboles filogenéticos (Woese, 1987). Los datos obtenidos, demuestran que la pared celular Gram positiva también posee una fuerte relevancia filogenética. Así, todas las bacterias Gram-positivas se agrupan en uno de los once principales taxones (Woese, 1987).

La composición global del ADN, entendida como el porcentaje de cada una de las bases presentes en la secuencia y expresada normalmente en porcentaje de moles G+C, es uno de los parámetros que caracterizan el genoma. Sin embargo, su valor taxonómico es limitado, ya que aunque diferencias importantes en dicho porcentaje son indicativas de la existencia de divergencia filogenética, la determinación de valores similares no lleva implícita una relación de proximidad. Pese a ello, el contenido en G+C, expresado como porcentaje molar en G+C en el ADN es una de las características requerida para la delimitación de especies y géneros (Stackebrandt *et al.*, 1992). El "Punto de Fusión" está frecuentemente fijado en un 50%, pero más bien se encuentra dentro del intervalo 53-55%.

Los detalles de las relaciones filogenéticas entre el género de las bacterias acidolácticas y entre ellas y otros géneros con bajo contenido en G+C se han conocido gracias al extenso estudio Collins, empleando la transcriptasa y las técnicas de secuenciación por PCR (Collins *et al.*, 1989, 1991, 1999; Martínez-Murcia y Collins, 1990; Martínez-Murcia, 1993). Se han definido límites máximos de variación en el contenido de G+C, entre cepas de la misma especie, del 3-5%, según autores, y entre cepas del mismo género el 10-12%. Dentro de las BAL, el contenido en G+C del género *Lactobacillus* varía entre 32 y 53%.

8. GÉNERO *Lactobacillus*

8.1. Antecedentes históricos

En 1901, Beijerinck propone el género *Lactobacillus* y Orla-Jensen, en 1919 hace una primera clasificación de este grupo basado en características morfológicas, de crecimiento y utilización de algunos azúcares. Con glucosa como fuente de carbono, los lactobacilos pueden ser homofermentativos, cuando el producto final de su metabolismo es casi exclusivamente ácido láctico, o heterofermentativos, cuando producen una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético. Esta característica, permitió a Kandler y Weiss en 1986 clasificar *Lactobacillus* en tres grupos. El grupo A son los lactobacilos homofermentativos obligados que sólo pueden fermentar los azúcares por la vía de la glucólisis, poseen el enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa pero carecen de fosfocetolasa, por lo que no fermentan pentosas ni gluconato. El grupo B son heterofermentativos facultativos, poseen tanto fructosa-1,6-difosfato aldolasa como fosfocetolasa. El grupo C son heterofermentativos estrictos, sólo pueden fermentar las hexosas por la vía de las pentosas fosfato, también denominada vía del fosfogluconato, debido a que carecen de fructosa-1,6-difosfato aldolasa (Wood and Holzapfel, 1995).

Tabla 7. Características de los lactobacilos homofermentativos obligados (grupo I), heterofermentativos facultativos (grupo II), heterofermentativos obligados (grupo III).

Características	GRUPO I Homofermentativos obligados	GRUPO II Heterofermentativos facultativos	GRUPO III Heterofermentativos obligados
Fermentación de pentosas	-	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa	+	+	-
Presencia de fosfocetolasa	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

En 1991 Collins *et al.*, basándose en el análisis de las relaciones filogenéticas de acuerdo a la secuencia del gen que codifica para el 16S rARN, forman tres subgrupos que no difieren mucho de la primera clasificación: grupo a de *Lactobacillus delbrueckii*; grupo b de *Lactobacillus casei- Pediococcus*; y grupo c de *Leuconostoc* (Vandamme *et al.*, 1996).

La utilización de letras mayúsculas para asignar los grupos según las características fenotípicas y las letras minúsculas para los grupos filogenéticos se debe a Hammes y Vogel, que en 1995 propusieron una nomenclatura basada en la combinación de ambas propiedades. Así, por ejemplo, Aa sería un *Lactobacillus* homofermentativo obligado del grupo filogenético del *L. delbrueckii* (Vandamme *et al.*, 1996).

Actualmente, el género *Lactobacillus*, cuenta con más de 100 especies reconocidas, caracterizadas por una alta diversidad, que se refleja en la dificultad para su clasificación taxonómica.

8.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica en procariontas ha evolucionado continuamente de forma paralela a los avances en las técnicas de laboratorio, permitiendo cada día el uso de mayor información para la adecuada diferenciación entre especies. El desarrollo de la taxonomía numérica por Sokal y Sneath en 1962 y los avances en informática hacen posible en la actualidad el manejo de grandes cantidades de datos que reúnen las características de un gran número de cepas bacterianas. Ésto, sumado al desarrollo de la biología molecular durante los años 60 que permitió el conocimiento de las propiedades del ADN, ha hecho de la taxonomía una ciencia en continua evolución, que permite la adecuada clasificación de las especies. Para la clasificación de los organismos en grupos o taxones en función de sus semejanzas, es necesaria la aplicación de un variado número de técnicas que permitan conocer sus características fenotípicas y su información genética, la integración de estos parámetros y la medición de las relaciones existentes entre ellos se conoce como taxonomía polifásica (Vandamme *et al.*, 1996).

Entre las características fenotípicas que tienen valor discriminativo entre cepas o especies bacterianas están la composición química de la pared celular, requerimientos nutricionales, capacidad de usar diferentes fuentes de carbono, productos de fermentación, tolerancia a diferentes temperaturas, crecimiento a

diferentes concentraciones de sal o diferentes pH, características inmunológicas, etcétera. La información genética es la que puede ser obtenida desde los ácidos nucleicos y ésta puede ser directa, como en el caso de la secuenciación, o indirecta a través de parámetros como la hibridación ADN-ADN o el porcentaje de guanina más citosina (G+C) (Sarmiento, 2008).

La unidad taxonómica en microbiología es la especie, que corresponde a una población de células genéticamente idénticas derivadas de la división sucesiva de una sola célula. Un grupo de cepas que muestran un alto grado de similitud entre ellas y difieren considerablemente de otro grupo de cepas con respecto a unas determinadas características, se denomina especie. El parámetro numérico más aceptado para establecer los límites entre especies de procariotas, es la similitud de su ADN expresado como porcentaje, el cual debe ser mayor al 70% entre cepas de la misma especie sometidas a un análisis de hibridación ADN-ADN (Roselló-Mora y Amann, 2001). Otro parámetro aceptado en la clasificación de especies consiste en la temperatura de fusión T_m , a la cual el 50% de la cadena de ADN está disociada, pues es característica de cada especie, ya que depende exclusivamente de la proporción de guanina más citosina presentes. Entre cepas de la misma especie la diferencia en la T_m no debe ser superior a 5°C (Grimont, 1988).

En el Anexo II puede encontrarse una tabla con las diferentes especies actualmente incluidas en el género *Lactobacillus*.

8.3. Hábitats

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos, excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental. Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos,...) e intervienen también en la fabricación de productos derivados de los vegetales como pepinillos o aceitunas (Bergey's Manual-9ª edición; Sanders and Klaenhammer, 2001).

8.4. Características morfológicas

El género *Lactobacillus*, está conformado por bacilos o cocobacilos de dimensiones 0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm . Aunque normalmente se trata de largos bacilos, algunas veces son casi cocos, habitualmente formando cortas cadenas.

Son Gram positivos, no formadores de esporas, y pocas veces móviles por flagelos peritricos.

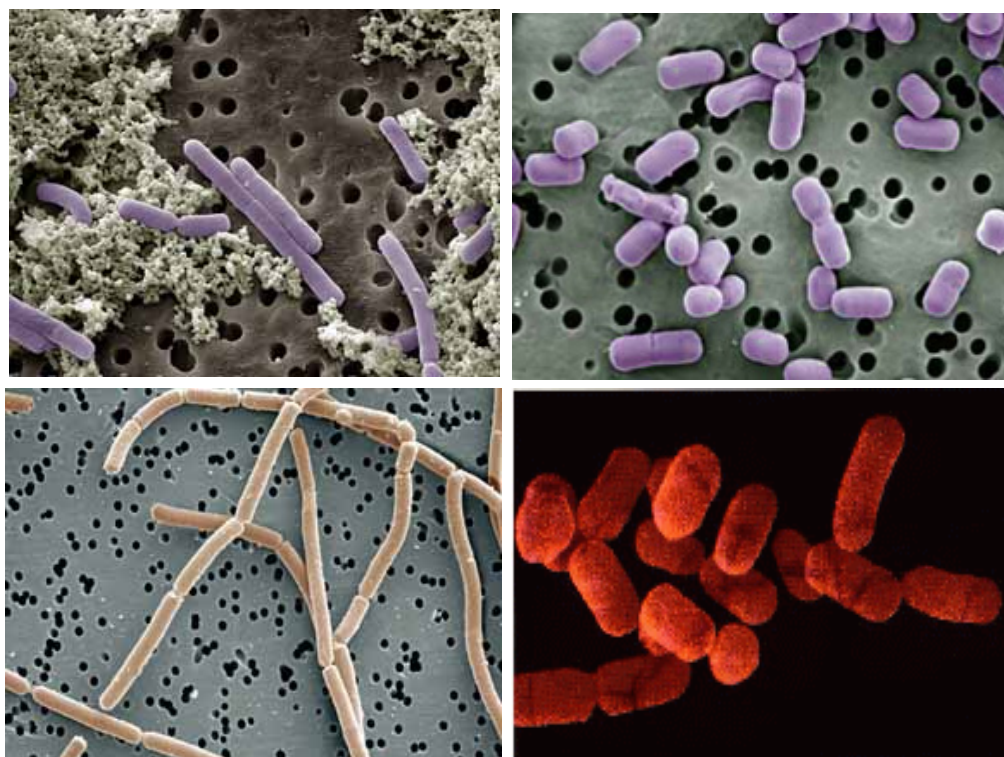


Figura 6. Morfología de algunas especies del género *Lactobacillus*. De arriba abajo y de izquierda a derecha: *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Lactobacillus plantarum*.

8.5. Características fisiológicas y culturales

Son anaerobios facultativos, algunas veces microaerófilos, creciendo muy poco en presencia de aire, si bien lo hace mejor con baja tensión de oxígeno. Su crecimiento se ve generalmente favorecido con un 5% de dióxido de carbono.

Tienen importantes requerimientos nutricionales, en cuanto a aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o sus ésteres y carbohidratos fermentables. Las colonias en el agar tienen un tamaño variable entre 2 y 5 mm, convexas, opacas y sin pigmentos.

Crece entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C.

En cuanto al pH, son acidúricos creciendo óptimamente entre 5,5-6,2. El crecimiento suele ocurrir a pH 5,0 o incluso menos.

8.6. Características bioquímicas

Su metabolismo es estrictamente fermentativo. Al menos la mitad de los productos carbonosos finales es lactato. El lactato normalmente no es fermentado. Otros productos adicionales pueden ser acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato. No se producen ácidos volátiles con más de dos átomos de carbono.

No suelen reducir los nitratos y, si lo hacen, es sólo cuando el pH final está en torno a 6,0.

No licúan la gelatina y la caseína no la digieren, aunque la mayoría de las cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni H₂S.

Son catalasa y citocromo negativas. Sin embargo, algunas cepas descomponen el peróxido por medio de una pseudocatalasa. La reacción de la bencidina es negativa.

Es rara la producción de pigmentos.

8.7. *Lactobacillus delbrueckii*

Lactobacillus delbrueckii es una especie perteneciente al género *Lactobacillus* y son bacilos con extremos redondeados, con unas dimensiones de 0,5-0,8 por aproximadamente 2-9 µm, que se presentan tanto aislados como en cortas cadenas.

En cuanto a los requerimientos nutricionales para su crecimiento, generalmente el ácido pantoténico y la niosina son esenciales; la riboflavina, el ácido

Introducción

fólico, la vitamina B12 y la timidina son necesarios para determinadas cepas; la tiamina, la piridoxina, la biotina y el ácido p-aminobenzoico no se precisan. Crecen bien a 45°C e incluso entre 48 y 52°C. El porcentaje G+C del ADN es de 49-51%

Actualmente, hay cuatro subespecies reconocidas del *Lactobacillus delbrueckii*. La primera de ellas es *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, aislado de material vegetal fermentado a elevadas temperaturas (40-53°C) y cuya cepa tipo es ATCC 9649. La segunda, es *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aislado de yogur y queso y con cepa tipo ATCC 11842. *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ha sido aislado de leche, queso, levadura comprimida y cereales molidos y su cepa tipo es ATCC 12315. Finalmente, *L. delbrueckii* subsp. *indicus* ha sido aislada de productos lácteos indios siendo su cepa tipo NCC 725.

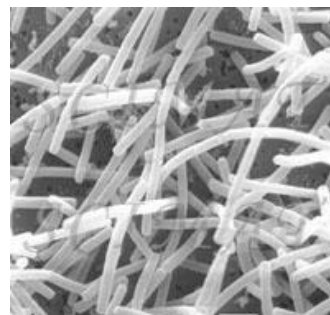


Figura 7. Morfología de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Las tablas 8 y 9 recogen algunas de las características fisiológicas y bioquímicas que permiten distinguir entre las cuatro subespecies.

Tabla 8. Características fisiológicas y bioquímicas de las cuatro subespecies del *L. delbrueckii*^a

Especie	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	
Tipo de peptidoglicano	Lys-DAsp	Lys-DAsp	Lys-DAsp	Lys-DAsp	
Ácido teitoico	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	
Motilidad electroforética ^c	D-LDH	1,50	1,50	1,70	1,50
	L-LDH	-	-	-	-
L-LDH alostérico	-	-	-	-	
Mol % G+C	49-51	49-51	49-51	49-51	
Isómero de ácido láctico ^d	D	D	D	D	
Crecimiento a 15°C	-	-	-	-	

NH ₃ de la arginina	d	d	-	-
--------------------------------	---	---	---	---

^a Símbolos: -, 90% o más cepas negativas; d, 11-89% cepas positivas.

^b Abreviaturas empleadas por Schleifer y Kandler (1972).

^c Determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida pH 7,5; se tomó como referencia el isómero I de L-LDH de conejo.

^d El isómero indicado, D o L, supone el 90% o más del ácido láctico total.

Tabla 9. Patrón de carbohidratos fermentados por las cuatro subespecies de *L. delbrueckii*

Espece	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>
Amigdalina	-	+	-	-
Arabinosa	-	-	-	-
Celobiosa	d	d	-	-
Esculina	-	+	-	-
Fructosa	+	+	+	+
Galactosa	-	d	-	-
Glucosa	+	+	+	+
Gluconato	-	-	-	-
Lactosa	-	+	+	+
Maltosa	d	+	-	-
Manitol	-	-	-	-
Manosa	+	+	-	+
Melecitosa	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-
Salicina	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-
Trealosa	d	+	-	-
Xilosa	-	-	-	-

Símbolos: +, 90% o más cepas positivas; -, 90% o más cepas negativas; d, 11-89% cepas positivas.

9. GÉNERO *Streptococcus*

9.1. Antecedentes históricos

Los estreptococos son un género de bacterias Gram positivas, esféricas pertenecientes al filo Firmicutes. Crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje. De allí que su nombre, del Griego streptos, significa que se dobla y retuerce con facilidad, como una cadena. Son oxidasa y catalasa negativos.

Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*. A pesar de la formación de nuevos géneros, el género *Streptococcus sensu stricto* es todavía muy amplio y su clasificación compleja. El género está ampliamente dividido en tres grupos: piogénicos, orales y otros estreptococos (Hardie y Whiley, 1995).

Sin embargo, la única especie de *Streptococcus* que está asociada a la tecnología de los alimentos es *S. thermophilus*, que se emplea en la fabricación de yogur (en cocultivo con *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus*).

S. thermophilus, es una bacteria termorresistente homofermentativa que produce ácido láctico como principal producto de la fermentación, se desarrolla a 37-40°C pero puede resistir 50°C e incluso 65°C durante media hora. Tiene menor poder de acidificación que el *lactobacillus*. En el yogur viven en perfecta simbiosis (Spreer, E y Sutherland, 1991). *S. thermophilus*, está actualmente incluido dentro de los estreptococos orales, que son comúnmente encontrados en la cavidad oral y el tracto respiratorio superior del hombre y otros animales.

9.2. Taxonomía

Los estreptococos son un género de bacterias gram-positivas y catalasa negativos, esféricas pertenecientes al filo firmicutes. Observadas bajo el microscopio, se ve que *Streptococcus thermophilus* crece formando pares (diplococos) o cadenas medianamente largas de células esféricas o elipsoides de un diámetro aproximado de 0,7-0,9 µm. Dentro de esta familia también se encuentran otras especies que son causantes de enfermedades como estreptococos del grupo A (*Streptococcus pyogenes* produce amigdalitis e impétigo) y estreptococos del grupo B (*Streptococcus agalactiae* produce meningitis en neonatos y trastornos del embarazo en la mujer; *Streptococcus pneumoniae* es la principal causa de

neumonía adquirida en la comunidad; *Streptococcus viridans* es una causa importante de endocarditis y de abscesos dentales).

En el **Anexo III** puede encontrarse una tabla con las diferentes especies actualmente incluidas en el género.

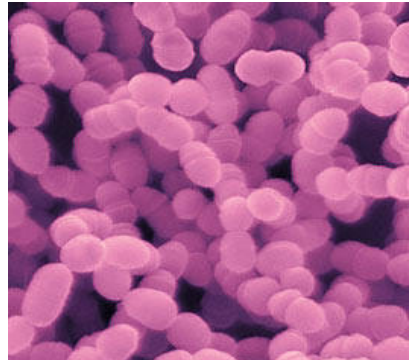
9.3. Hábitats

Son parásitos de vertebrados, siendo habituales en la boca y la parte superior del tracto respiratorio. Además, algunas especies son patógenas para el hombre y los animales.

9.4. Características morfológicas

Son células esféricas u ovoides de 0,5-2,0 μm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas cuando crecen en medios de cultivo líquidos. En ocasiones, se elongan en el eje de la cadena, apareciendo formas lanceoladas.

Su motilidad es nula, son no esporulados y Gram positivos. Algunas especies presentan cápsulas.



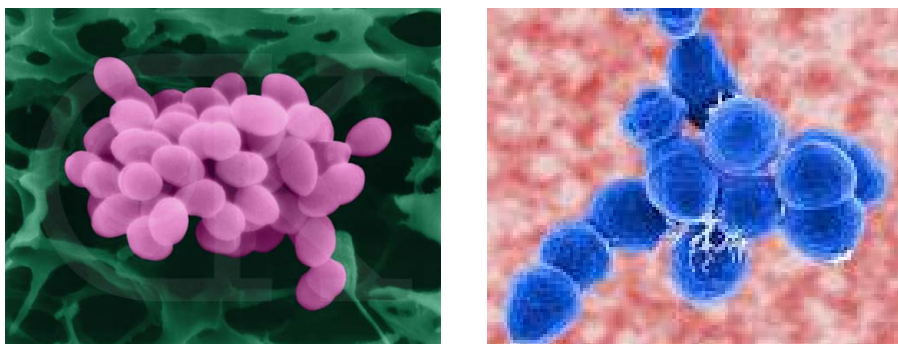


Figura 8. Morfología de algunas especies del género *Streptococcus*. De arriba abajo y de izquierda a derecha: *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus faecalis*; *Streptococcus pneumoniae*.

9.5. Características fisiológicas y culturales

Son anaerobios facultativos y quimioorganotrofos, requiriendo medios de cultivo muy ricos desde el punto de vista nutricional y, en ocasiones, el 5% de dióxido de carbono. La temperatura de crecimiento suele restringirse a 25-45°C, siendo la óptima de 37°C.

9.6. Características bioquímicas

Su metabolismo es fermentativo, produciendo principalmente ácido láctico aunque no gas. Son oxidasa y catalasa negativos.

Normalmente, atacan a los glóbulos rojos sanguíneos, produciendo bien una decoloración verdosa (α -hemólisis) bien un aclaramiento total (β -hemólisis).

9.7. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus, fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919. Su nombre procede del término griego “therme” que significa calor y de “philus” que significa afinidad (Collado, 2004).

Son células esféricas u ovoides de 0,8-1,0 μm de diámetro. La longitud de la cadena puede variar desde corta hasta muy larga.

Crece con facilidad en medios de cultivo adecuados en presencia de oxígeno.

La mayoría de las cepas son no hemolíticas en agar sangre, aunque en ocasiones se han encontrado cepas α - y β -hemolíticas.

Los requerimientos nutricionales mínimos fueron determinados por Smiley *et al.* (1943), quienes indicaron que son necesarios para su crecimiento nueve aminoácidos, cinco vitaminas y uracilo.

Produce ácido a partir de la glucosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, inulina, salicina y, normalmente, trealosa y lactosa. No hay producción de ácido, en cambio, con glicerol, manitol, sorbitol, xilosa y arabinosa. Algunas cepas fermentan únicamente la fracción fructofuranósica terminal de la rafinosa (formando polisacáridos) y los acumulados de melibiosa.

La mayoría de las cepas hidroliza la escualina y la urea (Colman, 1976), pero no así la arginina, y la mayoría produce también acetoina a partir de la glucosa.

Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4%. No crece a pH superiores a 9,6 ni en leche que posea un 0,1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. La habilidad para crecer a 52°C, la resistencia al calor y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos.

Streptococcus thermophilus se encuentra en la boca del hombre y de otros animales, estando particularmente asociado con la lengua y la saliva, y también en heces. Se aísla ocasionalmente de la sangre en casos de endocarditis infecciosa.

El porcentaje G+C del ADN es de 39-42%. La cepa tipo es la ATCC 7073.

Tabla 10. Características bioquímicas más importantes de *Streptococcus thermophilus*^a.

Característica	Resultados	Característica	Resultados
Fermentación de		Producción de	
Manitol	-	Acetoína	d
Sorbitol	-	H ₂ O ₂	-
Inulina	d ^b	Glucano	-
Rafinosa	d	Fructano	+
Lactosa	+	Crecimiento en/a	
Trealosa	d ^b	4% NaCl	d
Hidrólisis de		6,5% NaCl	-
Arginina	-	10% Bilis	+
Esculina	+	40% bilis	d
Almidón	d	45°C	d
Urea	d	Mol % G+C	39-42

^a Símbolos: +, 90% o más cepas positivas; -, 90% o más cepas negativas; d, 11-89% cepas positivas.

^b Los resultados registrados varían entre distintos laboratorios.

Fuente: Bergey's

10. TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN

10.1. Detección por cultivo

El método tradicional por excelencia para la detección e identificación de microorganismos es la observación de su crecimiento en sustancias nutritivas preparadas en el laboratorio.

Los lactobacilos requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

El medio de cultivo más empleado es el MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960. Este medio, contiene además, magnesio, manganeso, acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa. El problema de este medio es que con frecuencia se suelen presentar contaminantes, con lo cual se precisa una mayor selectividad. Por ello, se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo.

Por su parte, el medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17, que fue desarrollado por Teragazhi y Sandine en 1975, pero posteriormente Shankar y Davies (1977) demostraron la eficacia del medio para el aislamiento selectivo de *Streptococcus thermophilus* del yogur, que se debe a la combinación de un fuerte efecto tampón, que facilita el desarrollo de los estreptococos y una elevada concentración de glicerofosfato, que inhibe el desarrollo de los lactobacilos. Shankar y Davies (1977) observaron que se suprime el crecimiento de *Lactobacillus* si el pH del medio M-17 es de 6,8. El CeNAN (Centro Nacional de Alimentación y Nutrición) ha adoptado este medio de forma paralela con MRS para el examen rutinario del yogur.

También se emplea para el aislamiento de los microorganismos del yogur el medio LS-agar diferencial, formulado por el CeNAN (1982). Este medio está concebido para la enumeración simultánea de *Lactobacillus bulgaricus* y

Streptococcus thermophilus. A la mezcla base que contiene triptona, peptonas, extractos de carne y levadura, cisteína y cloruro sódico, se le adiciona leche descremada y la solución estéril de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1%. En este medio, *Lactobacillus delbrueckii* crece en forma de colonias lobuladas rojas de 1-1,5 mm de diámetro rodeadas de una zona blanca opaca y *Streptococcus thermophilus* crece en este medio formando colonias ovales o redondas rojas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro con un pequeño halo claro a su alrededor. El CeNAN ha adoptado este medio de forma alternativa al recuento con dos medios, el MRS y el M-17.

El método tradicional de crecimiento en medios de cultivo ha sido empleado por diversos autores.

Autores como Davis *et al.* (1971), Lee *et al.* (1974) y Bracquart (1981) han descrito medios de cultivo que permiten la determinación simultánea de *S. thermophilus* y de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Chagnaud *et al.* (2000) desarrollaron químicamente un medio de cultivo que denominaron BMP (milieu proche du lait) para el cultivo de lactobacilos y de *Streptococcus thermophilus*. Este medio resultó útil para llevar a cabo ensayos fisiológicos en estos microorganismos bajo condiciones nutricionales bien controladas.

García de los Ríos *et al.* (2003) en un estudio para analizar la composición de la microbiota y la supervivencia de los microorganismos en animales alimentados con yogur fresco y termizado, usaron el medio MRS para el cultivo de *Lactobacillus* y el M17, para la enumeración selectiva de *S. thermophilus* a partir del yogur.

Para el recuento de *Lactobacillus* procedentes del yogur no necesitó ningún suplemento para hacerlo más selectivo, aunque para emplearlo en el recuento de microorganismos procedentes de las muestras del tubo digestivo se empleó suplementado con 16 mg/l de metronidazol y 4 mg/l de colistina. El primero, por ser un antibiótico que actúa sobre la microbiota anaerobia del tubo digestivo y por haber resultado resistente la cepa de *Lactobacillus* del yogur empleado. El segundo, por ser un antibiótico que actúa sobre los microorganismos gram negativos en general.

Para el recuento de los estreptococos procedentes del yogur, se usó sin suplemento y para el recuento de los microorganismos del tubo digestivo, suplementado, como el MRS, con 4 mg/l de colimicina.

Por su parte, del Campo *et al.* (2003) buscaron la presencia de las bacterias en heces de 114 voluntarios por dos métodos, siendo uno de ellos un cultivo microbiológico en MRS y M17 seguido de una PCR específica para buscar segmentos de ADN exclusivos del *L. delbrueckii* y *S. thermophilus*.

Tal y como describen Coueret *et al.* 2003 en su revisión acerca del aislamiento, caracterización e identificación de lactobacilos, centrándose fundamentalmente en quesos y otros productos lácteos, autores como Lankaputhra *et al.* (1995), Hartemink *et al.* (1997) y Shah (2000) emplearon también en sus investigaciones MRS pero con la adición al mismo de un 0.05% de cisteína al constatar una mejora de la especificidad del medio para el aislamiento de lactobacilos.

Tharmaraj y Shah (2003) evaluaron 19 medios de cultivo para evaluar su eficacia para enumerar de forma selectiva *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Propionibacteria*. De sus trabajos concluyeron que el agar MRS y el agar M17 eran los más adecuados para los recuentos de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente.

Elli *et al.* 2006, llevaron a cabo un estudio para investigar la recuperación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* viables de muestras fecales de 20 individuos sanos alimentados con yogur comercial durante una semana.

Para el crecimiento de microorganismos de heces emplearon en un primer ensayo el medio de leche desnatada (RSMA), mientras que en un ensayo posterior lo suplementaron con 0.05% de tinte rojo de rutenio, para así obtener el RSMA modificado (m-RSMA), que permitió la clara distinción entre colonias de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

En cualquier caso, incluso cuando la enumeración vaya a realizarse a partir de técnicas moleculares, el uso de medios de cultivo es fundamental para el crecimiento inicial de los microorganismos (Hertel *et al.*, 1991; Beimfohr *et al.*, 1993).

10.2. Detección por PCR tradicional

La PCR es un método enzimático que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias de ella. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, siguiendo la cadena molde. Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8 y así sucesivamente. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

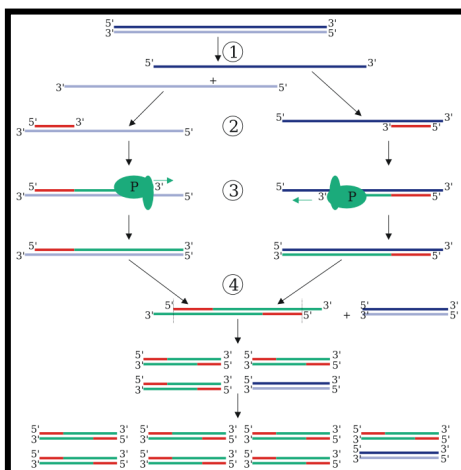


Figura 9. Representación esquemática de un ciclo de la PCR. (1) Desnaturalización a 94-96°C. (2) Hibridación. (3) Elongación a 72°C (P=Polimerasa). (4) El primer ciclo queda completado. Las dos hebras resultantes de ADN se convierten en la plantilla de ADN para el

siguiente ciclo, doblándose de esta manera la cantidad de ADN duplicado en cada nuevo ciclo. Fuente: www.juliantrubin.com/encyclopedia/biochemistry/pcr.html

La PCR se ha empleado en una gran cantidad de estudios para detectar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en un variado tipo de muestras.

Así, del Campo *et al.* 2005 identificaron cepas de yogur en heces mediante la técnica de PCR con los iniciadores específicos descritos por Lick *et al.* (2001). Los iniciadores para *L. delbrueckii*, basados en la secuencia del gen fueron DEL-F (5'AATTCCGTCAACTCCTCATC 3') y DEL-R (5' TGATCCGCTGCTTCATTTCA 3'). En cuanto a los iniciadores usados para la identificación de *S. thermophilus*, basados en el gen *lacZ*, fueron THER -F (5' CACTATGCTCAGAATACA 3') y THER-R (5' CGAACAGCATTGATGTTA 3'). Las condiciones de la PCR fueron diferentes en cada caso.

La misma metodología aplicaron Yuste *et al.* en 2003 para la detección de bacterias vivas del yogur en heces.

Bentley y Leigh (1995) en su trabajo desarrollaron un protocolo de hibridación basado en la PCR para la identificación de especies de estreptococos. Así, describieron el uso de una técnica para hibridar oligonucleótidos de los genes 16S rARN o rARN amplificado por PCR (rADN) de *S. agalactiae*, *S. uberis* y *S. parauberis* en solución.

Tilsala-Timisjärvi y Alatosava (1997) utilizaron la técnica de la PCR para amplificar y determinar la secuencia de la región intergénica 16S-23S del rARN de diferentes bacterias lácticas presentes en productos lácteos y en probióticos, entre ellas, de *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* para lo que diseñaron una serie de iniciadores que dieron resultados satisfactorios.

Berthier y Ehrlich (1998) estudiaron las secuencias 16S/23S del ADN de 6 especies de lactobacilos (*Lb. curvatus*, *Lb. graminis*, *Lb. sake*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus*) mediante PCR, definiendo iniciadores para cada una de ellas (Coeuret *et al.* 2003).

Tannock *et al.* (1999) utilizaron la amplificación por PCR para secuenciar la región 16S-23S de aislados de *Lactobacillus* demostrando la adecuación de esta técnica para la identificación de especies.

En 1997, Kaufmann *et al.* dedicaron su trabajo a la identificación y cuantificación de *Bifidobacterium* spp. aislados de alimentos con sondas específicas de género (con blanco la región 16S del rARN) mediante la técnica de PCR, sin el aislamiento previo de ADN, por rotura de las células con proteinasa K.

Tannock *et al.*, en 1999, identificaron aislados de *Lactobacillus* a partir del tracto intestinal, de ensilados y de yogur mediante comparaciones de la secuencia de la región intergénica 16S-23S del gen rARN, por amplificación de la misma mediante PCR.

Mannu *et al.* (2000) utilizaron la PCR para identificar lactobacilos mesofílicos en queso Fiore Sardo, un queso curado tradicional de Sardinia. Para ello, usaron siete iniciadores específicos de los diseñados por Berthier y Ehrlich (1998), Drake *et al.* (1996) y Ward y Timmins (1999).

Heilig *et al.*, en 2002, emplearon la PCR junto a la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para determinar la diversidad molecular de *Lactobacillus* spp. y otras bacterias lácticas en el intestino humano, concluyendo que esta combinación permite detectar bajos números de bacterias en ecosistemas específicos y caracterizarlas, tales como los lactobacilos en el tracto gastrointestinal humano.

En 2003, De Champs *et al.* estudiaron la colonización por *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* Lcr 35 del tracto intestinal de ratones y humanos. Para ello, diseñaron una sonda específica para hibridar la región 16S del rARN y aplicaron la técnica de la PCR, demostrando la capacidad de la cepa de sobrevivir en el tracto digestivo.

En 2004, Savadogo *et al.*, emplearon algunos de los iniciadores diseñados por Tilsala-Timisjärvi y Alatosava (1997) para identificar algunas de las bacterias presentes en muestras de leche fermentada Burkina Faso, amplificando las secuencias de la región intergénica 16S-23S por medio de la PCR, resultando el grupo de lactobacilos el más dominante.

Vlková *et al.*, (2004), emplearon la PCR para identificar a nivel de género varias cepas de Bifidobacterias derivadas de seis productos lácteos, obteniendo buenos resultados.

Dickson *et al* (2005) diseñaron en su trabajo iniciadores de PCR específicos de especie que permiten la identificación directa de *L. fermentum* en muestras clínicas y los usaron en PCR para la detección del mismo en muestras de saliva y de pus.

Elli *et al.*, en un estudio llevado a cabo en 2006, aplicaron la PCR para estudiar la supervivencia de las bacterias del yogur en el intestino humano.

Se han descrito numerosos iniciadores específicos de especies, estando los normalmente disponibles recogidos en la tabla 11.

Tabla 11. Iniciadores específicos de especies normalmente disponibles

Iniciadores	5'-3'	Target	Ref.
LbLMA1-rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	región 16S/23S Lactobacilli	
R16-1 (/LbLMA1-rev)	CTTGACACACCGCCCGTCA (/LbLMA1-rev)	gen 16S rARN	Dubernet <i>et al.</i> , 2002
Y2 casei(/Y2)	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT TGCCTGAGATTGACTTAA (/ Y2)	gen 16S rARN 16S <i>Lb. casei</i>	
para(/Y2)	CACCGAGATTCAACATGG (/Y2)	16S <i>Lb. paracasei</i>	Ward y Timmins, 1999
rham(/Y2)	TGCATCTTGATTTAATTTTG (/Y2)	16S <i>Lb. rhamnosus</i>	
16	GCTGGATCACCTCCTTTC	gen 16S rARN	
paracaseiITS/16	CGATGCGAATTTCTTTTTC /16	región 16S/23S <i>Lb. paracasei</i>	
rhamnosusITS/16	CGATGCGAATTTCTATTATT /16	región 16S/23S <i>Lb. rhamnosus</i>	
zeaeITS/16	CGATGCGAATTTCTAAATT /16	región 16S/23S <i>Lb. zeae</i>	Berthier <i>et al.</i> , 2001
16 reverse	GAAAGGAGGTGATCCAGC	gen 16S rARN	
Paracasei16S/16 reverse	CACCGAGATTCAACATGG/16 reverse	gen 16S rARN. <i>Lb. paracasei</i>	
Rhamnosus16S/16 reverse	TTGCATCTTGATTTAATTTTG/16 reverse	gen 16S rARN. <i>Lb. rhamnosus</i>	
zeae 16S/16 reverse	GCATCGTGATTCAACTTAA/16 reverse	gen 16S rARN <i>Lb. zeae</i>	
Ala	CTGCTGGGACGATTTG		
Ala'(/Ala)	CTGCTGGGACCATGTG (/Ala)	<i>Lb. curvatus</i> (1840 pb)	
Alb	CTGCTGGGACCATTTG		
Alb'(/Alb)	CTGCTGGGACACAATATG (/Alb)	No testado (1470 pb)	
Alc	GGAGGGTGTTCAGGAC		
Alc'(/Alc)	GGAGGGTGTTCAGGAC (/Alc)	<i>Lb. curvatus</i> (260 pb)	
Bla	CTGCTGGGACCAATT		Berthier y

Introducción

Bla'(/Bla)	CTGCTGGGACGAAAAG (/Bla)	<i>Lb. sake</i> B1 (750 pb)	Ehrlich, 1999
B2a	CTGCTGGGACCTTAA		
B2a'(/B2a)	CTGCTGGGACTGAAG (/B2a)	<i>Lb. sake</i> B2 (1700 pb)	
16	GCTGGATCACCTCCTTC		
Lc(/16)	TTGGTACTATTTAATTCTTAG (/16)	<i>Lb. curvatus</i> (220 pb)	
Ls(/16)	ATGAAACTATTAATTGGTAC (/16)	<i>Lb. sake</i> (220 pb)	
16	GCTGGATCACCTCCTTC	gen16S rARN	
23(/16)	AGTGCCAAGGCATCCACC (/16)	Gen 23S rARN (/16S)	
Lc(/16)	TTGGTACTATTTAATTCTTAG (/16)	región 16S/23S <i>Lb. curvatus</i>	
Lg(/16)	GTTGGTACATTTAATTCTTGA (/16)	región 16S/23S <i>Lb. graminis</i>	Berthier y Ehrlich, 1998
Lpapl(/16)	ATGAGGTATTCAACTTATT (/16)	región 16S/23S <i>Lb. paraplantarum/plantarum</i>	
Lpe(/16)	GTATTCAACTTATTAGAACG (/16)	16S/23S región <i>Lb. pentosus</i>	
Lpl(/16)	ATGAGGTATTCAACTTATG (/16)	región 16S/23S <i>Lb. plantarum</i>	
Ls(/16)	ATGAAACTATTAATTGGTAC (/16)	región 16S/23S <i>Lb. sake</i>	
LB1	AAAAATGAAGTTGTTAAAGTAGGTA	<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i> (1065 pb)	Torriani et al., 1999
LLB1 (/LB1)	AAGTCTGTCCTCTGGCTGG (/LB1)	<i>Lb. delbrueckii lactis</i> (1600 pb)	
20A	AATTCGGTCAACTCCTCATC		
23B (/20A)	TGATCCGCTGCTTCATTTCA(/20A)	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. (715 pb)	
34/2	CGTCAACTCCTCATCAACCGGGGCT		
37/1(/34/2)	CGCCGCCCGGGTGAAGGTG(/34/2)	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (678 pb)	Lick et al., 2000
33	CCTCATCAACTGGCGCC		
37(/33)	CGCCCGGGTAAAGGTA(/33)	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> (670 pb)	
LbP11	AATTGAGGCAGCTGGCCA		
LbP12 (/LbP11)	GATTACGGGAGTCCAAGC (/LbP11)	Iniciador derivado de RAPD. <i>Lb. plantarum</i>	
Lb1	AGAGTTTGATCATGGCTCAG		Quere et al., 1997
Lb2 (/Lb1)	CGGTATTAGCATCTGTTTCC (/Lb1)	Iniciador semi-universal. 16S rARN	
Aci I	TCTAAGGAAGCGAAGGAT		
Aci II (/Aci I)	CTCTTCTCGGTCGCTCTA (/Aci I)	región 16S-23S. <i>Lb. acidophilus</i>	
Pr I	CAGACTGAAAGTCTGACGG		
PrII 5/PrI)	GTA CTGACTTGCGTCAGCGG (/PrI)	región 16S-23S <i>Lb. paracasei/rhamnosus</i>	Tiisala- Timisjarvi y Alatossava, 1998
Pcas I (/PrI)	GCGATGCGAATTTCTTTTTTC (/PrI)	región 16S-23S <i>Lb. paracasei</i>	
Rha II(/PrI)	GCGATGCGAATTTCTATTATT (/PrI)	región 16S-23S <i>Lb. rhamnosus</i>	
Del I	ACGGATGGATGGAGAGCAG		
Del II (/Del I)	GCAAGTTTGTTCTTTTCTGAACTC (/Del I)	región 16S-23S <i>Lb. delbrueckii</i>	
Hel I	GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA		
Hel II (/Hel I)	CTCTTCTCGGTCGCCTTG (/Hel I)	región 16S-23S <i>Lb.</i>	

		helveticus	
DB1	ACCTATCTCTAGGTGTAGCGCA		
SS1 (/DB1)	GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG (/DB1)	16S <i>Lb. delbrueckii</i> (1100 pb)	
HE1	AGCAGATCGCATGATCAGCT		Drake <i>et al.</i> , 1996
SS2 (/HE1)	CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTAC-GACTT(/HE1)	16S <i>Lb. helveticus/Lb. acidophilus</i> (1400 pb)	Andrighetto <i>et al.</i> , 1998
CA1 (/SS1)	TGATCTCTCAGGTGATCAAAA (/SS1)	16S <i>Lb. casei, Lb. rhamnosus</i>	
16 SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
Aci 16SI (/16SII)	AGCTAACCAACAGATTCAC (/16 SII)	16S <i>Lb. acidophilus</i>	
Cri 16SI(/16SII)	GTAATGACGTTAGGAAAGCG (/16 SII)	16S <i>Lb. crispatus</i>	
GasI	GAGTGCGAGAGCATAAAG		
GasII (/GasI)	CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT (/GasI)	región 16S-23S <i>Lb. gasserii</i>	
Joh 16SI(/16SII)	GAGCTTGCCTAGATGATTTTA (/16 SII)	región 16S-23S <i>Lb. johnsonii</i>	
Lpfr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT		
PlanII (/Lpfr)	TTACCTAACGGTAAATGCGA (Lpfr)	región 16S-23S <i>Lb. plantarum</i>	Walter <i>et al.</i> , 2000
Prl	CAGACTGAAAGTCTGACGG		Tynkkynen <i>et al.</i> , 1999
CasII (/Prl)	GCGATGCGAATTTCTTTTTC (/Prl)	región 16S-23S <i>Lb. casei</i>	
ZaeI	TGTTTTGAGGGGACG		
ZaeII (/ZaeI)	ATGCGATGCGAATTTCTAAATT (/ZaeI)	región 16S-23S <i>Lb. zeae</i>	
RhII(/Prl)	GCGATGCGAATTTCTATTATT (/Prl)	región 16S-23S <i>Lb. rhamnosus</i>	
Reu(/lpfr)	AACACTCAAGGATTGTCTGA (/lpfr)	región 16S-23S <i>Lb. reuteri</i>	
FerIII(/lpfr)	CTGATCGTAGATCAGTCAAG (/lpfr)	región 16S-23S <i>Lb. fermentum</i>	
ShI	GATAATCATGTAAGAAACCGC		
ShII(/ShI)	ATATTGTTGGTCGCGATTTCG (/ShI)	región 16S-23S <i>Lb. sharpae</i>	
SAL1	ATTCACTCGTAAGAAGT	16S	
LOWLAC(/SAL1) (/SAL1)	CGACGACCATGAACCACCTGT	16S <i>Lb. salivarius</i>	Chagnaud <i>et al.</i> , 2001
CbsA2F	GTACCAAGCCAAAGCAAGAC	CbsA (S-Layer protein gene)	Horie <i>et al.</i> , 2002
CbsA2R(/CbsA2F)	GTTTGAAGCCTTTACGTAAGTC (/CbsA2F)	<i>Lb. perolens</i>	
97K	CTGCTGCCTCCCGTA	16S Universal	Bunte <i>et al.</i> , 2000
Lpacaf(/97K)	CCGAGATTCAACATGG(/97K)	16S <i>Lb. paracasei</i>	

Fuente: Coeuret *et al.*, 2003

Se han realizado multitud de modificaciones sobre la técnica básica que pretenden aumentar el potencial de la PCR, como es el caso de la PCR múltiple, que permite detectar varias especies o varios genes de una misma especie en una misma muestra y reacción (Winter y Slavic, 2000), con el consiguiente ahorro de tiempo, reactivos y volumen de muestra.

Sin embargo, la combinación de más de un par de iniciadores en la reacción presenta algunos inconvenientes: la especificidad puede verse reducida debido a la formación de dímeros por complementariedad interna de las secuencias de los iniciadores. Ésto puede reducir la disponibilidad de los reactivos y, por tanto, hacer que la sensibilidad de la amplificación también disminuya. La PCR múltiple ha permitido la identificación y la detección simultánea de factores de virulencia tales como *cagA* y *vacA* (Chisholm *et al.*, 2002).

Muchos estudios recientes se han llevado a cabo empleando esta PCR múltiple (Coeuret *et al.*, 2003). Así, la técnica se ha aplicado para detectar *Lb. pontis* y *Lb. panis* en fermentaciones en productos de panadería (Muller *et al.*, 2000) y *Lactobacillus* en muestras fecales (Lucchini *et al.*, 1998) y en carne deteriorada (Yost y Nattress, 2000).

Song *et al.* (2000) usaron la PCR múltiple como método rápido, simple, y fiable para la identificación de *Lactobacillus* aislados de heces humanas.

También en este mismo año, Dong *et al.*, sobre la base de secuencias del 16S rARN, diseñaron iniciadores específicos para la identificación simultánea de cinco especies de *Bifidobacterium* aisladas del intestino humano.

Ventura *et al.* (2001), desarrollaron un nuevo set de iniciadores de PCR para una identificación específica de especies de una mezcla de bifidobacterias o como cultivo puro de *B. lactis*. El objetivo de su estudio era el desarrollo de un método rápido y fiable para la detección e identificación de este microorganismo detectable con frecuencia en heces de niños y en determinados productos comerciales. Para ello, se aplicó la técnica de PCR múltiple.

Germond *et al.*, en 2002, diseñaron unos iniciadores específicos, basados en las secuencias 16S del rARN para la rápida identificación por amplificación del ADN de nueve especies de *Bifidobacterium* humanas.

Tal y como recogen Ward *et al.* (2005) en su revisión, se han diseñado diferentes sondas múltiples para la detección simultánea de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentes* de origen humano (Dong *et al.*, 2000). También Mullié *et al.* 2003, aplicaron la técnica para detectar a) *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, b) *B. angulatum*, *B. catenulatum*/ *B. pseudocatenulatum continuum*, *B.*

dentium, *B. longum* y c) *B. adolescentis*, *B. scardovii*, *B. gallicum*, en todos los casos de origen humano.

Settani *et al.* 2005 diseñaron un método basado en la PCR múltiple, con dos pasos para la rápida detección de 16 especies de lactobacilos comúnmente presentes en masa panaria. El primer paso consistió en desarrollar una mezcla de iniciadores específicos de grupo, mientras que el segundo incluyó tres ensayos de PCR múltiple con una mezcla de iniciadores específicos de especie. El resultado fue una rápida diferenciación y la detección *in situ* de los lactobacilos seleccionados.

En un trabajo posterior, Settani *et al.* (2006) emplearon esta PCR múltiple en combinación con la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para detectar lactobacilos en masas panarias fermentadas, demostrando la alta especificidad del nuevo método en este producto concreto.

En la tabla 12, se detallan algunos Iniciadores múltiples empleados para la identificación de lactobacilos.

Tabla 12. Iniciadores múltiples empleados para la identificación de lactobacilos

Iniciadores	5'–3'	Blanco	Referencias
Lac-2	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT		
Ldel-7 (/lac-2)	ACAGATGGATGGAGAGCAGA (/lac-2)	ISR/23S PCR-G lactobacilos Grupo I (450pb)	
LU-1'(/lac-2)	ATTGTAGAGCGACCGAGAAG (/lac-2)	ISR/23S PCR-G lactobacilos Grupo II (300 pb)	
LU-3'(/lac-2)	AAACCGAGAACACCGCGTT (/lac-2)	ISR/23S PCR-G lactobacilos Grupo IV (350 pb)	
LU-5(/lac-2)	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT (/lac-2)	ISR/23S PCR-G lactobacilos Grupo III (400 pb)	
23-10C	CCTTCCCTCACGGTACTG		
Laci-1 (23-10C)	TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC (/23-10C)	ISR/23S PCR-II-1 Grupo II, <i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> (210 pb)	
Ljen-3 (23-10C)	AAGAAGGCACTGAGTACGGA (/23-10C)	ISR/23S PCR-II-1 Grupo II, <i>Lb. jensenii</i> (700 pb)	
Lcri-1	AGGATATGGAGAGCAGGAAT		
Lcri-2(/Lcri-1)	CAACTATCTCTTACTACTGCC (Lcri-1)	ISR/23S PCR-II-2 Grupo II, <i>Lb.</i>	

Introducción

Lgas-1	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA	<i>crispatus</i> (522 pb)	
Lgas-2 (/Lgas-1)	TGCTATCGCTTCAAGTGCTT (/Lgas-1)	ISR/23S PCR-II-2 Grupo II, <i>Lb. gasseri</i> (360 pb)	Song <i>et al.</i> , 2000
Lfer-3	ACTAACTTGACTGATCTACGA		
Lfer-4 (/Lfer-3)	TTCACTGCTCAAGTAATCATC (/Lfer-3)	ISR/23S PCR-IV Grupo IV, <i>Lb.</i> <i>fermentum</i> (192 pb)	
Lpla-3	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT		
Lpla-2 (/Lpla-3)	CCTGAACTGAGAGAATTTGA (/Lpla-3)	ISR/23S PCR-IV Grupo IV, <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> (248 pb)	
Lreu-1	CAGACAATCTTTGATTGTTTAG		
Lreu-4 (/Lreu-1)	GCTTGTGGTTTGGGCTCTTC (/Lreu-1)	ISR/23S PCR-IV Grupo IV, <i>Lb. reuteri</i> (303 pb)	
Lsal-1	AATCGCTAAACTCATAACCT		
Lsal-2 (/lsa-2)	CACTCTCTTTGGCTAATCTT (/lsa-2)	ISR/23S PCR-IV Grupo IV, <i>Lb.</i> <i>salivarius</i> (411 pb)	
Lpar-4 (/LU-5)	GGCCAGCTATGTATTCACTGA (/LU-5)	ISR/23S PCR-III Grupo III, <i>Lb.</i> <i>paracasei</i> (312 pb)	
Rhall (/LU-5)	GCGATGCGAATTTCTATTATT (/LU-5)	ISR/23S PCR-III Grupo III, <i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i> (113 pb)	
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTAGGCCCG	16S rARN	
Y2 (/Y1)	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT (/Y1)	16S rARN PCR A (350 pb)	
16	GCTGGATCACCTCCTTTC	gen 16S rARN	
Ls (/16)	ATGAACTATTAATTTGGTAC (/16)	16S/23S SR <i>Lb. sake</i> PCR A (220 pb)	
Lc (/16)	TTGGTACTATTTAATTCTTAG (/16)	16S/23S SR <i>Lb.</i> <i>curvatus</i> PCR B (220 pb)	Yost y Nattress, 2000
Lu1r	CCACAGCGAAAGGTGCTTGCCAC	<i>Leuconostoc</i> gen 16S rARN	
Lu2 (/lu1r)	GATCCATCTCTAGGTGACGCCG (/lu1r)	<i>Leuconostoc</i> PCR B (175 pb)	
Lw5 (/Y1)	ACTAGAATCATTCCCTATTCTAGC (/Y1)	<i>Leuconostoc</i> PCR C (470 pb)	
Cb1	CCGTCAGGGGATGAGCAGTTAC	<i>Carnobacterium</i> gen 16S rARN	
Cb2r (/Cb1)	ACATTCGGAAACGGATGCTAAT (/Cb1)	<i>Carnobacterium</i> PCR D (340 pb)	
616V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	universal	
609R (/616V)	ACTACYNGGGTATCTAAKCC (/616V)	universal (800 pb)	
LaponR (/616V)	AGCCATCTTTGAAAT (/616V)	<i>Lb. pontis</i> (236 pb)	Muller <i>et al.</i> , 2000
LapanR	AACCATCTTTTATAC (/616V)	<i>Lb. panis</i> (236 pb)	

(/616V) LaspecR (/616V)	AGCCTTCTTTTATAC (/616V)	<i>Lb. sp.</i> (236 pb)
-------------------------------	-------------------------	-------------------------

Fuente: Coeuret *et al.*, 2003

Otra modificación de la técnica se conoce como PCR anidada (nested PCR) (Waage *et al.*, 1999): en ella, se realiza una doble amplificación con dos parejas de iniciadores, en donde la segunda pareja reconoce y amplifica una región interna del primer amplificado. Esta modificación aumenta la sensibilidad y la especificidad de la PCR, siendo muy útil en la detección de muestras en la que los microorganismos se encuentren en muy poca cantidad, como las muestras ambientales (Cellini *et al.*, 2005). Sin embargo, su utilización presenta un elevado riesgo de contaminación, al ser necesario pasar muestra del producto de la primera amplificación a nuevos viales con la mezcla de reacción para la segunda amplificación. En este caso, es necesario la realización de múltiples controles para desechar la posibilidad de aparición de falsos positivos debido a la contaminación con ADN.

En ocasiones se emplea una variante de esta técnica conocida como PCR semi-anidada, cuya diferencia básica con la anterior es que sólo emplea tres iniciadores diferentes, utilizándose uno de ellos en las dos amplificaciones (Fujimura *et al.*, 2002).

En esta tecnología se están produciendo continuos avances. El objetivo es conseguir una automatización completa del proceso en todas sus fases, extracción, amplificación y detección, pasando esta última, incluso, por un análisis de la secuencia del producto obtenido.

Ha sido empleada, por ejemplo, por Ventura *et al.* 2001, en el estudio descrito en líneas anteriores para una identificación específica de especies de una mezcla de bifidobacterias o como cultivo puro de *B. lactis* en heces de niños y en determinados productos comerciales.

10.3. Caracterización mediante iniciadores aleatorios, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)

Descrita por Williams *et al.* (1990), es el más simple de los métodos de tipado basados en los ácidos nucleicos. Esta técnica, se basa en la detección de diferencias en la secuencia del ADN genómico total de distintas cepas, amplificando

al azar regiones del ADN encabezadas por secuencias a las que son capaces de unirse iniciadores de secuencia única aleatoria. La secuencia del iniciador no guarda homología conocida con el ADN diana, por lo que la amplificación se realiza con una temperatura baja de unión del iniciador. Así se generan fragmentos de distintos tamaños, que mediante separación en gel de agarosa proporcionan patrones de bandas distintos para aquellas cepas que presentan diferencias en sus secuencias genéticas (Welsh y McClelland, 1990), que son específicas para cada par iniciador-patrón empleados, obteniéndose una huella genómica o “fingerprinting” característica de cada cepa (Tilsala-Timisjarvi y Alatossava, 1998).

Las ventajas de esta técnica son que no es necesario conocer con anterioridad información sobre la secuencia a amplificar y que se puede emplear con gran variedad de especies, requiriéndose poca cantidad de cultivo (Swaminathan y Matar, 1993). Es más rápido que otros métodos (PCR-RFLP's), ya que no se realiza la digestión del producto amplificado. Por el contrario, esta técnica posee una reducida reproducibilidad inter laboratorios debido a que diferentes aparatos puedan dar lugar a diferentes patrones de bandas (McPherson *et al.* 1993; Swaminathan y Barrett, 1995). Además, el patrón de bandas que se obtiene en unas determinadas condiciones, no siempre es constante, sobre todo cualitativamente. Los análisis densitométricos por ordenador de cada amplificación, permiten estudios más precisos.

Los RAPDs han mostrado ser discriminatorios a nivel de especie, se ha aplicado al grupo de *L. acidophilus* que tiene seis especies con similares fenotipos (Du Plessis y Dicks, 1995). En un estudio sobre los diferentes tipos de *L. plantarum*, esta técnica presentó una discriminación mayor entre subespecies que mediante ribotipado (Johansson *et al.*, 1995). La técnica RAPDs se ha empleado con éxito para diferenciar las subespecies de *Lactobacillus delbrueckii* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) (Torriani *et al.* 1999) y otros lactobacilos (Ward y Timmins, 1999; Tynkkynen *et al.*, 1999; Roy y Sirois, 2000 y Cusick *et al.*, 2000).

Las variedades de *Streptococcus thermophilus* han sido diferenciadas por RAPDs (Moschetti *et al.*, 1998). Esta técnica ha sido aplicada para caracterizar la variabilidad genética de bifidobacterias aisladas de ratas alimentadas con dietas específicas (Faneli *et al.*, 1998).

El género *Bifidobacterium* ha sido diferenciado por la técnica de RAPDs (Vincent *et al.*, 1998; Kullen *et al.*, 1997), usando cinco iniciadores que distinguen tres especies diferentes (*B. breve*, *B. bifidum* y *B. adolescentes*) en base a la similitud de los perfiles RAPDs obtenidos con cepas de referencia (Vincent *et al.* 1998). Esta técnica también es útil para monitorizar cepas industriales dentro de clusters específicos (*B. longum/infantis* o *B. animalis/lactis*).

Numerosos grupos de investigación han demostrado la fiabilidad del tipado con RAPDs para la diferenciación inter e intra específica de la mayoría de las especies de *Lactobacillus*. Además, es considerada, junto con la secuenciación del gen 16S rARN, la técnica más ampliamente utilizada para caracterizar lactobacilos asociados a alimentos, y se ha demostrado que distingue de forma precisa entre cepas de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* (Charteris *et al.* 1997).

Además, el RAPD múltiple (RAPD con múltiples iniciadores arbitrarios) se ha empleado con éxito para la diferenciación de bacterias acidolácticas aisladas del tracto gastrointestinal (Lucchinin *et al.* 1998).

Más recientemente, los estudios incluyen el uso de RAPD para la identificación de sondas específicas para especies y cepas o iniciadores de PCR para algunos lactobacilos incluyendo *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus rhamnosus* (Lucchini *et al.* 1998; Tilsala- Timisjarvi y Alatossava, 1998; McCartney (2002).

La tabla 13 recoge algunos iniciadores de RAPDs.

Tabla 13. Algunos iniciadores de RAPDs empleados por distintos autores

Iniciadores de RAPD (5'–3')	Empleado para	Referencias
1254 CCGCAGCCAA	<i>Lb. delb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. kéfiranofasciens</i> , <i>Lb. helveticus</i> ,	Torriani <i>et al.</i> , 1999
M13 GAGGGTGGCGGTTCT	<i>Lb. delb. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. maltoromicus</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. kéfir</i>	
9898 GCAGCCGG	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hilgardii</i>	Sohier <i>et al.</i> , 1999
AGTCAGCCAC	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. zeae</i>	Tynkkynen <i>et al.</i> , 1999
P1 GCGGCGTCGCTAATACAT GC		Cocconcelli <i>et al.</i> , 1996 Rebecchi <i>et al.</i> , 1998

Introducción

P4 ATCTACGCATTTACCCGC TAC	<i>Lactobacillus</i>	
CTGCTGGGAC GGAGGGTGTT	<i>Lb. curvatus, Lb. graminis, Lb. sakei</i>	Berthier y Ehrlich, 1999
OPL-01 GGCATGACCT	<i>Lb. acidophilus, Lb. crispatus, Lb. amylovorus,</i> <i>Lb. gallinarum, Lb. gasseri, Lb. johnsonii</i>	<i>Du Plessis y Dicks, 1995</i>
OPL-04 GACTGCACAC		
UNAMED ACGCGCCCT <i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Johansson et al., 1995</i> <i>Antonsson et al., 2001</i>
UNAMED AGCAGCGTGG	<i>Lb. acidophilus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. reuteri,</i> <i>Lb. plantarum.</i>	<i>Cocconcelli et al., 1995</i> <i>Baruzzi et al., 2000</i>
OPL-01 GGCATGACCT		
OPL-04 GACTGCACAC	<i>Lb. pentosus, Lb. casei, Lb. sake, Lb. curvatus,</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Van Reenen y Dicks, 1996</i>
OPL-02 TGGGCGTCAA		
OPL-05 ACGCAGGCAC		
OPB-06 TGCTCTGCCC		<i>Giraffa et al., 1998</i>
OPB-10 CTGCTGGGAC	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Bouton et al., 2002</i>
P1 TGCTCTGCCC		<i>Quiberoni et al., 1998</i>
P2 CTGCTGGGAC	<i>Lb. helveticus</i>	
RP CAGCACCCAC	<i>Lb. paracasei, Lb. rhamnosus</i>	<i>Ward y Timmins, 1999</i>
CRA 23 GCGATCCCCA CRA25 AACGCGCAAC	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Daud Khaled et al., 1997</i>
OPA-02 TGCCGAGCTG		
OPM-05 GGGAACGTGT	<i>Lb. acidophilus group</i>	<i>Gancheva et al., 1999</i>
OPL-07 AGGCGGGAAC		
OPL-16 AGGTTGCAGG		

Fuente: Coeuret *et al.*, 2003

10.4. Detección mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes fue desarrollada independientemente por dos grupos de investigación. El ADN o ARN 28S marcado radiactivamente fue hibridado con preparaciones citológicas realizadas con oocitos de *Xenopus* y detectado por microautoradiografía. Esta técnica permitió examinar las secuencias de ácidos nucleicos dentro de las células, sin alterar su morfología o la integridad de sus compartimentos. Desde entonces, la técnica ha sido modificada para el estudio de evolución cromosómica y estudios citogenéticos de una gran variedad de especies. Finalmente, fue introducido en la bacteriología por Giovannoni, quien fue el primero en usar sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente para la detección microscópica de bacterias. Posteriormente, los marcadores radiactivos fueron sustituidos por colorantes fluorescentes (Pinkel *et al.*, 1998).

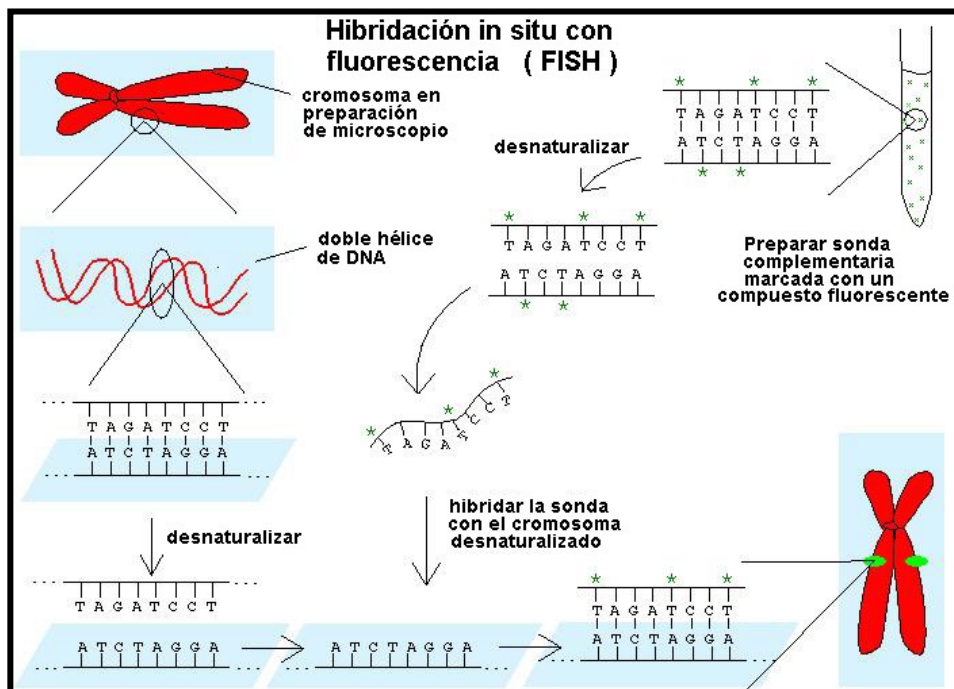


Figura 10: Esquema de la técnica de hibridación *in situ*

Fuente: biomodel.uah.es/citogene/horwitz/cytogen1.htm

Comparadas con las radioactivas, las sondas fluorescentes son más seguras, ofrecen una mejor resolución y no necesitan pasos adicionales. Además, las sondas fluorescentes pueden marcarse con colorantes de distinta longitud de onda de emisión, permitiendo la detección de varias secuencias con un paso simple de hibridación.

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada por fluorescencia que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula. Se emplea como blanco una región del ARN ribosómico 16S o 23S por su estabilidad genética, su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables y su alto número de copias (Woese, 1987), lo que permite una amplificación de la señal fácilmente detectable.

Esta técnica se ha convertido en una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos (Amman *et al.*, 1995). Presenta ventajas sobre otros métodos, como la PCR o la detección con anticuerpos, ya que no requiere un cultivo previo ni extracción de ácidos nucleicos, ni surgen problemas de uniones inespecíficas ni sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación. Además, FISH combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la visualización e identificación de células microbianas individuales dentro de su microambiente natural o del tejido enfermo.

La mayor limitación del método es la sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se esté hibridando. El método utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001).

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que queremos detectar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de ARNr muy homólogas. La accesibilidad de la sonda al ARNr es diferente según la molécula de ARNr de la que se trate (23S o 16S) y la zona del mismo de la que sea complementaria, lo que hay que tener en cuenta en el diseño de la sonda. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad, pero pueden llevar menos marcadores

(Charteris *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2001). Muchas de estas sondas específicas para rARN se han usado de forma extensiva en el análisis de productos lácteos (Hertel *et al.*, 1993; Andrighetto *et al.*, 1998).

Hertel *et al.* (1991), identificaron secuencias específicas del 23S rARN para *Lactobacillus curvatus*, *L. sake* y *L. plantarum/pentosus*, desarrollando sondas complementarias para la identificación rápida de lactobacilos en productos cárnicos.

La misma técnica (hibridación por sondas específicas para la región 23S) emplearon Pot *et al.* (1993) para la identificación y clasificación de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* y *L. johnsonii*.

Por su parte, Hensiek *et al.* (1992), desarrollaron sondas para el diagnóstico de oligonucleótidos para cuatro especies de *Lactobacillus* presentes en el tracto intestinal.

Para investigar la estructura de la población de los grupos filogenéticos predominantes en la microbiota típica de heces de adultos, Sghir *et al.* (2000) diseñaron, validaron y usaron una sonda para la región 16S del rARN.

Del mismo modo, Ehrmann *et al.* (1992), diseñaron una sonda específica para hibridar la región 23S del rARN de las cepas tipo de *Streptococcus thermophilus* y de *Streptococcus salivarius*.

Vlková *et al.*, (2004), emplearon el método FISH para identificar a nivel de género varias cepas de Bifidobacterias derivadas de seis productos lácteos, obteniendo buenos resultados. Para ello, usaron un kit específico para *Bifidobacterium spp.*, siendo el componente de este kit una sonda de ADN específica de género marcada con isotiocianato de fluoresceína, que se une al rARN de la bifidobacteria. Finalmente, las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia.

Tabla 14. Sondas oligonucleótidas para la identificación de lactobacilos

Sonda	Secuencia 5' 3'	Blanco	Especificidad	Referencia
Lba	TCTTTCGATGCATCCACA	23S	<i>Lb. acidophilus</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
Lba	AGCGAGCUGAACCAACAGAUU C	16S	<i>Lb. acidophilus</i>	Hensiek <i>et al.</i> , 1992
Lbam	GTAATCTGTTGGTTCCGC	16S	<i>Lb. amylovorus</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbb	TGTTGAAATCAAGTGCAAG	16S	<i>Lb. brevis</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
Lbc	ATGATAATACCCGACTAA	23S	<i>Lb. curvatus</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1991
Lbco	AGCACTTCATTTAACGGG	16S	<i>Lb. collinoides</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbcp	CAATCTCTTGGCTAGCAC	23S	<i>Lb. crispatus</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1992
Lbcr	GCAGGCAATACACTGATG	23S	<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. rhamnosus</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1993
Lbcrp	CTGATGTGTACTGGGTTTC	23S	<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. paracasei</i> / <i>Lb. Rhamnosus</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1993
Lbd	AAGGATAGCATGTCTGCA	23S	<i>Lb. delbrueckii</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1993
Lbdb	ATCCGAAAACCTTCT	16S	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i>	Lick <i>et al.</i> , 2000
Lbdl	ATCCGAAGACCTTCT	16S	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis/delbrueckii</i>	Lick <i>et al.</i> , 2000
33/2	CATCAACTGGCGCCTT	fragmento ADN 730pb <i>EcoRI/PstI</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i>	Lick <i>et al.</i> , 2000
34B	CATCAACCGGGGCTTT	fragmento ADN 730pb <i>EcoRI/PstI</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Lick <i>et al.</i> , 2000
Lbfe	GCGACCAAAATCAATCAGG	16S	<i>Lb. fermentum</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
Lbfr	CTCGCTGCTAACTTAAGTC	16S	<i>Lb. fructivorans</i> / <i>Lb. homohiochii</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
Lbg	TCCTTTGATATGCATCCA	23S	<i>Lb. gasserii</i>	Pot <i>et al.</i> , 1993
Lbh	ACTTACGTACATCCACAG	23S	<i>Lb. helveticus</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1993
Lbhi	CTCAACTTCATTGACCAAG	16S	<i>Lb. hilgardii</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbj	ATAATATATGCATCCACAG	23S	<i>Lb. johnsonii</i>	Pot <i>et al.</i> , 1993
Lbk	GTTTCATGTTAAATCATTCA	16S	<i>Lb. kefir</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbkf	TGCGGCTAGCCCTTCCGG	23S	<i>Lb. kefirano-faciens</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbl	TCGGTCAGATCTATCGTC	16S	<i>Lb. lindneri</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbma	CAAAAGCGACAGCTCGAAAG	16S	<i>Lb. manihotivorans</i>	Ampe, 1993
Lbp	ATCTAGTGGTAACAGTTG	23S	<i>Lb. pentosus</i> / <i>Lb. plantarum</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1991
Lbpa	CACTGACAAGCAATACAC	23S	<i>Lb. paracasei</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1993
Lbpa	TAACTCATTGACTGACTCG	23S	<i>Lb. parabuchneri</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbpe	TCAAATGTAAATCATGATG	16S	<i>Lb. pentosus</i> / <i>plantarum</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Unnamed	GGTATTGGTGATGCAAG	16S	<i>Lb. perolens</i>	Back <i>et al.</i> , 1999
Lbpp	ATCTAGTCGTAACAGTTG	23S	<i>Lb. plantarum</i> /	Hertel <i>et al.</i> , 1991

<i>pentosus</i>				
Lbpo	GGTAATCCATCGTCAAATC	16S	<i>Lb pontis</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
Lbre	GATCCATCGTCAATCAGG	16S	<i>Lb reuteri</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 1994
Lbru	TTCGGTGAAAGAAAGCTTG	16S	<i>Lb ruminis</i>	Hensiek <i>et al.</i> , 1992
Lbs	TTAATGATAATACTCGATT	23S	<i>Lb sake</i>	Hertel <i>et al.</i> , 1991
Lbsa	TAAGAATCAATTGGGCGAC	16S	<i>Lb sanfransiscensis</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994

Fuente: Coeuret *et al.*, 2003

Hay diferentes métodos de marcaje de las sondas. El marcaje fluorescente directo es el más utilizado, rápido, barato y fácil, ya que no requiere ningún paso posterior de detección tras la hibridación. Una o más moléculas de colorante fluorescente se unen al oligonucleótido, bien químicamente durante la síntesis a través de un aminoénlace en el extremo 5' terminal de la sonda, o enzimáticamente, utilizando una transferasa terminal que une los nucleótidos marcados fluorescentemente al extremo 3' terminal. Los fluorocromos de última generación emiten una señal fluorescente más intensa y son mucho más estables frente a la luz (Ammann *et al.*, 1990).

Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes van a ser la temperatura y la concentración de formamida en el tampón de hibridación. En la mayoría de los protocolos, la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida lo que va a dar lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno, permitiendo temperaturas más bajas con condiciones astringentes (Moter y Göbel, 2000).

Beimfohr *et al.* (1993) emplearon esta técnica para la identificación *in situ* de lactococos, enterococos y estreptococos.

También Langendijk *et al.* (1995) y Harmsen *et al.* (1999 y 2000) han utilizado esta técnica para detectar bifidobacterias en muestras fecales, obteniendo datos cuantitativos en la microbiota intestinal.

Welling *et al.* (1997), usaron sondas fluorescentes específicas para la región 16S del rARN para la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes de bacterias en muestras de heces humanas.

Franks *et al.* 1998, aplicaron FISH para estudiar las variaciones de las poblaciones bacterianas en heces humanas empleando sondas específicas para el 16S rARN, contribuyendo así al conocimiento de la composición y dinámica de la microbiota.

En 2002, Harmsen *et al.*, diseñaron siete sondas basadas en el 16S rARN para la detección de seis grupos de bacterias anaerobias presentes en heces humanas. Las condiciones de hibridación fueron optimizadas para aplicar FISH, siendo entonces las sondas validadas para una mezcla de organismos de referencia. Las sondas se aplicaron también en heces de 11 voluntarios.

Así lo hicieron también Ouwehand *et al.* (2004), quienes emplearon una cepa probiótica de *Bifidobacterium* en una matriz alimentaria seca, para llevar a cabo un estudio de viabilidad. Los recuentos de la cepa en heces de los diez individuos participantes en el estudio se determinaron aplicando la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes.

Sakai *et al.* 2004 aplicaron la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes para cuantificar las bacterias lácticas presentes en residuos de cocina fermentados, para lo cual diseñaron dos sondas específicas de grupos de bacterias. La técnica permitió conocer la evolución de este grupo de bacterias a lo largo del proceso de fermentación.

10.5. Detección de formas viables por DVC-FISH

Las primeras definiciones de viabilidad de una población celular se referían a la proporción de células capaces de multiplicarse tras la incubación en condiciones microbiológicas estándar. Se consideraría que una bacteria está muerta cuando no muestra crecimiento visible en un medio bacteriológico en un tiempo determinado. El método clásico para determinar la viabilidad es, por tanto, el recuento en placa (Villarino *et al.*, 2000).

Sin embargo, esta definición de viabilidad celular cuenta con muchas limitaciones. En primer lugar, no todas las especies bacterianas de muestras ambientales pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio. Y en segundo lugar, se ha descrito un nuevo estadio fisiológico llamado viable pero no cultivable (VBNC) (Haq *et al.*, 1996). Estas células serían viables, pero habrían perdido su

capacidad de formar colonias bajo condiciones de análisis, por lo que no serían detectadas.

Por lo tanto, ha sido necesario desarrollar varios métodos alternativos para determinar la viabilidad celular. Algunos métodos se basan en la demostración de actividad metabólica, como la reducción de sales de tetrazolio como indicador de un transporte activo de electrones (Rodríguez *et al.*, 1992), la detección de actividad esterasa mediante el uso de un sustrato fluorogénico (Reynolds y Fricker, 1999), o la detección de consumo de sustratos (Rahman *et al.*, 1994). Otros métodos ensayan la viabilidad por la demostración de la integridad de la membrana celular (Virta *et al.*, 1998) o la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante PCR (Islam *et al.*, 1993) o FISH (Karner *et al.*, 1997).

Direct Viable Count (DVC)

La atención se ha dirigido hacia otros nuevos marcadores de viabilidad como la elongación celular en respuesta a nutrientes en presencia de un inhibidor de la división celular, la técnica Direct Viable Count (DVC) o la detección del ARN mensajero (ARNm), una molécula con una vida corta, que podría establecer una correlación más estrecha con el estado viable que los métodos basados en el ADN.

El método original de DVC fue propuesto por el grupo de Kogure en 1979 para la enumeración de bacterias viables en un ambiente marino natural (Kogure *et al.*, 1979). Se basa en la incubación de las muestras con un agente antimicrobiano y nutrientes. Este agente antimicrobiano actúa como un inhibidor específico de la síntesis de ADN, con lo que se previene la división celular sin afectar a otras actividades metabólicas. Las células pueden por lo tanto continuar metabolizando nutrientes y aparecen elongadas y/o más gruesas tras la incubación.

Este método original presenta dos dificultades para la aplicación en comunidades complejas. En primer lugar, en un microambiente real hay bacterias que son resistentes al agente antimicrobiano empleado y, en consecuencia, serían capaces de crecer sin la formación de células elongadas. En segundo lugar, es difícil discriminar entre células elongadas y células que no lo están. Las células elongadas pueden ser más pequeñas que la media de la población y enmascarar las células que se están buscando (Coullier *et al.*, 1994; Joux and LeBaron, 1997).

Singh *et al.* (1989) en un trabajo inicial modificaron el método tradicional de DVC para hacerlo compatible con el análisis de imagen. Realizaron una comparación entre los recuentos de células viables por el método de siembra en placa y por los recuentos directos de viables (DVC) obtenidos empleando microscopía epifluorescente por análisis de imagen manual o automático, a partir de cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa* en un medio de cultivo con ácido nalidíxico. Las muestras filtradas se tiñeron para la microscopía eifluorescente y se analizaron manualmente y por análisis de imagen, considerando viables las células elongadas. En todos los casos, los recuentos de viables obtenidos con el análisis de imagen fueron superiores a los obtenidos por los otros dos métodos (siembra en placa o recuento manual de viables), variando eso sí la concentración óptima de ácido nalidíxico y el periodo de incubación con el cultivo. Como conclusión de su estudio, los investigadores indicaron que, bajo condiciones óptimas, la combinación del DVC con el análisis al microscopio, proporcionó una técnica de recuento de bacterias viables eficaz y cuantitativa a corto plazo.

En un trabajo posterior (Singh *et al.* (1990)), los autores emplearon esta combinación de DVC y análisis de imagen para la enumeración rápida de células dañadas por cloro en un cultivo de *Escherichia coli*. También emplearon el método para determinar los daños causados por el cloro en aislados de coliformes y bacterias patógenas entéricas. Con sus resultados demostraron que el análisis de imagen, bajo condiciones óptimas, proporcionó recuentos significativamente superiores de *E. coli* sometidas a estrés que el método tradicional de recuento en placa y permitió detectar daños en varios cultivos en 4 a 6 horas.

Buchrieser y Kaspar (1993) modificaron el método propuesto por Kogure *et al.* (1979), reemplazando el ácido nalidíxico por ciprofloxacina para la enumeración de bacterias de la leche. Esta modificación hizo posible que el método fuese también aplicable a una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Para ello, probaron cuatro antibióticos diferentes (ácido nalidíxico, novobiocina, ciprofloxacino y mitomicina C), siendo estos dos últimos los únicos que resultaron eficaces para aplicar el DVC con todas las bacterias probadas. Además, la ciprofloxacina fue la única que podía usarse en una sola concentración (1 µg/ml), mientras que para el resto fueron necesarios ajustes según géneros e, incluso, especies. El uso del ciprofloxacino en el DVC resultó en células viables elongadas hasta 5-11 veces con respecto a su longitud original, concluyendo de su estudio que

este DVC modificado es una técnica muy útil para estudios de crecimiento y supervivencia de patógenos y no patógenos en leche y otros alimentos.

Barcina *et al.* (1995), siguiendo también el método descrito por Kogure *et al.* (1979), emplearon ciprofloxacina, una quinolona que inhibe la división celular de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, para cuantificar el número de bacterias viables en una serie de cultivos. Así, como bacterias emplearon tres cepas de *Escherichia coli*, dos de ellas sensible al ácido nalidíxico y la tercera resistente a este inhibidor y tres bacterias Gram positivas: un bacilo (*Lactobacillus plantarum*) y dos cocos (*Enterococcus faecalis* y *Micrococcus varians*). Pese a que la ciprofloxacina resultó ser un inhibidor de la división celular para las seis cepas, se detectaron diferencias en la morfología de bacilos y de cocos. De hecho, el porcentaje de bacterias viables fue determinado en el caso de los bacilos por el aumento bien de longitud bien de biovolumen, mientras que para los cocos se hizo por el aumento de biovolumen. Para detectar las variaciones en biovolumen, se necesitó aplicar el análisis de imagen. Se detectaron porcentajes similares de bacterias viables con el uso de ambos inhibidores.

Servis *et al.* (1995), desarrollaron un procedimiento de DVC para algunas bacterias Gram positivas. Para facilitar el DVC diferencial para bacterias Gram positivas, la ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina e isopropil cinodina reemplazaron al ácido nalidíxico. Se eligieron estos antibióticos puesto que, al igual que el ácido nalidíxico, son inhibidores de la ADN girasa. Se emplearon diferentes concentraciones (1000 pg/ml, 100 pg/ml y 10 mg/ml) para los antibióticos y los microorganismos que se seleccionaron para el estudio fueron *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*, así como un estreptococo fecal aislado de una planta de tratamiento de aguas residuales. En todos los casos excepto para el estreptococo fecal se encontró el antibiótico así como su concentración más adecuada para optimizar el porcentaje de células elongadas.

Joux y LeBaron, 1997 emplearon también el DVC descrito por Kogure *et al.* 1979 para estudiar las implicaciones ecológicas de la aplicación del mismo para bacterias acuáticas, pero en este caso, mejorado mediante el uso de una mezcla de antibióticos en vez de ácido nalidíxico exclusivamente. De su estudio concluyeron la mejora en la eficacia del método, concluyendo que el DVC debe ser adaptado a cada ecosistema, puesto que las concentraciones de antibiótico son dependientes

de la cepa. Hicieron asimismo hincapié en la gran utilidad del DVC combinado con la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH).

Kalmbach *et al.* 1997 resaltaron también la importancia y efectividad de esta combinación de técnicas, aplicándolas para estudiar la dinámica de la formación de una biopelícula en agua potable.

Guyard *et al.* (1999), realizaron un estudio para determinar qué antibióticos eran más potentes y a qué concentraciones para la enumeración directa y la caracterización de células viables de poblaciones bacterianas de agua mineral. Para ello, se aislaron quince cepas de dos aguas minerales emergentes y se estudiaron sus sensibilidades a siete antibióticos del grupo de las fluoro quinolonas inhibidores de la replicación (ácidos nalidíxico y pipemídico, flumequina, norfloxacin, ofloxacin, perfloxacin y ciprofloxacina). Se demostró con ello que el procedimiento de DVC puede ser mejorado empleando ciertos cócteles de antibióticos. Las características morfológicas de las bacterias se determinaron con éxito empleando el análisis de imagen y un software adaptado. De su estudio concluyeron la adecuación del método para su aplicación a otras comunidades bacterianas tales como los cultivos mixtos en biofermentadores o en alimentos con una microbiota conocida.

Regnault *et al.* (2000), en su trabajo trataron de poner de manifiesto los problemas asociados con la aplicación del procedimiento de recuento directo de viables (DVC) a las bacterias Gram positivas. Así, según los autores, el procedimiento de DVC original, está limitado a bacterias Gram negativas que son sensibles al ácido nalidíxico y, por ello, el objetivo de su estudio consistió en desarrollar un procedimiento para estimar el número de células Gram positivas metabólicamente activas de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, empleando un método que combinaba el número de células dependientes del sustrato y su identificación por FISH.

Para ello, para cada especie, evaluaron diferentes medios bajos en nutrientes y medios de cultivo complejos, diferentes fluoroquinolonas y antibióticos beta-lactama, concentraciones de antibióticos, combinaciones de antibióticos, temperatura y tiempo empleando bacterias en diferentes estados fisiológicos y en muestras naturales.

Por su parte, Yokomaku *et al.* 2000, desarrollaron un procedimiento de DVC cuantitativo para discriminar clara y fácilmente la viabilidad de las células bacterianas. En él, las células viables fueron lisadas selectivamente por la formación de esferoplastos causada por la incubación con antibióticos y glicina. Este efecto de la glicina provoca la formación de células hinchadas con una pared celular muy débil siendo entonces cuando las células viables son lisadas fácilmente con un tratamiento sencillo de congelación-descongelación.

DVC FISH

Para solucionar este problema se puede llevar a cabo la combinación de los ensayos de DVC, que incrementan los niveles intracelulares de ARNr, con el análisis mediante FISH, basado en secuencias diana específicas de la bacteria que se desea detectar. Villarino *et al.* (2000) han empleado el método DVC-FISH para la detección de células viables de *E. coli*. demostrando que células inactivadas con bajas dosis de radiación UV, que habían perdido la cultivabilidad, eran capaces de elongarse, mostrando un estado viable.

Baudart *et al.* (2002), llevaron a cabo su trabajo al objeto de evaluar la especificidad y sensibilidad de un nuevo método que combinaba el FISH con el DVC para la enumeración directa, a nivel de célula individual, de células viables altamente diluidas de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en agua dulce y agua potable tras una filtración por membrana. Los resultados de su investigación demostraron la presencia de células viables pero no cultivables de algunos miembros de *Enterobacteriaceae* en agua potable tratada.

Lepeuple *et al.* (2003), se plantearon un estudio cuyo objetivo se centraba en desarrollar un método de detección con citometría de fase sólida para células de *Escherichia coli* marcadas para DVC-FISH. Para lograr la detección automática con un escáner se combinó la epifluoresceína-tiramida con una sonda oligonucleótida directamente marcada con peroxidasa para aumentar la intensidad de la fluorescencia. El método desarrollado se probó para la enumeración de cultivos puros, y para muestras de agua potable y filtrada con carbón activo granulado. El método que resultó ser equivalente al método de cultivo, fue menos sensible que el DVC-FISH seguido de análisis microscópico.

Piqueres *et al.*, 2006, utilizaron una combinación de DVC y de FISH para estimar la viabilidad de las células de *Helicobacter pylori*. Para ello, en su estudio, el

Introducción

DVC fue modificado y adaptado para el análisis de este microorganismo probando diferentes tiempos de incubación y concentraciones de inhibidores de ADN girasa. El procedimiento de DVC se combinó con el FISH para la detección específica de las células viables de *H. pylori* (DVC–FISH), concluyendo que la combinación de ambas técnicas puede proporcionar un método rápido y específico para detectar e identificar células viables de *H. pylori* en muestras ambientales, tras haberla aplicado en muestras de agua dulce y de agua marina.

OBJETIVOS

Un probiótico es un suplemento dietético microbiano (principalmente localizado en leches fermentadas y productos lácteos) que, consumido en ciertas cantidades, es capaz de ejercer beneficios sobre la salud.

Para que estos microorganismos probióticos ejerzan su efecto beneficioso sobre el huésped, han de encontrarse en proporciones elevadas en el producto ($>10^7$ microorganismos/ml) y ser capaces de sobrevivir en suficiente cantidad al tránsito gastrointestinal.

En la actualidad, se ha producido una cierta discrepancia entre diferentes líneas de investigación a la hora de afirmar los efectos beneficiosos del yogur tradicional. Algunas de ellas aseguran que sus bacterias no son capaces de sobrevivir al tracto gastrointestinal mientras que otras afirman lo contrario.

Todo ello nos llevó a establecer cuatro objetivos globales:

1. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de las bacterias lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) presentes en yogures de 11 marcas comerciales.

- A. Realizar recuentos totales de la población microbiana de los yogures para comprobar que cumplen con la normativa legal.
- B. Muestreo y aislamiento de las diferentes cepas presentes en cada uno de los yogures.
- C. Caracterización fenotípica: identificación bioquímica de las cepas por el sistema comercial API-50CHL.
- D. Caracterización genotípica de las diferentes cepas mediante RAPDs y análisis de los perfiles generados.

2. Puesta a punto de técnicas de detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, ADN y ARN: PCR y FISH.

Objetivos

- A. Puesta a punto de técnicas de detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* mediante PCR y PCR seminested y *Streptococcus thermophilus* mediante PCR.
 - B. Diseño de sondas específicas y puesta a punto de técnicas de detección y recuento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* mediante FISH.
3. Desarrollo de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables, de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- A. Puesta a punto (*in vitro*) de la técnica DVC-FISH.
 - B. Aplicación (*in vitro*) de la técnica DVC-FISH: simulación de jugos gastrointestinales para determinar la resistencia de las cepas.
4. Estudio *in vivo* de la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de BAL de un producto fermentado (yogur).
- A. Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante la aplicación de las técnicas de PCR y DVC-FISH en muestras de heces.
 - B. Estudio de la viabilidad de *Streptococcus thermophilus* mediante la aplicación de las técnicas de PCR y DVC-FISH en muestras de heces.
 - C. Estudio de la evolución de la microbiota intestinal a lo largo del ensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, RECuento Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus*) PRESENTES EN YOGURES DE ONCE MARCAS COMERCIALES

1.1. Yogures analizados y cepas de referencia utilizadas

Se analizaron un total de once yogures naturales tradicionales y tres pasteurizados después de la fermentación de diferentes marcas comerciales. Los yogures naturales se denominaron como Y1, Y2, sucesivamente hasta Y11 y los pasteurizados como YP1, YP2 e YP3.

Se utilizaron cepas de referencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (CECT 4005T) y *Streptococcus thermophilus* (CECT 801) para la puesta a punto de los diferentes métodos de aislamiento, identificación, recuento y caracterización molecular. Estas cepas se sembraron en agar MRS y M17, respectivamente, y se incubaron en anaerobiosis a dos temperaturas distintas (37°C y 42°C) para comprobar sus condiciones óptimas de crecimiento.

Todas las cepas utilizadas en la investigación se conservaron a -20°C y -80°C en caldo nutritivo adicionado con un 20% de glicerol.

1.2. Muestreo, recuento y aislamiento de microorganismos

Como paso previo a la toma de muestra, los yogures anteriormente descritos fueron homogeneizados y atemperados a temperatura ambiente. Se pesaron en condiciones de esterilidad 10 gramos de cada yogur que fueron introducidos en una bolsa estéril de plástico conteniendo 90 ml de agua de peptona tamponada. La mezcla se llevó al homogeneizador de muestras Stomacher MIX1 (Aes Laboratoire) para su emulsión durante 3-4 minutos, aproximadamente.

Después se realizaron diluciones decimales seriadas en agua con Tween 80 al 4% que se sembraron por duplicado en los medios de cultivo apropiados para realizar los recuentos.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- Medio agar LS Differential (Scharlau Schemie) para el recuento diferencial de las bacterias lácticas presentes en el yogur y para su aislamiento. En este medio, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* crece en forma de colonias lobuladas rojas de 1-1,5 mm de diámetro rodeadas de una zona blanca opaca y *Streptococcus thermophilus* crece en este medio formando colonias ovales o redondas rojas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro con un pequeño halo claro a su alrededor.
- Medio agar MRS (Merck) para el aislamiento de lactobacilos y su crecimiento mediante siembra en masa. En este medio, las colonias que aparecen son grandes, blancas y con los bordes bien definidos. Éstas se corresponden con el género *Lactobacillus*.
- Medio agar M-17 (Merck) para el aislamiento de estreptococos y su crecimiento en masa. Las colonias que aparecen son color crema y se corresponden con el género *Streptococcus*.

Las placas se incubaron a 37°C durante 72 h en condiciones de anaerobiosis (generada mediante sobres de anaerobiosis AnaeroGen (Oxoid)).

Se realizaron recuentos específicos en agar LS Diferencial por duplicado, en base a la morfología de las colonias. Los aislamientos iniciales de las cepas de lactobacilos y estreptococos de cada yogur también se realizaron en este medio de cultivo. A los lactobacilos se les otorgó la nomenclatura LDY1 a LDY11 y a los estreptococos STY1 a STY11, según el producto del cual fueron aislados.

1.3. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas

Del análisis de cada yogur natural (Y1, Y2..., Y11) realizado se seleccionaron colonias características de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* crecidas en el medio de cultivo selectivo LS Diferencial agar y se procedió a su identificación fenotípica mediante tinción Gram, prueba de la catalasa y perfiles de fermentación de carbohidratos (tira API 50 CHL).

El sistema de identificación API 50 CHL (Biomerieux, France) fue empleado para comprobar la acción de estas cepas seleccionadas (aisladas de cada una de las 11 muestras de yogur) sobre 50 sustratos. Este sistema se basa en el estudio de

fermentación de los 49 azúcares que posee la galería (compuesta por 50 microtubos, el primer tubo, sin principio activo, sirve como control negativo).

Antes de iniciar la prueba, las colonias aisladas seleccionadas se sembraron mediante triple estría en agar Plate Count (Merck) para obtener un cultivo puro (cultivo a 37°C durante 24 horas y en condiciones de anaerobiosis). Se picó una colonia que se resuspendió en el medio incluido en el test (color violeta) hasta una turbidez equivalente al tubo de McFarland número 2 y después se inoculó en cada microtubo de la galería. Se realizó todo el procedimiento según instrucciones del fabricante, incubando la galería en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 horas, siendo la primera lectura una vez transcurridas 24 horas y la segunda a las 48 horas.

Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH, pasando el medio de color violeta a color amarillo (prueba positiva). Los resultados obtenidos constituyeron los perfiles bioquímicos de cada una de las cepas y sirvieron para su identificación.

1.4. Recuento e identificación de BAL mediante la utilización de sondas específicas (FISH)

La hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) detecta las células de interés mediante la hibridación de la muestra con sondas sintéticas marcadas con fluorocromos. La molécula empleada como blanco para FISH es una región del ARN ribosómico 16S o 23S por su estabilidad genética, su dominio estructural con regiones conservadas y regiones variables y su alto número de copias que permite la unión de la sonda produciendo una amplificación de la señal.

Se propuso diseñar un protocolo para la detección de las BAL *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* mediante la hibridación con sondas específicas sin necesidad de cultivo previo (FISH). Mediante esta técnica (FISH) se analizaron los productos descritos en el apartado 1.1, identificando y cuantificando las bacterias aisladas en los mismos.

Para realizar los recuentos de lactobacilos y estreptococos en cada uno de los productos comerciales estudiados anteriormente, se tomaron 2 ml (1 ml para la hibridación con la sonda correspondiente de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y 1 ml para la de *Streptococcus thermophilus* en dos eppendorfs

diferentes) de las muestras de yogur utilizadas para el recuento en placa (descrito en el apartado 1.2) para poder comparar los resultados obtenidos por ambos métodos. La hibridación *in situ* se realiza según la técnica descrita a continuación.

1.4.1. Sondas

L. delbrueckii subsp. bulgaricus

Se diseñaron sondas complementarias y específicas de las secuencias parciales de los genes 16S y 23S del ARN ribosómico, para la detección a nivel de subespecie de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* así como para la realización de recuentos mediante FISH en diferentes matrices.

Para la detección de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se utilizaron varias sondas.

En primer lugar, se diseñó la sonda LDE16S complementaria a una región del gen 16S del ARNr cuya secuencia es:

LDE16S: 5'- GAC TCT TCG GGG TGA TTT -3'

Por otro lado, se diseñó una sonda específica, complementaria a una región del ARNr 23S. La secuencia de la sonda es la siguiente:

LDE23S: 5'- GCG TGT TCC CTC CTT AAG C -3'

Se comprobó la especificidad teórica de ambas. Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo de ambas con las secuencias del ARN ribosómico 16S y 23S de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* contenidas en las bases de datos RDP (Ribosomal Data Project II) y mediante el programa BLAST del GenBank.

Así mismo, se valoró la especificidad de las sondas mediante la hibridación de una batería de cepas pertenecientes a distintas especies de BAL (de referencia y aisladas de producto y de heces). Se realizaron recuentos de *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* de los productos comerciales estudiados mediante hibridación *in situ* con esta sonda.

Por otro lado, se diseñó otra sonda basada en la secuencia específica de la cepa aislada de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* del producto Y7. Para ello, se secuenciaron parcialmente los genes 16S y 23S de la cepa de este yogur natural. En la región complementaria a la sonda LDE23S se observó que había un cambio de base precisamente en esa zona. Se diseñó otra sonda LDE23R con ese cambio de base para los posteriores experimentos (*in vitro* e *in vivo*) que se realizaron con ese producto cuya secuencia fue:

LDE23R: 5'- GCG TGT TCC (T/C)TC CTT AAG C -3'

La secuenciación parcial de los genes 16S y 23S de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislada del producto comercial que se empleó para realizar todos los productos posteriores aparece en el anexo VI.

Streptococcus thermophilus

Se diseñó una sonda complementaria y específica de las secuencias parciales del gen 23S del ARN ribosómico, para la detección a nivel de especie de *Streptococcus thermophilus* así como para la realización de recuentos mediante FISH en diferentes matrices. Se compararon las secuencias del gen que codifica el ARNr 23S de *Streptococcus thermophilus* con las del resto de microorganismos almacenadas en los distintos bancos de datos. La especificidad de las sondas se comprobó de forma teórica mediante el programa BLAST. Las secuencias de las sondas fueron las siguientes:

STH23S: 5'-CAT GCC TTC GCT TAC GCT-3'

A nivel práctico, la especificidad de la misma se comprobó mediante la hibridación con una batería de cepas de BAL y otros estreptococos y enterococos endógenos que pudieran estar presentes en heces humanas y pudieran dar falsos positivos en un futuro ensayo *in vivo*.

Sondas EUB

Se empleó una combinación de tres sondas EUB338, complementarias de una región del ARNr 16S del dominio *Eubacteria* como control positivo, ya que hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Amann *et al.*, 1995).

EUB338-I: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'
EUB338-II: 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'
EUB338-III: 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'

Todas las sondas empleadas fueron sintetizadas y marcadas por TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) con 5 (6)-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida éster (FLUOS), que emite en el espectro del verde y con CY3, que emite en el espectro del rojo.

1.4.2. Hibridación *in situ* (FISH)

Para llevar a cabo la fijación de las células se tomaron las alícuotas de 1 ml descritas anteriormente (apartado 1.4.) de cada uno de los yogures a analizar (Y1 hasta Y11) y se procedió a su centrifugación. El precipitado se resuspendió en PBS y paraformaldehído en proporción 1:3, manteniéndose durante 3 horas a 4°C. A continuación, se procedió a dos lavados de las muestras con PBS y, tras los mismos, se resuspendió el precipitado con etanol y PBS en una proporción 1:1 y se almacenó a -20 °C. Una vez fijadas, las muestras se depositaron sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina. Se dejaron secar al aire y se añadió 10 µl de lisozima a una concentración de 10 mg/ml. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a la deshidratación, sumergiendo el portaobjetos en volúmenes de 50, 80 y 100% de etanol, durante 3 minutos en cada uno.

Posteriormente, cada uno de los pocillos se cubrió con 10 µl de tampón de hibridación (0,9 M/l NaCl, 0,01% SDS, 20 mM/l Tris-HCl y X% formamida, pH 7,6) conteniendo 50 ng de sonda marcada con el correspondiente fluorocromo. Para la puesta a punto de la técnica se probaron varias concentraciones de formamida. La función de la formamida es aumentar la astringencia de unión, de forma que cuanto

mayor sea la concentración, más específica debe ser la unión de la sonda con la secuencia diana.

El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en un tubo tipo Sarsted de 50 ml, en el que se había introducido previamente una base de papel de celulosa humedecida con el mismo tampón de hibridación. La reacción se llevó a cabo a 46°C, en oscuridad y en condiciones de humedad según Moreno *et al.* (2001). El tiempo de hibridación fue de aproximadamente 2 horas.

A continuación, se procedió al lavado del portaobjetos con una solución de lavado (20 mM/l Tris-HCl, 0,01% SDS, 5 mM/l EDTA) atemperada a 48°C, primero vertiendo una pequeña cantidad sobre el mismo para arrastrar el tampón de hibridación y, después, sumergiéndolo en 50 ml de la misma para eliminar el resto de sonda que no se hubiera unido al ARNr. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48°C en oscuridad. Al tampón de lavado se le añadió una concentración de NaCl condicionada por el porcentaje de formamida utilizado en la hibridación.

%Formamida (Tampón de hibridación)	µl de NaCl 0.5M (Tampón de lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
40	460

Tras los 15 minutos de lavado, los portaobjetos se lavaron con agua y se secaron al aire en oscuridad. Posteriormente, se montaron con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad) entre cubre y portaobjetos y se visualizó mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

Se contaron un total de 20 campos por muestra. Todos los recuentos se hicieron por duplicado.

1.5 Caracterización genotípica

1.5.1 Aislamiento de ADN genómico

El aislamiento del ADN genómico de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDY1 a LDY11) y *Streptococcus thermophilus* (STY1 a STY11), así como de las cepas de referencia de estas bacterias utilizadas se realizó con el método de extracción del CTAB modificado descrito por Wilson (1987).

Se partió de un cultivo puro que se resuspendió en 500 µl de tampón TE. El tampón contiene EDTA, capaz de acomplejar tanto los cationes divalentes como los iones Mg^{+2} , que mantienen la estructura de la pared celular. La eliminación de estos iones produce un debilitamiento de la misma. El EDTA también inhibe los enzimas que pueden degradar el ADN, ya que éstos necesitan la presencia de cationes divalentes para poder actuar.

A continuación, se añadieron 30 µl de SDS al 10%, cuya función es disociar las proteínas unidas a los ácidos nucleicos y eliminar los lípidos que actuarían formando micelas con lipoproteínas y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para facilitar la eliminación de los restos proteicos. Toda la mezcla se agitó e incubó a 37°C durante 1 hora.

Transcurrida la incubación, se añadieron 100 µl de NaCl 5M, que proporciona la concentración salina necesaria para que el CTAB no acompleje con el ADN. A continuación, se adicionaron 80 µl de solución CTAB/NaCl para separar las proteínas del ADN, manteniéndolas en solución. De nuevo se agitó y se incubó la mezcla a 65°C durante 10 minutos. Tras la incubación se añadieron 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El detergente y los lípidos se extraen con el cloroformo, el alcohol isoamílico facilita la separación de las fases y evita la formación de espuma durante las mezclas.

Se agitó y, después, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 10 minutos, con el fin de separar la fase acuosa, que contiene el ADN, de la fase CTAB-restos celulares. El sobrenadante obtenido (400-600 µl) se transfirió a un nuevo tubo y se añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El fenol desnaturaliza las proteínas, que precipitan, separándolas del

ADN, que permanece soluble. Tras agitar, la mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar cualquier resto de CTAB precipitado.

El sobrenadante (300-400 μ l) se transfirió a un tubo nuevo y se añadió isopropanol frío (200-250 μ l). La mezcla se agitó suavemente durante unos minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para precipitar el ADN. Al finalizar la centrifugación, se eliminó todo el isopropanol y el precipitado se lavó con 500 μ l de etanol frío al 70% y se secó al vacío. Por último, se resuspendió en 25 μ l de tampón TE y se le añadió 1 μ l de solución ARNsA, conservándolo a -20°C .

Se comprobó la extracción de ADN mediante un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (1x). Se realizó la electroforesis de este gel y, tras finalizar, se tiñó con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos. La presencia de ADN se comprobó tras su visualización con luz ultravioleta.

1.5.2 Amplificación del ADN mediante iniciadores aleatorios (“Random Amplified Polymorphic DNA” o RAPDs)

La técnica RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) se emplea como técnica de caracterización molecular que abarca todo el ADN bacteriano, obteniéndose de este modo una diferenciación intraespecífica. Diferencia, por tanto, entre cepas pertenecientes a una misma especie. La técnica se basa en la detección de diferencias en la secuencia del ADN genómico total de distintas cepas, amplificando al azar regiones del ADN encabezadas por secuencias a las que son capaces de unirse iniciadores de secuencia única aleatoria. Se generan fragmentos de distintos tamaños, que mediante separación en gel de agarosa proporcionan patrones de bandas distintos para aquellas cepas que presentan diferencias en sus secuencias genéticas, obteniéndose una huella genómica característica de cada cepa.

Se utilizaron dos iniciadores distintos de nueve pares de bases para la caracterización de lactobacilos y estreptococos.

El primero de ellos, fue el iniciador que se denominó RAPD1, descrito por Tynkkynen *et al.* (1999).

RAPD1 : 5' - AGT CAG CCA C - 3'

El segundo fue el iniciador que se denominó RAPD2 (Torriani *et al.*, 1999)

RAPD2: 5' - CCG CAG CCA A - 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl, conteniendo:

Taq- ADN polimerasa	2,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	4 µM
Iniciador	0,4 µM
ADN muestra	5 µl
Agua	32 µl

Tabla 15. Condiciones de reacción de amplificación por RAPD's para lactobacilos y estreptococos

Nº ciclos	Temperaturas y tiempos	Proceso
1 ciclo	94°C durante 5 min	Desnaturalización
35 ciclos	94°C durante 1 min	Desnaturalización
	32°C durante 2 min	Unión al iniciador
	72° C durante 2 min	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 2 min	Extensión del producto

Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (agarosa MS-12, HispanLab).

1.6. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPDs

Los perfiles de bandas fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se registraron en un soporte informático. A continuación, las bandas se analizaron con el programa informático TDI Lane Manager (TDI España).

El primer paso del análisis consistió en determinar el tamaño de cada banda, mediante extrapolación de la distancia de migración de los fragmentos del marcador (100 pb ADN Ladder, Fermentas). Para ello, se empleó el programa 1D-Manager (TDI), mediante el cual se definen los perfiles de bandas y el perfil de referencia correspondiente al marcador de pesos moleculares, de modo que el programa estima el tamaño de las diferentes bandas de cada microorganismo.

Posteriormente, se construye una matriz de distribución de los fragmentos. En la matriz, las filas representan las diversas bandas generadas por amplificación del ADN y las columnas se corresponden con los distintos microorganismos analizados. La comparación entre microorganismos se realiza mediante el coeficiente de similitud de Dice (S_D), definido como:

$$S_D = \frac{2a}{2a+b+c}$$

siendo **a**: número de bandas comunes para ambas cepas.

b y c: número de bandas no comunes en cada cepa.

La comparación entre microorganismos, también, se realiza mediante el coeficiente de similitud de Jacard (S_D), definido como:

$$S_D = \frac{a}{a+b+c}$$

siendo **a** : número de bandas comunes para ambas cepas.

b y c: número de bandas no comunes en cada cepa.

Materiales y métodos

Los coeficientes de similitud de Dice y de Jacard se utilizan en la construcción de una representación gráfica de las relaciones entre los microorganismos analizados, denominada “Dendrograma”. Con ayuda del programa informático Lane Manager (TDI) se determinan los coeficientes de similitud de Dice y de Jacard para cada combinación de parejas de microorganismos.

El programa construye una matriz de similitud cuyas filas y columnas se corresponden con los microorganismos y que está compuesta por los valores del coeficiente de Dice y de Jacard. Aplicando el algoritmo matemático UPGMA (Unweighted-Pair Group Meted with Average linkage) los microorganismos son agrupados basándose en la similitud de sus perfiles de bandas y se construye el dendrograma.

2. DETECCIÓN DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus* MEDIANTE PCR TRADICIONAL y PCR SEMINESTED

2.1. Cepas bacterianas utilizadas, condiciones de cultivo y conservación

Para el ensayo de especificidad, se emplearon las cepas que aparecen en Tabla 16. Se incluyeron cepas de referencia de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). El resto fueron las cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas de los productos comerciales utilizados (STY1 a STY11 y LDY1 a LDY11, respectivamente).

Tabla 16. Cepas de referencia utilizadas

Especies o subespecies	Cepa
<i>Streptococcus thermophilus</i> (aislados de los yogures comerciales Y1 a Y11)	STY1 a STY11
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CECT 801
<i>Streptococcus intermedius</i>	CECT 803T
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 407
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4102
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (aislados de los yogures comerciales Y1 a Y11)	LDY1 a LDY11
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CECT 4005T
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CECT 286T
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CECT 282
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 4022
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 4121
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 4063
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 225T
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 562

El cultivo de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* se llevó a cabo en MRS y M17, respectivamente, según las condiciones descritas anteriormente.

El resto de especies incluidas en el estudio se incubaron en un agar nutritivo en condiciones adecuadas para su crecimiento, según el manual de la Colección Española de Cultivos Tipo (www.cect.org).

Todas las cepas utilizadas en la investigación se conservaron a -20°C y -80°C en caldo nutritivo adicionado con un 20% de glicerol.

2.2. Aislamiento del ADN genómico bacteriano

Para el aislamiento del ADN bacteriano se utilizó el protocolo de Wilson *et al.* (1987), del mismo modo que se ha descrito anteriormente en el apartado 1.5.1. de material y métodos.

2.3. Detección de *L. delbrueckii* mediante PCR simple

Para la detección de la especie *L. delbrueckii* se emplearon los iniciadores descritos por Lick *et al.* (2000):

1: AAT TCC GTC AAC TCC TCA TC
2: TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA

Estos iniciadores amplifican una región de 717 pares de bases del gen ARNr 16S.

La reacción de amplificación se llevó a cabo, según las condiciones descritas por dicho autor, en un volumen de 50 µl conteniendo: tampón 10X, 15 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada nucleótido, 1 mM de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2, 1 U del enzima *Taq* ADN polimerasa y 5 µl de ADN molde de cada muestra.

Las condiciones de PCR aparecen en la tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de PCR para *Lactobacillus delbrueckii*

Nº ciclos	Temperaturas y tiempos	Proceso
10 ciclos	92°C durante 20 s	Desnaturalización
	65 °C durante 75 s	Unión al iniciador
	72° C durante 40 s	Extensión del producto
35 ciclos	90°C durante 20 s	Desnaturalización
	55°C durante 50 s	Unión al iniciador
	72° C durante 30 s	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 3 min	Extensión del producto

Se trataron de identificar mediante PCR todas las cepas aisladas como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de los 11 productos comerciales denominadas como LDY1 a LDY11 y la cepa de referencia de esta bacteria indicada anteriormente. Se realizaron también reacciones con el resto de cepas de referencia (tabla 16) para comprobar que no fueran amplificadas.

2.4. Detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante PCR seminested

Para poder detectar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en muestras más complejas, se puso a punto un protocolo de PCR seminested para intentar mejorar la especificidad y la sensibilidad de la PCR vista anteriormente.

Se emplearon los iniciadores descritos por Lick *et al.* (2000) LdelbF, LdelR1 y LdebR2. Estos primers amplifican una región de 678 pares de bases del gen ARNr 16S de esta bacteria.

La reacción de amplificación se llevó a cabo, según indicaciones de los autores, en un volumen de 50 µl conteniendo: Tampón 10X, 15 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada nucleótido, 1 mM del iniciador LdelbF, 0,5 mM de los iniciadores LdelbR1 y LdelbR2, 1 U del enzima *Taq* ADN polimerasa y 5 µl de ADN molde de cada muestra.

<p>LdelbF: CCT CAT CAA CCG GGG CT LdelbR1 (2PCR simple): TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA LdelbR2: CGC CCG GGT GAA GGT G</p>
--

Las condiciones de esta PCR seminested aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 18. Condiciones de PCR seminested para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Nº ciclos	Temperaturas y tiempos	Proceso
1 ciclo	94°C durante 20 s	Desnaturalización
	90°C durante 20 s	Desnaturalización
35 ciclos	55°C durante 75 s	Unión al iniciador
	72° C durante 40 s	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 2 min	Extensión del producto

Se estudió la especificidad de esta reacción con todas las cepas mostradas en la tabla 16.

2.5. Detección de *S. thermophilus* mediante PCR

Se utilizaron los iniciadores TH1 y TH2, cuyas secuencias describieron Timisjärvi y Alatosawa en 1996. Estos dos iniciadores amplifican un fragmento de 259 pares de bases de la región intermedia ("spacer region") comprendida entre los genes 16s y 23s del ARNr de *S. thermophilus*.

TH1: 5'-ACG GAA TGT ACT TGA GTT TC-3'

TH2: 5'-TTT GGC CTT TCG ACC TAA C-3'

Se ensayaron diferentes temperaturas de unión de los iniciadores y tiempos de extensión del producto. Los primeros ensayos se realizaron a una temperatura de 51°C, que fue aumentándose de 1°C en 1°C hasta 55°C. Los tiempos de extensión evaluados fueron 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos y 1 minuto.

La especificidad de esta reacción de PCR se comprobó con las cepas de referencia (tabla 16). Se trataron de identificar mediante PCR las cepas de *S. thermophilus* aisladas de productos comerciales denominadas de STY1 a STY11.

2.6. Análisis de los productos de PCR

En todos los casos, 10 μ l del producto generado por la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X sometido a 100 V durante 60 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz UV tras teñirlos con bromuro de etidio con una concentración del 1%.

3. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN Y RECUENTO DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus* MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH)

El método FISH utilizado para la detección y recuento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, así como las sondas empleadas para ello (diseño, especificidad), han sido descritos en el apartado 1.4 de material y métodos.

4. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO COMBINADO DVC-FISH PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*

Con la finalidad de poder diferenciar entre células viables y no viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* se puso a punto una técnica molecular (DVC-FISH) que permitiera detectar e identificar, de forma específica, las células vivas.

El método del DVC (Direct Viable Count method) discrimina por microscopía las células viables y no viables. Se basa en la incubación de las muestras en la presencia de nutrientes y un inhibidor de la ADN girasa y, por tanto, de la síntesis de ADN, impidiendo la división de las células sin afectar a otras actividades metabólicas celulares. Las células pueden continuar metabolizando nutrientes y se elongan o aumentan su tamaño tras la incubación.

Este método se combinó con la detección específica con sondas sintéticas marcadas con fluorocromos (FISH) descrito en el apartado 1.4.

4.1. Puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para llevar a cabo el ensayo se empleó la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDY7), aislada del producto Y7. Se sembró en agar MRS durante 48 horas en anaerobiosis. Esta cepa se utilizó para establecer las condiciones óptimas del método DVC, ya que es la misma que se utilizaría para el ensayo *in vivo* (descrito en apartados posteriores).

Se inoculó una cantidad equivalente a un asa en varios matraces que contenían 25 ml de caldo MRS con distintos antibióticos a diferentes concentraciones. También se inoculó un matraz del mismo medio que no contenía ningún antibiótico como control negativo. Se realizaron controles negativos, consistentes en inocular diferentes matraces (con los distintos antibióticos y concentraciones), con la bacteria que previamente se había mantenido durante 10 minutos a 100°C, tratamiento que producía la muerte celular.

Los antibióticos (posibles inhibidores de la ADN girasa) ensayados fueron ácido nalidíxico, ciprofloxacino, novobiocina y ácido pipemídico y las

Materiales y métodos

concentraciones evaluadas de cada uno de ellos fueron 0,5, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Todos los matraces se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis y, tras 0, 3, 7 y 24 horas de haber introducido la bacteria en el medio de cultivo se procedió a la extracción de dos alícuotas de 1 ml de cada matraz, para el análisis mediante FISH y mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (figura 11).

Materiales y métodos

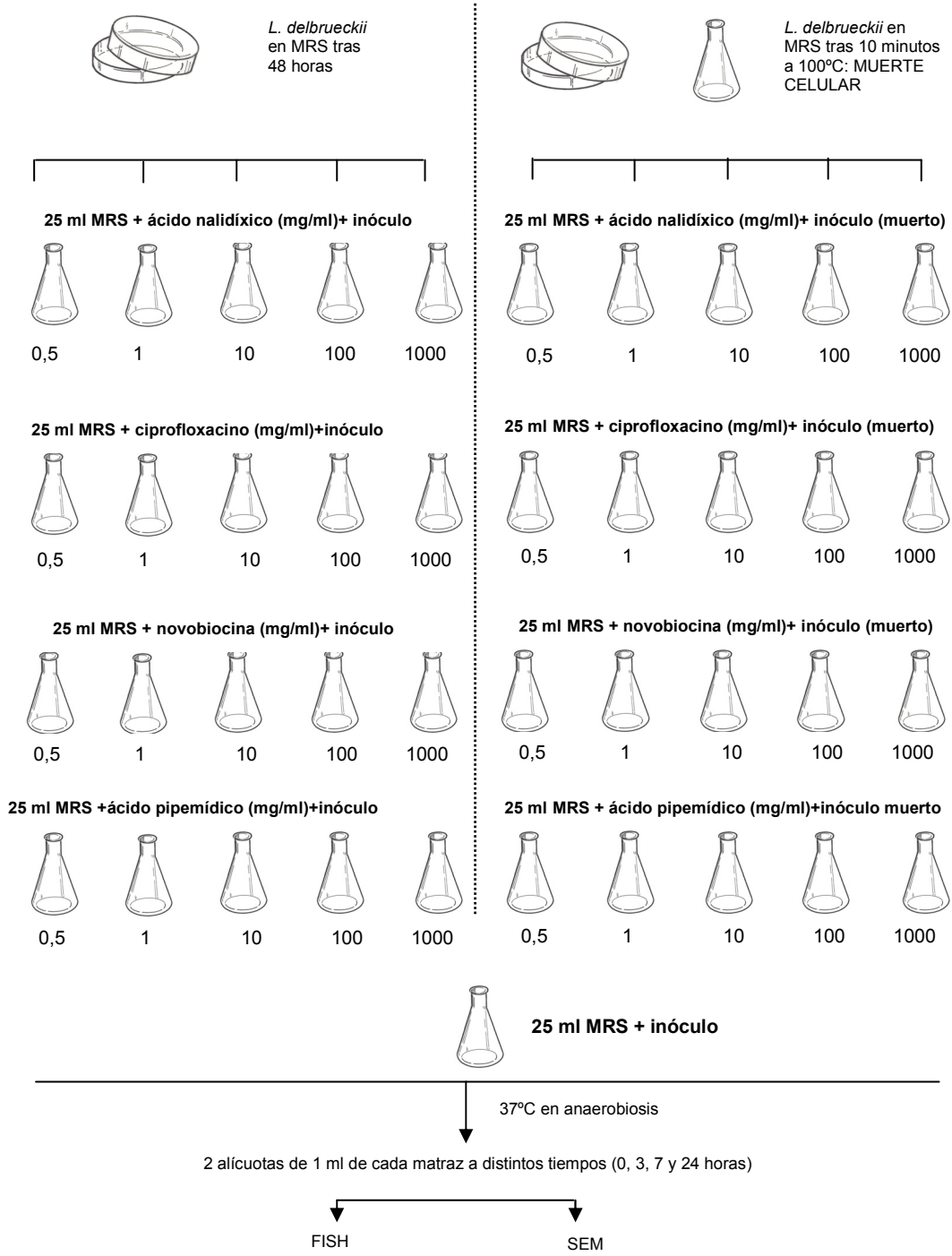


Figura 11. Puesta a punto del método DVC-FISH para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para el análisis mediante FISH, se tomó 1 ml de cada matraz y se centrifugó. Se fijó la muestra y se llevó a cabo la hibridación *in situ* tal y como se describió anteriormente en el apartado 1.4.1 de Material y Métodos.

Para el análisis mediante SEM, las células se fijaron con PBS 0,1 M (pH 7,2), que contenía un 2.5% de glutaraldehído y un 2% de tetraóxido de osmio a 4°C durante 8 horas. Las células fijadas se lavaron con PBS 0,1M tres veces y, finalmente, se resuspendieron en un volumen de 100 µl. Se depositaron 10 µl de la suspensión en la superficie de membranas de policarbonato de 25 mm con un tamaño de poro de 0,2 µm y se procedió a su inmersión en un baño de nitrógeno líquido. Las membranas se cubrieron con oro y las muestras se visualizaron con un Microscopio Electrónico de Scanning, JEOL JSM-5410, que operaba a 20 kv (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan).

De acuerdo con trabajos previos (Besnard *et al.*, 2000; Buchrieser, 1993), se consideraron como células viables aquéllas que se elongaron al menos dos veces respecto al tamaño original.

4.2. Puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de *Streptococcus thermophilus*

Para llevar a cabo el ensayo se empleó un cultivo de 48 horas de la cepa de *Streptococcus thermophilus* STY7 crecida en MRS. Esta cepa fue aislada previamente del producto Y7 (mismo producto que para la cepa aislada de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Se decidió utilizar el medio MRS en lugar del M17 para optimizar el procedimiento futuro en el estudio de resistencia de las cepas al tracto intestinal tanto *in vitro* como *in vivo* ya que, como se apunta en la introducción, tanto el M17 como el MRS son válidos según el CeNAN para el examen rutinario del yogur. De esta forma, en los siguientes estudios se realizó el enriquecimiento de la muestra para ambas cepas del yogur en un único medio de cultivo.

Se inoculó una cantidad equivalente a un asa en varios matraces que contenían 25 ml de Caldo MRS con distintos antibióticos a diferentes concentraciones. Se utilizaron los mismos antibióticos y las mismas concentraciones descritos en el apartado anterior. Igualmente, se prepararon los mismos controles negativos descritos para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Todos los matraces se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis y, tras 0, 3, 7 y 24 horas de haber introducido la bacteria en el medio de cultivo con los antibióticos, se procedió a la extracción de una alícuota de la muestra para el análisis mediante FISH y mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La preparación de la muestra para FISH y para SEM se realizó del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior.

Según los trabajos previos de Besnard *et al.* 2000 y Buchrieser, 1993 se consideraron como células viables de *S. thermophilus* aquellas que alcanzaron un diámetro de coco de, al menos, dos veces el tamaño original.

Materiales y métodos

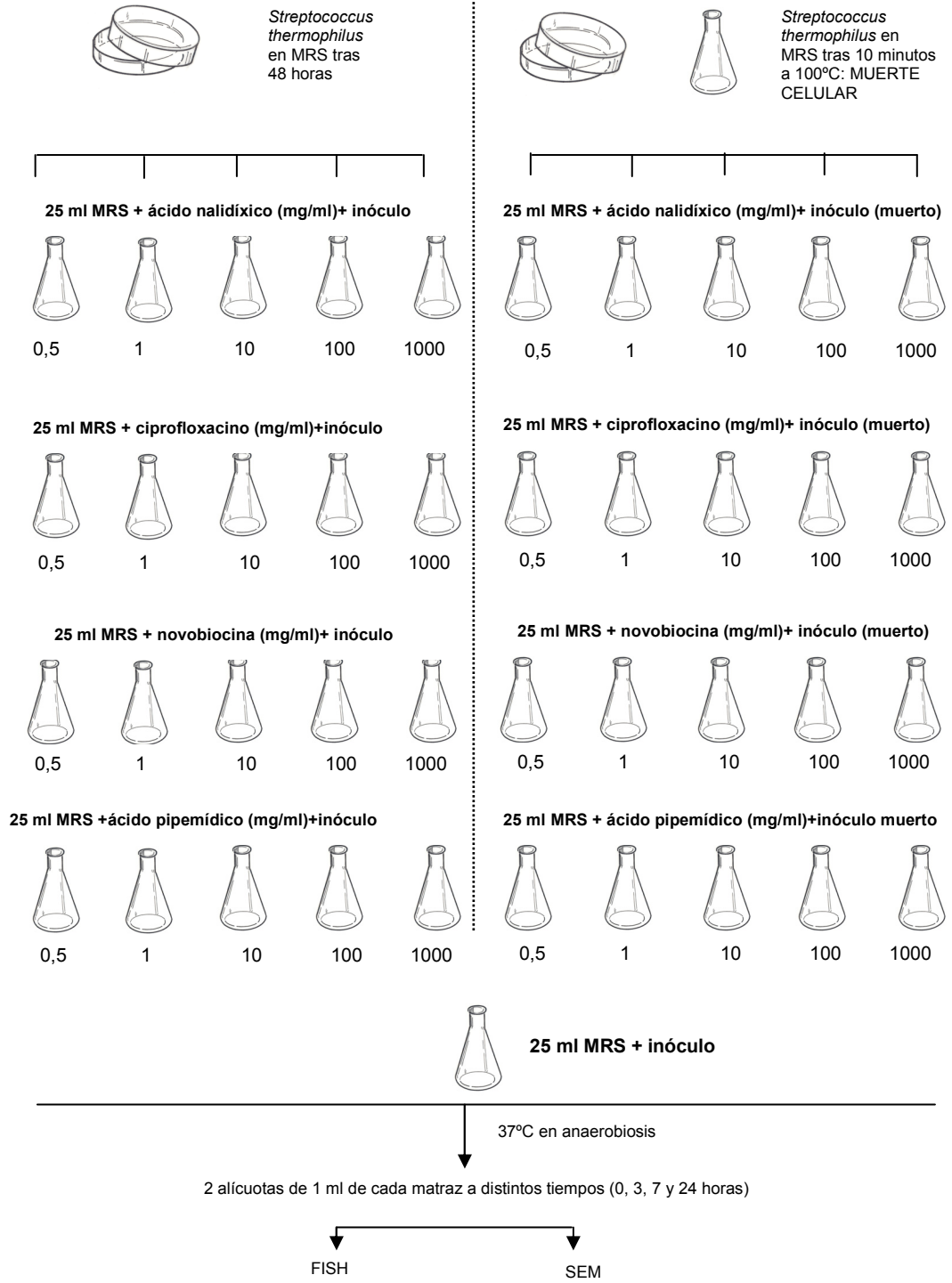


Figura 12. Puesta a punto del método DVC-FISH para *Streptococcus thermophilus*

5. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus* A LAS CONDICIONES DE TRÁNSITO GASTROINTESTINAL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DVC-FISH

Una vez puesta a punto en apartados anteriores la combinación DVC-FISH para la detección de células viables de las BAL contenidas en el yogur natural Y7 (lactobacilo y estreptococo LDY7 y STY7 respectivamente), se procedió a comprobar la utilidad de la misma en ensayos de supervivencia de estas BAL a los jugos gástricos. Para ello, se simuló *in vitro* el paso de las BAL del yogur a través de los jugos gastrointestinales.

En los dos estudios descritos en los apartados 4.1 y 4.2, varios antibióticos, a diferentes concentraciones y tiempo de exposición resultaron efectivos para diferenciar de forma rápida y sencilla células vivas y muertas tanto de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como de *S. thermophilus* mediante DVC-FISH. Sin embargo, tras optimizar el método se decidió seleccionar el antibiótico novobiocina, a una concentración de 10 µg/ml y una incubación de 7 horas puesto que esta combinación resultó efectiva para ambas bacterias, al permitir discriminar entre células vivas y muertas además de no reducir el número de células totales pudiendo ser considerado el recuento como real (ver apartado 3 de resultados).

En primer lugar, se simularon los jugos gástricos y pancreáticos en condiciones de esterilidad y por separado, resuspendiendo pepsina (Sigma) (3 g/l) y pancreatina (1 g/l) en suero salino estéril (0,5% m/vol) de acuerdo con los procedimientos descritos por Charteris *et al.* (1998). El pH de estas soluciones fue ajustado a pH 2,0 y 8,0, usando HCl concentrado y NaOH 0,1M respectivamente, mediante el uso del pH-metro MicropH 2001 (Crison).

Para todo el estudio se utilizó un yogur natural de una marca comercial conocida. El yogur utilizado fue el denominado anteriormente como Y7. Sus recuentos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* así como la caracterización fenotípica y otros datos de interés aparecen en el apartado 1 resultados.

Antes de iniciar el experimento, se volvieron a realizar recuentos en placa de las dos bacterias del yogur en estudio para comprobar que, el recuento era el

habitual. Para ello, se tomó 1 ml de yogur, se realizaron diluciones decimales y se sembraron en agar LS-diferencial.

Los estudios de resistencia a la pepsina y a la pancreatina se realizaron por separado, simulando así el paso del producto por el tracto gastrointestinal. Se tomaron diversas muestras del yogur a distintos tiempos de contacto con dichos jugos, de acuerdo a los tiempos de exposición a los jugos gástricos e intestinales que tienen lugar en un proceso de digestión humana. Así, el tránsito por el estómago tiene una duración, normalmente, de aproximadamente de tres horas, mientras que el tránsito intestinal tiene una duración habitual de seis horas desde que el alimento entra en el sistema digestivo. Según algunos autores estos tiempos se reducen de forma importante si la ingesta se produce en ayuno, lo que no se correspondería con el presente estudio.

Así pues, las tomas de muestra se realizaron para los jugos gástricos a los 0 minutos, 10 minutos, 60 minutos y 180 minutos (tres horas), mientras que para los jugos intestinales a los 0 minutos, 10 minutos, 4 horas y 6 horas.

5.1. Estudio de la resistencia a la pepsina

Lo primero que se hizo fue realizar un recuento inicial del producto Y7 a ensayar para comprobar que, el recuento era el habitual. Para ello, se tomó 1 ml de yogur, se realizaron diluciones decimales y se sembraron en agar LS-diferencial.

Antes de comenzar el ensayo, se homogenizó el yogur Y7 durante 1 minuto. Se realizó una dilución 1:5 del yogur en la disolución de pepsina. Para ello, se tomaron 3 ml del yogur en condiciones estériles y se diluyeron en 15 ml de dicha disolución antes descrita. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 ml de esta dilución a los 0, 10, 60 y 180 minutos para aplicar el DVC-FISH tanto a los lactobacilos como a los estreptococos, que se centrifugaron inmediatamente a 7000 rpm durante 5 minutos, recuperando de esta forma las células. El sedimento de cada muestra se resuspendió en una pequeña cantidad de caldo MRS, se introdujo en un matraz con 100 ml de caldo MRS conteniendo 10 µg/ml de novobiocina y se incubó a 37°C en anaerobiosis durante 7 horas.

Se tomaron 2 ml de cada matraz para fijar las células de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *S. thermophilus* tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 1.4.

También se procedió a la extracción de una alícuota de 1 ml de cada muestra para el análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) según el método descrito anteriormente.

Tras la hibridación de las muestras con las sondas específicas, se procedió al recuento de las células viables y no viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por un lado y de *S. thermophilus* por el otro. Se contaron un mínimo de veinte campos en cada hibridación. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Para la diferenciación en ambos casos entre células vivas y muertas se siguieron los criterios descritos en los apartados 4.1 y 4.2 de material y métodos. Mediante una sencilla fórmula matemática (factor de multiplicación en función del objetivo utilizado en el microscopio), se calculó el número real de microorganismos de la muestra, así como el porcentaje de bacterias viables y no viables y su variación en función del tiempo de exposición a la pepsina. De esta forma se obtuvieron los resultados de la resistencia de ambas cepas a la pepsina a diferentes tiempos.

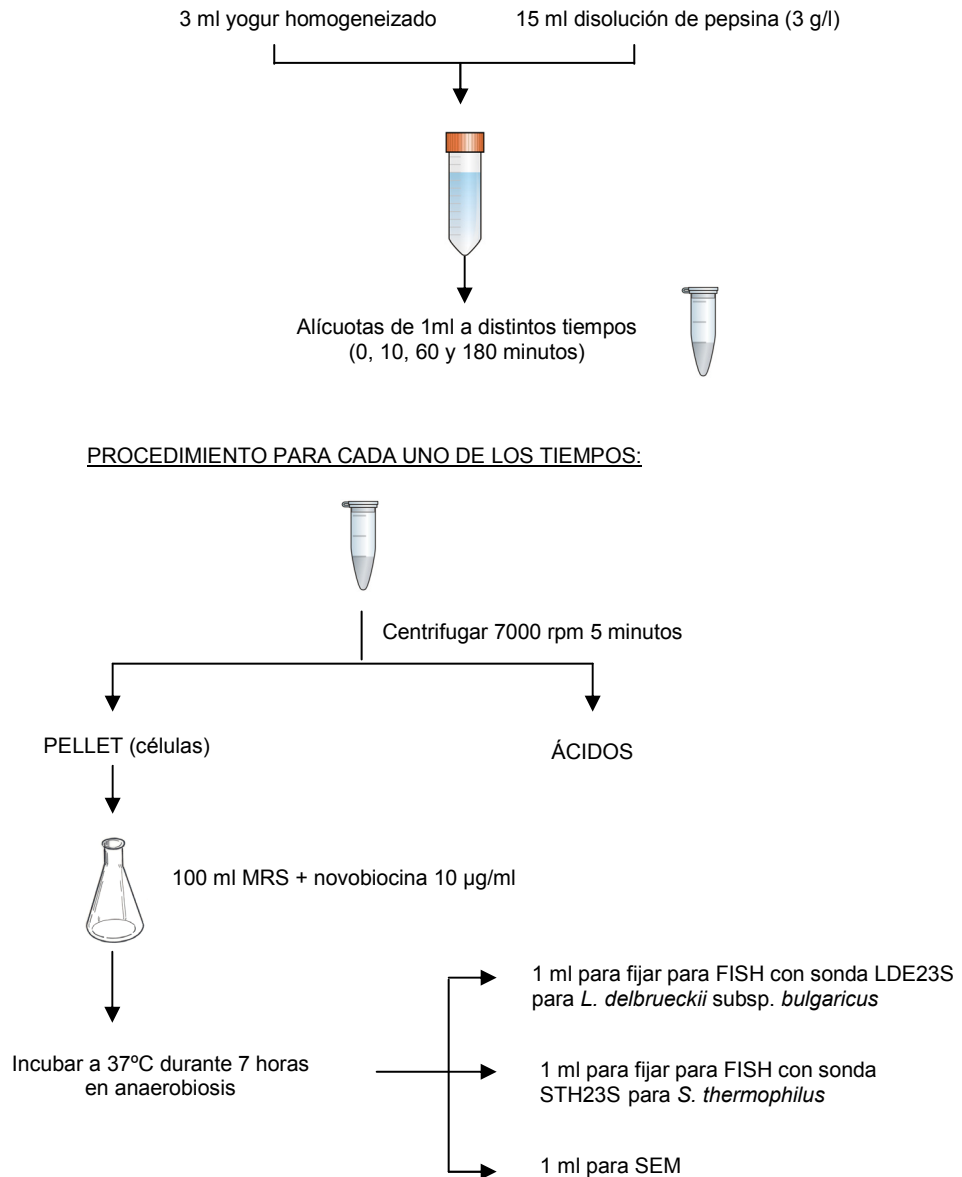


Figura 13. Estudios de resistencia a la pepsina de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*

A su vez, se comprobó la viabilidad mediante un recuento en placa de lactobacilos y de estreptococos. Para ello, se tomó una alícuota de 1 ml a cada tiempo de exposición a la pepsina, realizando la misma operación de separación de los ácidos descrita en líneas anteriores. Tras ello, se resuspendió el pellet en agua estéril, se realizaron diluciones decimales seriadas y recuentos en placa en agar LS diferencial. Las placas se incubaron a 37°C durante tres días en condiciones de anaerobiosis.

Los resultados para los recuentos en placa se expresaron como la media de dos determinaciones (recuento por duplicado), mientras que para los recuentos con epifluorescencia, se expresaron como la media de los recuentos en veinte campos diferentes multiplicada por el factor de microscopio.

5.2. Estudio de la resistencia a la pancreatina

Como en el estudio anterior, se homogenizó el yogur Y7 durante 1 minuto. Se tomaron 3 ml de éste en condiciones estériles y se diluyeron en 15 ml de la disolución de pancreatina descrita anteriormente. Se tomó una alícuota de 1 ml de esta dilución a los 0, 10, 240 y 360 minutos. El procedimiento a partir de este punto fue exactamente el mismo al aplicado para el estudio de la resistencia a la pepsina y puede verse de forma completa en la figura 14.

Materiales y métodos

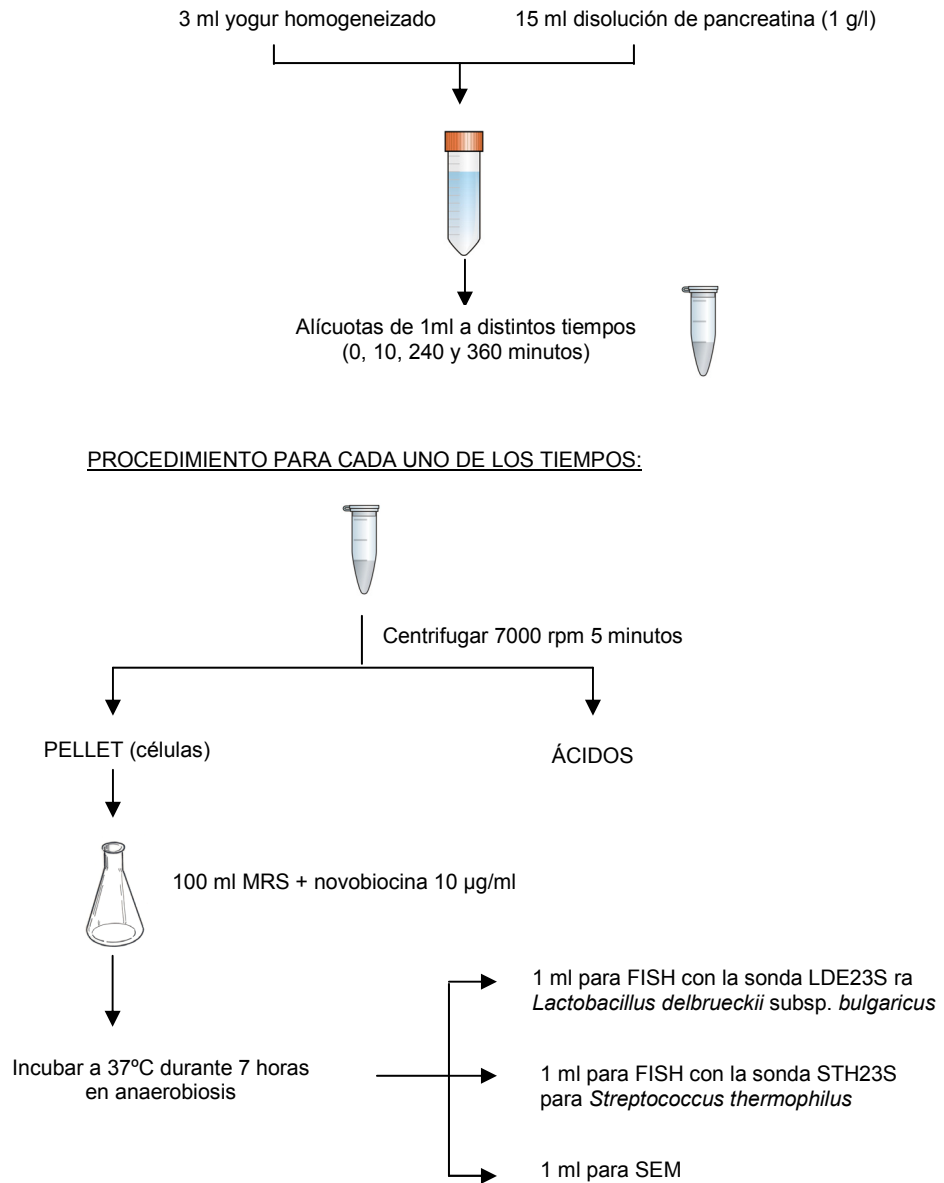


Figura 14. Estudios de resistencia a la pancreatina de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*

6. ESTUDIO *IN VIVO* PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS CEPAS DE BAL DE UN PRODUCTO FERMENTADO (YOGUR)

Una vez puestas a punto todas las técnicas de detección e identificación molecular de las BAL, se pasó a comprobar la eficacia de las mismas en un estudio *in vivo* en personas mediante la ingesta de un producto comercial.

6.1. Determinación del límite de detección de las diferentes técnicas empleadas para la detección de las BAL en heces

6.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces inoculadas artificialmente para determinar el límite de detección de las técnicas de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH

Antes de aplicar las técnicas desarrolladas al estudio *in vivo* con heces humanas, se determinó el límite de detección de cada una de ellas mediante inoculación de heces con un número conocido de BAL. Se llevaron a cabo ensayos, por duplicado, con muestras de heces inoculadas artificialmente con distintas concentraciones de la cepa *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7. Todas las muestras fueron de personas que no habían ingerido ningún producto lácteo fermentado durante las dos semanas anteriores a la recogida.

Para ello, se homogeneizó 1 g de cada una de estas heces en diferentes tubos conteniendo 9 ml de PBS estéril. Cada uno de los tubos de PBS había sido previamente inoculado con diluciones decimales seriadas de un cultivo de 48 horas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, desde 10^7 hasta 10^2 u.f.c./ml. La cantidad de células de cada dilución se ajustó mediante recuento en placa en MRS de una dilución inicial, incubando las placas a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas.

Tras su homogeneización durante 2 minutos, se tomaron alícuotas de 1 ml para la extracción de ADN para la detección por PCR. También se sembraron 100 µl en diferentes medios de cultivo como Agar MRS y Agar LS diferencial para la detección mediante cultivo. Finalmente, se tomó 1 ml para realizar el DVC-FISH, cuyo estudio del límite de detección en heces se describe posteriormente en el apartado 6.1.3.

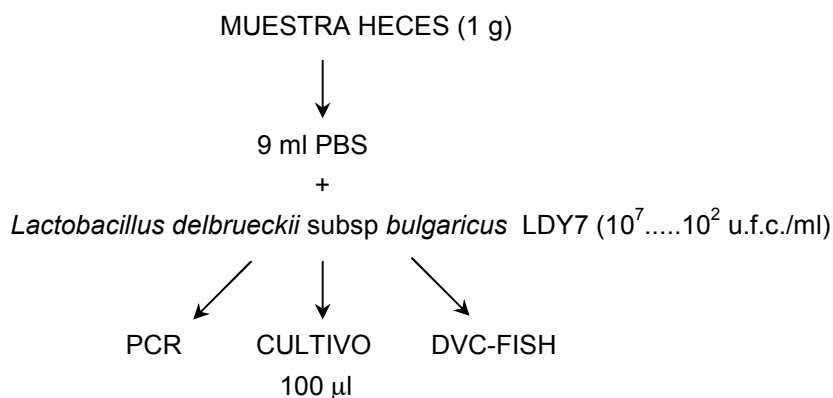


Figura 15. Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria

6.1.2. *Streptococcus thermophilus* en heces inoculadas artificialmente para determinar el límite de detección de las técnicas de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH

Para determinar el límite de detección de los distintos métodos de detección de *S. thermophilus* se procedió del mismo modo que en el apartado 5.1.1. Se llevó a cabo un ensayo, por duplicado, con muestras de heces inoculadas artificialmente con distintas concentraciones de esta bacteria.

Se hicieron diluciones de 1g de heces en diferentes diluciones de 9 ml de PBS estéril. El PBS había sido previamente inoculado con diluciones seriadas de un cultivo de 48 horas de *S. thermophilus* STY7, desde 10^8 hasta 10^2 cel/ml. La cantidad de células contenidas en cada dilución se calculó mediante recuento en placa en M17, incubado a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas.

Se extrajo 1 ml de la muestra extracción de ADN para la detección por PCR, 100 µl que se sembraron en Agar M-17 y Agar LS diferencial para la detección mediante cultivo y 1 ml para realizar el DVC-FISH cuyo estudio del límite de detección en heces se describe en el apartado 6.1.3.

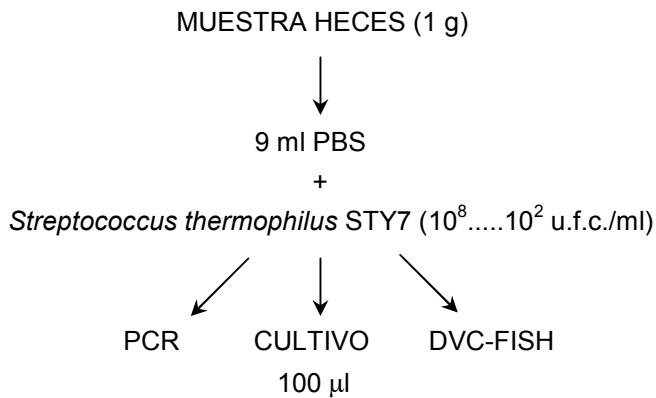


Figura 16. Detección de *Streptococcus thermophilus* en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria

6.1.3. Aplicación del DVC-FISH para la detección de células viables en heces y determinación del límite de detección del método.

En los apartados 4.1. y 4.2. se desarrolló el método del DVC-FISH para la determinación de células viables de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *S. thermophilus* del producto Y7. Se ensayaron diferentes concentraciones y tipos de inhibidores de la ADN girasa a tiempos de incubación.

Una vez seleccionado el antibiótico, su concentración y el tiempo de incubación óptimos (10 µg/ml de novobiocina durante 7 horas), se quiso comprobar la eficacia del método en una matriz compleja como son las heces y determinar su límite de detección para su aplicación en estudios *in vivo*.

Se realizaron diluciones de 1 g de heces en 9 ml de caldo PBS a las cuales se les inoculó cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* hasta alcanzar concentraciones desde 10^2 hasta 10^8 células/ml. Para ello, se partió de dos cultivos de 48 horas de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* del producto Y7 en caldo MRS y caldo M17 respectivamente. Se determinaron sus concentraciones mediante la realización de recuentos en placa en agar MRS y agar M17, respectivamente. Finalmente, se realizaron las diluciones correspondientes

Materiales y métodos

para obtener las concentraciones deseadas de ambas bacterias en las diluciones de heces.

Se inoculó 1 ml de cada una de las diluciones con concentraciones conocidas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *S. thermophilus* (ver apartados 6.1.1. y 6.1.2.) en diversos matraces que contenían 25 ml de MRS, con una concentración de novobiocina de 10 µg/ml. También se inocularon dos matraces más con este caldo que no contenían antibiótico como control negativo.

Todos los matraces se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 7 horas. Tras ese tiempo se tomó 1 ml de cada matraz para su análisis por FISH. Se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 250 µl de PBS y 750 µl de paraformaldehído. Tras las 3 horas de fijación se lavaron las muestras con 1ml de PBS dos veces consecutivas y se resuspendió en igual volumen de etanol frío y PBS. Se almacenaron todas estas muestras a -20°C hasta su análisis por FISH.

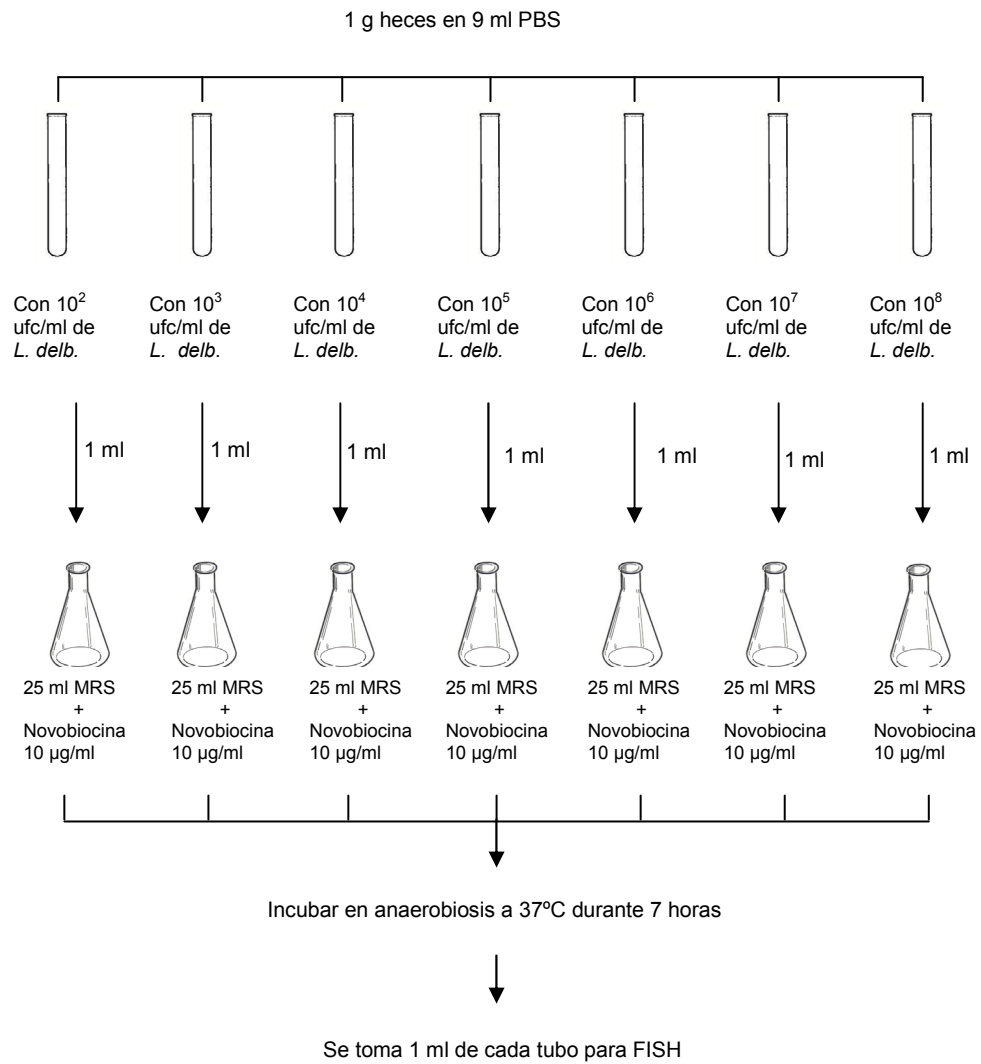


Figura 17. Estudio del límite de detección del método DVC-FISH para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria

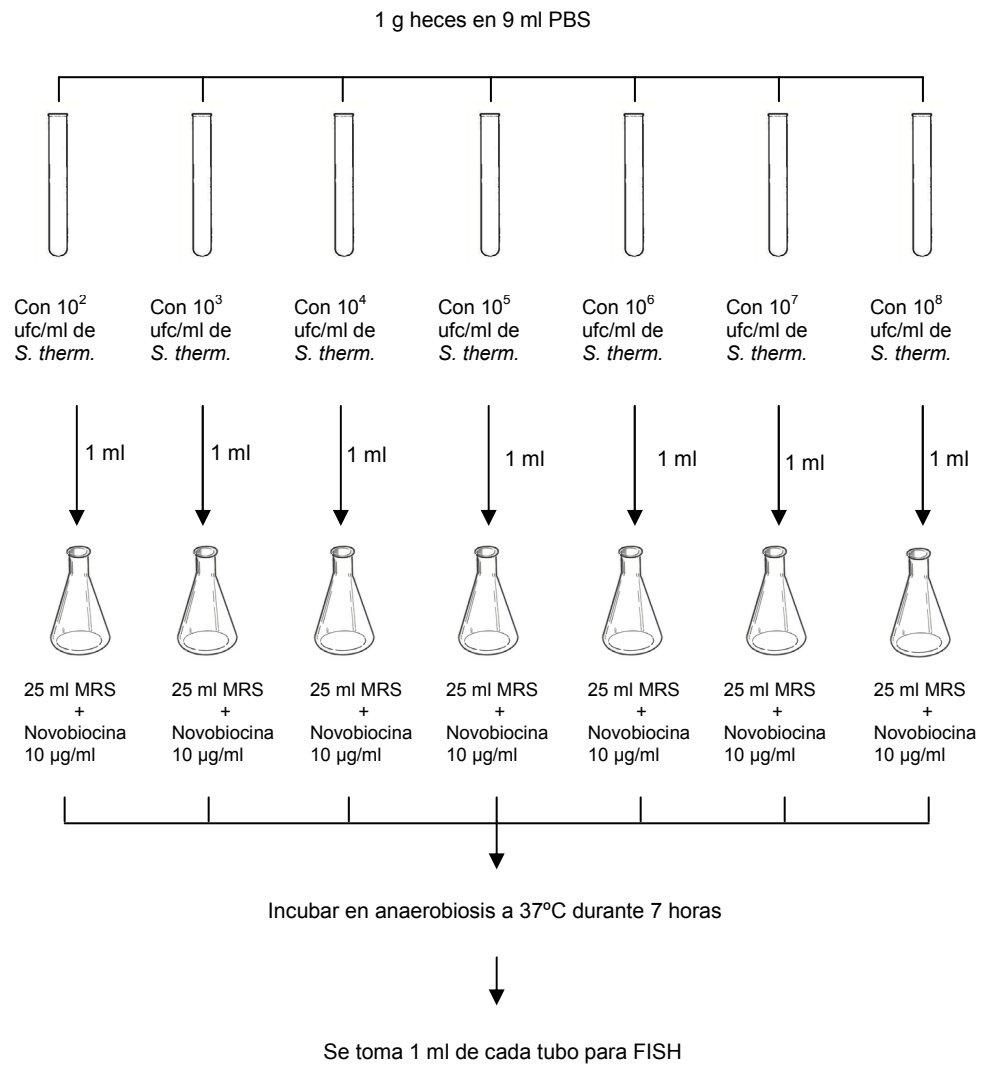


Figura 18. Estudio del límite de detección del método DVC-FISH para *Streptococcus thermophilus* en heces inoculadas con concentraciones crecientes de la bacteria

6.2. Estudio *in vivo* para determinar la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de BAL de un producto fermentado (yogur)

6.2.1 Diseño del estudio

Se seleccionaron 30 voluntarios sanos de edades comprendidas entre los 25 y 65 años que seguían una dieta habitual carente de leches fermentadas. Además, no tomaron ningún tipo de antibiótico durante la duración del experimento (un total de 11 semanas).

La duración del estudio fue de 11 semanas con tres periodos diferenciados:

- Periodo control: tres semanas sin ingestión de ninguna leche fermentada con lactobacilos y estreptococos, ni ningún otro producto lácteo.
- Periodo de administración: cuatro semanas en las que se administró 250 g diarios del yogur natural Y7, el mismo producto que se utilizó para la puesta a punto de los métodos de detección en apartados anteriores.
- Periodo de post-administración: cuatro semanas sin ingestión de ninguna leche fermentada con lactobacilos y estreptococos, ni ningún otro producto lácteo.

También participó un voluntario más que no ingirió el producto durante todo el ensayo (control negativo).

Durante el periodo de ingesta se les administró 250 g diarios de producto (Y7) y, por tanto, una cantidad conocida de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus*. En todo caso, se realizó un recuento previo de estas dos bacterias presentes en el yogur antes del periodo de administración para comprobar que se encontraban en las cantidades habituales.

Durante el estudio, los voluntarios no consumieron ningún otro producto lácteo fermentado que contuviera bacterias lácticas (BAL).

6.2.2. Análisis de las muestras fecales

Se realizaron un total de seis tomas de muestras fecales durante las 11 semanas que duró el ensayo tal y como se refleja en la figura 19. Todas las muestras de heces fueron recogidas en fresco y almacenadas en recipientes estériles de plástico, refrigeradas y transportadas inmediatamente al laboratorio para procesarlas ese mismo día.

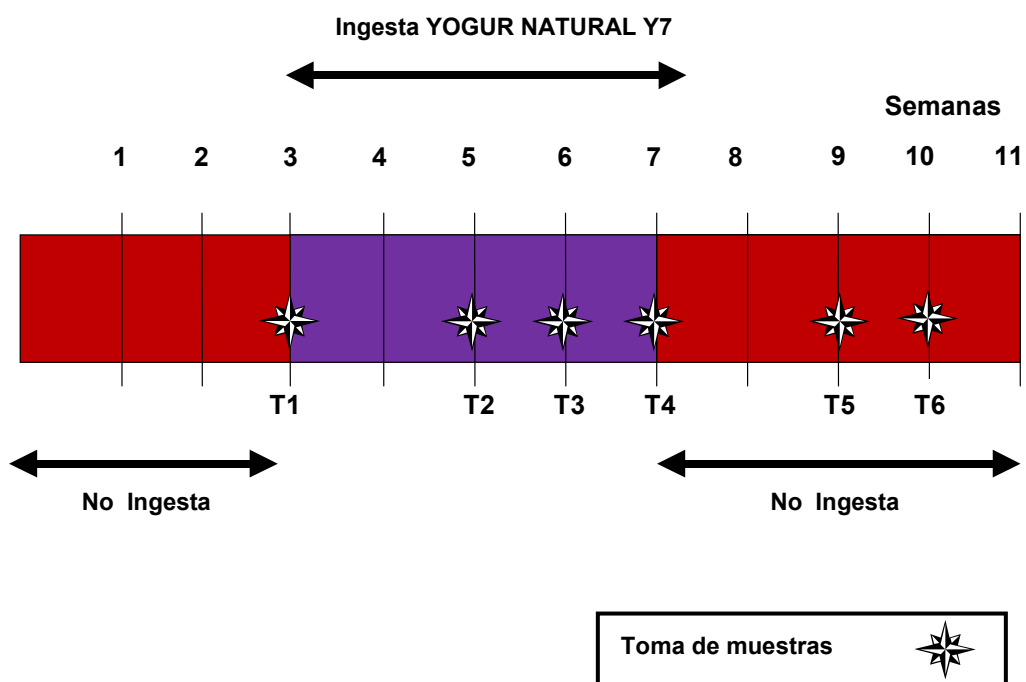


Figura 19. Esquema de las tomas de muestras durante el estudio *in vivo*

El plan de trabajo fue el mismo durante las seis tomas de muestra del ensayo que fueron denominadas desde T1 hasta T6. Los individuos fueron denominados desde N1 hasta N30. Así pues, por ejemplo, la muestra del individuo 23 en la toma 4 se denominaría como N23T4, y así para todas las muestras de todos los individuos.

Como paso previo y en todos los casos, las muestras de heces se aatemperaron y se tomó 1 gramo de cada una que se homogeneizó en tampón fosfato (PBS1x). Esta dilución fue denominada 10^{-1} .

A partir de ahí, se analizaron las muestras para aplicar los distintos métodos de detección puestos a punto.

Recuentos en placa

A partir de la primera dilución realizada en PBS1x, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-7} de los homogeneizados de las muestras fecales de cada individuo y se realizaron recuentos en placa en diferentes medios de cultivo tal como se describe posteriormente en el apartado 6.3 en el estudio de la evolución de la microbiota bacteriana en las heces.

Extracción de ADN

Se tomó un ml de la dilución 10^{-1} para la extracción de ADN de todas las muestras. Todas las extracciones se realizaron de acuerdo con el método del CTAB, descrito en el apartado 1.5.1. El ADN se almacenó para el posterior estudio de detección por PCR de las BAL.

DVC-FISH

Se tomó 1 ml de la primera dilución para la realización del DVC-FISH para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y otro para el DVC-FISH de *Streptococcus thermophilus*, tal y como se describe en los siguientes apartados.

6.2.3 Estudio de la viabilidad por DVC-FISH y detección por PCR seminested de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en muestras de heces

Detección por PCR seminested

Se empleó el protocolo de PCR descrito en el apartado 2.4, aplicando los mismos iniciadores y las mismas condiciones para la posible detección de esta bacteria en las heces.

En todos los casos, 10 μ l del producto de PCR se analizó por gel de electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, sometido a 100 V durante 60 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz UV tras teñirlos con bromuro de etidio con una concentración del 1%.

Se consideró la reacción de PCR como positiva y, por tanto, como presencia de ADN genómico de esta bacteria en las heces la aparición de la banda correspondiente de 678 pb.

Detección de células viables por DVC-FISH

Se utilizaron las mismas condiciones consideradas como óptimas en la puesta a punto del método (apartado 4.1). Además, fueron las mismas condiciones utilizadas en el estudio de resistencia de esta bacteria a los jugos gastrointestinales.

Se inocularon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-1} de las heces de cada individuo en diferentes matraces, todos ellos conteniendo 25 ml de caldo MRS con 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina. Se incubaron a 37°C durante 7 horas y se tomó 1 ml para fijar la muestra con paraformaldehído (4%). Tras 3 horas de fijación, se procedió al lavado de cada muestra con 1 ml de PBS. Se decidió hacerlo por triplicado debido a la complejidad de la matriz de la que se partía. Las muestras se almacenaron después a -20°C.

La hibridación se realizó a continuación según el método Amann *et al.* (1995) ya descrito en el apartado 1.4.2. Se realizó la hibridación *in situ* de cada muestra utilizando las mismas condiciones, es decir, misma concentración de formamida y misma sonda de hibridación LDE23R diseñada (cuya especificidad se comprobó en apartados anteriores). La observación también se realizó en las condiciones anteriormente descritas.

Se consideraron como positivas las muestras en las cuales se observaron células viables de la bacteria. Se utilizaron los mismos criterios descritos anteriormente para considerar una célula de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como viable. Si había detección, se realizaban recuentos de células viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Para ello, se contaban 20 campos de la muestra positiva, se realizaba una media y se multiplicaba por el factor del microscopio para obtener el número de células viables por gramo de heces del individuo.

Para aumentar el nivel de sensibilidad y, en caso de no haber detección, descartar que el resultado se debiera a la sensibilidad de la técnica, se utilizó un medio más selectivo según bibliografía para lactobacilos en muestras complejas.

El medio de enriquecimiento fue el siguiente:

Medio MRS + 0,05% cistina, pH 5,2

Se inocularon las muestras de heces de la toma T4 (en principio la toma que debería presentar una cantidad superior puesto que es tras las 4 semanas de ingesta) a 42° C durante 72 horas en anaerobiosis. Para ello, se tomaron 10 ml de heces diluídas en PBS y se introdujeron en 90 ml del medio descrito.

Tras este tiempo se tomó 1ml del caldo y se siguió el mismo procedimiento para la detección mediante DVC-FISH descrito anteriormente.

6.2.4 Estudio de la viabilidad por DVC-FISH y detección por PCR de *Streptococcus thermophilus* en muestras de heces

Detección por PCR

Se realizó previamente la puesta a punto de la reacción de PCR (apartado 2.5). Se emplearon por lo tanto esas mismas condiciones e iniciadores para su posible detección en las heces.

En todos los casos, 10 µl del producto de PCR se analizaron por gel de electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, sometido a 100 V durante 60 minutos. Los fragmentos se visualizaron bajo luz UV tras teñirlos con bromuro de etidio con una concentración del 1%.

Se consideró la reacción de PCR como positiva y, por tanto, como presencia de ADN genómico de esta bacteria en las heces la aparición de la banda correspondiente de 259 pb.

Detección de células viables por DVC-FISH

Se utilizaron las mismas condiciones consideradas como óptimas en la puesta a punto del método (apartado 4.2). Además, fueron las mismas usadas en el estudio de resistencia de esta bacteria a los jugos gastrointestinales.

Se inocularon alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-1} de cada individuo en diferentes matraces, todos ellos conteniendo 25 ml de caldo MRS con 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina (antibiótico seleccionado tras el ensayo descrito en el apartado 4.2). Se incubaron a 37°C durante 7 horas y se tomó 1 ml para fijar la muestra con paraformaldehído (4%). Tras 3 horas de fijación se procedió al lavado de cada muestra con 1 ml de PBS. Se decidió hacerlo por triplicado debido a la matriz de la cual se partía. Las muestras se almacenan después a -20°C.

Se realizaron las hibridaciones de todas las muestras utilizando las mismas condiciones y la misma sonda de hibridación STH23 diseñada y descrita en el apartado 1.4.1.

Se consideraron como positivas las muestras en las cuales se observaron células viables de la bacteria. Se utilizaron los mismos criterios descritos anteriormente para considerar una célula de *Streptococcus thermophilus* como viable.

En las muestras que hubo detección positiva mediante DVC-FISH, se realizaron recuentos de células viables. Se contaron un total de 20 campos en cada una de las muestras positivas, realizándose la media de los recuentos en cada campo. Se multiplicó por el factor de microscopio para obtener el número de *Streptococcus thermophilus* vivos en cada una de las muestras en las que hubo detección positiva.

6.3. Estudio de la evolución de la microbiota de las heces de las personas sometidas al ensayo *in vivo*

6.3.1. Recuentos de la población bacteriana presente en las heces a lo largo del ensayo

Se realizó un estudio de la evolución de la microbiota fecal de todas las personas sometidas al ensayo *in vivo* durante todas las tomas de muestras realizadas en el mismo.

El estudio consistió en medir el impacto del consumo del yogur tradicional en la microbiota fecal mediante la utilización de técnicas de cultivo selectivas y no selectivas. La composición de la microbiota fecal de los 30 individuos se controló antes (toma 1), durante (periodo de ingesta de 4 semanas en las cuales se

realizaron 3 tomas de muestras) y después (2 tomas durante las 3 semanas posteriores) de la administración del producto lácteo conteniendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* tal y como se describe anteriormente.

1 g de heces fue añadido a un tubo estéril con 9 ml de tampón salino (PBS1x). Después de homogeneizar el contenido, se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-8}) en agua estéril. 100 μ l de cada dilución fueron sembrados en una placa en superficie por triplicado en medios selectivos (agar MRS, agar MacConkey y agar BFM) y en medios no selectivos (agar Columbia para aerobios y agar Wilkins-Chalgren para anaerobios). El medio de cultivo, los microorganismos investigados, la composición de la fase gaseosa y el tiempo de incubación se detallan en la tabla 19.

Tabla 19. Medios de cultivo, condiciones y tiempos de incubación para cada grupo de microorganismos estudiado

Microorganismos	Medios de cultivo	Atmósfera	Tiempo (h)
Aerobios totales	Base de agar Columbia sangre	O ₂	24
Anaerobios totales	Agar Wilkins-Chalgren	CO ₂ +H ₂	48
Coliformes y otras enterobacterias	Agar MacConkey n° 3	O ₂	24
Lactobacilos	Agar MRS	CO ₂ +H ₂	48
Bifidobacterias	Agar BFM	CO ₂ +H ₂	72

El medio base de agar Columbia sangre (Oxoid) se emplea para el cultivo de microorganismos en general y en particular aquellos que son especialmente exigentes a partir de una amplia variedad de muestras. Se utilizó el medio de la casa Oxoid.

El medio agar Wilkins-Chalgren (Oxoid) se utiliza para el cultivo y para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias anaerobias. El extracto de levadura asegura el buen crecimiento de *Peptostreptococcus anaerobius* y *Bacteroides melaninogenicus*. La arginina asegura suficientes aminoácidos, necesarios para el crecimiento de *Eubacterium lentum*. El piruvato está presente como fuente de energía para cocos como *Veillonella*. La hemina es esencial para el

crecimiento de especies de Bacteroides y la menadiona para *Bacteroides melaninogenicus*.

El medio agar MacConkey nº 3 (Oxoid) es un medio selectivo que da una excelente diferenciación entre coliformes y no fermentadores de la lactosa, con inhibición de cocos gram positivos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* se desarrollan en el mismo. En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la microbiota Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Para el cultivo selectivo de lactobacilos se utilizó el agar MRS (Oxoid). Este medio de cultivo fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. Las colonias de lactobacilos son generalmente pequeñas, blanco-grisáceo, lisas o rugosas.

Para la enumeración de las bifidobacterias se utilizó el agar BFM (Nebra y Blanch, 1999), donde forman pequeñas colonias de color blanquecino o semitransparente, claramente diferenciables gracias al color azul del medio. El crecimiento de otros géneros fue estudiado por Lynch *et al.* 2002, comprobando que únicamente crecían bifidobacterias.

La composición de los diferentes medios de cultivo y sus preparaciones aparecen en los anexos.

Para conseguir las condiciones de anaerobiosis en los medios que lo requieren, las placas se introdujeron en jarras junto a sobre generadores de esta atmósfera (Anaerogen de Oxoid). La microaerofilia se logró con sobres de la casa Oxoid. Las placas se incubaron a 37°C.

Todos los recuentos se realizaron por triplicado. Los resultados se calcularon como la media de los tres recuentos y fueron expresados como logaritmo de las unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por gramo de heces.

6.3.2. Análisis estadísticos

Los resultados de la evolución de los diferentes grupos de microorganismos en el tiempo fueron expresados como la media y la mediana de los valores de los 30 individuos en cada una de las tomas de muestras. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para cada uno de los grupos bacterianos estudiados (anexo VIII). Este análisis realiza varios tests y gráficos para comparar los valores medios de cada uno de los grupos durante las seis tomas de muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprueba si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si las hay, los Tests de Rangos Múltiples indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Si hay valores atípicos se elige el test Kruskal-Wallis que compara las medianas en lugar de las medias. Las diferencias entre las medias a los diferentes tiempos fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus*) PRESENTES EN 11 YOGURES COMERCIALES

1.1 Aislamiento y recuento en placa de BAL de las muestras de yogur analizadas

Ya que la temperatura recomendada para el crecimiento de las BAL oscila entre 37°C y 42°C, se realizó una prueba inicial de crecimiento por duplicado con las cepas de referencia a 37°C y 42°C optando finalmente por la temperatura de 37°C al observarse un crecimiento ligeramente mayor.

En el análisis de todos los yogures naturales, los recuentos y aislamientos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* se realizaron en el medio LS Diferencial (Scharlau Chemie), siendo necesario un tiempo de 72 horas para realizar los recuentos. En la Figura 20 puede observarse el crecimiento de estas dos bacterias en este medio de cultivo, claramente diferente.

Se picaron las colonias típicas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* de cada producto y se sembraron en triple estría en MRS y M17, respectivamente (figuras 21 y 22), reduciéndose el tiempo de incubación a 48 horas para ambas bacterias. Los microorganismos fueron simultáneamente identificados morfológicamente mediante tinciones. Finalmente, se realizó un cultivo en masa de los mismos empleando también los medios MRS y M17 y se congelaron las cepas para posteriores experimentos como las identificaciones bioquímicas mediante tira API. Todos los medios se incubaron a 37°C, en anaerobiosis durante 48 horas.

Se realizaron, por tanto, recuentos por duplicado de estos dos microorganismos para cada uno de los yogures estudiados. El número de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* contenidos en los productos lácteos analizados se muestra en la Tabla 20. Los datos que aparecen son el resultado de la media de ambos recuentos.

Todos los productos lácteos analizados cumplieron la normativa legal vigente, pues contenían más de 10^7 microorganismos cultivables por gramo de producto y fueron capaces de mantener estas características durante la vigencia legal del producto (24 días). En lo que se refiere al recuento total, todas las muestras oscilaron entre 10^8 - 10^9 células/ml.

TABLA 20. Recuentos de la microbiota de los productos lácteos analizados

Producto	Lactobacilos (u.f.c./ml)	Estreptococos (u.f.c./ml)	Recuento Total (u.f.c./ml)
Y1	$3,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
Y2	$1,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$
Y3	$4,0 \times 10^6$	$8,8 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$
Y4	$3,5 \times 10^7$	$4,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
Y5	$4,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
Y6	$4,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$
Y7	$4,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$
Y8	$2,1 \times 10^8$	$7,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
Y9	$5,6 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
Y10	$3,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
Y11	$3,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$

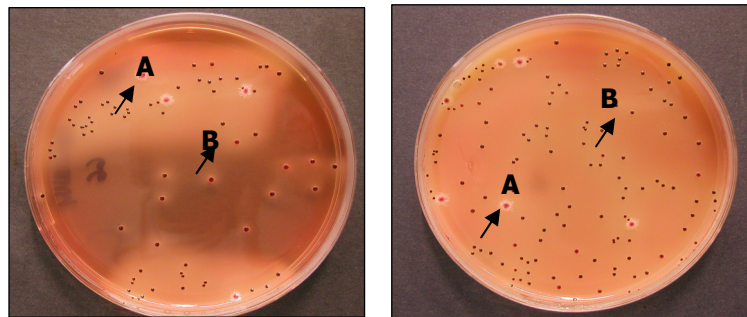


Figura 20. Medio de Cultivo LS Diferencial. Colonia A: lactobacilo y Colonia B: estreptococo

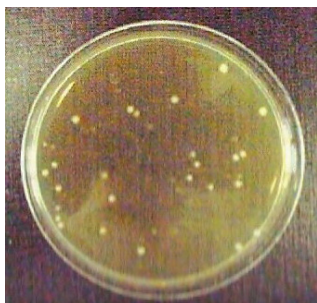


Figura 21. Estreptococos en agar M17



Figura 22. Lactobacilos en agar MRS

Se realizaron los recuentos anteriormente descritos en tres productos pasteurizados después de la fermentación para comprobar que este proceso produce la muerte de las bacterias fermentadoras. No se observó ningún crecimiento después del periodo de incubación de las placas. Se puede afirmar, por tanto, que en este tipo de productos no hay bacterias ácido lácticas viables. Existiría la posibilidad de que algún microorganismo viable pudiera reproducirse en la matriz del producto por contaminación externa o por problemas en el proceso tecnológico.

Generalmente, se observó en todos los productos que los estreptococos (recuentos del orden de 10^8 u.f.c./ml) predominaron en la matriz frente a los lactobacilos (recuentos del orden de 10^7 u.f.c./ml), salvo en el caso de dos marcas (yogures Y8 e Y9) donde ambas bacterias se hallaron prácticamente en la misma proporción (10^8 u.f.c./ml).

1.2. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas (sistema comercial API-50CHL)

Las presuntas colonias típicas de cada microorganismo estudiado se sembraron en su medio selectivo (MRS para lactobacilos y M-17 para estreptococos) por el método de triple estría para la obtención de colonias aisladas, a partir de las cuales se realizaron las identificaciones bioquímicas mediante el sistema API-50CHL y posteriores pruebas moleculares.

Se sembraron las tiras API por duplicado para cada una de las cepas aisladas de las 11 muestras obteniendo perfiles correspondientes a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o *S. thermophilus*, en función de la colonia sembrada.

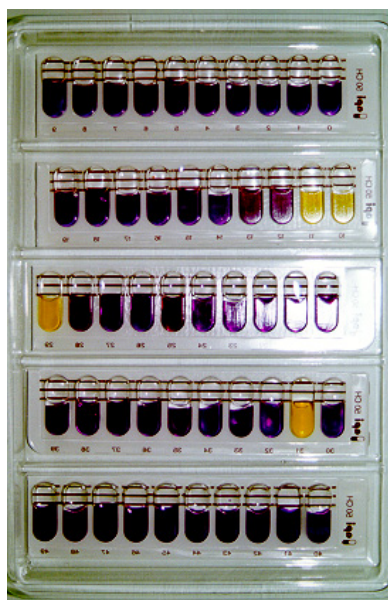


Figura 23. Perfil de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en Tira API-50 CHL.

En el caso del género *Streptococcus*, la tira API-50 CHL sólo puede identificar *Streptococcus thermophilus*. En cuanto a los lactobacilos, se encontró más variabilidad en la identificación.

Todos los estreptococos aislados de los once yogures de las once marcas diferentes fueron identificados correctamente como *Streptococcus thermophilus*

mediante este sistema, presentando en todos los casos el mismo perfil de fermentación de azúcares.

Por su parte, todos los lactobacilos fueron identificados a nivel de especie como *Lactobacillus delbrueckii*, mientras que al nivel de subespecie se encontraron diferencias. En algunos casos, la muestra analizada se identificó como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que la misma muestra en otros casos apareció como *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Estas diferencias en cuanto a subespecie son debidas en su mayoría a la falta de reproducibilidad de las tiras API, ya que el considerar una prueba como negativa y/o positiva (puesto que en ciertas ocasiones algunas pruebas resultan confusas) provoca variaciones en la identificación del microorganismo. Por tanto, para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* únicamente se puede llegar a una identificación fiable a nivel de especie.

Todas las identificaciones de microorganismos realizadas mediante pruebas bioquímicas fueron corroboradas mediante FISH con el uso de sondas específicas así como por PCR (ver apartado 1.3 de resultados). Igualmente, se realizaron recuentos mediante FISH para compararlos a los obtenidos por recuento en placa.

1.3 Identificación y recuento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

1.3.1. Identificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante sondas fluorescentes. Especificidad de las sondas y recuento en productos comerciales

En primer lugar se utilizó la sonda LDE16S, complementaria a una región del gen 16S y con la siguiente secuencia: (5'- GAC TCT TCG GGG TGA TTT -3').

El alineamiento de la secuencia de la sonda LDE16S con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica para la hibridación con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (tabla 21).

Resultados

Tabla 21. Alineamiento de secuencias de la sonda LDE16S

1	g a c t c t t c g g g g t g a t t t	18	Sonda LDE16S
83	g c g t g t t c c c t c c t t a a g	100	16S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC BAA-365
685466	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	685448	16S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842

```

L.delbrueckii 16S rARN
Length=1488
Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.042
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GACTCTTCGGGGTGATTT 18
      || || || || || || || || || ||
Sbjct 83 GACTCTTCGGGGTGATTT 100
    
```

La especificidad de esta sonda se comprobó experimentalmente por medio de la hibridación con la batería de cepas de BAL, las cepas aisladas de productos comerciales denominadas de LY1 a LY11 y otras de referencia (tabla 22). La sonda resultó específica para las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas del yogures naturales, así como para la cepa de referencia de la CECT.

Tabla 22. Especificidad de la sonda LDE16S

Especies o subespecies	Cepa	Resultado de hibridación
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LY1 a LY11	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CECT 4005T	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CECT 286	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CECT 282	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 4022	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 4121	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903	-
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 4063	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 225T	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 562	-

Sin embargo, la intensidad de fluorescencia fue baja (figura 24) pese a la utilización de diferentes concentraciones de formamida en el tampón.

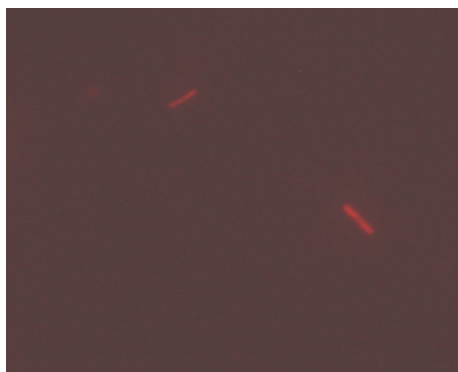


Figura 24. Cultivo puro de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hibridado con LDE16S marcada con CY3 (rojo)

En la figura 25 se observa una clasificación de las zonas del ARNr en función de la accesibilidad de las sondas, de forma que las zonas de clase I, serían las más accesibles, entre un 81 y 100% y las zonas de clase VI serían las menos accesibles, entre un 0% y un 5%.

Resultados

La sonda LDE16S hibridaría en una zona de clase V con una accesibilidad entre el 6 y el 20% (se encuentra entre los pares de bases 83 y 100), por lo que no sería una buena sonda a pesar de ser totalmente específica para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ésto justificaría la baja señal de fluorescencia emitida en las hibridaciones realizadas con esta sonda.

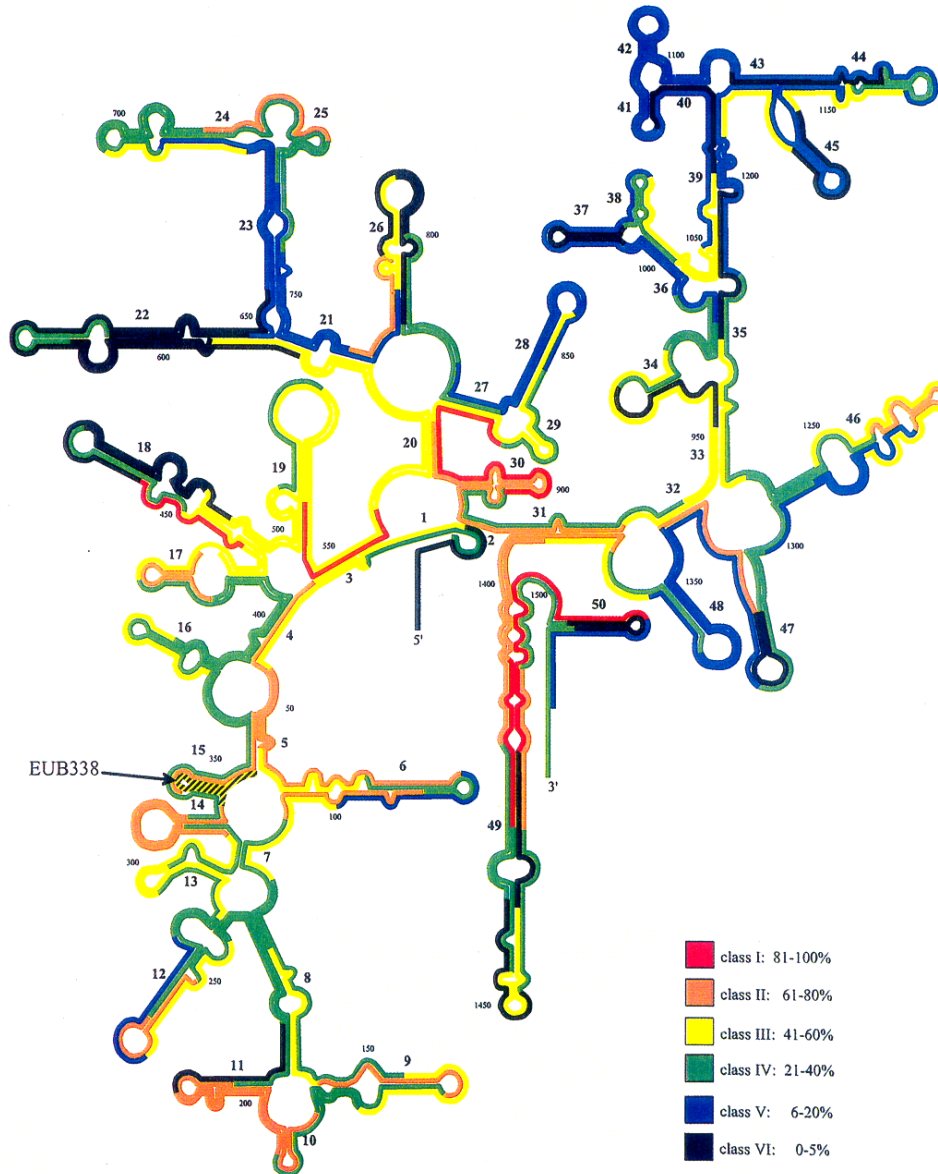


Figura 25. Acceso a la estructura secundaria del ARNr 16S

Resultados

Por lo tanto, se decidió diseñar otra sonda específica complementaria al 23S (LDE23S) con la siguiente secuencia:

LDE23S: 5'- GCG TGT TCC CTC CTT AAG C -3'

El alineamiento de las secuencias de la sonda LDE23S con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (tabla 23) para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no presentando homología con otras especies del género ni otros géneros próximos.

Tabla 23. Alineamiento de secuencias de la sonda LDE23S

1	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	19	Sonda LDE23S
47119	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	47101	23S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
691334	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	691316	23S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
808352	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	808334	23S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
1359296	g c g t g t t c c c t c c t t a a g c	1359314	23S ARNr <i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842

Su especificidad real fue comprobada mediante la hibridación de la misma con una batería de cepas de BAL, tanto aisladas de productos como de colección (tabla 24). Resultó solamente específica para las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas del yogur, así como para las cepas de colección de esta misma bacteria.

Tabla 24. Especificidad de la sonda LDE23S

Especies o subespecies	Cepa	Resultado de hibridación
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LY1 a LY11	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CECT 4005T	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CECT 286	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CECT 282	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 4022	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 4121	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903	-
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475	-

<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 4063	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 225T	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 562	-

Utilizando una concentración de 20% de formamida se consiguió una elevada especificidad y una buena señal de fluorescencia para realizar los recuentos. Las figuras 26 y 27 muestran células de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* hibridadas con la sonda específica LDE23S en un cultivo puro y en yogur natural respectivamente.

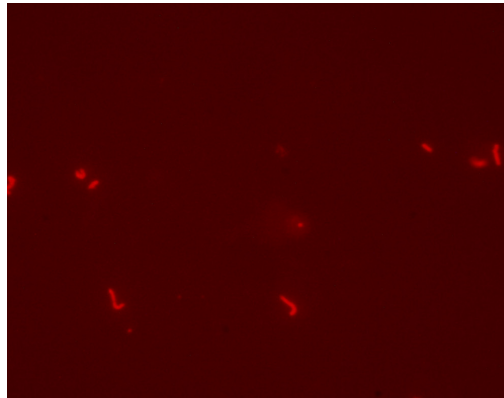


Figura 26. Cultivo puro de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* hibridada con LDE23S marcada con CY3 (rojo)

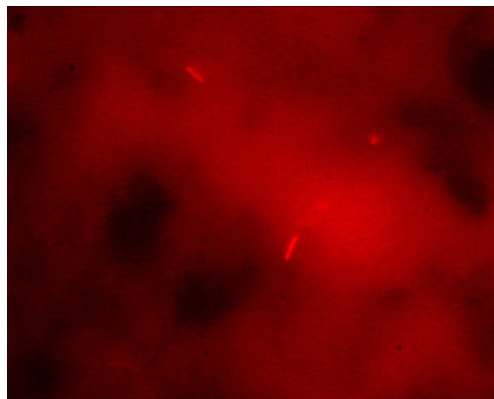


Figura 27. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en yogur natural, hibridado con LDE23S marcada CY3 (rojo)

Se realizaron, por tanto, recuentos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de los diferentes yogures naturales comerciales estudiados anteriormente mediante FISH, utilizando la sonda de hibridación LDE23S. Para ello, se contaron las células hibridadas en veinte campos y se multiplicó por el factor de microscopio correspondiente al objetivo de 60x. Los resultados se recogen en la tabla 25.

TABLA 25. Recuentos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en los diferentes yogures naturales mediante FISH

Producto	Nº Lactobacilos/g yogur
Y1	5×10^7
Y2	$3,5 \times 10^6$
Y3	$8,8 \times 10^6$
Y4	2×10^7
Y5	$4,5 \times 10^7$
Y6	5×10^7
Y7	$6,2 \times 10^7$
Y8	$8,5 \times 10^7$
Y9	2×10^8
Y10	$4,8 \times 10^7$
Y11	6×10^7

Se observó que los recuentos mediante hibridación *in situ* fueron ligeramente superiores aunque del mismo orden a los obtenidos por recuento en placa para prácticamente todos los productos.

Pese a la correcta hibridación de la sonda con la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislada del producto Y7, se decidió secuenciar los genes 16S y 23S de ésta para intentar identificar únicamente el lactobacilo del producto que se utilizaría en el ensayo *in vivo*, diferenciándolo del resto. Se comprobó que había una base, justo en la zona de alineamiento, que variaba respecto a la sonda LDE23S. Se decidió, por tanto, diseñar una sonda específica para esta cepa que sirviera para la detección de esta cepa en los posteriores estudios *in vitro* e *in vivo* y que fuera totalmente complementaria. Las secuencias de estos genes pueden verse en el anexo VI.

La secuencia de esta sonda fue:

LDE23R: 5'- GCG TGT TCC (T/C)TC CTT AAG C -3'

Esta sonda variaba sólo en una base respecto a la anterior, siendo complementaria en su totalidad al gen 23S de la cepa aislada del producto Y7.

Se llevaron a cabo hibridaciones de la cepa del lactobacilo aislado de Y7 con esta sonda, comprobándose una mejoría en la intensidad de fluorescencia respecto a la hibridación realizada con la sonda LDE23S para esta cepa. Con la adición del tampón del 20% de formamida se consiguió discriminar entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y el resto de microorganismos. La sonda hibridó también con las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas del resto de productos comerciales. La figura 28 muestra células del producto Y7 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hibridadas con la sonda específica LDE23R para esta cepa.

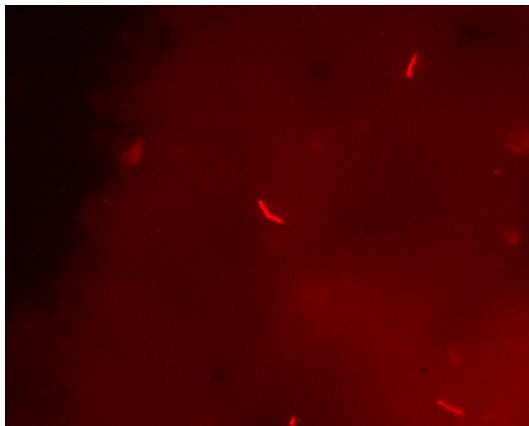


Figura 28. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Y7) hibridado con LDE23R marcada con CY3 (rojo)

En consecuencia, la sonda LDE23R será la usada en los posteriores estudios de resistencia a jugos gastrointestinales (*in vitro*) y el estudio *in vivo* de supervivencia que se realice en humanos, puesto que se ensayará con el yogur natural Y7.

1.3.2. Identificación de *S. thermophilus* mediante sondas fluorescentes. Especificidad de la sonda y recuento en productos comerciales

Resultados

Se utilizó la sonda diseñada (apartado de materiales y métodos 1.4.1.), complementaria del 23S rARN de *Streptococcus thermophilus*.

El alineamiento de la secuencia de la sonda diseñada STH23S con las secuencias contenidas en el GeneBank mostró su validez teórica (tabla 26) para la detección de *S. thermophilus*, no presentando alineamiento con otras especies del género ni con otros géneros próximos.

Tabla 26. Alineamiento de secuencias de la sonda STH 23S

1	c a t g c c t t c g c t t a c g c t	18	Sonda STH23S
21518	c a t g c c t t c g c t t a c g c t	21501	23S ARNr <i>S. therm.</i>
			CNRZ 1066
69286	c a t g c c t t c g c t t a c g c t	69269	23S ARNr <i>S. therm.</i>
			CNRZ 1066
132774	c a t g c c t t c g c t t a c g c t	132757	23S ARNr <i>S. therm.</i>
			CNRZ 1066
138581	c a t g c c t t c g c t t a c g c t	138564	23S ARNr <i>S. therm.</i>
			CNRZ 1066

<i>S.thermophilus</i> for 23S rARN			
Length=2900			
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005			
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)			
Strand=Plus/Minus			
Query	1	CATGCCTTCGCTTACGCTAA	20
Sbjct	1883	CATGCCTTCGCTTACGCTAA	1864

A nivel práctico, la especificidad de la misma se comprobó mediante la hibridación con una batería de cepas de BAL y otros estreptococos (endógenos), resultando específica únicamente para *S. thermophilus*. Con la adición al tampón del 10% de formamida se consiguió discriminar entre *S. thermophilus* y el resto de estreptococos testados.

La figuras 29 y 30 muestran células de *S. thermophilus* hibridadas con la sonda específica STH23S, marcada con CY3, en cultivo puro y en un yogur natural.

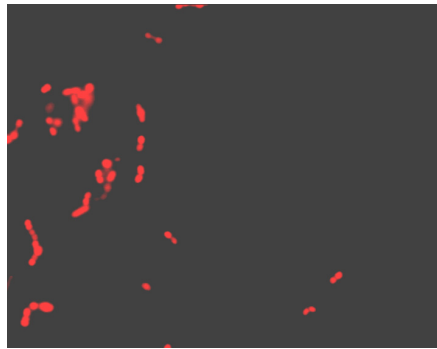


Figura 29. Cultivo puro *Streptococcus thermophilus* hibridado con STH23S marcada con CY3 (rojo)

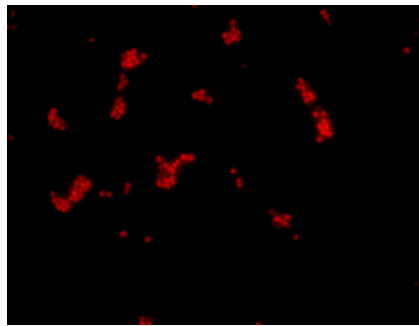


Figura 30. *Streptococcus thermophilus* en yogur Y7 hibridado con STH 23S marcada con CY3 (rojo)

Tabla 27. Hibridación de cepas de BAL con la sonda STH23S

Especies o subespecies	Cepa	Resultado de hibridación
<i>Streptococcus thermophilus</i> aislados de los yogures	STY1 a STY11	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CECT 986	+
<i>Streptococcus intermedius</i>	CECT 803	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 407	-

Resultados

<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 4102	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DN 100182	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CECT 286	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 4022	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 4121	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903	-
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 278	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	CECT 4063	-

Una vez comprobada la especificidad de la sonda, se realizaron recuentos de células de *S. thermophilus* mediante FISH de los diferentes productos comerciales, obteniendo los resultados que se recogen en la tabla 28. Para ello, se contaron las células hibridadas en veinte campos y se multiplicó por el factor de microscopio correspondiente.

Tabla 28. Recuentos de células de *Streptococcus thermophilus* hibridadas en los diferentes yogures.

Producto	Nº <i>Streptococcus thermophilus</i> /g yogur
Y1	$2,5 \times 10^8$
Y2	$2,8 \times 10^8$
Y3	$7,4 \times 10^8$
Y4	$5,2 \times 10^8$
Y5	9×10^8
Y6	$6,5 \times 10^8$
Y7	$7,7 \times 10^8$
Y8	8×10^8
Y9	$3,5 \times 10^8$
10	4×10^8
11	$8,5 \times 10^8$

Los recuentos por este método fueron muy similares a los realizados por recuento en placa.

En los posteriores estudios de la cepa de *S. thermophilus* contenida en el producto Y7 de resistencia a los jugos gastrointestinales (estudio *in vitro*) y de supervivencia al tracto gastrointestinal (estudio *in vivo* en humanos) se utilizó, por tanto, esta sonda STH23S.

1.4. Análisis de los perfiles de bandas generados por RAPDs

Una vez aisladas las cepas de lactobacilos y estreptococos de los productos comerciales se realizaron RAPDs para obtener una diferenciación intraespecífica de éstos. Se caracterizaron por separado las dos especies en estudio: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Se utilizaron dos iniciadores diferentes, RAPD1 y RAPD2, para ambas bacterias obteniendo más de un perfil por especie.

Los perfiles generados se estudiaron mediante el programa informático TDI Lane Manager, obteniéndose un dendrograma en el que se puede observar gráficamente las similitudes genéticas.

1.4.1. Caracterización molecular mediante RAPD's de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas de productos comerciales

Con el iniciador RAPD1 (figura 31) se observaron entre 8 y 12 bandas con pesos moleculares entre 2800 y 300 pb. Todas las cepas compartieron 4 bandas con pesos moleculares de 2800, 2200, 1350 y 1250 pb.

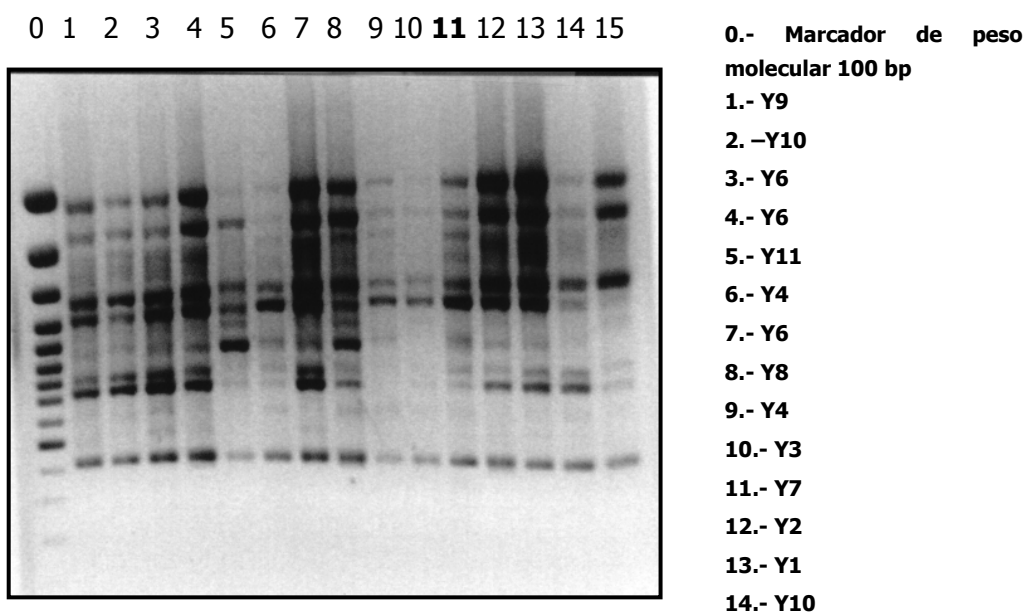


Figura 31. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de las diferentes cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* con el iniciador RAPD1

Seis cepas compartieron exactamente el mismo perfil de bandas (100% homólogas) entre las que se encuentran Y7 e Y1. La figura 32 muestra los porcentajes de homología entre todas las cepas de *Lactobacillus* de los distintos productos usando el iniciador RAPD1 mientras que la tabla 29 muestra el porcentaje de homología únicamente frente a Y7, por ser la cepa que utilizaremos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* posteriores, mostrando por tanto un interés mayor para nosotros.

A continuación, se muestra el porcentaje de homología genética entre la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 (la cepa de la marca comercial que se utilizó para el resto de esta tesis doctoral) y el resto de lactobacilos de las otras marcas comerciales obtenido por RAPDs mediante el uso del iniciador RAPD1.

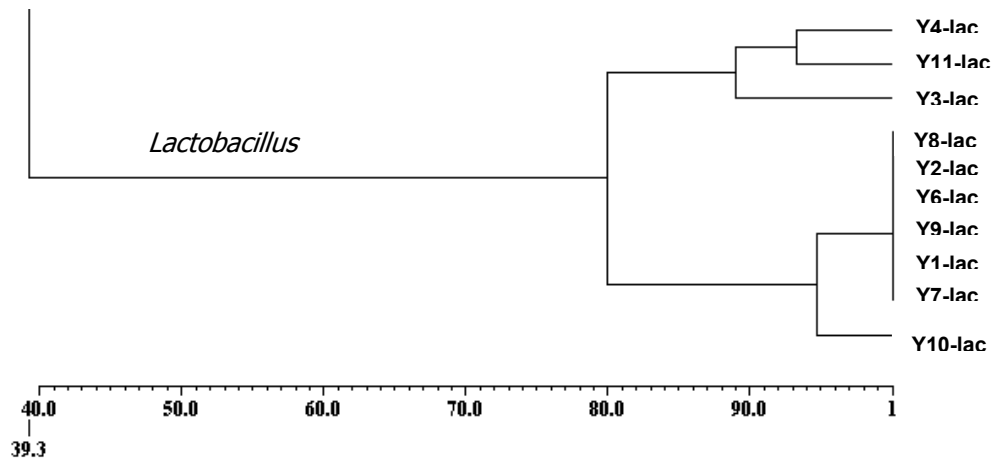


Figura 32. Dendrograma de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, empleando el iniciador RAPD1 y el coeficiente de similitud de DICE

Tabla 29. Porcentajes de homología genética entre la cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y7 y el resto de lactobacilos de otras marcas comerciales, obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD1

PRODUCTO	% HOMOLOGÍA	PRODUCTO	% HOMOLOGÍA
Y9	100	Y10	95
Y8	100	Y4	80
Y1	100	Y3	80
Y2	100	Y11	80
Y6	100		

Con el iniciador RAPD2 se consiguió una mayor discriminación entre cepas, con 7 perfiles de bandas distintos, con un número de bandas entre 7 y 14 y con pesos moleculares entre 2500 y 500 pb (figura 33).

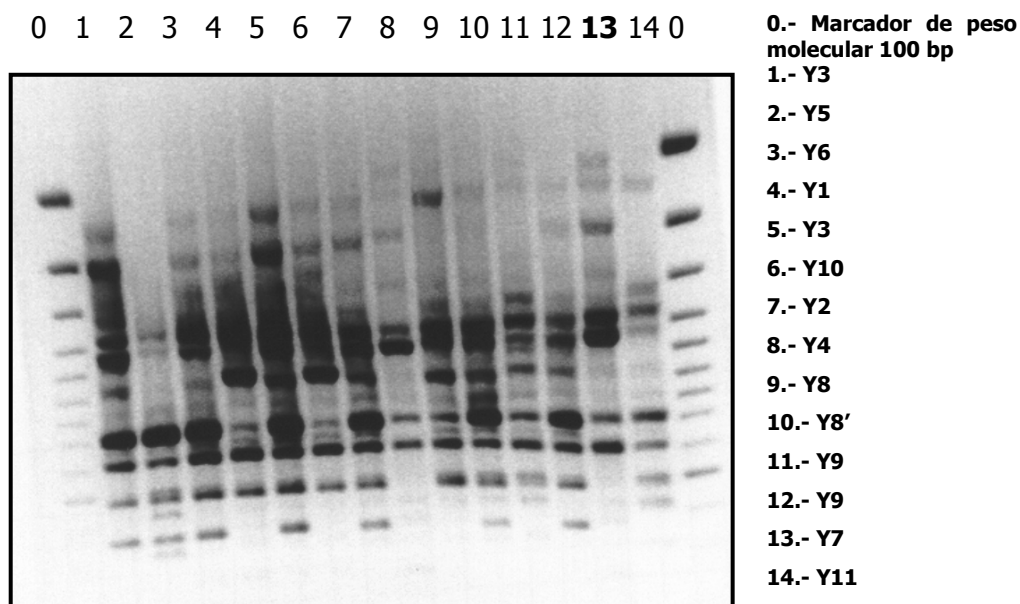


Figura 33. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género *Lactobacillus* spp. con el iniciador RAPD2

Se obtuvieron perfiles de bandas muy heterogéneos. Aunque la cepa de Y7 presentó un perfil único, se observó una homología entre esta cepa y la cepa de Y9 del 89% frente al 100% de homología que se consigue con el primer RAPD1. Sin embargo, existe una homología del 95% entre Y1, Y10 e Y7. La figura 34 representa los porcentajes de homología entre las cepas de *Lactobacillus* de los distintos yogures mientras que la tabla 30 muestra la homología solamente con respecto a la cepa LY7, que es la que será utilizada en estudios posteriores. Todas las cepas se agrupan en un 80% de similitud, diferenciándose tres grupos unidos en más del 90% de similitud.

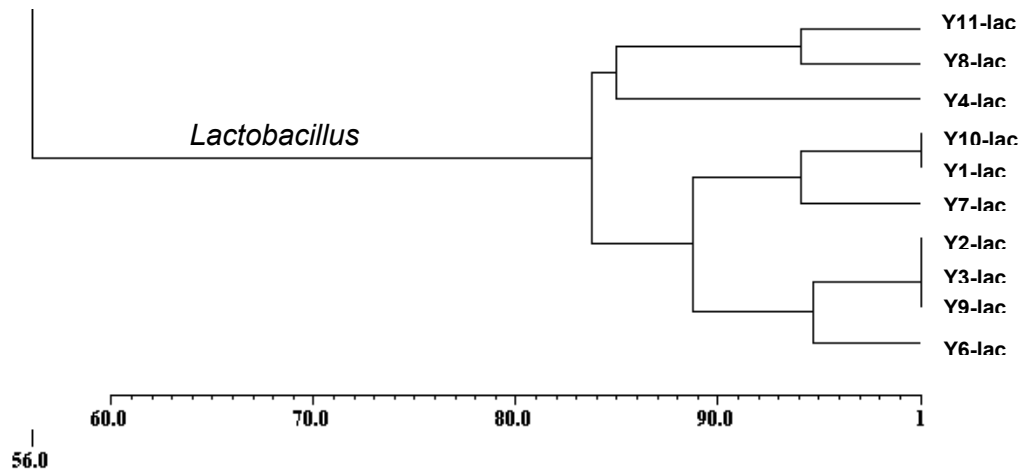


Figura 34. Dendrograma de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, empleando el iniciador RAPD2 y el coeficiente de similitud de DICE

TABLA 30. Porcentajes de homología genética entre la cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y7 y el resto de lactobacilos de otras marcas comerciales, obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD2

PRODUCTO	% HOMOLOGÍA	PRODUCTO	% HOMOLOGÍA
Y1	95	Y3	89
Y10	95	Y8	84
Y9	89	Y4	84
Y2	89	Y11	84
Y6	89		

1.4.2. Caracterización molecular mediante RAPDs de las cepas de *S. thermophilus* aisladas de productos comerciales

Los perfiles obtenidos mediante RAPDs tras la amplificación con el iniciador RAPD1, descrito por Tynkkynen *et al.* (1999) para los estreptococos aislados de yogures naturales se muestran en la siguiente figura.

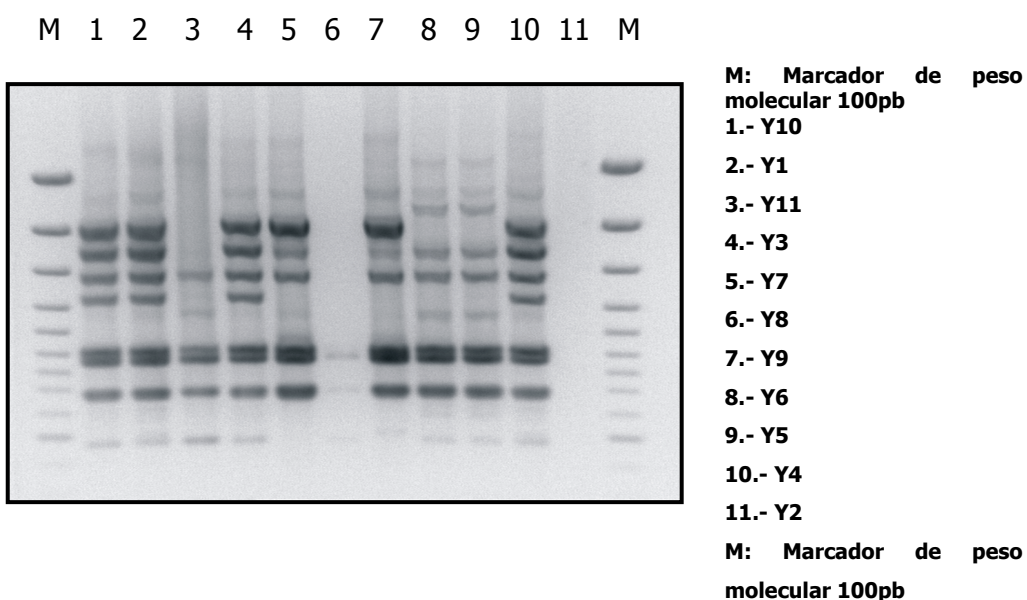


Figura 35. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género *Streptococcus* con el iniciador RAPD1

Con el uso del iniciador RAPD1, los estreptococos aislados de los productos lácteos presentaron una gran homología en sus patrones de bandas. Los perfiles presentaron un número de bandas entre 6 y 10 con pesos moleculares que oscilaron entre 2000 y 500 pb. Todas las cepas tuvieron en común tres bandas de pesos moleculares: 900, 850 y 570 pb.

Se compararon los perfiles obtenidos respecto a la cepa del producto Y7 puesto que es el que se usaría posteriormente en los estudios *in vitro* e *in vivo* de supervivencia. Se observó que las cepas de los productos Y9 e Y7 compartían el mismo patrón de bandas, siendo único y diferente al resto de cepas. La figura 36 muestran los porcentajes de homología entre todas las cepas de *Streptococcus thermophilus* de los distintos productos usando el iniciador RAPD1, mientras que la

tabla 31 muestra el porcentaje de homología de las diferentes cepas respecto a la del producto Y7.

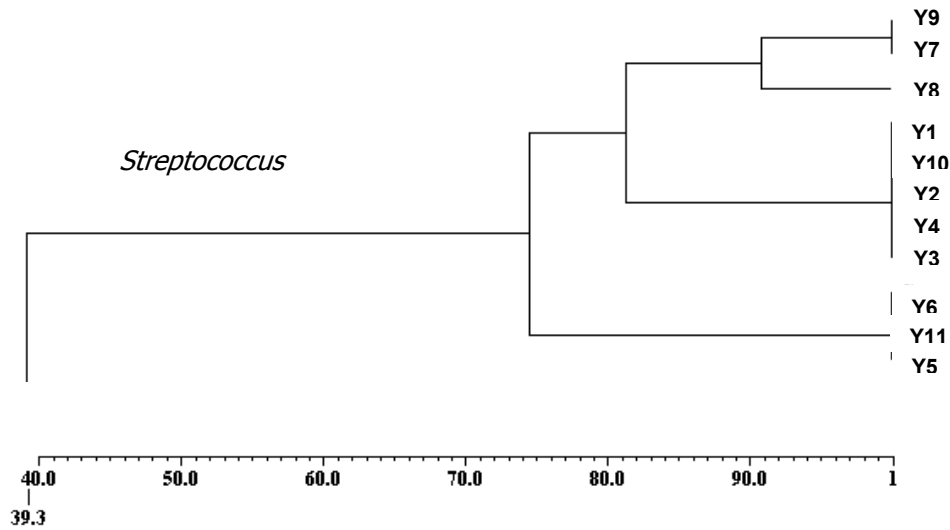


Figura 36. Dendrograma de las cepas de *Streptococcus thermophilus* empleando el iniciador RAPD1 y el coeficiente de similitud de DICE

Se puede observar que las cepas utilizadas por las diferentes casas comerciales coinciden en algunas ocasiones, mientras que en otras no son las mismas. Con respecto a la cepa del producto Y7, solamente se estaría utilizando también en el producto Y9.

Tabla 31. Porcentajes de homología genética entre la cepa del *S. thermophilus* Y7 y el resto de estreptococos aislados de otras marcas comerciales obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD1

PRODUCTO	% HOMOLOGÍA	PRODUCTO	% HOMOLOGÍA
Y9	100	Y4	80
Y8	90	Y3	80
Y1	80	Y6	75
Y10	80	Y11	75
Y2	80	Y5	75

Resultados

Cuando se utilizó el iniciador RAPD2, los *S. thermophilus* aislados de los diferentes yogures presentaron una gran homología entre sí (Figura 37) aunque inferior que con el anterior iniciador utilizado, diferenciándose tres perfiles distintos que comparten dos bandas. Los perfiles presentaron un número de banda entre 2 y 10 con pesos moleculares oscilantes entre 2000 y 500 pb.

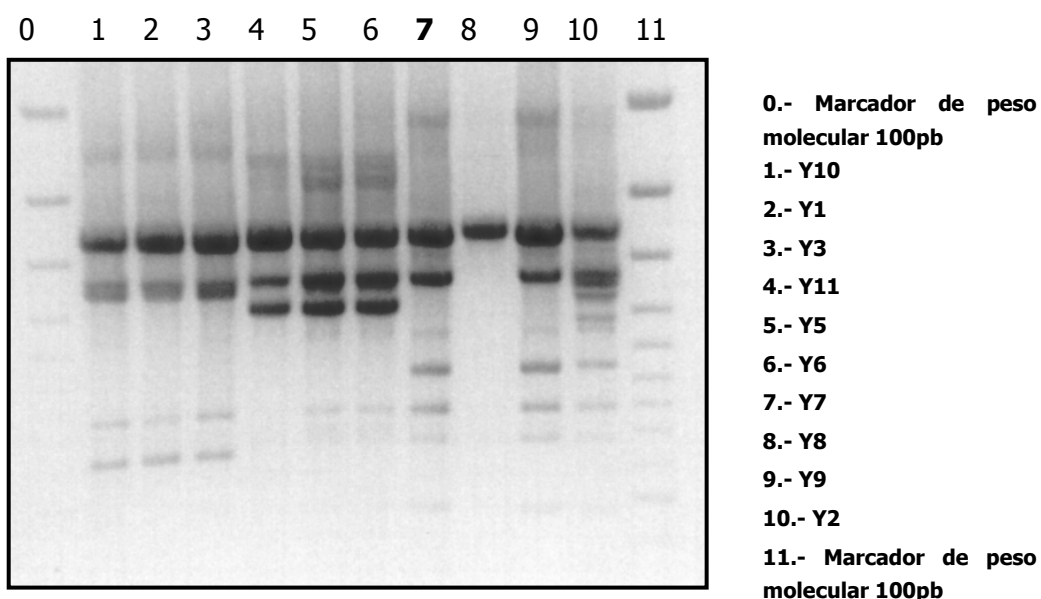


Figura 37. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género *Streptococcus* con el iniciador RAPD2

Nuevamente, se observó que el perfil de bandas de las cepas de *S. thermophilus* de Y7 e Y9 es idéntico y distinto al resto de los perfiles obtenidos. La figura 38 muestra los porcentajes de homología entre todas las cepas de estreptococos de los distintos productos usando el iniciador o primer RAPD2 mientras que la tabla 32 muestra el porcentaje de homología únicamente frente a la cepa del producto Y7.

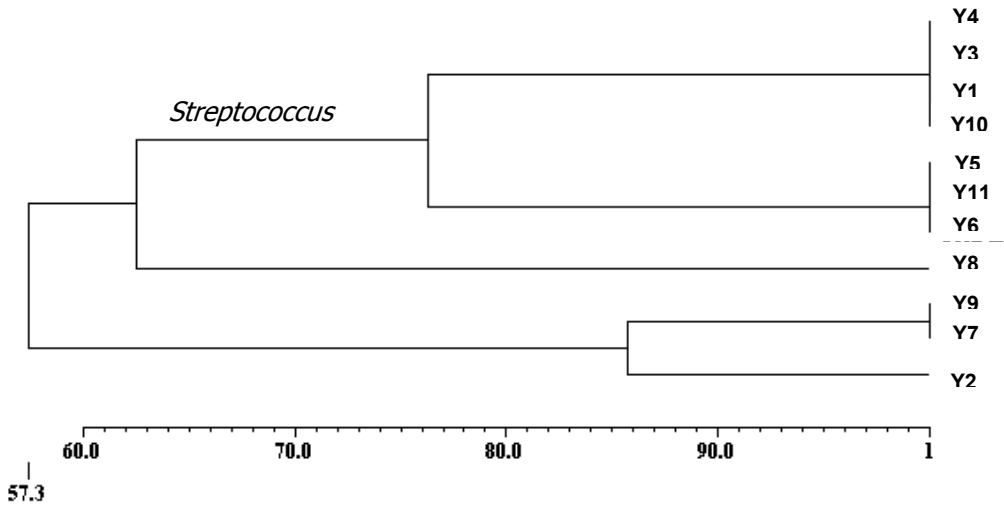


Figura 38. Dendrograma de las cepas de *Streptococcus thermophilus* empleando el iniciador RAPD2 y el coeficiente de similitud de DICE

TABLA 32. Porcentajes de homología genética entre la cepa de *S. thermophilus* que Y7 y el resto de estreptococos aislados de otras marcas comerciales, obtenido por RAPD mediante el uso del iniciador RAPD2

PRODUCTO	% HOMOLOGÍA	PRODUCTO	% HOMOLOGÍA
Y9	100	Y4	65
Y2	85	Y3	65
Y1	65	Y6	65
Y10	65	Y11	65
Y8	65	Y5	65

Por tanto, en los RAPDs de los estreptococos aislados de los once yogures naturales obtenidos por ambos iniciadores, se observó que la cepa de *S. thermophilus* empleada por las marcas 7 y 9 tiene probablemente el mismo origen, ya que presentan el mismo perfil entre ellos para los dos iniciadores empleados en el estudio. Del mismo modo, los estreptococos de las marcas 5, 6 y 11 presentaron el mismo perfil entre sí y, en consecuencia, pueden ser la misma cepa. Para los estreptococos de las marcas 1, 3, 4 y 10 se observó la misma situación descrita anteriormente. Sin embargo, los estreptococos de las marcas 2 y 8 se agruparían en diferente similitud dependiendo del iniciador usado.

Resultados

Con ambos iniciadores, los lactobacilos presentaron homologías más altas que los estreptococos, con perfiles de bandas mucho más complejos y con un mayor número de bandas.

Aunque existe una gran homología entre todas las cepas de lactobacilos, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* contenida en el yogur Y7 muestra un perfil distinto al resto de lactobacilos de los demás yogures aunque muy similar a los perfiles empleados por Y1 e Y10.

2. DETECCIÓN DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus* MEDIANTE PCR TRADICIONAL y PCR SEMINESTED

2.1. Detección de *L. delbrueckii* mediante PCR

Se utilizaron los iniciadores 1 y 2 propuestos por Lick *et al.* (2001):

1: AAT TCC GTC AAC TCC TCA TC
 2: TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA

El alineamiento de estos iniciadores con las secuencias de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* publicadas en el GeneBank, mostraron que Ldelb1 y Ldelb2 resultaban adecuados para su detección (Tabla 1).

Tabla 33. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2

1	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	20	Iniciador Ldelb1
856763	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	856782	L. delb. bulg. ATCC 11842
843163	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	843182	L. delb. bulg. ATCC BAA-365
1	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	20	Iniciador Ldelb2
857479	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	857460	L. delb. bulg. ATCC 11842
843879	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	843860	L. delb. bulg. ATCC BAA-365

Se observaron las bandas esperadas de 717 pb para todas las cepas *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, aisladas de productos comerciales así como para la cepa de referencia (figura 39).

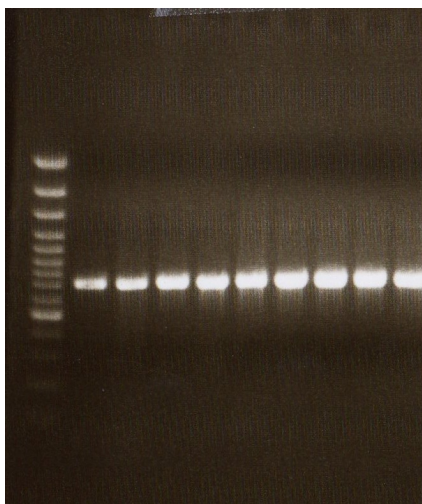


Figura 39. Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* aisladas de productos comerciales

Sin embargo, estos iniciadores también alineaban con las secuencias de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* al 100% (tablas 34 y 35). En efecto, se observaron las bandas esperadas de 717 pb para estas cepas tras la realización de las reacciones de PCR. Por lo tanto esta reacción de PCR no es específica para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Tabla 34. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2 con *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*

1	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	20	Iniciador Ldelb1
856763	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	856782	<i>L. del. del.</i> ATCC 9649
843163	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	843182	<i>L. del. del.</i> ATCC 9649
1	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	20	Iniciador Ldelb2
857479	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	857460	<i>L. del. del.</i> ATCC 9649
843879	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	843860	<i>L. del. del.</i> ATCC 9649

Tabla 35. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores Ldelb1 y Ldelb2 con *L. delbrueckii* subsp. *lactis*

1	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	20	Iniciador Ldelb1
856763	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	856782	<i>L. delb. lac.</i> ATCC 12315
843163	a a t t c c g t c a a c t c c t c a t c	843182	<i>L. delb. lac.</i> ATCC 12315
1	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	20	Iniciador Ldelb2
857479	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	857460	<i>L. delb. lac.</i> ATCC 12315
843879	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	843860	<i>L. delb. lac.</i> ATCC 12315

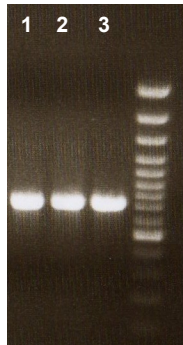


Figura 40. 1) Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, 2) Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*, 3) Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *delbrueckii*

Aunque para el resto de especies de lactobacilos ensayados (tabla 16), entre los cuales se incluyeron varios presentes en la microbiota endógena humana, la reacción de PCR fue negativa, se decidió no utilizar estos iniciadores para los ensayos *in vivo* ya que, las subespecies *lactis* y *delbrueckii*, pese a no ser endógenas, podrían formar parte de la microbiota intestinal por alguna circunstancia y, por lo tanto, inducir a error en un estudio *in vivo* si se utilizaran estos iniciadores. Se podrían obtener falsos positivos por la detección de esas dos cepas.

2.2. Detección de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* mediante PCR seminested

Se comprobó la validez del protocolo de PCR seminested (Lick *et al.*, 2000) para detectar de forma específica *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* a nivel de subespecie.

El alineamiento de los iniciadores seleccionados con las secuencias de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* publicadas en el GeneBank mostraron que estos iniciadores utilizados en este estudio, LdelbF, LdelbR1 y LdelbR2 resultaban adecuados para la detección de la subespecie (Tabla 1). Además los iniciadores LdelbR2 y LdelbF resultaron solamente específicos para la subespecie *bulgaricus*, coincidiendo LdelbR1 con el iniciador 2 descrito anteriormente en la PCR simple.

LdelbF: CCTCATCAACCGGGGCT
 LdelbR1: TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA
 LdelbR2: CGC CCG GGT GAA GGT G

Tabla 36. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores LdelbF, LdelbR1 y LdelbR2

1	c c t c a t c a a c c g g g g c t	17	Iniciador LdelbF
856776	c c t c a t c a a c c g g g g c t	856791	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
843176	c c t c a t c a a c c g g g g c t	843192	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC BAA-365
1	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	20	Iniciador LdelbR1
857479	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	857460	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
843879	t g a t c c g c t g c t t c a t t t c a	843860	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC BAA-365
1	c g c c c g g g t g a a g g t g	16	Iniciador LdelbR2
857451	c g c c c g g g t g a a g g t g	857436	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC 11842
843851	c g c c c g g g t g a a g g t g	843836	<i>L. delb. bulg.</i> ATCC BAA-365

Los iniciadores LdelbR2 y LdelbF utilizados resultaron completamente específicos, corroborando el análisis teórico. Se obtuvo una la banda esperada de 678 pb para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Se comprobó la especificidad con el resto de cepas de lactobacilos indicadas en la tabla 16. Estas especies no mostraron banda cuando se sometieron a esta PCR empleando estos iniciadores y las condiciones de amplificación (Figura 41).

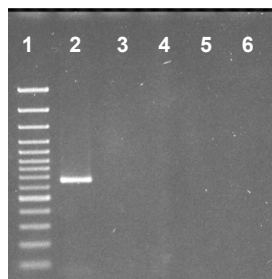


Figura 41. Detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por PCR seminested 1) marcador pesos moleculares (100pb), 2) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 3-6) otros lactobacilos

2.3. Detección de *S. thermophilus* mediante PCR

El alineamiento de los iniciadores seleccionados TH1 y TH2 con las secuencias de *S. thermophilus* publicadas en el GeneBank mostró que los iniciadores resultaban específicos para la detección de esta bacteria (Tabla 37).

Tabla 37. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores TH1 y TH2

1	a c g g a a t g t a c t t g a g t t t c	20	Iniciador TH1
20703	a c g g a a t g t a c t t g a g t t t c	20722	<i>S. therm.</i> LMD-9
68365	a c g g a a t g t a c t t g a g t t t c	68384	<i>S. therm.</i> LMD-9
142574	a c g g a a t g t a c t t g a g t t t c	142593	<i>S. therm.</i> LMD-9
1	t t t g g c c t t t c g a c c t a a c	20	Iniciador TH2
20961	t t t g g c c t t t c g a c c t a a c	20943	<i>S. therm.</i> LMD-9
68623	t t t g g c c t t t c g a c c t a a c	68605	<i>S. therm.</i> LMD-9
142832	t t t g g c c t t t c g a c c t a a c	142814	<i>S. therm.</i> LMD-9

Los primeros ensayos se realizaron a una temperatura de 51°C, que fue aumentándose de 1°C en 1°C hasta 56°C, para obtener la temperatura óptima de unión de los iniciadores lo mas restrictiva posible. La temperatura de unión de 55°C resultó ser la óptima. Finalmente, las condiciones adoptadas fueron las siguientes:

Nº ciclos	Temperaturas y tiempos	Proceso
1 ciclo	92°C durante 2 min	Desnaturalización
	95°C durante 30 s	Desnaturalización
35 ciclos	55°C durante 30 s	Unión al iniciador
	72° C durante 30 s	Extensión del producto
1 ciclo	72°C durante 2 min	Extensión del producto

La reacción de PCR resultó positiva para todas las cepas de *S. thermophilus* aisladas de productos comerciales así como para la cepa de referencia de esta bacteria (ver tabla 16).

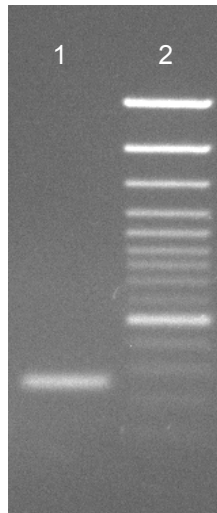


Figura 42. Detección de *Streptococcus thermophilus* por PCR 1) *Streptococcus thermophilus* aislado del producto Y7, 2) marcador pesos moleculares (100pb)

La especificidad de los iniciadores Th1 y TH2 para *S. thermophilus* se comprobó con las otras especies enumeradas en el apartado 2.1 (tabla 16). Se observó la banda esperada de 259 pares de bases solamente en el caso de esta especie. No hubo banda de amplificación ni para las especies más próximas genéticamente como *S. intermedius* ni para otras bacterias ensayadas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

3. PUESTA A PUNTO DE MÉTODO COMBINADO DVC-FISH PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus*

3.1. Detección de células viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

En el procedimiento del DVC (Direct Viable Count), las bacterias deben ser incubadas en un caldo rico en nutrientes y con una concentración óptima de antibióticos que inhiban la replicación celular pero que permita otras vías de síntesis para sobrevivir (Buchrieser and Kaspar, 1993). Por tanto, en estas condiciones las bacterias viables continúan metabolizando nutrientes y se elongan, pero no se replican. Se considerarán células viables aquellas que presenten una longitud igual o mayor de 18 μm , es decir el doble de la original.

La longitud de las células control de lactobacilos LDY7, aquellas a las que no se le había aplicado ningún antibiótico, varió entre 3 y 9 μm de longitud.

La evaluación de los distintos antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación mostró grandes diferencias entre los mismos como se puede ver en la tabla 38.

El Ácido Pipemídico resultó no ser apropiado para el ensayo de DVC, ya que a ninguna de las concentraciones ni a los tiempos analizados se observó un aumento destacado del tamaño celular.

El agente antimicrobiano Ciprofloxacino tampoco resultó demasiado efectivo en la elongación de las células a concentraciones bajas, aunque a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó que las células aumentaban su tamaño. Antes del tratamiento con el antibiótico, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tenía una longitud celular de entre 3 y 9 μm y, tras 7 horas de tratamiento con este antibiótico, la longitud de algunas células alcanzaba los 29 μm . Se observó, además, que tras el tratamiento con este antibiótico aparecían algunas células elongadas pero con morfología en forma helicoidal (figura 48). Tras 24 horas de incubación, también se detectaron algunas células elongadas de 15 μm si bien esta longitud no es suficiente para considerar la célula viable de acuerdo al criterio establecido anteriormente. El resto de tiempos y concentraciones evaluadas no modificaron la longitud original.

El Ácido Nalidíxico no resultó efectivo a ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados, lo que coincide con los resultados de otros autores que indican que solamente resulta efectivo para las bacterias Gram- (figuras 52 y 53).

Fue la Novobiocina el que produjo la mayor elongación en las células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (figuras 44, 45, 46 y 47), a una concentración de 10 µg/ml y tras 7 y 24 horas de incubación, alcanzándose tamaños celulares de hasta 56 y 59 µm de longitud respectivamente, lo que quintuplicaría el tamaño de las células control (figura 43). A la concentración de 100 µg/ml, pese a ser efectivo a la hora de elongar las células, el número total de bacterias presentes se reducía considerablemente, presentando cierto efecto bactericida. Este efecto no se produjo a la concentración de 10 µg/ml.

Por todo ello, se decidió considerar la Novobiocina, a la concentración de 10 µg/ml como el antibiótico más efectivo para la aplicación de la técnica DVC-FISH para esta bacteria.

Tabla 38. Antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación evaluados en la puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 según longitud celular

[conc.]	Tiempo	Ac. nalidíxico	Novobiocina	Ciprofloxacina	Ac. pipemídico
	0 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
	3 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
0,5 µg/ml	7 h	9 µm	3 µm	9 µm	9 µm
	24 h	9 µm	3 µm	9 µm	9 µm
	0 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
	3 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
1 µg/ml	7 h	9 µm	10 µm	9 µm	9 µm
	24 h	9 µm	12 µm	9 µm	9 µm
	0 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
	3 h	12 µm	15 µm	11µm	9 µm
10 µg/ml	7 h	12 µm	56 µm	12 µm	9 µm
	24 h	11 µm	59 µm	9 µm	9 µm
	0 h	9 µm	9 µm	9 µm	9 µm
	3 h	12 µm	16 µm	9 µm	9 µm
100 µg/ml	7 h	11 µm	50 µm	29 µm	9 µm
	24 h	12 µm	52 µm	15 µm	9 µm

Resultados

	0 h	9 μm	9 μm	9 μm	9 μm
	3 h	9 μm	9 μm	9 μm	9 μm
1000 $\mu\text{g/ml}$	7 h	9 μm	10 μm	9 μm	9 μm
	24 h	9 μm	9 μm	9 μm	9 μm

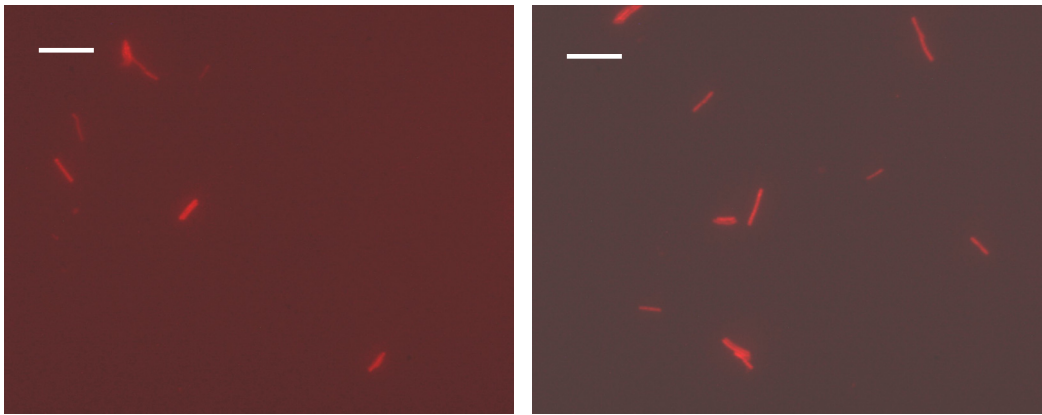


Figura 43. Control negativo del DVC-FISH para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 mostrando el tamaño normal de la célula (barra: 10 μm)

Las fotografías siguientes muestran células de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* tratadas con varias concentraciones de distintos antibióticos durante diferentes tiempos y observadas mediante hibridación in situ y SEM.

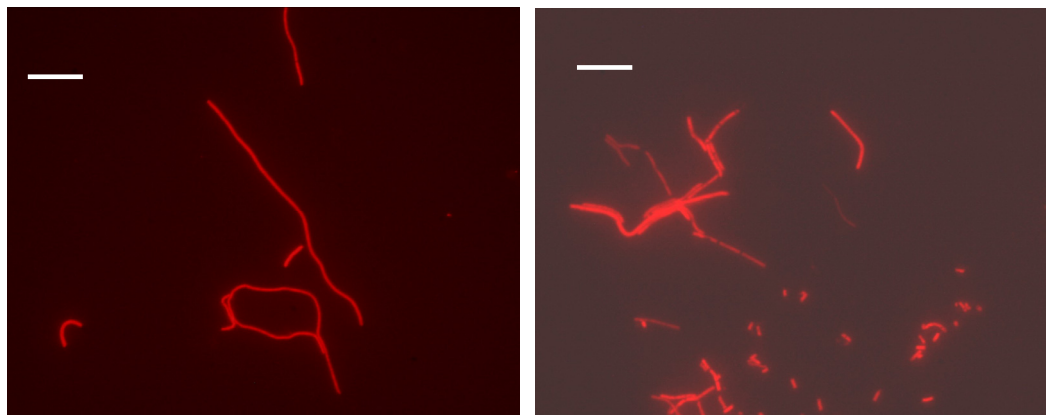


Figura 44. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μm)

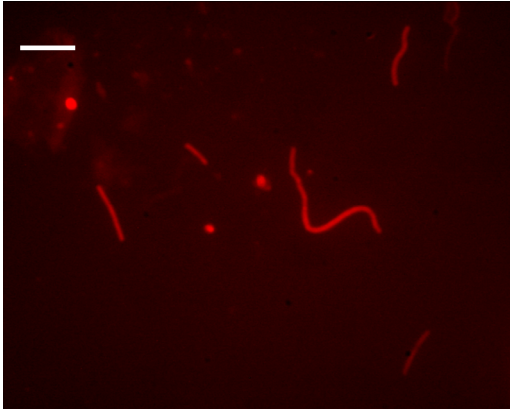


Figura 45. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)

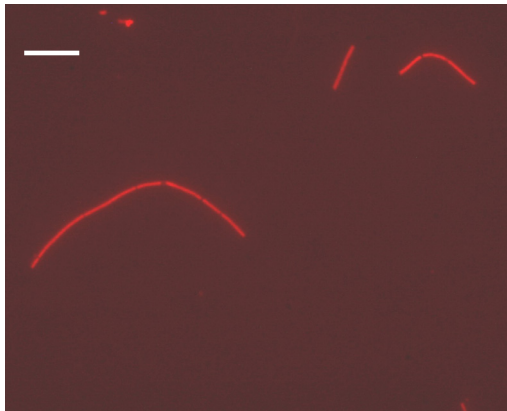


Figura 46. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)

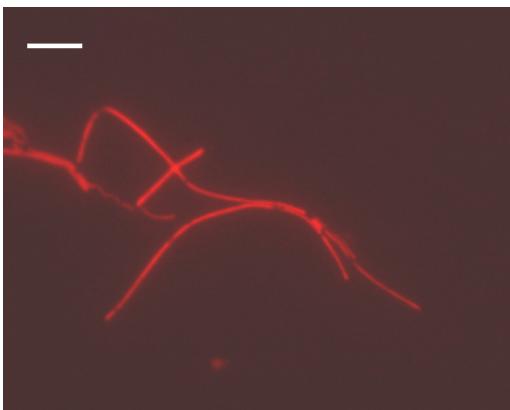


Figura 47. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)

Resultados

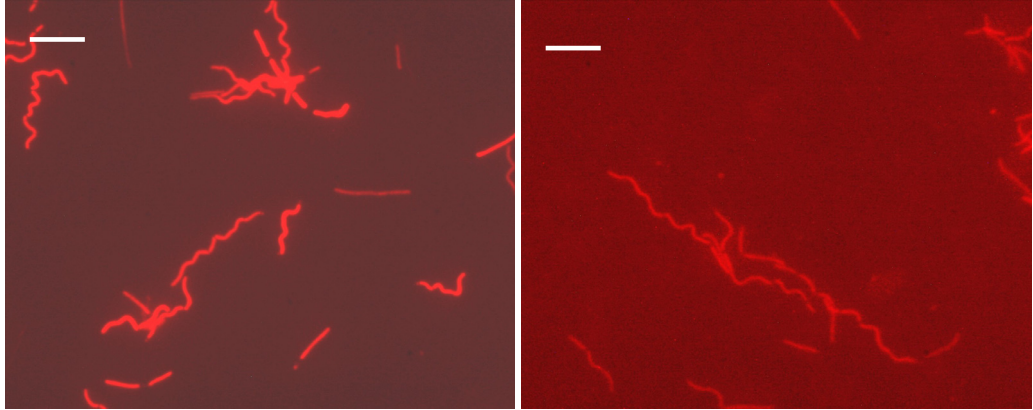


Figura 48. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 µm)

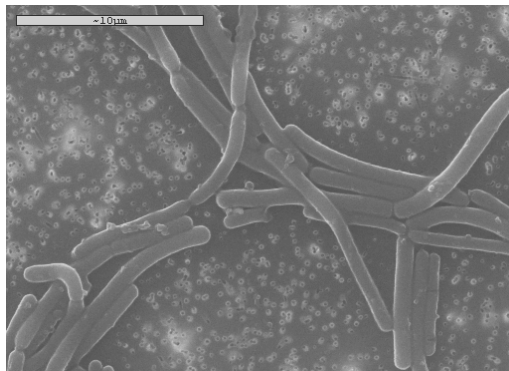


Figura 49. Control de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado en MRS (sin antibiótico) durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido

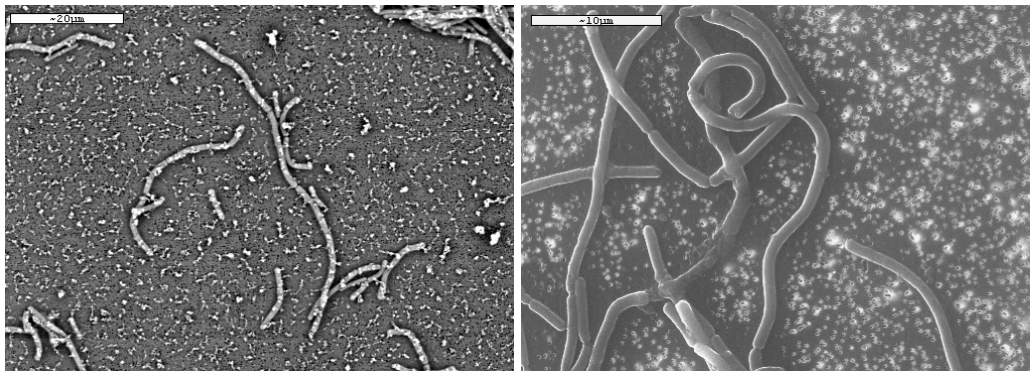


Figura 50. *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido

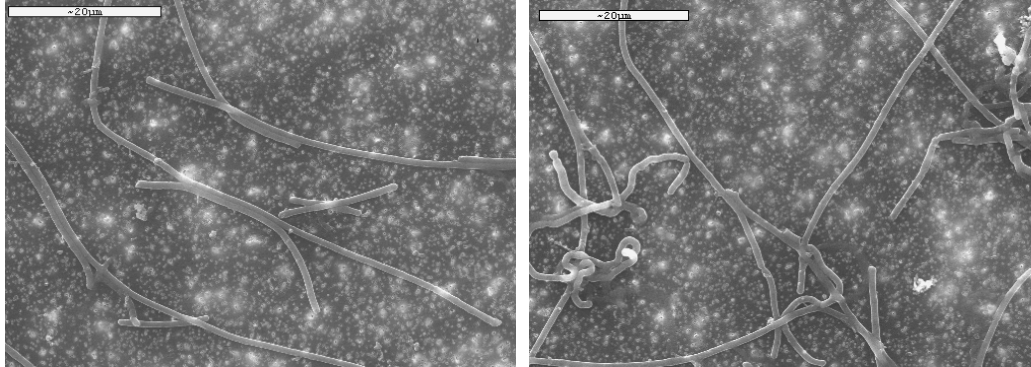


Figura 51. *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido

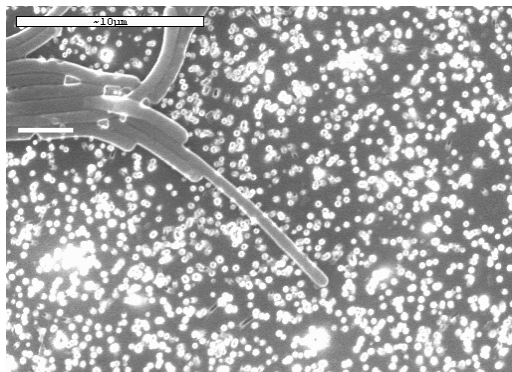


Figura 52. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ácido nalidixico durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido

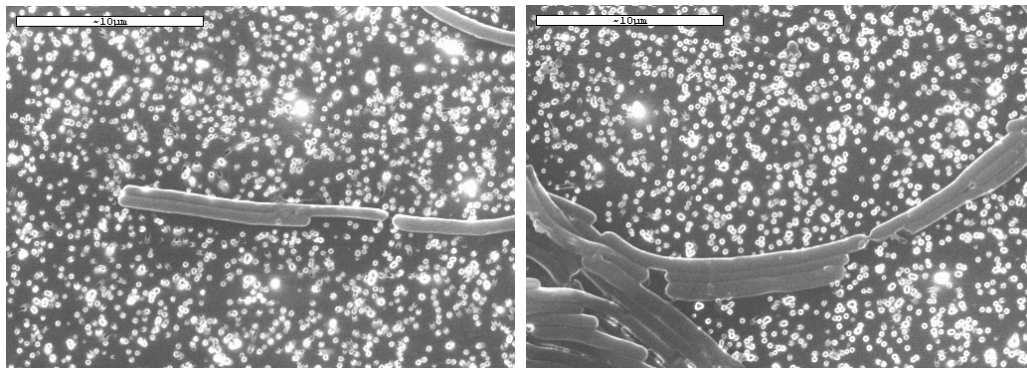


Figura 53. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ácido nalidixico durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido

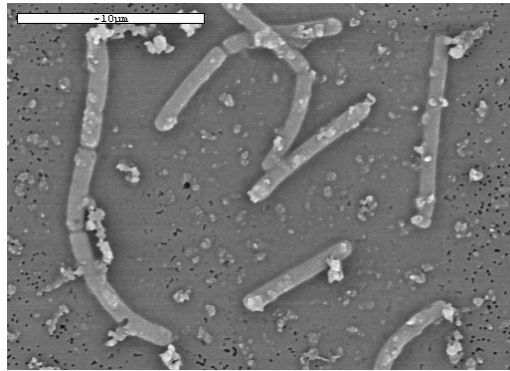


Figura 54. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido



Figura 55. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ciprofloxacino durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido

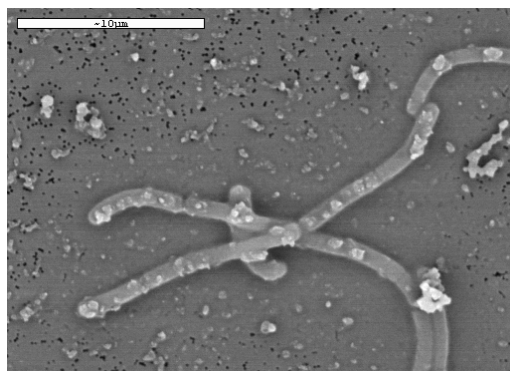


Figura 56. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 incubado con una concentración de 100 µg/ml de ciprofloxacino durante 24 h detectado mediante microscopía de barrido

3.2. Detección de células viables de *S. thermophilus*

En el caso de *S. thermophilus*, la aplicación del DVC inhibe la replicación celular pero en lugar de una elongación se produce un aumento del tamaño celular que se cuantificará por medición del diámetro. Se considerarán células viables aquellas que presenten un diámetro superior a 1,6 μm , es decir el doble del habitual (0,8 μm).

Para la puesta a punto de este método, se utilizó la cepa STY7, aislada del producto Y7. Todos los antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación ensayados para *S. thermophilus* aparecen en la tabla 39.

El Ácido Pipemídico resultó no ser apropiado para el ensayo del DVC ya que a ninguna de las concentraciones ni a los tiempos analizados se observó un aumento destacado del tamaño celular.

El agente antimicrobiano Ciprofloxacino tampoco fue demasiado efectivo en el aumento del diámetro de las células a bajas concentraciones, aunque a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó un ligero incremento del tamaño, alcanzándose diámetros celulares de 1,2 μm . Estos valores no fueron por lo tanto suficientes para discriminar entre las células viables y las no viables.

El Ácido Nalidíxico produjo aumento del tamaño celular a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y los tiempos 7 y 24 horas pero no de forma significativa para poder diferenciar entre los estreptococos vivos y muertos.

La Novobiocina resultó ser el antibiótico más efectivo como inhibidor de la ADN-girasa para el caso del *S. thermophilus*. La concentración y el tiempo de incubación óptimos de este antibiótico fue de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 7 horas respectivamente. Se observó un importante aumento del tamaño celular así como un incremento significativo en la fluorescencia de las células viables frente a las no viables como puede apreciarse en la figura 57.

Antes del tratamiento con novobiocina, *S. thermophilus* tenía un diámetro celular de hasta 0,8 μm . Tras 7 horas de incubación con este antibiótico, a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, la longitud de algunas células alcanzó los 2,3 μm de diámetro (figura 59). Del mismo modo, a las 24 horas también se detectaron células viables de 2,2 μm pero se eligió un tratamiento de 7 horas para minimizar el tiempo

Resultados

del proceso así como el contacto con el antibiótico. El resto de tiempos y concentraciones evaluadas no modificaron significativamente el diámetro original.

Tabla 39. Antibióticos, concentraciones y tiempos de incubación evaluados en la puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de células viables de *Streptococcus thermophilus* STY7 según diámetro celular

[conc.]	Tiempo	Ac. nalidíxico	Novobiocina	Ciprofloxacino	Ac. pipemídico
0,5 µg/ml	0 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	3 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	7 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	24 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
1 µg/ml	0 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	3 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	7 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	24 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
10 µg/ml	0 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	3 h	1 µm	1,2 µm	0,8 µm	0,8 µm
	7 h	1,2 µm	2,3 µm	0,8 µm	0,8 µm
	24 h	1,5 µm	2,2 µm	0,8 µm	0,8 µm
100 µg/ml	0 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	3 h	1,2 µm	2,2 µm	1,2 µm	0,8 µm
	7 h	1,2 µm	2,2 µm	1,2 µm	0,8 µm
	24 h	1,5 µm	2,2 µm	1,1 µm	0,8 µm
1000 µg/ml	0 h	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm	0,8 µm
	3 h	1 µm	1 µm	0,8 µm	0,8 µm
	7 h	1 µm	1 µm	0,8 µm	0,8 µm
	24 h	1 µm	1 µm	0,8 µm	0,8 µm

Las fotografías siguientes muestran células de *S. thermophilus* incubadas con varias concentraciones de antibióticos a diferentes tiempos y observadas mediante FISH y SEM. La barra blanca en cada una de ellas indica una longitud de 10 µm.

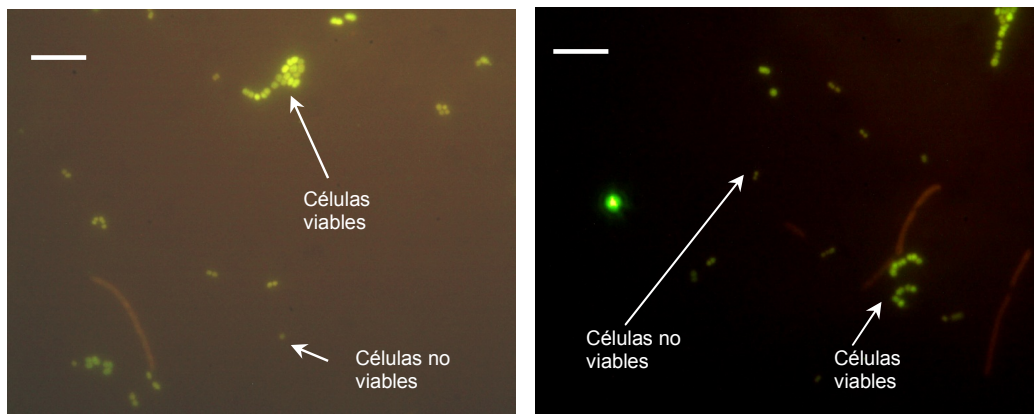


Figura 57. *Streptococcus thermophilus* STY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda STH23S marcada con FLUOS (barra: 10 µm)

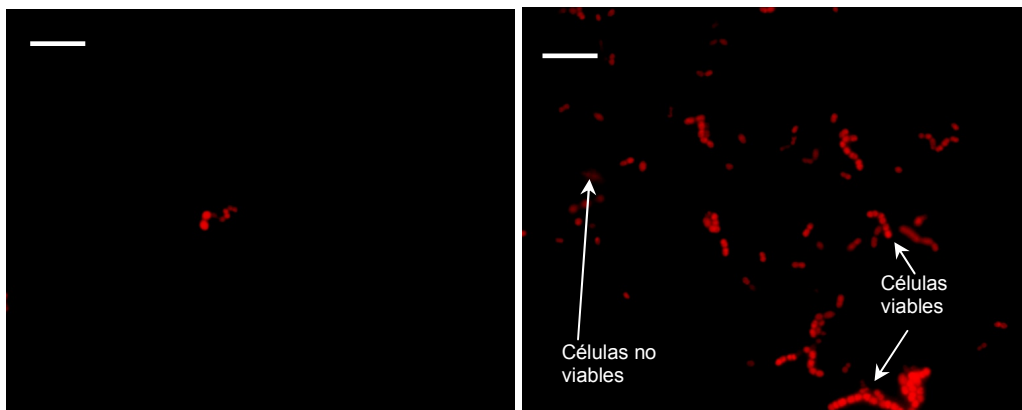


Figura 58. *Streptococcus thermophilus* STY7 incubado con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de fluorescencia con la sonda STH23S marcada con CY3 (barra: 10 µm)

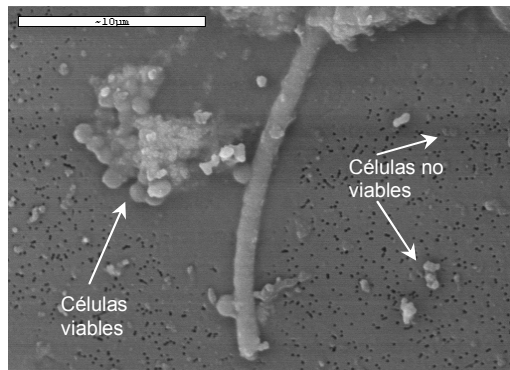


Figura 59. *Streptococcus thermophilus* STY7 viables y no viables tras su incubación con una concentración de 10 µg/ml de novobiocina durante 7 h detectado mediante microscopía de barrido (SEM).

La utilización de la novobiocina como antibiótico para la realización del DVC-FISH a 10 µg/ml de concentración y durante 7 horas permite discriminar entre células vivas y muertas tanto para *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* como para *S. thermophilus*.

4. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus* A LOS JUGOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DVC-FISH

La metodología *in vitro* que simula el tránsito a través del tracto gastrointestinal ha sido empleada para la selección de cepas probióticas en diversas ocasiones. Este tipo de estudio de viabilidad es, por tanto, de gran interés para averiguar si éstas pueden sobrevivir a través del tránsito gastrointestinal.

Inicialmente, y antes de someter a las bacterias del yogur a los efectos de los jugos gastrointestinales, se realizaron recuentos en placa por duplicado del producto a ensayar (yogur natural Y7). Los recuentos de lactobacilos y estreptococos aparecen en la tabla 40.

Del mismo modo, se comprobó que la técnica DVC-FISH puesta a punto resultaba igual de efectiva cuando la matriz era más compleja como la del yogur, utilizando como antibiótico la novobiocina a concentración 10 µg/ml durante 7 horas de incubación.

Se pudo comprobar mediante SEM, midiendo la longitud de las células, que este método era efectivo para determinar la viabilidad de ambas cepas dentro de una leche fermentada.

Se quiso descartar igualmente que se hubiera cambiado de cepas en el producto comercial Y7 y que se produjera un mal funcionamiento del antibiótico o las sondas de hibridación correspondientes a cada cepa en la matriz del producto fermentado.

Tanto para *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* como para *S. thermophilus* del producto Y7, el número de bacterias viables obtenido por recuento en placa fue ligeramente inferior al obtenido mediante el recuento por DVC-FISH, aunque los resultados fueron muy similares (tabla 40).

TABLA 40. Media de los recuentos del producto Y7 realizados en placa y por DVC-FISH previos a la realización de las pruebas de resistencia a los jugos gastrintestinales

Recuento	Lactobacilos (u.f.c./ml)	Estreptococos (u.f.c./ml)
En placa	$4,4 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$
DVC-FISH	$4,6 \times 10^7$	$8,9 \times 10^8$

Fue posible enumerar las bacterias viables así como las no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* después de la exposición a los jugos gastrintestinales gracias al método del DVC-FISH. El estudio de resistencia al tránsito gástrico y el de resistencia al tránsito intestinal se hicieron por separado como se ha descrito anteriormente. Se realizaron recuentos en 20 campos de visión diferentes en el microscopio de epifluorescencia para cada uno de los tiempos de exposición en los cuales se tomaron muestras. Todas las hibridaciones se hicieron por duplicado para evitar posibles errores.

4.1. Acción de los jugos gástricos

Las células viables y no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 y de *Streptococcus thermophilus* STY7 se diferenciaron perfectamente bajo la acción de la pepsina, tras la aplicación del DVC con la novobiocina y la posterior hibridación con las sondas correspondientes para cada bacteria.

Se pudo comprobar que los componentes del yogur no interfirieron en la correcta aplicación de la técnica DVC-FISH ya que, pese a haber cierto ruido de fondo en algunos casos, en ningún momento impidió la correcta visualización de las células y la realización de los recuentos (figuras 60, 61 y 62).

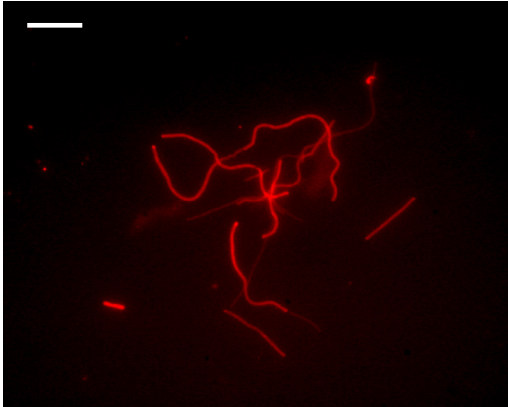


Figura 60. Células viables y no viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 tras la acción de la pepsina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μ m)

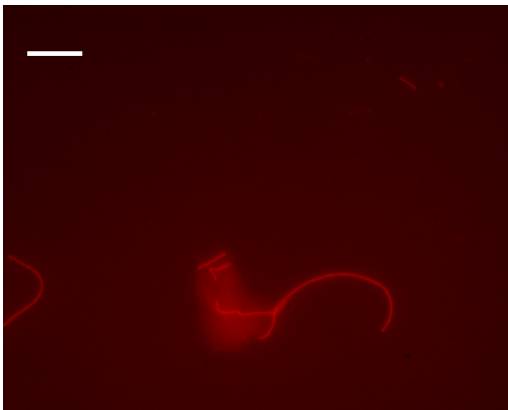


Figura 61. Células viables y no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 tras la acción de la pepsina (60 min) y tras el DVC-FISH con la sonda LDE marcada con CY3 (barra: 10 μ m)

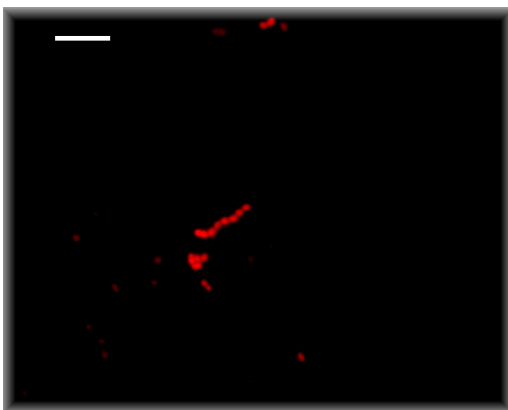


Figura 62. Células viables y no viables de *Streptococcus thermophilus* STY7 tras la acción de la pepsina (60 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3

Resultados

Tanto la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como la de *S. thermophilus* frente a los jugos gástricos (pepsina) se vio afectada con el tiempo de exposición. Tras el choque inicial (datos tomados en tiempo 0), la viabilidad frente al pH ácido de la pepsina se redujo hasta un 61,2% para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y hasta un 40,7% para *Streptococcus thermophilus*. Para ambas cepas este porcentaje fue decreciendo con el tiempo de exposición a este jugo. Tras 180 minutos de exposición, la supervivencia final fue del 29,6% para los lactobacilos del 10,9% para los estreptococos (tabla 41). Por lo tanto se puede decir que la cepa aislada del producto Y7 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tolera mejor la exposición a los jugos gástricos que la aislada de *S. thermophilus*. En ambos casos, se obtuvieron células viables en órdenes de 10^7 tras 180 minutos de exposición a la pepsina. Todos los recuentos se hicieron por duplicado contando en cada preparación un mínimo de 20 campos.

Igualmente, se realizaron recuentos en placa a los diferentes tiempos de exposición y los resultados obtenidos muestran que el número de células viables recuperadas en el medio de cultivo es inferior que el número de células obtenidas mediante DVC-FISH, llegando a ser de un orden menor en algunos casos.

TABLA 41. Efecto *in vitro* del tránsito gástrico (pepsina) sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* de un yogur natural comercial

	Tiempo de exposición a la pepsina				
	0 min	5 min	10 min	60 min	180 min
Nº lactobacilos viables por gramo de yogur (DVC-FISH)	$2,82 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7$	$1,74 \times 10^7$	$1,49 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$
% lactobacilos viables tras tránsito gástrico	61,2	40,5	37,9	32,4	29,6
Nº lactobacilos por gramo de yogur (recuento en placa)	$2,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$	$9,5 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$
Nº estreptococos viables por gramo de yogur (DVC- FISH)	$3,62 \times 10^8$	$2,01 \times 10^8$	$1,34 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$
% estreptococos viables tras tránsito gástrico	40,7	22,6	15,1	12,2	10,9
Nº estreptococos por gramo de yogur (recuento en placa)	$3,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$

4.2. Acción de los jugos intestinales

Las células viables y no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* se diferenciaron perfectamente bajo la acción de la pancreatina y tras la aplicación del DVC-FISH (figuras 63, 64, 65 y 66)

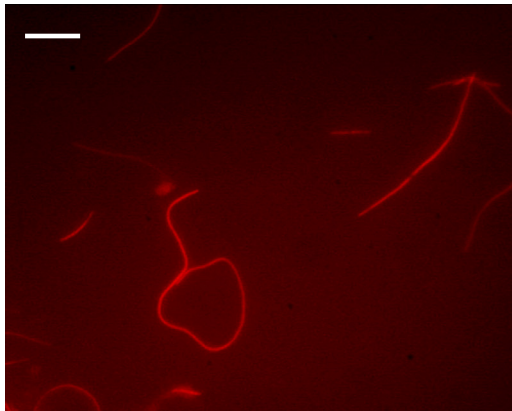


Figura 63. Células viables y no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 tras la acción de la pancreatina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3

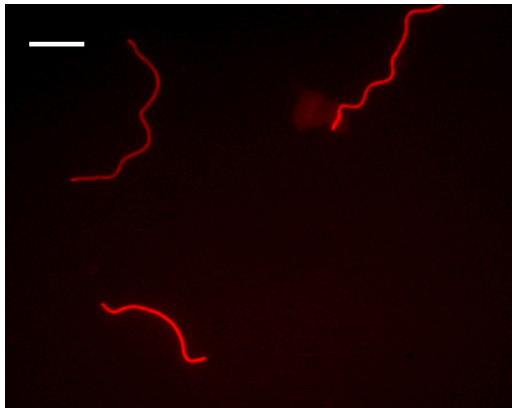


Figura 64. Células viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 tras la acción de la pancreatina (240 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3

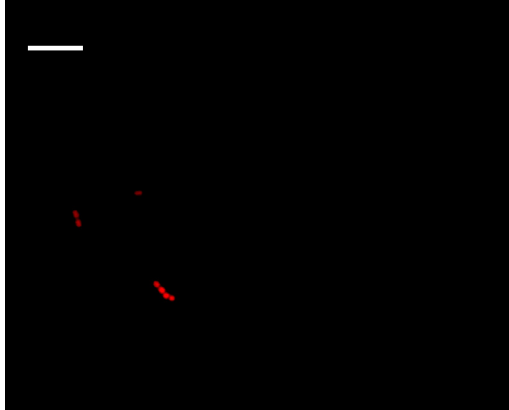


Figura 65. Células viables y no viables de *Streptococcus thermophilus* STY7 tras la acción de la pancreatina (10 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3.

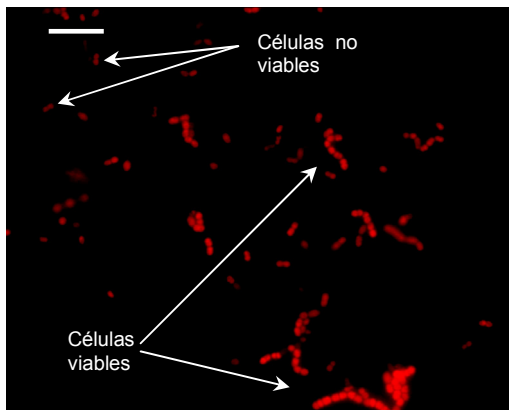


Figura 66. Células viables y no viables de *Streptococcus thermophilus* STY7 tras la acción de la pancreatina (240 min) y tras el DVC-FISH con la sonda STH23 marcada con CY3

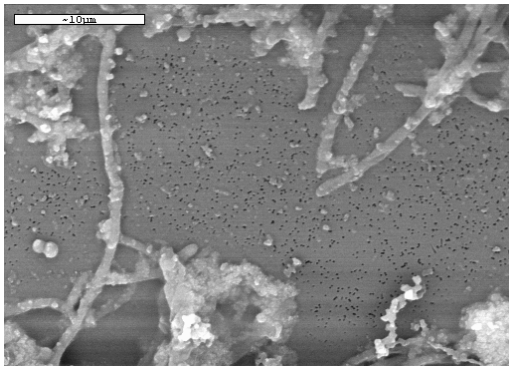


Figura 67. Lactobacilos y estreptococos LDY7 y STY7 tras la acción de la pancreatina y la aplicación del DVC detectados mediante microscopía electrónica de barrido

Frente a los jugos intestinales (pancreatina), tanto la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como la de *S. thermophilus* disminuyó ligeramente (tabla 42). En el caso de los lactobacilos disminuyó en un 10% aproximadamente (viabilidad del 90%) al inicio y se mantuvo prácticamente constante al cabo de las

seis horas de exposición mientras que la viabilidad de *S. thermophilus* se redujo hasta un 84,6%, es decir que el porcentaje de estreptococs viables descendió un 15% aproximadamente (tabla 42). Los recuentos por FISH se hicieron por duplicado, contando en cada preparación un mínimo de veinte campos. Los porcentajes de viabilidad recogidos en la tabla 42 se calcularon como la relación entre el número de células viables obtenidas en el recuento mediante FISH a los distintos tiempos de exposición frente al número de bacterias viables del control inicial.

Se realizaron recuentos en placa en medio LS-diferencial a los diferentes tiempos de exposición y los resultados obtenidos indicaron que el número de células viables recuperadas en el medio de cultivo fue menor que el número de células viables detectadas mediante DVC-FISH tanto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como para *S. thermophilus*.

TABLA 42. Efecto *in vitro* del tránsito intestinal (pancreatina) sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* del yogur natural Y7 empleando la técnica del DVC-FISH para realizar los recuentos

	Tiempo de exposición a la pancreatina				
	0 min	5 min	10 min	240 min	360 min
Nº lactobacilos viables por gramo de yogur (DVC-FISH)	$4,27 \times 10^7$	$4,24 \times 10^7$	$4,23 \times 10^7$	$4,19 \times 10^7$	$4,09 \times 10^7$
% viabilidad lactobacilos tras tránsito gástrico	92,8	92,2	92,0	91,1	88,7
Nº lactobacilos por gramo de yogur (recuento en placa)	$4,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
Nº estreptococos viables por gramo de yogur (DVC-FISH)	$7,95 \times 10^8$	$7,84 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$7,65 \times 10^8$	$7,53 \times 10^8$
% viabilidad estreptococos tras tránsito gástrico	89,3	88,1	86,5	86	84,6
Nº estreptococos por gramo de yogur (recuento en placa)	$6,9 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$

Resultados

El método del DVC-FISH se presentó como un método rápido y apropiado para la enumeración total de las bacterias viables, si bien es cierto que resultó bastante más sencillo discriminar entre células viables y no viables por longitud en el caso de los lactobacilos, ya que medir el diámetro de los estreptococos resultó más complicado.

Tanto *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como *S. thermophilus* resultaron más sensibles a la acción de los jugos gástricos que a los intestinales, como puede observarse en los resultados de la tabla 43.

Se observó que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resiste ligeramente mejor las condiciones del tránsito intestinal, presentando un porcentaje de viabilidad del 88,7% frente al 84,6% de *S. thermophilus*.

Ambas cepas perdieron viabilidad justo en el mismo instante de su exposición a los dos jugos gastrointestinales debido al shock ácido y básico causado por la acción inmediata de los mismos (figuras 68 y 69). Esta respuesta es mucho más acusada frente a la acción de la pepsina (pH 2,0) de pH ácido (figura 70).

Los resultados de la viabilidad teórica acumulada (número de células viables al final del tracto gastrointestinal) se muestran en la tabla 43. Los resultados se calcularon de forma teórica multiplicando el número inicial de cada bacteria por sus porcentajes de supervivencia frente a cada jugo gastrointestinal.

TABLA 43. Viabilidad acumulada de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* del producto Y7 tras superar tránsito gastrointestinal por recuento mediante DVC-FISH

Cepa	Nº inicial células viables	Nº células viables tras tránsito gastrointestinal	% viabilidad frente a la pepsina	% viabilidad frente a la pancreatina	% viabilidad acumulada tras tránsito gastrointestinal
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$4,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	29,6	88,7	26,2
<i>S. thermophilus</i>	$8,9 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	10,9	84,6	9,2

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* presentaron una resistencia *in vitro* a ambos jugos gastrointestinales del 26,2% y 9,2%

respectivamente. Esto quiere decir que, partiendo de un producto con un número de células viables conocido, el 26,2% de lactobacilos y el 9,2% de estreptococos podrían ser capaces de llegar vivos al final del intestino (figura 70). Esta cantidad sería por lo tanto el porcentaje de células que podrían ejercer efectos beneficiosos para la salud. Según bibliografía, únicamente las células resistentes podrían sobrevivir al tránsito gastrointestinal y llegar vivas al final del intestino para ejercer su efecto beneficioso.

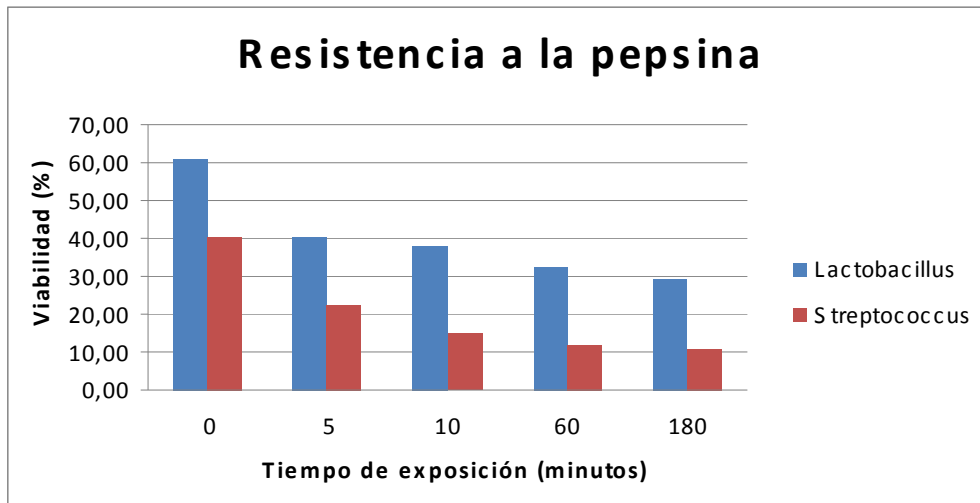


Figura 68. Resistencia a la pepsina (evolución de su viabilidad) de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7

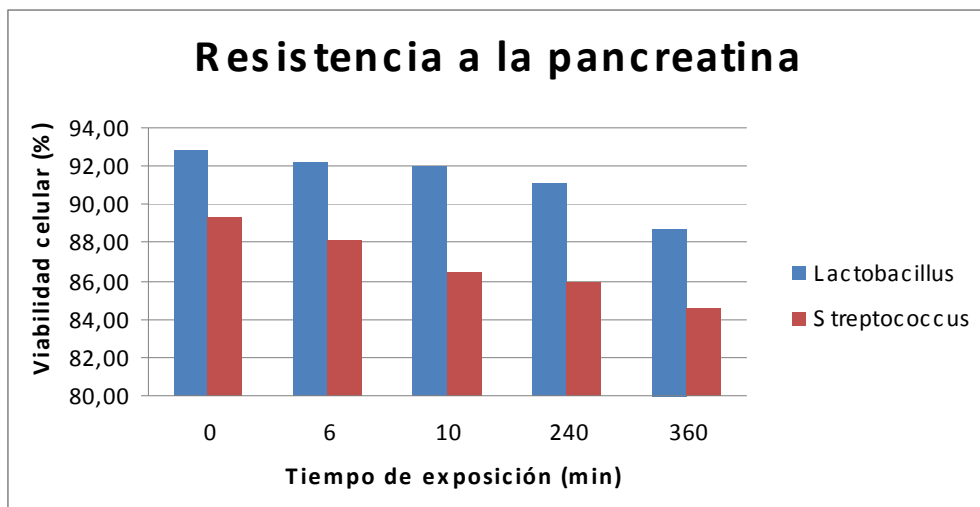


Figura 69. Resistencia a la pancreatina (evolución de su viabilidad) de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7

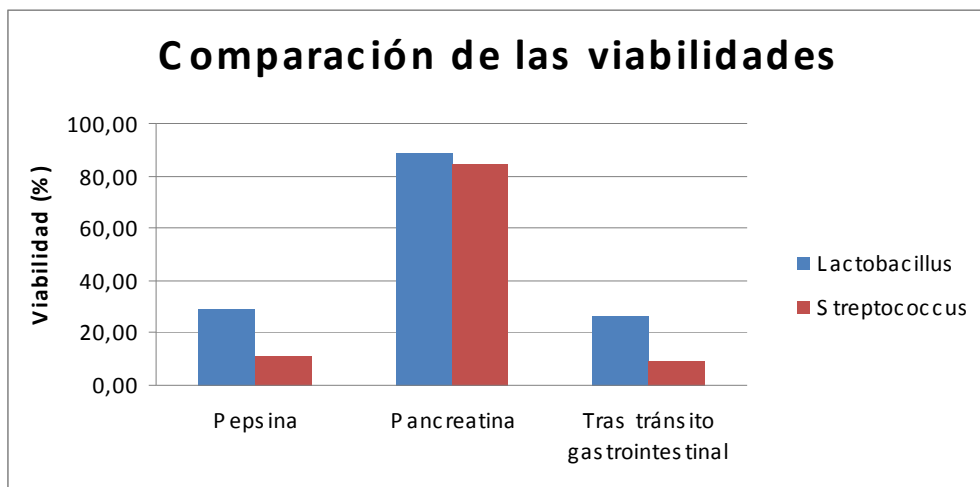


Figura 70. Viabilidad acumulada de las cepas de lactobacilos y de estreptococos aisladas del producto Y7 tras el tránsito gastrointestinal

5. ESTUDIO *IN VIVO* PARA DETERMINAR LA SUPERVIVENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS CEPAS DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y *Streptococcus thermophilus*

5.1. Estudio del límite de detección de los métodos ensayados en heces humanas inoculadas artificialmente

5.1.1 Límites de detección de los métodos de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH para la detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces inoculadas artificialmente

Se llevó a cabo un estudio del límite de detección de las distintas técnicas de detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 desarrolladas anteriormente, como cultivo en placa, PCR y DVC-FISH. Se emplearon heces que se inocularon artificialmente. Los ensayos se repitieron en cinco ocasiones utilizando cinco tipos de heces diferentes, todas ellas procedentes de personas que no habían ingerido ningún producto lácteo fermentado durante las dos semanas anteriores a la recogida de muestra.

El cultivo en placa con los medios utilizados resultó no ser un método eficaz para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces debido al enorme crecimiento de microbiota acompañante, que enmascara el posible crecimiento de esta bacteria en caso de que se produjera. Ninguno de los medios de cultivo utilizados resultó ser suficientemente selectivo para su detección y cuantificación.

El límite de detección de la PCR seminested para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces inoculadas artificialmente fue de 1×10^4 u.f.c./g de heces en cuatro ocasiones y de 1×10^5 u.f.c./g de heces en el quinto ensayo realizado (figura 71).

También se evaluó el límite de detección del método DVC-FISH para los cinco ensayos de heces inoculadas artificialmente. En las cinco repeticiones la sensibilidad en esta matriz fue de 10^4 u.f.c./g de material evaluado. El ensayo, a la vez sirvió para comprobar que la sonda no hibridaba inespecíficamente. Para ello se realizaron hibridaciones en heces sin inocular lactobacilos y se comprobó que no se producía hibridación alguna con la microbiota propia de las heces.

Por último, se comprobó que el método DVC-FISH para la detección de células viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* era válido para emplearlo en esta

Resultados

matriz mucho más compleja, y que el ruido de fondo no interfería en su detección. También se comprobó que se producía la elongación celular, pudiendo diferenciar entre bacterias viables y no viables (figuras 74).

En la siguiente tabla se recogen las sensibilidades de las diferentes técnicas desarrolladas.

Tabla 44. Comparación de los límites de detección de las distintas técnicas para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en muestras de heces inoculadas en u.f.c./g de heces

	Muestra heces 1	Muestra heces 2	Muestra heces 3	Muestra heces 4	Muestra heces 5
Cultivo	-	-	-	-	-
PCR	1×10^4	1×10^5	1×10^4	1×10^4	1×10^4
DVC-FISH	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4

La figura 71 muestra el límite de detección de 1×10^4 u.f.c./g de heces de la técnica de PCR para muestras de heces inoculadas artificialmente con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7.

Las figuras 72, 73 y 74 muestran la capacidad de la técnica DVC-FISH para discriminar entre células viables y no viables de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces siempre y cuando haya una presencia mínima de 10^4 u.f.c./g en esas heces.

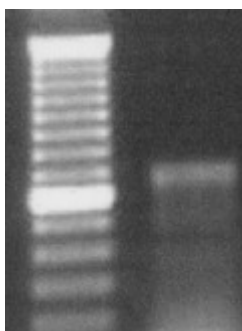


Figura 71. Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 mediante PCR en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^4 células/g de heces.

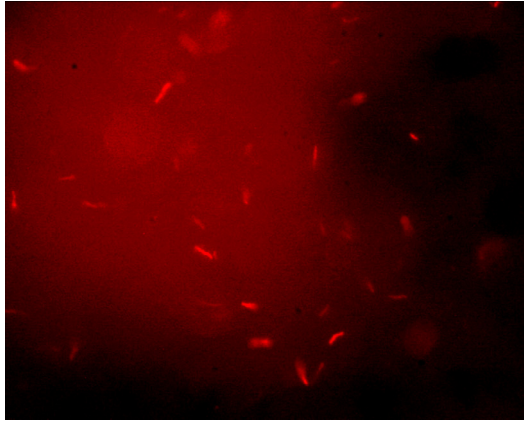


Figura 72. Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 mediante FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^6 células/g de heces empleando la sonda LDE23S (CY3)

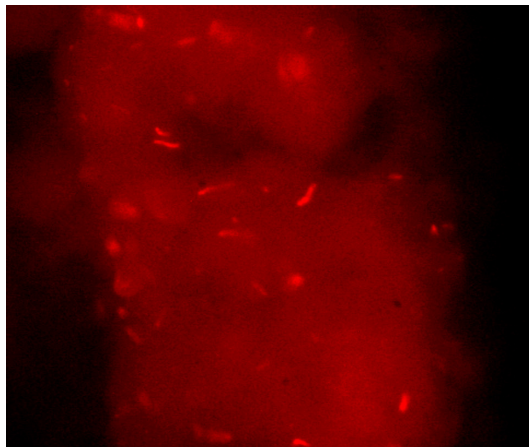


Figura 73. Detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 mediante FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^5 células/g de heces empleando la sonda LDE23S (CY3)

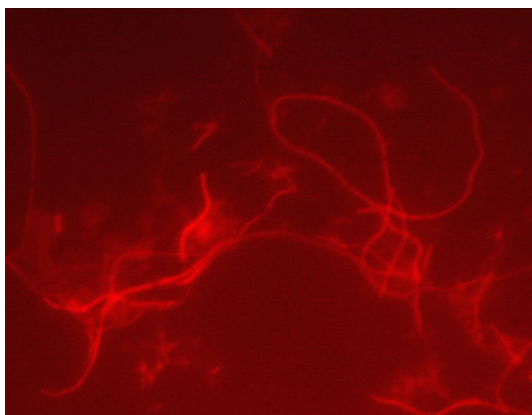


Figura 74. Detección de células viables y no viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 mediante DVC-FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^6 células/g de heces, empleando la sonda LDE23S (CY3)

5.1.2. Límite de detección de los métodos de cultivo en placa, PCR y DVC-FISH para la detección de *Streptococcus thermophilus* en heces inoculadas artificialmente

Se inocularon artificialmente heces para determinar el límite de detección de las distintas técnicas de detección de *S. thermophilus* STY7: cultivo en placa, PCR y DVC-FISH. Se realizaron ensayos utilizando cinco heces de diferentes individuos, todos ellos sin haber ingerido ningún producto lácteo fermentado durante las dos semanas anteriores a la recogida de muestra.

El cultivo en placa en todos los medios utilizados resultó no ser un método eficaz para la detección de *S. thermophilus* en heces debido a la falta de selectividad de los medios.

El límite de detección del método de PCR para la detección de *S. thermophilus* en heces inoculadas artificialmente fue de 1×10^4 u.f.c./g de heces en las cinco ocasiones que se realizó el ensayo. La figura 75 muestra el límite de detección de esta técnica. En un ensayo *in vivo* debería haber al menos 10^4 lactobacilos por gramo de heces para poder ser detectado mediante esta técnica aunque su detección no garantice su viabilidad.

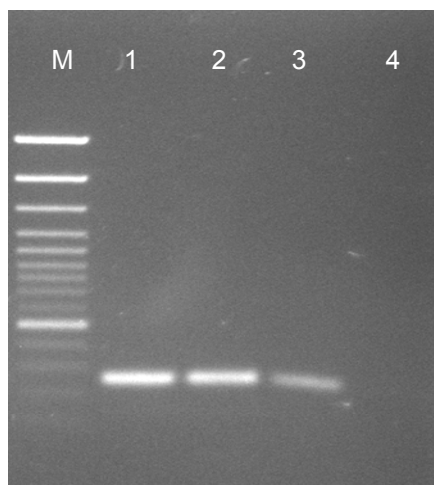


Figura 75. Límite de detección de la PCR de *S. thermophilus* STY7 en heces inoculadas artificialmente (1: 10^6 u.f.c/g; 2: 10^5 u.f.c./g; 3: 10^4 u.f.c./g; 4: 10^3 u.f.c./ M: marcador de pesos moleculares)

Se comprobó la especificidad del método FISH ya que se realizaron hibridaciones en heces sin inocular y se comprobó que no se producía hibridación alguna con la microbiota propia de las heces.

También se verificó que el método DVC-FISH para la detección de células viables de *S. thermophilus* desarrollado anteriormente era válido para emplearlo en esta matriz. En las cinco muestras del ensayo se comprobó que el límite de detección de esta técnica era de 10^4 , ya que se detectó hasta una concentración de 10^4 estreptococos inoculados por gramo de heces. Se diferenció entre bacterias viables y no viables por diferencia del diámetro celular como puede verse en las siguientes figuras.

En la siguiente tabla se recogen los límites de detección de las diferentes técnicas ensayadas.

Resultados

Tabla 45. Comparación de los límites de detección de las distintas técnicas para la detección de *Streptococcus thermophilus* en muestras de heces inoculadas en u.f.c./g de heces.

	Muestra heces 1	Muestra heces 2	Muestra heces 3	Muestra heces 4	Muestra heces 5
Cultivo	-	-	-	-	-
PCR	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4
DVC-FISH	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4

La figura 76 muestra la presencia de 10^4 u.f.c./g de heces, mediante la técnica FISH, mientras que la figura 77 muestra la capacidad de la técnica DVC-FISH para discriminar entre células viables y no viables de *Streptococcus thermophilus* en heces siempre y cuando haya una presencia mínima de 10^4 u.f.c./g en esas heces.

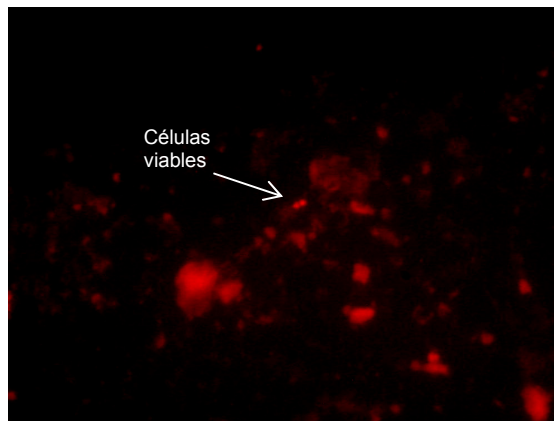


Figura 76. Detección de *Streptococcus thermophilus* STY7 mediante FISH en la dilución 10^4 empleando la sonda LDE23S (CY3)

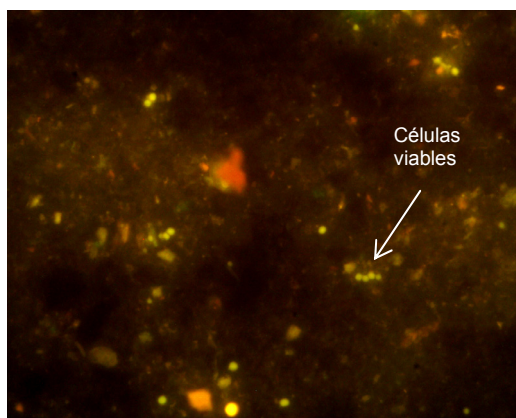


Figura 77. Detección y determinación de viabilidad de *Streptococcus thermophilus* STY7 mediante DVC-FISH en heces inoculadas artificialmente en cantidad de 10^5 células/g de heces, empleando la sonda LDE23S (FLUOS)

5.2. Estudio *in vivo* para determinar la supervivencia al tracto gastrointestinal de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* de un producto fermentado

Se analizaron un total de 30 muestras de heces de 30 individuos incluidos en el ensayo en cada una de las seis tomas de muestras según la forma descrita anteriormente en material y métodos.

Se emplearon las técnicas PCR seminested y DVC-FISH para la detección y recuento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDY7 y las técnicas PCR y DVC-FISH para la detección y recuento de *S. thermophilus* STY7.

5.2.1 Detección y recuento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces

Ninguna de las 180 muestras analizadas dieron reacción positiva tras su análisis mediante PCR seminested y DVC-FISH. No se detectaron ni células viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ni presencia de ADN. Podemos concluir por lo tanto que, o bien se encuentran en una cantidad inferior a nuestro límite de detección (10^4 u.f.c./g) o bien no son capaces de resistir el tránsito intestinal.

El análisis mediante DVC-FISH de las muestras de heces de la toma T4 tras introducir un paso previo de enriquecimiento no mejoró los resultados obtenidos ya

que, al no disponer de un medio lo suficientemente selectivo para esta bacteria, se incrementó toda la microbiota acompañante, enmascarando la visualización de las posibles células hibridadas mediante la sonda específica.

En el caso de la PCR no se realizó el paso previo de enriquecimiento puesto que la posible detección no nos garantizaría la viabilidad celular.

5.2.2. Análisis de las muestras de heces mediante PCR y DVC-FISH para la detección de *S. thermophilus* en heces

Se analizaron un total de 180 muestras, es decir 30 muestras de otros tantos individuos a lo largo del experimento en el que se recogieron seis tomas.

En la toma T1 no hubo detección alguna de *S. thermophilus*. En T2 hubo detección en el 6,7% y el 10% de las muestras mediante PCR y DVC-FISH respectivamente. El número de muestras positivas fue en aumento durante todo el periodo de ingesta. Así en T3 se detectó en un 13,3% por PCR y en un 23,3% por DVC-FISH. En T4 un 16,7% y en un 30% de las muestras fueron positivas, mediante PCR y DVC-FISH respectivamente. Ya en el periodo de post-administración hubo un descenso acusado en el número de muestras positivas. Así, en T5 únicamente hubo detección en un 6,7% mediante PCR y en un 10% mediante DVC-FISH. En T6 no se produjo detección positiva en ninguna de las muestras analizadas.

Las tablas 46, 47 y 48 muestran los resultados de los análisis de las muestras fecales para la detección de *S. thermophilus* mediante PCR y DVC-FISH.

Tabla 46. Análisis de muestras fecales de las tomas T1 y T2 para la detección de *Streptococcus thermophilus* mediante PCR seminested y DVC-FISH

MUESTRA	T1		T2	
	PCR SEMINESTED	DVC-FISH	PCR SEMINESTED	DVC-FISH
N.1	-	-	-	-
N.2	-	-	-	-
N.3	-	-	-	+
N.4	-	-	-	-
N.5	-	-	+	+
N.6	-	-	-	-
N.7	-	-	-	-
N.8	-	-	-	-
N.9	-	-	-	-
N.10	-	-	-	-
N.11	-	-	-	-
N.12	-	-	-	-
N.13	-	-	-	-
N.14	-	-	-	-
N.15	-	-	-	-
N.16	-	-	-	-
N.17	-	-	+	+
N.18	-	-	-	-
N.19	-	-	-	-
N.20	-	-	-	-
N.21	-	-	-	-
N.22	-	-	-	-
N.23	-	-	-	-
N.24	-	-	-	-
N.25	-	-	-	-

Resultados

N.26	-	-	-	-
N.27	-	-	-	-
N.28	-	-	-	-
N.29	-	-	-	-
N.30	-	-	-	-

Tabla 47. Análisis de muestras fecales de las tomas T3 y T4 para la detección de *Streptococcus thermophilus* mediante PCR seminested y DVC-FISH

MUESTRA	T3		T4	
	PCR SEMINESTED	DVC-FISH	PCR SEMINESTED	DVC-FISH
N.1	-	-	-	-
N.2	-	-	-	-
N.3	+	+	-	+
N.4	-	-	-	-
N.5	+	+	+	+
N.6	-	-	-	-
N.7	-	-	-	-
N.8	-	-	-	-
N.9	-	-	-	-
N.10	-	-	-	+
N.11	-	-	-	-
N.12	-	-	-	-
N.13	-	+	+	+
N.14	-	-	-	-
N.15	-	-	-	-
N.16	-	+	+	+
N.17	+	+	+	+
N.18	-	-	-	-
N.19	-	-	-	-
N.20	-	-	-	-

N.21	-	-	-	-
N.22	-	-	-	-
N.23	-	-	-	-
N.24	+	+	-	+
N.25	-	-	-	-
N.26	-	-	-	-
N.27	-	-	-	-
N.28	-	-	+	+
N.29	-	+	-	+
N.30	-	-	-	-

Tabla 48. Análisis de muestras fecales de las tomas T5 y T6 para la detección de *Streptococcus thermophilus* mediante PCR seminested y DVC-FISH

MUESTRA	T5		T6	
	PCR SEMINESTED	DVC-FISH	PCR SEMINESTED	DVC-FISH
N.1	-	-	-	-
N.2	-	-	-	-
N.3	-	-	-	-
N.4	-	-	-	-
N.5	+	+	-	-
N.6	-	-	-	-
N.7	-	-	-	-
N.8	-	-	-	-
N.9	-	-	-	-
N.10	-	-	-	-
N.11	-	-	-	-
N.12	-	-	-	-
N.13	-	-	-	-
N.14	-	-	-	-
N.15	-	-	-	-
N.16	+	+	-	-
N.17	-	+	-	-

Resultados

N.18	-	-	-	-
N.19	-	-	-	-
N.20	-	-	-	-
N.21	-	-	-	-
N.22	-	-	-	-
N.23	-	-	-	-
N.24	-	-	-	-
N.25	-	-	-	-
N.26	-	-	-	-
N.27	-	-	-	-
N.28	-	-	-	-
N.29	-	-	-	-
N.30	-	-	-	-

La figura 78 muestra varias PCRs con la banda de 259 pares de bases indicando la presencia de *Streptococcus thermophilus* en las muestras de heces.

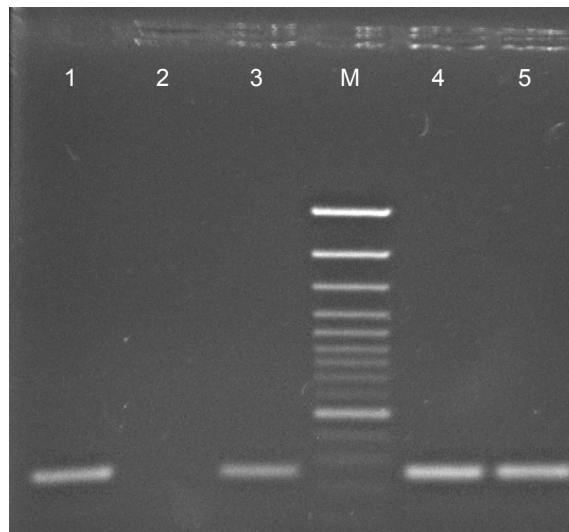


Figura 78. Detección de *S. thermophilus* STY7 en muestras de heces en T4 mediante PCR (1: N5T4; 2: N6T4; 3: N13T4; 4: N16T4; 5: N17T4; M: marcador de pesos moleculares)

Las figuras 79 y 80 muestran la detección de células viables y no viables de *Streptococcus thermophilus* mediante DVC-FISH en diferentes muestras de heces.

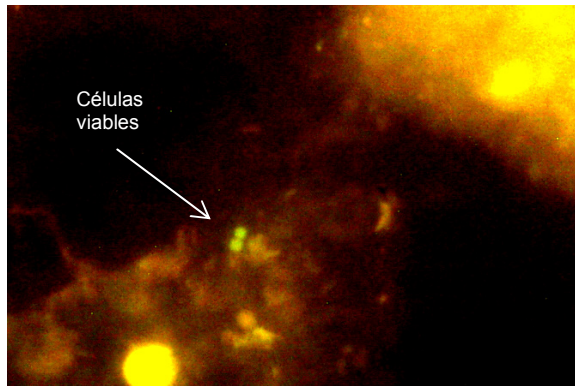


Figura 79. DVC-FISH mostrando células viables de *S. thermophilus* STY7 en muestras N5T4

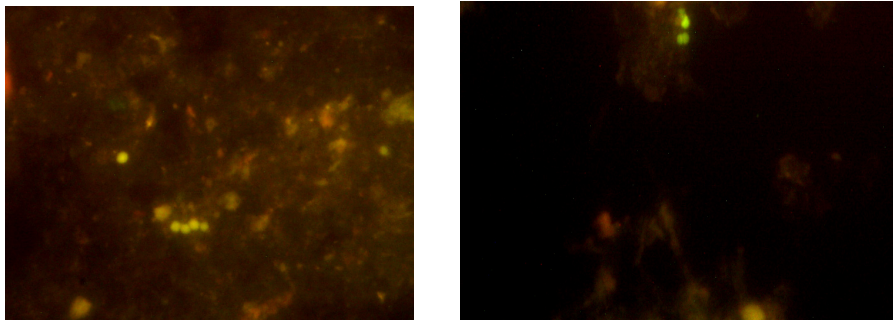


Figura 80. DVC-FISH mostrando células viables (derecha) y no viables (izquierda) de *S. thermophilus* STY7 en muestras N13T4

Los resultados del número *S. thermophilus* viables en las muestras en las que hubo detección vienen recogidos en las siguientes tablas, expresados como la media del recuento de 20 campos multiplicado por el factor de microscopio.

Tabla 49. Recuentos de células viables de *Streptococcus thermophilus* STY7 mediante DVC-FISH en diferentes individuos durante la toma de muestras

MUESTRA	Nº <i>Streptococcus thermophilus</i> viables por gramo de heces			
	T2	T3	T4	T5
3	4,2x10 ⁴	4,2x10 ⁴	4,6x10 ⁴	-
5	1,3x10 ⁴	1,3x10 ⁴	3,3x10 ⁴	2,8x10 ⁴
10	-	-	1,7x10 ⁴	-
13	2,6x10 ⁴	2,5x10 ⁴	4,4x10 ⁴	-
16	-	6,6x10 ⁴	3,5x10 ⁴	1,2x10 ⁴
17	-	1,9x10 ⁴	3,7x10 ⁴	1,6x10 ⁴
24	-	2,6x10 ⁴	2,1x10 ⁴	-
28	-	-	5,5x10 ⁴	-
29	-	3x10 ⁴	3,7x10 ⁴	-

El límite de detección de las técnica es de 10⁴ células por gramo de heces, por lo que en el resto de las muestras donde no se produjo detección, no podemos asegurar que no hayan células viables de *Streptococcus thermophilus* en las heces sino que hay menos de 10⁴ células por gramo de muestra.

6. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LAS HECES DE LAS PERSONAS SOMETIDAS AL ENSAYO *IN VIVO*

Se realizaron recuentos en placa en diferentes medios de cultivo para cada uno de los grupos de bacterias estudiados.

6.1. Recuentos de la población bacteriana presente en las heces a lo largo del ensayo

6.1.1. Recuentos de lactobacilos

En el anexo VII se muestra una tabla con los resultados obtenidos de los recuentos de lactobacilos en heces para los 30 individuos durante cada una de las tomas de muestras del ensayo.

El número de lactobacilos tras el periodo de no ingesta de productos lácteos fue de $5,15 \log_{10}$ u.f.c./g, expresado como el valor medio de los 30 individuos sometidos a ensayo. Se observó que desde la segunda semana de ingesta del producto lácteo (toma 2), los recuentos de lactobacilos aumentaban. De hecho, el porcentaje de individuos con una concentración de lactobacilos mayor de $6 \log_{10}$ u.f.c./g aumentó durante todo el periodo de ingesta (desde el 6,7% en T1 hasta el 33,3% en T2 tras 15 días de ingesta y el 60% en T4 tras las 4 semanas de ingesta).

El análisis ANOVA muestra que existen diferencias significativas ($F = 7,96$, $gl = 5,174$, $p < 0,05$) entre las medias de los recuentos de lactobacilos durante las diferentes tomas de muestras para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 50: análisis de varianza simple (ANOVA) para Lactobacilos según Tiempo (días)

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	22,752	5	4,55039	7,96	0,0000
Intra grupos	99,4777	174	0,571711		
Total (Corr.)	122,23	179			

Así pues, se observa que existe un aumento significativo de lactobacilos desde la segunda semana de ingesta del producto lácteo (T2). Este aumento podría sugerir la supervivencia de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* al tracto digestivo o bien un aumento de lactobacilos endógenos tras el consumo de yogur. Igualmente, se produce un descenso significativo tras la interrupción de la administración, entre las tomas de muestras T4 y T5. Los recuentos realizados durante el periodo post-administración (T5 y T6) muestran valores del número de lactobacilos en las heces (5,87 log₁₀ u.f.c./g y 5,49 log₁₀ u.f.c./g respectivamente) muy similares a los obtenidos tras dos semanas de ingesta, pero inferiores a los obtenidos tras la última semana de ingesta. Tras 3 semanas de no ingesta (T5), los recuentos de estos microorganismos descienden de forma significativa alcanzando valores similares a los iniciales.

Durante el periodo de consumo de yogur se detectó por lo tanto un importante aumento en el número de lactobacilos así como una lenta disminución de éstos tras la interrupción del consumo.

6.1.2. Recuentos de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos

En el anexo VII aparecen los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos anaerobios en heces, realizados en agar Wilkins-Chalgren a los 30 individuos durante cada una de las tomas de muestras del ensayo.

Tras el periodo control (T1), se encontraron valores medios oscilantes entre 7,87 y 10,11 log₁₀ u.f.c./g (media 9,36). Durante el periodo de ingesta, se obtuvieron valores entre 7,89 y 9,98 log₁₀ u.f.c./g (media 9,25), entre 7,64 y 10,32 log₁₀ u.f.c./g (media 9,14) y entre 7,81 y 10,15 log₁₀ u.f.c./g (media 9,22) en las tomas T2, T3 y T4 respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados revela que no existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos de microorganismos anaerobios totales obtenido en el periodo control, periodo de administración y post-administración ($F = 0,57$, $gl = 5$, 174 , $p > 0,05$).

Tabla 51: ANOVA para Anaerobios según Tiempo (días)

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,35605	5	0,27121	0,57	0,7207
Intra grupos	82,3744	174	0,473416		
Total (Corr.)	83,7305	179			

Por lo tanto, las comparaciones entre el número medio de anaerobios totales no revelan diferencias significativas entre los datos obtenidos en las diferentes tomas de muestras.

6.1.3. Recuentos de microorganismos aerobios

En la el anexo VII aparecen los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos aerobios en las heces de los 30 individuos durante cada una de las tomas de muestras del ensayo así como las medias y medianas de éstos.

Los valores medios obtenidos fueron 6,82 log₁₀ u.f.c./g, 6,85 log₁₀ u.f.c./g, 6,92 log₁₀ u.f.c./g, 6,98 log₁₀ u.f.c./g, 6,88 log₁₀ u.f.c./g y 6,87 log₁₀ u.f.c./g a T1, T2, T3, T4, T5 y T6 respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados revela que no existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos de microorganismos aerobios totales obtenido en el periodo control, periodo de administración y post-administración ($F = 0,75$, $gl = 5$, 174 , $p > 0,05$).

Tabla 52: ANOVA para Aerobios según Tiempo (días)

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,475476	5	0,0950952	0,75	0,5891
Intra grupos	22,1409	174	0,127246		
Total (Corr.)	22,6164	179			

6.1.4. Recuentos de bifidobacterias

En la el anexo VII aparecen los resultados obtenidos de los recuentos de bifidobacterias en heces de los individuos sometidos al ensayo a cada una de las tomas de muestras así como las medias y medianas de éstos.

Así, en el control T1, se encontraron valores medios oscilantes entre 7,95 y 9,58 \log_{10} u.f.c./g (media de 8.76), durante tomas T2, T3 y T4 valores medios de 8,84, 8,67 y 8,63 \log_{10} u.f.c./g respectivamente y durante T5 y T6, valores medios de 8,74 y 8,67 \log_{10} u.f.c./g. Los recuentos de bifidobacterias presentaron por lo tanto valores medios muy parecidos durante todas las tomas de muestras.

El análisis estadístico de los resultados revela que no existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos de bifidobacterias en las diferentes tomas de muestras durante el periodo control, periodo de administración y post-administración ($F = 0,84$, $gl = 5, 174$, $p > 0,05$).

Tabla 53: ANOVA para Bifidobacterias según Tiempo (días)

Análisis de la Varianza						
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
Entre grupos	0,835718	5	0,167144	0,84	0,5246	
Intra grupos	34,7164	174	0,19952			
Total (Corr.)	35,5521	179				

6.1.5. Recuentos de enterobacterias

En la el anexo VII aparecen los resultados obtenidos de los recuentos de enterobacterias de las heces de los individuos sometidos al ensayo a cada una de las tomas de muestras así como las medias y medianas de éstos.

Así, la población media de enterobacterias descendió de 6.85 \log_{10} u.f.c./g en el periodo control a 6,40, 6,26 y 6,24 \log_{10} u.f.c./g en las tomas T2, T3 y T4 del periodo de ingesta.

El análisis ANOVA muestra que existen diferencias significativas ($F = 22,26$, $gl = 5,174$, $p < 0,05$) entre las medias de los recuentos de enterobacterias durante las diferentes tomas de muestras para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 54: ANOVA para Enterobacterias según Tiempo (días)

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	24,4813	5	4,89626	22,26	0,0000
Intra grupos	38,269	174	0,219937		
Total (Corr.)	62,7504	179			

Los datos obtenidos demuestran que el número de enterobacterias disminuye de forma significativa durante las cuatro semanas que duró el periodo de ingesta. Igualmente, se produce un aumento estadísticamente significativo de esta población bacteriana cuando la ingesta de yogur natural cesa, alcanzándose valores medios de 6,84 y 6,96 \log_{10} u.f.c./g en T5 y T6 respectivamente.

DISCUSIÓN

Durante los últimos años el interés mostrado por la sociedad hacia los productos fermentados con cepas probióticas ha aumentado considerablemente. Se ha producido una cierta discrepancia entre diferentes líneas de investigación a la hora de afirmar los efectos beneficiosos del yogur tradicional. Algunas de ellas aseguran que sus bacterias no son capaces de sobrevivir al tracto gastrointestinal mientras que otras afirman lo contrario.

En la actualidad se discuten los efectos beneficiosos que puede tener el yogur tradicional sobre la salud. Durante la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios de investigación realizados por todo el mundo con el objeto de evaluar las propiedades de las leches fermentadas sobre el organismo. Lo que sí está claro es que las bacterias probióticas deben sobrevivir al tracto gastrointestinal en cantidad suficiente para poder ejercer sus efectos. En este contexto se planteó un estudio para evaluar los efectos beneficiosos de las bacterias del yogur tradicional.

Este trabajo se estructuró en varias partes. En la primera se realizó una caracterización de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* presentes en yogures naturales comerciales mediante su **aislamiento, identificación y caracterización molecular**. Se observó mediante recuento en placa que todos los productos analizados contenían alrededor 10^8 - 10^9 u.f.c. por gramo, cumpliendo la normativa legal vigente (R.D. 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur), que señala que un producto lácteo para denominarse yogur, debe contener, al menos 10^7 microorganismos vivos por gramo para poder ejercer su posible acción beneficiosa sobre la salud así como ser capaces de mantener todas sus características durante la vigencia legal del producto (28 días). En general se observó que los estreptococos predominan en la matriz del producto, encontrándose los lactobacilos en menor medida.

El análisis de productos fermentados se realiza habitualmente mediante técnicas de recuento en placa, pero en realidad no existe un medio sintético lo suficientemente eficaz y selectivo para el aislamiento de BAL en matrices más complejas como por ejemplo las heces. Las técnicas moleculares permiten la detección y caracterización de bacterias en este tipo de matrices y, por ello, se decidió poner a punto diferentes metodologías.

En primer lugar se pusieron a punto dos protocolos de detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* mediante

FISH. La técnica FISH permite la visualización, identificación, enumeración y localización simultánea de células microbianas (Amman *et al.*, 1995). Además, esta técnica presenta la ventaja frente a la PCR (que no proporciona información sobre la morfología o la distribución espacial de los microorganismos) de ser capaz de discernir entre diferentes morfologías de la misma bacteria.

En la puesta a punto de la técnica FISH para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se diseñó, en primer lugar, una sonda complementaria del gen 16S de ARNr, altamente conservado y clave para establecer relaciones filogenéticas entre distintos organismos (Ludwig & Schleifer, 1994).

Los análisis de especificidad mostraron que la sonda era completamente específica para esta bacteria. Sin embargo, no se pudo obtener una buena señal de fluorescencia a ninguna de las concentraciones de formamida testadas (del 0% hasta el 40%). Las formas bacilares de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* producían señal fluorescente al hibridar con la sonda LDE16S, aunque de intensidad muy baja. Se evaluó entonces la accesibilidad de la sonda LDE16S al ARN ribosómico. Su estructura secundaria (puede verse en la figura 25 del apartado 1.3.1 de resultados), muestra una clasificación de las zonas del ARNr en función de la accesibilidad de las sondas, de forma que las zonas de clase I, serían las más accesibles, entre un 81 y 100% y las zonas de clase VI serían las menos accesibles, entre un 0% y un 5%. La sonda LDE16S hibridaría en una zona de clase V con una accesibilidad entre el 6 y el 20% (se encuentra entre los pares de bases 83 y 100) por lo que no sería una buena sonda de hibridación, a pesar de ser totalmente específica para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Se diseñó entonces una sonda complementaria del gen 23S del ARNr de esta misma bacteria. Se comprobó su total especificidad frente a una batería de BAL. En este caso la señal fluorescente fue muy alta con una concentración de formamida del 20%. Se evaluó también su accesibilidad al ARN ribosómico. Según la estructura secundaria del 23S (Fuchs *et al.*, 2001), se comprobó que esta sonda hibridaba en una zona de clase I, con una accesibilidad entre el 81% y el 100%, lo que explicaría la buena señal de fluorescencia emitida. Un tiempo de incubación de dos horas fue suficiente para obtener buena señal de fluorescencia. Pese a la correcta hibridación de la sonda con la cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislada del producto Y7 (que se utilizaría en los posteriores estudios de supervivencia), se decidió secuenciar el gen 23S de ésta (cuya secuencia parcial aparece en el anexo VI) para asegurar el alineamiento total de la secuencia. Se

comprobó que había una base, justo en la zona de alineamiento, que variaba respecto a la sonda, diferenciándose de la secuencia del resto de cepas. Por ello, se decidió diseñar una sonda específica para esta cepa (LDE23R) que sirviera para su detección en los posteriores estudios *in vivo*, para intentar que hibridara completamente con esta cepa en condiciones altamente específicas a altas concentraciones de formamida.

Para la detección de *S. thermophilus* mediante FISH, se diseñó una sonda complementaria del gen 23S. Los análisis de especificidad frente a una batería de cepas mostraron que la sonda era completamente específica para esta bacteria. La señal de fluorescencia fue muy alta con una concentración de formamida del 20%.

Al igual que el método de recuento en placa, el recuento de lactobacilos y estreptococos presentes en los diferentes productos comerciales analizados mediante hibridación con sondas específicas (FISH) también resultó apropiado. Los recuentos de BAL mediante FISH fueron del mismo orden aunque algo más elevados. Ésto podría deberse a la presencia de bacterias viables no cultivables que no son capaces de crecer en los medios sólidos (como señalan los estudios de Auty *et al.*, 2001 y Moreno *et al.*, 2005.), o a que necesitan un tiempo mayor para crecer. Se puede afirmar que el método FISH para realizar recuentos, además de ser más rápido, es ligeramente más efectivo que el método tradicional de recuento en placa (Moreno *et al.* 2005).

Una vez aisladas e identificadas las BAL, se decidió caracterizarlas con la finalidad de encontrar diferencias entre las distintas marcas. Se empleó la técnica **RAPDs** (Random amplified Polymorphic DNA) como técnica de genotipado para obtener una diferenciación intraespecífica a nivel de cepa de las BAL aisladas, puesto que se desconocían sus secuencias y se trata de una técnica que emplea iniciadores aleatorios.

Después del análisis numérico de los perfiles obtenidos se obtuvieron dendrogramas que mostraron importantes diferencias entre las cepas de algunos productos mientras que la homología entre las cepas de otros resultó del 100%. La caracterización a este nivel es importante ya que muchos de los efectos beneficiosos que estas bacterias ejercen en la salud humana no pueden atribuirse de una forma extendida a un género y/o especie, siendo en ocasiones dependientes de cada cepa. Por esta razón, es muy importante encontrar una técnica óptima con el fin de asociar un efecto específico a una cepa concreta para poder llevar a cabo las investigaciones necesarias en diferentes estudios tecnológicos, clínicos y

epidemiológicos. Por consiguiente, la técnica RAPDs es una técnica rápida y sencilla que nos proporciona una herramienta adecuada para la identificación y caracterización de estas bacterias lácticas.

Los RAPDs se realizaron aplicando dos iniciadores diferentes denominados RAPD1 y RAPD2, siendo RAPD2 el que aportó mayor nivel de diferenciación puesto que se obtuvieron siete perfiles diferentes de lactobacilos y cinco de estreptococos. En cuanto a las cepas del producto Y7, el lactobacilo presentó un perfil único, por lo que podemos decir que esta casa comercial tiene una cepa que presenta claras diferencias genéticas con el resto de las cepas estudiadas. En cambio el estreptococo compartió perfil con la cepa de la casa comercial Y9.

La detección e identificación bacteriana en matrices complejas mediante **PCR** depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores utilizados en la reacción de amplificación. Es importante el empleo de una amplia batería de bacterias pertenecientes a diferentes géneros, cercanos y lejanos filogenéticamente, o que pudieran estar presentes en las muestras donde se pretende aplicar la metodología, para realizar los estudios de especificidad.

Para la puesta a punto del método por PCR para la detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se recurrió en primer lugar a los iniciadores diseñados por Lick *et al.* (2001). Se observó que la reacción de PCR no era específica para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ya que también resultó ser positiva para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Esta reacción de PCR de detección a nivel de especie no sería del todo apropiada para una posible detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en heces en un estudio *in vivo* ya que las subespecies *lactis* y *delbrueckii*, pese a no ser endógenas, podrían formar parte de la microbiota intestinal por alguna circunstancia y, por lo tanto, obtener falsos positivos debido a su detección.

Se decidió entonces utilizar los iniciadores diseñados también por Lick *et al.* (2001) para la detección de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante PCR seminested. Esta reacción resultó totalmente específica para esta bacteria cuando se ensayó frente a una batería de BAL.

En la puesta a punto de la PCR para la detección de *Streptococcus thermophilus* se utilizó el protocolo descrito por Timisjärvi y Alatosawa en 1996. Éste resultó específico para esta bacteria al ensayar esta reacción frente a otras bacterias que pudieran dar falsos positivos en el futuro estudio *in vivo*.

Se puso a punto posteriormente la técnica **DVC-FISH** ya que, para poder demostrar que las BAL del yogur ejercen sus efectos beneficiosos, no basta con la detección de las moléculas de ADN o ARN en las heces, sino que es necesario determinar la viabilidad celular. Por lo tanto, esta parte del trabajo consistió en el desarrollo de una nueva metodología que permitiera la detección de células viables, discriminándolas de las formas celulares muertas.

El estado viable pero no cultivable (VNC) es un mecanismo de supervivencia adoptado por muchas bacterias cuando se exponen a condiciones adversas medioambientales (como pudieran ser las heces humanas). En este estado las bacterias pierden la capacidad para crecer en medios de cultivo, se hacen más resistentes a condiciones ambientales hostiles (Wong y Wang, 2004), mantienen la viabilidad y algunas veces son capaces de revertir a su estado normal restableciendo sus condiciones normales de crecimiento (Kell *et al.*, 1998). El desarrollo y aplicación de la técnica del Direct Viable Count (DVC) y los primeros ensayos para la utilización del ARNm como indicador de viabilidad abren nuevas puertas en la detección de este estado fisiológico.

En el procedimiento del DVC, las bacterias deben ser incubadas en un caldo con una concentración óptima de antibiótico que inhiba la replicación celular pero que permita otras vías de síntesis para sobrevivir (Buchrieser and Kaspar, 1993). Por tanto, en estas condiciones las bacterias viables continúan metabolizando nutrientes y se elongan en el caso de ser bacilos o aumentan su tamaño en el caso de los cocos, pero no se replican.

Además, la incubación de una bacteria con un antibiótico que inhiba la ADN girasa produciría un aumento de la cantidad de ARN ribosómico en la célula y, por lo tanto, un teórico aumento de la intensidad de la señal de fluorescencia.

El método DVC combinado con la técnica FISH se presentaría como un método eficaz para detectar las células viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*. Así pues, se decidió ponerlo a punto por primera vez para BAL.

En este estudio se emplearon 4 antibióticos para la evaluación del método DVC, de acuerdo con trabajos previos (Besnard *et al.*, 2000; Guyard *et al.*, 1999; Jous and LeBaron, 1997). Puesto que el tiempo óptimo de incubación para la elongación celular depende de la tasa de crecimiento, se evaluaron distintos tiempos de incubación para cada concentración de antibiótico.

Discusión

En la puesta a punto del DVC para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ni el ácido pipemídico ni el ácido nalidíxico fueron efectivos a ninguna de las concentraciones ni tiempos de incubación. El agente antimicrobiano ciprofloxacino tampoco resultó suficientemente efectivo a las concentraciones y tiempos ensayados.

El tratamiento con novobiocina generó una elongación significativa de las células viables en comparación con las células no tratadas. A las concentraciones de 10 y 100 µg/ml y tras 7 y 24 horas de incubación se observaron bacterias que alcanzaban hasta 59 µm de largo, lo que quintuplicaría el tamaño de las células control. Fue a una concentración de 10 µg/ml y tras 7 y 24 horas de incubación cuando se produjo la mayor elongación, alcanzándose tamaños celulares de hasta 56 y 59 µm de longitud respectivamente. Sin embargo, a la concentración de 100 µg/ml, pese a ser efectivo a la hora de elongar las células, se constató que el número total de bacterias presentes se reducía considerablemente, como si el efecto del antibiótico a esa concentración fuera capaz de lisar las células. Este efecto no se produjo a la concentración de 10 µg/ml. Además, los recuentos en placa mostraron que el número de *Lactobacillus* en el matraz control, sin antibiótico, aumentaron tras la incubación, mientras que el recuento de células tras el tratamiento con novobiocina permaneció constante. De acuerdo con otros autores (Besnard *et al.*, 2000; Buchrieser *et al.*, 1993), consideraron como células viables aquellas que se elongaron al menos dos veces respecto al tamaño original, aunque en nuestro caso las células presentaban un mayor tamaño.

Por todo ello, se decidió considerar la novobiocina, a la concentración de 10 µg/ml y durante 7 horas como el antibiótico adecuado para la realización del DVC puesto que además de producir una elongación considerable de las células viables no produjo ningún efecto de lisado en éstas.

En la puesta a punto del DVC para *S. thermophilus*, ni el ácido pipemídico ni el ácido nalidíxico ni el ciprofloxacino resultaron apropiados, ya que a ninguna de las concentraciones ensayadas se observó un aumento significativo del tamaño celular. El antibiótico novobiocina resultó ser el antibiótico más efectivo para *S. thermophilus* como inhibidor de la ADN-girasa. La concentración y el tiempo de incubación óptimos fueron de 10 µg/ml y 7 horas respectivamente. Antes del ensayo, *S. thermophilus* tenía un diámetro celular de hasta 0,8 µm. Tras 7 horas de tratamiento con novobiocina a una concentración de 10 µg/ml, el diámetro de algunas células alcanzó los 2,3 µm. Del mismo modo, a las 24 horas también se detectaron células

viabiles de 2,2 μm pero se eligió un tratamiento de 7 horas para minimizar el tiempo del proceso así como el tiempo de contacto con el antibiótico. El resto de tiempos y concentraciones evaluadas no modificaron significativamente el diámetro original. Además de un importante aumento del tamaño celular se observó también un incremento significativo en la fluorescencia de las células viables frente a las no viables. Este aumento en la fluorescencia también puede considerarse como un factor de viabilidad puesto que las células vivas son capaces de sintetizar más ribosomas, aunque en nuestro caso no fuera posible cuantificarlo.

La utilización de la novobiocina a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y durante 7 horas de tratamiento como antibiótico para la realización del DVC-FISH permite discriminar entre células vivas y muertas tanto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como para *S. thermophilus*. Además este antibiótico no reduce el número de células totales por lo que podemos considerar los recuentos de células como reales.

Algunos estudios han utilizado el método DVC-FISH para la detección de células viables de *Escherichia coli* (Villarino *et al.*, 2000), para la enumeración directa de células viables de la familia *Enterobacteriaceae* en agua dulce y agua potable tras una filtración por membrana (Baudart *et al.* 2002) y para la detección específica de las células viables de patógenos como *Helicobacter pylori* en matrices complejas (Piqueres *et al.*, 2006) pero nunca se ha utilizado para el estudio de la viabilidad celular de bacterias lácticas.

La técnica DVC-FISH permitiría realizar los recuentos en matrices que no fueran aptas para recuentos en placa como, por ejemplo, en heces humanas donde el contenido de otras especies bacterianas es muy elevado, pudiendo conducir a errores importantes a la hora de cuantificar.

El método del DVC-FISH se presenta como un método novedoso, rápido y apropiado para la enumeración total de BAL, si bien es cierto que, en el caso de los lactobacilos, resulta más sencillo discriminar entre células viables y no viables por longitud, puesto que medir el diámetro de los estreptococos es más complicado.

Una vez puesta a punto la técnica, se decidió aplicar el método para el estudio de la **viabilidad de estas BAL frente a los jugos gastrointestinales**, ya que, un microorganismo probiótico efectivo debe (además de otras características) presentar un elevado porcentaje de células viables, ser capaz de sobrevivir a la microbiota intestinal y permanecer viables durante su almacenamiento en refrigeración.

Diversos estudios científicos, han investigado la viabilidad de las bacterias lácticas en distintos productos usando las técnicas tradicionales de recuento en medios selectivos (Nighswonger *et al.*, 1996; Shing *et al.*, 2000). Las principales barreras e impedimentos para la supervivencia de las BAL durante el tránsito gastrointestinal son el ambiente ácido del estómago y los efectos inhibitorios de las sales biliares secretadas en el duodeno. La metodología *in vitro* que simula el tránsito a través del tracto gastrointestinal (según Charteris *et al.*, 1998) ha sido empleada para la selección de cepas probióticas en diversas ocasiones (De Champs *et al.*, 2003). En 1998, Charteris *et al.* desarrollaron y aplicaron una metodología *in vitro* para determinar la tolerancia al tránsito gastrointestinal de las especies probióticas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la parte superior del tracto gastrointestinal humano. Se estudió también el efecto sobre la tolerancia al tránsito mediante la adición de proteínas lácteas, de mucina gástrica del cerdo y de inhibidores de tripsina-cimotripsina. La mayoría de las muestras perdieron más del 90% de viabilidad durante la simulación del tránsito gástrico. Sólo *Lactobacillus fermentum* se pudo considerar intrínsecamente resistente. La adición de proteínas lácteas solas o combinadas generalmente mejoró la tolerancia al tránsito gástrico. En general, la adición de mucina gástrica no influyó a la tolerancia gástrica de los lactobacilos, pero tendió a aumentar la de las bifidobacterias. Este tipo de estudio de supervivencia es, por tanto, de gran interés para averiguar si éstas pueden sobrevivir al tránsito gastrointestinal.

En la elaboración de productos probióticos, es necesaria la selección de cepas resistentes sobre todo al choque ácido. Por ello, y por las diferencias en la tolerancia a condiciones ácidas, la cantidad de inóculo inicial de las cepas en un producto debería variar en función de la cepa seleccionada ya que, aunque el contenido fuera el reglamentario, si la cepa es sensible no llegará a su lugar de acción en número adecuado.

Se realizó por tanto un estudio *in vitro* de supervivencia frente a los jugos gastrointestinales de las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* contenidas en un yogur natural de una importante marca comercial. En nuestro ensayo ambas cepas resultaron más sensibles a los jugos gástricos que a los intestinales. Los resultados mostraron que el paso de estas bacterias por la cavidad gástrica es crítico para que éstas puedan llegar al colon en número suficiente y ejercer sus efectos beneficiosos y, por tanto, deben de tratarse de cepas intrínsecamente tolerantes a estos ácidos.

La técnica del DVC-FISH resultó adecuada para el estudio de supervivencia *in vitro* de BAL. Además, los resultados mediante esta técnica pueden obtenerse en menos de un día, mientras que las técnicas tradicionales de cultivo tardan entre dos y tres días. La utilización de la novobiocina como antibiótico para la realización del DVC-FISH a la concentración y el tiempo adecuados permitió discriminar entre células vivas y muertas tanto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como para *S. thermophilus* así como realizar recuentos de éstas.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* contenidas en el yogur comercial utilizado son tolerantes en una cantidad aceptable, tanto a la pepsina como a la pancreatina y, por tanto, podrían atravesar el tracto digestivo. Su tolerancia a los jugos intestinales, indica que podría colonizar el epitelio intestinal y ejercer sus efectos como probióticos. Además, según diversos autores (Charteris *et al.*, 1997; Huang y Adams, 2004), la presencia de ingredientes alimenticios o los propios alimentos, podrían ejercer de protección de los microorganismos probióticos durante su tránsito gastrointestinal cuando son consumidos a través de productos alimenticios, aumentando de este modo la viabilidad de los mismos frente a condiciones gastrointestinales.

Ambas cepas mostraron una tolerancia moderada a la pepsina durante su tránsito simulado a través del estómago (pH 2.0) siendo el porcentaje de bacterias viables del 29,6% y del 10,9% para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente. El número de lactobacilos y de estreptococos capaz de llegar vivos al intestino es de $1,36 \times 10^7$ y $9,7 \times 10^7$ células por gramo de yogur, respectivamente.

La tolerancia al tránsito intestinal es importante para que las cepas probióticas puedan colonizar el intestino. Las cepas utilizadas en este estudio demostraron su elevada capacidad de resistencia frente a las condiciones intestinales, ya que no presentaron pérdidas de viabilidad significativas tras exposición durante 360 minutos a la pancreatina. Un 88,7% de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y un 84,6% de *S. thermophilus* fueron capaces de sobrevivir al tránsito intestinal. En consecuencia, la cantidad de bacterias capaces de sobrevivir a todo tracto gastrointestinal es de $1,2 \times 10^7$ lactobacilos/gramo de yogur y de $8,2 \times 10^7$ estreptococos/gramo de yogur.

En este estudio se ha demostrado que la viabilidad de las cepas de BAL contenidas en el yogur natural comercial objeto del posterior ensayo *in vivo* se ve

afectada de forma importante aunque no definitiva por la acción de los jugos gastrointestinales, teniendo una supervivencia final del 26,25% para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y del 9,22% para *Streptococcus thermophilus*. Esta cantidad será, en consecuencia, el porcentaje de células resistentes que podría sobrevivir al tránsito gastrointestinal y llegar vivas al final del intestino para ejercer su efecto beneficioso. Según bibliografía sería suficiente para ejercer efectos beneficiosos para la salud.

El método DVC-FISH además de efectivo para la determinación de la viabilidad celular de los microorganismos del yogur, ha resultado eficaz para estudiar la resistencia de estas bacterias frente a los jugos gastrointestinales, puesto que ha permitido realizar recuentos de forma rápida y específica de las células viables y no viables en diferentes momentos del ensayo.

De acuerdo con los conceptos científicos actuales, los microorganismos se consideran probióticos si se puede obtener un efecto fisiológico beneficioso del consumo de cultivos vivos y si el beneficio ha sido apoyado de forma adecuada con estudios en humanos (Guarner *et al.*, 2005). Por ello, la **supervivencia a su paso a través del tracto gastrointestinal**, está generalmente considerada como una característica clave para que los probióticos ejerzan los esperados efectos sobre la salud (Bezkorovainy, 2001).

Además, cada vez está más aceptado que la forma en que las bacterias son administradas es decisiva para su supervivencia y que, en función del sustrato que las acompaña, pueden verse más o menos protegidas de factores como por ejemplo la acidez (Bouhnik, 1993; Conway *et al.*, 1987; Drouault, 1999; Klaenhammer, 1998; Pochart *et al.* 1989). Conway *et al.* (1987), estudiaron la viabilidad *in vitro* de algunas BAL al ser expuestas al jugo gástrico así como los efectos de un aditivo como la leche, tanto en la supervivencia como en la adhesión. Demostraron que, al incorporar la leche, ambas características (supervivencia y capacidad de adhesión) mejoraron para todas las cepas.

Dos años después, Pochart *et al.* (1989), se propusieron investigar la supervivencia de un cultivo iniciador, así como la actividad de la β -galactosidasa del yogur tras atravesar el estómago y detectar cualquier digestión de la lactosa por las enzimas bacterianas en el duodeno. Para ello, entubaron a diez personas con problemas de absorción de lactosa y se les suministró yogur fresco, a los que les añadieron polietilenglicol y esporas de *Bacillus stearothermophilus*, como patrones

internos. Los datos obtenidos demostraron que, tras la ingesta de yogur fresco, el cultivo iniciador alcanza el duodeno en su forma viable y presenta actividad β -galactosidasa. Sin embargo, la capacidad tamponante del yogur que permite la protección de las bacterias lácticas de la secreción ácida del estómago, también reduce la hidrólisis de la lactosa en el duodeno por la β -galactosidasa.

En 1998, Charteris *et al.* concluyeron que las proteínas lácteas y la mucina podrían funcionar como agentes tamponantes e inhibidores de la actividad proteasa digestiva, protegiendo las cepas bacterianas ingeridas durante el tránsito gastrointestinal.

Los estudios de viabilidad han cobrado, por tanto, gran importancia, apareciendo entre ellos muchas discrepancias. Conway *et al.* (1987), estudiaron tanto *in vitro* como *in vivo*, la supervivencia de cuatro cepas de bacterias lácticas (dos de *Lactobacillus acidophilus*, una de *Lactobacillus bulgaricus*, y otra de *Streptococcus thermophilus*) al ser expuestas al jugo gástrico humano y su adhesión a células intestinales de humanos y de cerdos. La capacidad de sobrevivir al ácido gástrico y de adherirse a las células varió de forma significativa en función de las cepas. Así, *L. acidophilus* sobrevivió y se adhirió mejor que el resto, mientras que *S. thermophilus* sobrevivió y se adhirió muy poco. Tanto la supervivencia como la capacidad de adhesión mejoraron al incorporar estas bacterias junto a leche.

En lo relacionado con la recuperación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en muestras fecales tras la ingesta de yogur, se han llevado a cabo estudios contradictorios. Algunos de ellos afirman que estas BAL son capaces de sobrevivir en mayor o menor medida al tracto gastrointestinal.

Aunque algunos autores como Lick *et al.* (2001) han defendido que los recuentos en heces para estudiar la supervivencia de bacterias administradas no refleja verazmente la supervivencia durante el tránsito intestinal, por lo general, la mayoría de estudios, sobre todo en humanos se realiza mediante el análisis de éstas. En su estudio, Lick *et al.* (2001) alimentaron a cerdos con yogur que contenía *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vivos. Tras la ingesta se tomaron muestras detectándose ambos microorganismos con vida en números de entre 10^6 y 10^7 por gramo de contenido intestinal en todos los animales de la investigación.

Drouault *et al.* (2002), investigaron si *S. thermophilus* era capaz de producir una β -galactosidasa activa durante el tránsito por el tracto digestivo que reducía el

contenido de lactosa. Este hecho reforzaba la observación de que esta bacteria del yogur debía estar viva para ayudar a que se produjera la digestión de la lactosa (Marteau *et al.*, 1990; Rizkalla *et al.*, 2000). De hecho, estos datos sugieren que esta bacteria láctica del yogur no sólo no está muerta en el tracto digestivo, sino que además es capaz de responder a los estímulos de la dieta y mantener la síntesis de nuevas proteínas para adaptarse a las condiciones ambientales. En el yogur, *Streptococcus thermophilus* contiene una β -galactosidasa que es activa en el tracto digestivo de ratones libres de gérmenes (Drouault *et al.* 2002), mientras que *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* no dispone de ella (Pochart *et al.*, 1989). Esto sugiere que *Streptococcus thermophilus* sobrevive al tránsito gastrointestinal, resultado similar al obtenido en nuestro estudio, como se verá más adelante

Por su parte, Brigidi *et al.* (2003), llevaron a cabo un estudio para estudiar la supervivencia de *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis* Y1 y *Bifidobacterium breve* Y8, al tracto gastrointestinal. La persistencia intestinal de *S. thermophilus* fue estudiada en las heces de diez individuos sanos que consumieron durante diez días una dieta sin yogur y durante los siguientes diez días recibieron una dieta con 250 g diarios de yogur. A partir del tercer día de consumo, se pudo identificar *S. thermophilus* en las muestras fecales de estos sujetos en una cantidad de 5×10^5 ufc/g. Cuando se dejó de administrar el yogur disminuyó la presencia de *S. thermophilus* en las muestras fecales.

Posteriormente, Mater *et al.* (2005) recogieron 39 muestras de 13 sujetos sanos a lo largo de un periodo de 12 días de ingesta de yogur y de ellas, 32 contenían *S. thermophilus* vivos (con un valor medio de $6,3 \times 10^4$ UFC por gramo de heces) y 37 contenían *L. delbrueckii* (con un valor medio de $7,2 \times 10^4$ UFC por gramo de heces), demostrando con ello que un número importante de bacterias del yogur es capaz de sobrevivir al tránsito gastrointestinal.

Recientemente, Elli *et al.*, (2006) investigaron si *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* podían ser recuperadas tras su paso por el intestino humano, alimentando a 20 voluntarios sanos con yogur comercial durante una semana. Sólo se recuperó por cultivo *Streptococcus thermophilus* en uno de los voluntarios en el día 7, no pudiendo excluir la posibilidad de que una ingesta más prolongada o una mayor cantidad ingerida de yogur tal y como describieron Mater *et al.* 2005, pudiese afectar positivamente a la tasa de recuperación del microorganismo de muestras fecales. Sí pudieron, sin embargo,

confirmar la presencia de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* viables en las heces, apareciendo en las muestras de seis de los diez voluntarios desde el segundo día del experimento y aumentando el número hasta siete positivos el último día de ingesta. Como conclusión, los autores afirmaron que las bacterias del yogur pueden sobrevivir al tracto intestinal.

Alvaro *et al.* (2007), compararon la composición y el metabolismo de la microbiota fecal de personas que habitualmente consumían al menos 200 gramos de yogur al día y de otros que no consumían yogur. En un 73% de las muestras fecales de los consumidores de yogur se identificó *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Además, durante el estudio, la actividad de la β -galactosidasa en las heces aumentó de forma significativa para los consumidores de yogur y exhibía una correlación positiva con la cantidad de yogur consumida dentro de este grupo.

En contraposición, los trabajos de Gilliland (1979 y 1989), Pedrosa *et al.* (1995), Marteau *et al.* (1997), García de los Ríos *et al.*, (2003) Yuste *et al.* (2003) y Del campo *et al.* (2005) afirman que las bacterias lácticas del yogur no son capaces de sobrevivir al tracto gastrointestinal.

En nuestro trabajo se pusieron a punto diversos métodos de detección y de viabilidad de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* en heces y se estudiaron sus respectivos límites de detección. Así pues, el límite de detección de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* mediante PCR resultó de 10^4 lactobacilos por gramo de heces. Aún así su detección no garantizaría su viabilidad puesto que las baterías podrían no ser viables y ser detectadas mediante esta técnica por presencia del ADN en la matriz. El límite de detección de la técnica DVC-FISH para la detección de esta bacteria en las heces también fue de 10^4 lactobacilos por gramo de heces. Esta técnica proporciona una reducción en el tiempo de detección con respecto a la PCR ya se puede realizar en el mismo día de recogida, lo que supone un importante ahorro de tiempo. Hasta el momento no se había realizado ningún estudio de supervivencia de BAL aplicando el método DVC-FISH.

En nuestro **estudio *in vivo* de detección y supervivencia de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus***, tras el análisis de las muestras, no se consiguió detectar la presencia de esta bacteria en ninguna de las 180 muestras analizadas mediante las técnicas utilizadas. Siendo el límite de detección de 10^4 lactobacilos por gramo de heces, tanto para la PCR como para el DVC-FISH, se puede concluir que,

o bien esta bacteria se encuentra en una cantidad inferior al límite de detección de estas técnicas, o bien no son capaces de sobrevivir el tránsito gastrointestinal.

Similares resultados fueron obtenidos por diversos autores.

Gilliland (1979), tras comparar la resistencia a la acidez gástrica de muchas especies, llegó a la conclusión de que *L. bulgaricus* no podría sobrevivir a la primera hora de exposición. Posteriormente, en 1989, el mismo autor hizo una revisión acerca de los potenciales beneficios para los consumidores de los productos lácteos con *Lactobacillus acidophilus* concluyendo nuevamente que las bacterias del yogur no sobrevivirían ni crecerían en el tracto intestinal por su falta de resistencia a la bilis.

Pedrosa *et al.* (1995) diseñaron un estudio para investigar la supervivencia de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en el estómago y el intestino delgado de ancianos con gastritis atrófica y de ancianos con una función secretora gástrica normal, tras ingerir yogur en una pequeña cantidad de leche conteniendo exclusivamente *Lactobacillus gasseri* vivos diariamente. No se recuperaron ni *S. thermophilus* ni *L. bulgaricus* del estómago o el intestino delgado de sujetos alimentados con yogur o yogur pasteurizado, si bien se demostró que bacterias como *Lactobacillus gasseri* pueden sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal.

Poco después, Marteau *et al.* (1997), validaron un modelo predictivo del estómago y del intestino delgado que habían desarrollado en un estudio anterior para cuantificar la supervivencia de bacterias ácido lácticas y para evaluar la influencia de las secreciones gastrointestinales. Al aplicarlo, se encontró que incluso para las especies más sensibles a la acidez como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, una fracción relativamente elevada de bacterias ingeridas fue capaz de alcanzar el duodeno con vida (26 y 12 %, respectivamente). Esto sucedió principalmente durante los primeros 20 a 30 minutos tras la comida. Sin embargo, tras un tiempo de digestión entre 70 y 110 minutos, este porcentaje se reducía al 1% aproximadamente. Tras el paso a través del intestino delgado, la supervivencia se redujo drásticamente.

Por su parte, García de los Ríos *et al.*, (2003) iniciaron un trabajo con el objetivo de analizar la composición de la microbiota y la supervivencia de los microorganismos del yogur en animales alimentados con una dosis normal de yogur

fresco y de yogur termizado. El análisis estadístico de los resultados no mostró diferencias significativas en la microbiota intestinal de los diferentes grupos de animales.

Ese mismo año, Yuste *et al.* analizaron el comportamiento de las bacterias del yogur en el tracto gastrointestinal. Para ello, estudiaron a 114 sujetos sanos que recibieron alternativamente yogur tradicional y yogur pasteurizado durante 15 días continuados, mas un tercer grupo, que se utilizó como control de calidad y para el contraste de resultados, no consumió ningún tipo de yogur. Los autores concluyeron que no se produce una colonización del intestino por los gérmenes ingeridos vivos y que, en consecuencia, los iniciadores del yogur no se comportan como probióticos.

Del campo *et al.* (2005) valoraron la presencia de los microorganismos del yogur en las heces de voluntarios sanos en condiciones basales, así como tras consumo reiterado de yogur y de yogur pasteurizado mediante el uso de medios de cultivo y por PCR. Obtuvieron resultados consistentemente negativos por ambos métodos. Mediante PCR se detectó únicamente ADN compatible con las bacterias del yogur en 10 de 96 individuos que habían consumido yogur fresco (10,52 %) y en 2 individuos que habían consumido yogur pasteurizado (2,10 %) ($p=0.01$). Se obtuvo una proporción significativamente mayor de resultados positivos en los voluntarios que consumieron yogur fresco que entre los voluntarios que consumieron yogur pasteurizado, pero aún con todo en el primer grupo, el 90 % de las muestras no se detectó ningún resto de ADN. Sin embargo, los autores no asociaron esta observación a una mayor colonización entre los voluntarios que consumieron yogur fresco, sino a una mayor degradación del ADN en los productos pasteurizados por el propio proceso de pasteurización, que mata a las bacterias y se empieza a degradar el ADN antes del consumo del producto.

En cambio, en nuestro **estudio *in vivo* de detección y supervivencia de *S. thermophilus***, desde la toma de muestras T2 se hallaron muestras positivas tanto por PCR como por DVC-FISH. En T4, momento de máxima ingesta, en un 16,7% de las muestras se detectó esta bacteria por PCR. Además, en un 30% del número de muestras analizadas en esta toma (todas ellas coincidentes con las detectadas por PCR) se detectaron células viables de *S. thermophilus* por DVC-FISH. Se puede concluir que, tras 4 semanas de ingesta, *S. thermophilus* fue capaz de sobrevivir al tránsito gastrointestinal en un 30% de la población estudiada. En todas las muestras que hubo detección mediante DVC-FISH se realizaron

recuentos, obteniendo un número de estreptococos viables de $4,5 \times 10^4$ de media, lo que supone un orden por debajo de los resultados obtenidos por Brigidi *et al.* (2003) y coinciden con los obtenidos por Mater *et al.* (2005), ya comentados anteriormente. Los resultados de supervivencia de esta bacteria al tracto gastrointestinal también coinciden con los obtenidos por Lick *et al.* (2001) y por Drouault *et al.* (2002).

Pese a que el límite de detección de la técnica DVC-FISH era del mismo orden que el obtenido para la PCR, se obtuvo un mayor número de muestras positivas de *S. thermophilus*, mediante DVC-FISH que mediante PCR. Este resultado podría explicarse debido a la presencia de productos de inhibición de la PCR en este tipo de muestras (Radström *et al.*, 2004). Otra posible explicación podría encontrarse en los ensayos realizados. Es posible que el límite de detección real de FISH sea mayor que el teórico. La cepa empleada en los ensayos era una cepa de referencia, con lo que podría no adaptarse bien al ambiente fecal en el que fue introducida, y por lo tanto sufrir daños celulares y disminución del contenido ribosómico, emitiendo menor señal de fluorescencia.

Ya que las técnicas DVC-FISH y PCR puestas a punto en este trabajo resultan altamente específicas y suponen una reducción importante de tiempo, no se incluyeron en el trabajo las técnicas culturales, ya que, aunque algunos autores las utilizan, no existe ningún medio de cultivo lo suficientemente selectivo para el aislamiento de estas BAL en muestras fecales y que distinga las BAL ingeridas con el yogur de las endógenas.

Finalmente se hizo un **estudio de la evolución de la microbiota de las heces** de las 30 personas sometidas al ensayo *in vivo* con la intención de estudiar el efecto de la ingesta de las BAL del yogur sobre los otros grupos de poblaciones bacterianas.

En los **recuentos de lactobacilos en heces**, se observó que, desde la segunda semana de ingesta del producto lácteo (T2), existieron diferencias estadísticamente significativas respecto a los recuentos en las tomas iniciales. Éstos aumentaron de forma significativa durante todo el periodo de ingesta. Este aumento podría sugerir la supervivencia de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* al tracto digestivo o bien un aumento de lactobacilos endógenos tras el consumo de lactobacilos exógenos, lo que demostraría el efecto prebiótico. Los recuentos realizados durante el periodo post-administración mostraron valores del número de lactobacilos en las

heces muy similares a los obtenidos durante el periodo de ingesta, si bien es cierto que tras 3 semanas de no ingesta los recuentos de estos microorganismos comienzan a descender.

Estos resultados concuerdan con los de Tannock *et al.* (2000), quienes describieron los resultados de un estudio a largo plazo en el cual sujetos sanos consumieron un producto probiótico con células viables de *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Para ello, midieron el impacto del consumo de este probiótico en la microbiota fecal mediante la utilización de una gran variedad de métodos. La microbiota fecal de 10 individuos se controló antes, durante y después de la administración de un producto lácteo conteniendo esa BAL. Según sus resultados el consumo de la leche fermentada dio como resultado una frecuencia mayor de detección (100%) de lactobacilos en muestras fecales en comparación con el periodo inicial de control (76%) y el periodo posterior al ensayo (84%). Las frecuencias de detección en los periodos de control y post-ensayo no difirieron. El número de u.f.c. de lactobacilos por gramo fue más elevado durante el periodo de ensayo (mediana: 5,8 log₁₀ UFC/g; intervalo: 4,1 a 9,3 log₁₀ u.f.c./g) que durante el periodo de control. El periodo de control y el periodo tras el ensayo (mediana, 5,3 log₁₀ u.f.c./g; intervalo, 2,0 a 8,4 log₁₀ u.f.c./g) no presentaron diferencias significativas.

Igualmente, Guerin-Danan *et al.* (1998) evaluaron la influencia de dos leches fermentadas sobre varios géneros de la microbiota intestinal en 39 niños sanos de entre 10 y 18 meses. Un 0% del grupo consumidor de yogur presentó concentraciones iniciales de lactobacilos superiores a 6 log₁₀ UFC/g de heces. Este porcentaje aumentó hasta el 10% tras 15 días de suplementación o 30% tras 30 días de ingesta. Estos resultados concuerdan plenamente con los obtenidos en nuestro estudio.

Por su parte, García-Albiach *et al.*, 2008 analizaron los cambios ocurridos en la microbiota fecal normal de 63 individuos sanos tras un consumo sostenido de yogur fresco y yogur termizado, mediante el empleo de las técnicas de PCR-DGGE cuantitativa y de PCR en tiempo real. Los autores no detectaron diferencias significativas entre ninguna muestra fecal. Sin embargo, tras el consumo de ambos tipos de yogur, se observó una densidad mayor de BAL y de *Clostridium perfringens* y un descenso significativo de *Bacteroides*. La densidad de la microbiota no

presentó diferencias significativas entre ambos grupos, excepto para las BAL, que fue significativamente superior para el grupo de yogur fresco.

Gotteland *et al.* 2006, evaluaron cómo el consumo de distintas cantidades del probiótico *Lactobacillus johnsonii* contribuye a la modulación de las principales poblaciones de la microbiota fecal. Se obtuvieron muestras de deposición en diferentes períodos del experimento, determinándose las cantidades de lactobacilos excretados por cultivo en agar MRS. Se observaron cambios leves en la excreción de *Lactobacillus* a lo largo del estudio, que afectaron principalmente a los niveles post-ingestión. La excreción fecal de *Lactobacillus johnsonii* aumentó durante el período de consumo, pero desapareció después de 14 días de haber terminado el período de ingestión. El consumo de *Lactobacillus johnsonii* aumentó las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que son consideradas como beneficiosas para el huésped. Las poblaciones bacterianas afectadas volvieron a sus niveles basales durante el periodo post-ingestión.

Otros autores han demostrado también que el recuento total de lactobacilos endógenos en adultos aumenta tras el consumo de lactobacilos exógenos permaneciendo altas durante dos semanas (Patel *et al.*, 1992; Sepp *et al.*, 1993) y durante 4 semanas (Ayebo *et al.* 1980). Igualmente, se recuperó *Lactobacillus* GG en niños tras 2 semanas (Sheen *et al.*, 1995) y tras 3 semanas (Millar *et al.*, 1993). Estos resultados positivos contrastan con los de Gilliland *et al.* 1978 y Pedrosa *et al.*, 1995, quienes detectaron un descenso de lactobacilos fecales tras la ingesta de lactobacilos exógenos.

Las comparaciones de las medias de los **recuentos de microorganismos anaerobios totales** durante el periodo de control, el periodo de ensayo y el periodo posterior al ensayo no presentaron diferencias significativas. Los datos durante el periodo post-administración tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados concuerdan con los de Tannock *et al.* 2000, para quienes los recuentos totales de anaerobios no difirieron a lo largo su estudio.

Se encontraron algunas variaciones en cuanto a la evolución en algunos sujetos pero las diferencias resultaron ser puntuales y se cree que no fueron debidas al consumo del alimento fermentado.

También coinciden con los resultados obtenidos por Guerin-Danan *et al.* 1998. En su estudio, ocho días antes de iniciar la ingestión con los lácteos y a

tiempo 0, la concentración media inicial de anaerobios totales fue 9,7 log₁₀ u.f.c./g. Tras 15 y 30 días de ingesta, estos valores se mantuvieron en torno a 9,8 log₁₀ UFC/g para los tres grupos, no presentando modificaciones estadísticamente significativas.

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los recuentos de **microorganismos aerobios** en heces, durante el periodo de ingesta de yogur respecto a los periodos de control y de post administración.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tannock *et al.* 2000, quienes encontraron valores medios que oscilaron entre 6,4 y 7,8 log₁₀ u.f.c./g (media 7,2) en el ensayo, mientras que en el periodo de control oscilaron entre 6,6 y 7,7 log₁₀ u.f.c./g (media 7,2) y en el posterior al ensayo entre 6,2 y 7,7 log₁₀ u.f.c./g (media 7,3), no siendo diferencias estadísticamente significativas.

Los recuentos de **bifidobacterias** en los periodos de control, ensayo y post-administración no revelaron diferencias significativas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tannock *et al.* 2000, quienes, para el caso de las bifidobacterias, encontraron valores medios en el control que variaron entre 9,4 y 10,2 log₁₀ u.f.c./g, en el ensayo entre 9,1 y 10,3 log₁₀ u.f.c./g y en el periodo posterior al ensayo, entre 9,1 y 9,8 log₁₀ u.f.c./g. En ningún caso, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos periodos.

También hay coincidencia con los resultados de Guerin-Danan *et al.* 1998, que ocho días antes de iniciar la suplementación con los lácteos y a tiempo 0 determinaron un valor medio de 9,1 log₁₀ u.f.c./g de este género. Tras 15 y 30 días de ingesta, esta media se mantuvo en valores de 9,3 log₁₀ u.f.c./g y a los 38 días (tras una semana sin administración), este valor medio volvió a ser de 9,1 log₁₀ u.f.c./g. En ningún caso, las diferencias entre periodos fueron estadísticamente significativas.

Sin embargo, nuestros resultados discrepan con los de Alvaro *et al.* 2007, quienes, con la técnica FISH adaptada para la detección por citometría de flujo detectaron, para el grupo de consumidores de yogur tradicional, que la proporción de bifidobacterias era directamente proporcional a su consumo. La técnica PCR

Discusión

combinada con electroforesis en gel mostraron los mismos resultados. Los autores, en su interpretación de los resultados, afirmaron que, un consumo regular de yogur en una dieta cualquiera, puede inducir modificaciones en la microbiota endógena.

El número de **enterobacterias** disminuyó de forma significativa durante las cuatro semanas que duró el periodo de ingesta. Igualmente, se produjo un rápido aumento de esta población bacteriana cuando la ingesta de yogur natural cesó, volviéndose a niveles anteriores a la ingesta.

En la investigación de Tannock *et al.* 2000, los valores medios de las enterobacterias fermentadoras de lactosa oscilaron, en el caso del control, entre 5,3 y 7,2 \log_{10} u.f.c./g, en el ensayo entre 5,6 y 7,5 \log_{10} u.f.c./g y en periodo posterior al ensayo entre 3,8 y 7,7 \log_{10} u.f.c./g. En ningún caso estas diferencias fueron estadísticamente significativas, lo que contrastaría con los resultados del presente estudio.

Tampoco concuerdan los resultados de Guerin-Danan *et al.* 1998, para quienes ocho días antes de iniciar la suplementación con los lácteos y a tiempo 0 las enterobacterias fueron, de los microorganismos estudiados, los menos abundantes con 8,0 \log_{10} u.f.c./g. A los 15 días de ingesta, el valor medio fue de 7,7 \log_{10} u.f.c./g y a los 30, éste fue de 8 \log_{10} u.f.c./g. Tras una semana sin administración (día 38), el valor fue de 7,6 \log_{10} u.f.c./g, no resultando las diferencias entre los periodos estadísticamente significativas.

Sin embargo, los resultados de Alvaro *et al.* 2007, apoyan los obtenidos en el presente estudio. Observaron una diferencia significativa en la evolución de la población de *Enterobacteriaceae*, que incluye bacterias patógenas, al encontrarse niveles significativamente inferiores en el grupo de consumidores, lo que podría sugerir que el consumo regular de yogur induce modificaciones de la microbiota endógena.

CONCLUSIONES

1. Todos los yogures naturales analizados cumplen la normativa legal vigente en cuanto al número de microorganismos viables. La cantidad de lactobacilos y estreptococos es muy variable aunque éstos últimos predominan en todos ellos.

2. Todas las sondas diseñadas, específicas del ARNr, permitieron identificar a nivel de especie todas las cepas de *Streptococcus thermophilus* y a nivel de subespecie todas las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* contenidas en los diferentes productos lácteos. Esto permitió realizar recuentos de las BAL de los productos comerciales mediante FISH, con resultados ligeramente superiores a los obtenidos mediante las técnicas tradicionales de recuento en placa y de forma más rápida y específica.

3. La técnica de caracterización molecular de RAPDs resulta adecuada para la caracterización y diferenciación de las distintas BAL contenidas en los productos comerciales estudiados, presentando diferencias en los perfiles obtenidos en función de su origen. Los perfiles obtenidos para las cepas del género *Lactobacillus* presentaron mayor heterogeneidad que los obtenidos para las cepas del género *Streptococcus*.

4. La técnica DVC-FISH se muestra como un método novedoso, rápido y eficaz para el recuento de células viables de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en las distintas matrices estudiadas (yogur natural y heces humanas). El antibiótico novobiocina, a la concentración de 10 µg/ml y tiempo de incubación de 7 horas, ha resultado ser el más efectivo para la aplicación de la técnica DVC-FISH para las BAL del yogur natural.

5. Tras estudiar *in vitro* la resistencia de las BAL del yogur frente a los jugos gastrointestinales mediante la aplicación del método DVC-FISH, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mostró una supervivencia del 26,2% mientras *S. thermophilus* sobrevivió en un 9,2%. Podemos decir que las cepas del producto estudiado son tolerantes a los jugos *in vitro* y, por tanto, potencialmente a los jugos generados por el tránsito gastrointestinal humano.

6. La técnica DVC-FISH es eficaz para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en heces y la determinación de su viabilidad.

permitiendo una detección visual de las células y evitando los falsos positivos, al proporcionar información acerca del número, morfología y distribución de las bacterias dentro de matrices complejas.

7. La técnica DVC-FISH no requiere de extracción de ADN, por lo que resulta más rápida que la PCR. Aunque en los ensayos previos ambas técnicas presentan el mismo límite de detección, la mayor eficiencia de detección de las BAL en heces mediante DVC-FISH la hace más apropiada para su aplicación en este tipo de matrices.

8. El cultivo no resulta adecuado para la detección de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* en heces, debido al gran crecimiento de microbiota acompañante que enmascara el crecimiento de estas bacterias en los medios de cultivo utilizados para su aislamiento habitualmente.

9. En el estudio *in vivo* de supervivencia de las BAL de Y7 al tracto gastrointestinal, la detección en heces de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante las técnicas de detección por PCR y DVC-FISH ha demostrado que esta bacteria no se detecta en cantidad superior a 1×10^4 células/g.

10. En el ensayo *in vivo* de supervivencia de BAL de Y7, *S. thermophilus* ha sido detectada (en cantidad superior a 1×10^4 células/g) en las heces del 30% de personas que ingirieron 250 gramos de yogur natural durante 4 semanas consecutivas. Por tanto esta bacteria cumple uno de los requisitos para considerarla como probiótica.

11. Tras el consumo continuado de yogur Y7 se observa un incremento significativo en la población de lactobacilos endógenos que vuelve a niveles basales en el periodo de post-ingesta. Esta acción se considera como efecto prebiótico ya que las múltiples propiedades de este género proporcionarían un efecto saludable en el organismo.

12. La población de enterobacterias, que incluye bacterias patógenas, se ve reducida de forma estadísticamente significativa desde la segunda semana de ingesta de yogur, proporcionando un posible beneficio sobre la salud intestinal.

13. El estudio *in vivo* muestra que las poblaciones de bifidobacterias, aerobios totales y anaerobios totales no se ven afectadas significativamente por la ingesta de yogur natural.

BIBLIOGRAFÍA

Adlerberth, I; Cerquetti, M; Poilane, I; Wold, A; Collignon, A (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. ***Microbial Ecology in Health and Disease***; 11: 223–239.

Agence Française de securite sanitaire des aliments: AFSSA (2005). Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults.

Alifano, P., Bruni, B., and Carlomagno, S. (1994). Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. ***Genetica***, 94: 157-172.

Alvaro, E.; Andrieux, C.; Rochet, V.; Rigottier-Gois, L.; Lepercq, P.; Sutren, M.; Galan, P.; Duval, Y.; Juste, C.; Doré, J. (2007). Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. ***British Journal of Nutrition***, 97: 126–133.

Amman R. I., Krumholz, L. and Stahl, D. A. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies of microbiology. ***Journal of Bacteriology***, 172: 762–770.

Amman, R.I., Ludwig, W and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. ***Microbiological Reviews***, 59: 143-169.

Ampe, F. (2000). Design and evaluation of a *Lactobacillus manihotivorans* species-specific rRNA-targeted hybridization probe and its application to the study of sour cassava fermentation. ***Applied Environmental Microbiology***, 66: 2224–2226.

Andrighetto, C.; De Dea, P.; Lombardi, A.; Neviani, E.; Rossetti, L.; Giraffa, G. (1998). Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. ***Research in Microbiology***, 149: 631–643.

Anónimo (2006). Derivados lácteos; crecimiento sostenido y alta rentabilidad. ***Tecnifood***, mayo-junio, pp. 40-47.

Antonsson, M.; Ardo, Y.; Molin, G. (2001). A comparison between the microflora of Herrgard cheese from three different dairies. *International Dairy Journal*, 11: 285–291.

Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. (2006). Clinical study comparing probiotic Lactobacillus GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, Oct; 8 (12-13): 2772-6.

Ashwell, M. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. *Public Health Nutrition*. 4(3): 859-862.

Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S. (1995). Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group. *European Urology*; 27 (2): 104-9.

Back, W.; Bohak, I.; Ehrmann, M.; Ludwig, W.; Pot, B.; Kersters, K.; Schleifer, K.H. (1999). *Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium. *Systematic Applied Microbiology*, 22: 354–359.

Bañares Vilella, S. (2006). Los alimentos funcionales y las alegaciones alimentarias en la Unión Europea: una somera aproximación jurídica. *Alimentación, nutrición y salud*, Vol. 13, N.º 3, pp. 81-90.

Barcina, I.; Arana, I.; Santorum, P.; Iriberry, J.; Egea, L. (1995). Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *Journal of Microbiological Methods*, 22 (2): 139-150.

Baruzzi, F.; Morea, M.; Matarante, A.; Cocconcelli, P.S. (2000). Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 807–814.

Baudart, J.; Coallier, J.; Laurent, P.; Prévost, M. (2002). Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family *Enterobacteriaceae* in freshwater and drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10): 5057–5063.

Beijerinck, MW (1901). Sur les ferments lactiques de l'industrie. **Archives Néerlandaises des sciences Exactes et Naturelles (Section 2)**, 6, 212-243.

Beimfohr, C.; Krause, A.; Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, KH. (1993). In situ identification of Lactococci, enterococci and streptococci. **Systematic applied microbiology**, 16: 450-453.

Bej, A. K., Morgan, W., Jones, D. and Mahbubani, M. (1996). Detection of viable *Vibrio cholerae* by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **Molecular Biotechnology**, 5: 1-10.

Belasco, J. (1993). mRNA degradation in prokaryotic cells: an overview. En: J. Belasco and G. Brawerman (eds.). Control of messenger RNA stability. Academic Press, San Diego.

Beltrán-Orozco, María del Carmen (2006). Ingredientes Funcionales; definición, ubicación y usos. **Industria alimentaria-Alfa editores técnicos**, julio-agosto, pp. 36-42.

Benno, Y; Mitsuoka, T (1986). Development of intestinal microflora in humans and animals. **Bifidobacteria and Microflora**; 5: 13–25.

Bentley, R. W.; Leigh, J. A. (1995). Development of PCR-Based Hybridization Protocol for Identification of Streptococcal Species. **Journal of Clinical microbiology**, Mayo, Vol. 33, No. 5, p. 1296–1301.

Berg, RD (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, 4: 430–435.

Berthier, F.; Beuvier, E.; Dasen, A.; Grappin, R. (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. **International Dairy Journal**, 11: 293–305.

Berthier, F.; Ehrlich, S.D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region, **FEMS Microbiology Letters**, 161: 97–106.

Berthier, F.; Ehrlich, S.D. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 49: 997–1007.

Berthier, F.; Ehrlich, S.D. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 49: 997–1007.

Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 73(Suppl. 2): 399S–405S.

Bianchi-Salvadori, B; Camaschella, P; Bazzigaluppi, E. (1984). Distribution and adherence of *Lactobacillus bulgaricus* in the gastroenteric tract of germ-free animals. ***Milk Science International***, 39: 387–391.

Bouton, Y.; Guyot, P.; Beuvier, E.; Tailliez, P.; Grappin, R. (2002). Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese ripening. ***International Journal of Food Microbiology***, 76: 27–38.

Bouhnik, Y. (1993). Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. ***Lait***, 73: 241-247.

Brigidi, P.; Swennen, E.; Vitali, B.; Rossi, M.; Matteuzzi, D. (2003). PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. ***International Journal of Food Microbiology***, 81: 203–209.

Brouns, F; Kettlitz, B; Arrioni, E. (2002). Resistant starch and the butyrate revolution. ***Trends in Food Science Technology***, 13: 251–261.

Buchrieser, C; Kaspar, CW. (1993). An improved direct viable count for the enumeration of bacteria in milk. ***International Journal of Food Microbiology***. Dec; 20 (4): 227-37.

Bunte C.; Hertel, C.; Hammes, W.P. (2000). Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestinal tract. **Systematic Applied Microbiology**, 23: 260–266.

Castro Rodríguez, Rubén (2007). El sector lácteo español: Una actividad estratégica y necesaria para los consumidores. **Distribución y Consumo**, Noviembre-Diciembre 2007, páginas 68-76.

Cebra, JJ. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. **American Journal of Clinical Nutrition**; 69: 1046–1051.

Cellini, L., Del Vecchio, A., Di Candia, M., Di Campi, E., Favaro, M. and Donelli, G. (2005). Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater **Journal of Applied Microbiology**, 97: 285-292.

Chagnaud, P.; Machinis, K.; Coutte, L.A.; Marecat, A.; Mercenier, A. (2001). Rapid PCR based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. **Journal of Microbiological Methods**, 44: 139–148.

Charteris, WP.; Kelly, PM.; Morelli, L; Collins, JK. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, 35: 1-27.

Chervaux, C.; Ehrlich, SD.; Maguin, E. (2000). Physiological Study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* Strains in a Novel Chemically Defined Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (2): 5306-5311.

Chisholm, S. A., Owen, R. J., Teare, E. L. and Saverymuttu, S. (2001). PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 1217-1220.

Cocconcelli ,P.S.; Porro, D.; Galandini, S.; Senini, L. (1995). Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci, **Letters in Applied Microbiology**, 21: 376–379.

Cocconcelli, P.S.; Parisi, M.G.; Senini, L.; Bottazzi, V. (1997). Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. **Letters in Applied Microbiology**, 25: 8–12.

Coeuret, V.; Ségolène Dubernet, S.; Bernardeau, M; Gueguen, M.: Vernoux, JP. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. **Lait**, 83: 269–306.

Collins, MD and Gibson, GR (1999). Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Nutrition**, 69 (suppl.):1052S-7S.

Collins, MD; Rodríguez, U; Aguirre, M; Farrow, JAE; Martínez-Murcia, A; Phillips, BA; Williams, AM; Wallbanks, S (1991). Phylogenetic analysis of genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS microbiology Letters**, 77: 5-12.

Colman, G. (1976). The viridans streptococci. In **Selected Topics in Clinical Bacteriology**, pp. 179-198. Edited by J. de Louvois. London: Bailliere Tindal.

Conway, P. L.; Gorbach, S. L.; Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, 70: 1–12.

Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **The Journal of Nutrition**; 137 (3 Suppl 2): 781S-90S.

Coullier, J., Prevots, M. and Rompre, A. (1994). The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. **Canadian Journal of Microbiology**, 40: 830-836.

Couret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other daily products. **Lait**, 83: 269-306.

Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. (2002). Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. **Alimentary pharmacology & therapeutics**; 16(8):1461-7.

Crittenden, R. G., Morris, L. F., Harvey, M. L., Tran, L. T., Mitchell, H. L. and Playne, M. J. (2001). Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. ***Journal of Applied Microbiology***, 90: 268-278.

Cusick, SM.; O'Sullivan, DJ. (2000). Use of a Single, Triplicate Arbitrarily Primed-PCR Procedure for Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria. ***Applied and Environmental Microbiology***, 66 (5): 2227-2231.

Daud Khaled, A.K.; Neilan, B.A.; Henriksson, A.; Conway, P.L. (1997). Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. ***FEMS Microbiology Letters***, 153: 191–197.

De Champs, C.; Maroncle, N.; Balestrino, D.; Rich, C.; Forestier, C. (2003). Persistence of Colonization of Intestinal Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* Lcr35, after Oral Consumption. ***Journal of Clinical Microbiology***, 41 (3), p. 1270–1273.

de Vrese M, Marteau PR. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. ***Journal of Nutrition***; 137(3 Supplement 2): 803S-11S.

de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. ***The American journal of clinical nutrition***; 73 (2 Suppl): 421S-429S.

Del Campo, Rosa; Bravo, Daniel; Cantón, Rafael; Ruiz-Garbajosa, Patricia; García-Albiach, Raimundo; Montesi-Libois, Alejandra; Yuste, Francisco-Javier; Abaira, Victor; Baquero, Fernando (2005). Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers. ***Applied and Environmental Microbiology***, Vol. 71, No. 1, p. 547–549.

Dickson, E. M.; Riggio, M. P.; Macpherson, L. (2005). A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. ***Journal of Medical Microbiology***, 54: 299–303.

Diplock A, Aggett P, Ashwell M, et al (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. ***British Journal of Nutrition***. 81(4): S1-27.

Dong, X.; Cheng, G. Jian, W. (2000). Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Systematic and applied microbiology* , vol. 23, no3, pp. 386-39

Drake, M.; Small, C.L.; Spence, K.D.; Swanson, B.G. (1996). Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. ***Journal of Food Protection***, 59: 1031–1036.

Drouault, S.; Anba, J.; Corthier, G. (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. ***Applied Environmental Microbiology***, 68: 938–941.

Du Plessis EM, Dicks LM. (1995). Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. ***Current Microbiology***, 31 (2): 114-118.

Dubernet, S.; Desmasures, N.; Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at genus level. ***FEMS Microbiology Letters***, 214: 271.

Ehrmann, M.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1992). Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. ***Systematic applied microbiology***, 15: 453-455.

Ehrmann, M.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1994). Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. ***FEMS microbiological letters***, 117: 143-149.

Elli, M.; Callegari, M. L.; Ferrari, S.; Bessi, E.; Cattivelli, D.; Soldi, S.; Morelli, L.; Goupil Feuillerat, N.; Antoine, J.-M. (2006). Survival of yogurt bacteria in the human gut. ***Applied and Environmental Microbiology***, 72: 5113-5117.

Engelbrektson AL, Korzenik JR, Sanders ME, Clement BG, Leyer G, Klaenhammer TR, Kitts CL (2006). Analysis of treatment effects on the microbial ecology of the human intestine. ***FEMS microbiology ecology*** ; 57(2): 239-50.

Eriksson K, Carlsson B, Forsum U, Larsson PG. (2005). A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules. **Acta dermato-venereologica**; 85 (1): 42-6.

Falk, P. G.; Hooper, L. V.; Midtvedt, T.; Gordon, J. I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 1157–1170.

Fanedl, L.; Nekrep, F.V.; Avguštin, G. (1998). Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. **Canadian Journal of Microbiology**, 44: 1094-1101.

Farjas Abadía, P. (2003). Sobre los alimentos funcionales. **Revista Española de Salud Pública**. 77: 313-316.

Figuroa, I., Gómez-Ruiz, L., García Garibay, M., Cruz-Guerrero, A. (2006). EL beneficio de los probióticos. **Industria alimentaria**, julio-agosto 2006: 22-27.

Fooks, LJ and Gibson, GR (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, 88: S39S49.

Franks, A H.; Harmsen, H J M.; Raangs, GC.; Jansen, GJ.; Schut, F.; Welling GW. (1998). Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (9): 3336-3345.

Fuchs, B.M., Sytsubo, K., Ludwing, W. and Amann, R. (2001). In situ accesibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 961-968.

Fujimura, S., Kawamura, T., Kato, S., Tateno, H. and Wanatabe, A. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. **Letters in Applied Microbiology**, 35: 504-507.

Fuller R. (1989). Probiotics *Lactobacillus acidophilus* in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**; 66: 365-378. Comentado en: The American journal of clinical nutrition 2001; 73: 430S-436s

Furrie, E. (2005). Probiotics and allergy. *Proceedings of the Nutrition Society*, Nov: 64(4):465-9. Review.

Gancheva, A.; Pot, B.; Vanhonacker, K.; Hoste, B.; Kersters, K. (1999). A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to and related species. *Systematic Applied Microbiology*, 22: 573–585.

García de los Ríos, JE; Santos Jiménez Gómez, J; Jiménez Gómez, PA; Reche Sainz, M^a P; Álvarez Dávila, F; Rojas Mendoza, A M^a (2003). Estudio microbiológico comparativo de yogur fresco y termizado en un modelo animal *in vivo*. *Nutrición hospitalaria*, 18 (4): 207-214.

García-Albiach, R.; Pozuelo de Felipe, MJ; Angulo, S.; Morosini, M. I.; Bravo, D.; Baquero, F.; del Campo, R. (2008). Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 91-96.

Germond, J-E.; Mamin, O.; Mollet, B. (2002). Species Specific Identification of Nine Human *Bifidobacterium* spp. in Feces. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 536-543.

Gibson, GR; Roberfroid, MB (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.

Gilliland, SE. (1979). Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Protection*, 42: 146- 167.

Gilliland, S.E.; Kim, H.S. (1984). Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal of Dairy Science*, 67: 1.

Gilliland, SE. (1989). Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72: 2483-2494.

Giraffa, G.; De Vecchi, P.; Rossetti, L. (1998). Note: identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 918–924.

Gotteland R., M; Garrido C., D; Cruchet M., S. (2006). Regulación de la microbiota intestinal en voluntarios sanos mediante el consumo de un producto con el probiótico *Lactobacillus johnsonii* La1. **Revista Chilena de Nutrición**, 33 (2): 198-203.

Greene, J. D.; Klaenhammer, T. R. (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, 60: 4487–4494.

Grimont, PA. (1988). Use of DNA reassociation in bacterial classification. **Canadian Journal of Microbiology**, 34: 541-546.

Grönlund, MM; Arvilommi, H; Kero, P; Lehtonen, OP; Isolauri, E. (2000). Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. **Archives of Disease in Childhood**; 83: F186–F192.

Grönlund, MM; Lehtonen, OP; Eerola, E; Kero, P (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after Cesarean delivery. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**; 28: 19–25.

Guarner, F.; Malagelada, JR. (2003). Gut flora in health and disease. **Lancet**; 361: 512–519.

Guarner, F. (2002). El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. **Nutrición Hospitalaria** XVII (Sup. 2) 7-10.

Guarner, F. (2006). Funciones de la microflora intestinal. **Alimentación, nutrición y salud- Instituto Danone**, 13 (2): 41-47.

Guarner, F.; Perdigon, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B.; Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? **British Journal of Nutrition**, 93: 783–786.

Guarner, F. and Schaafna, GJ. (1998). Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 39, 237-238.

Guerin-Danan, C.; Chabanet, C.; Pedone, C.; Popot, F.; Vaissade, P.; Bouley, C.; Szylit, O.; Andrieux, C. (1998). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, 67: 111–7.

Guyard, S.; Mary, P.; Defives, C.; Hornez, J.P. (1999). Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. ***Journal of Applied Microbiology***, 86: 841–850.

Hammes, WP; Vogel (1995). The genus *Lactobacillus*. The genera of Lactic acid bacteria (B. J. B Wood and W. H. Holzapfel, eds). Blackie Academic and Professional. Glasgow, NZ, pp 19-54.

Haq, A. and Colwell, R. R. (1996). A microbiological paradox-viable but non-culturable bacteria with special reference to *Vibrio cholerae*. ***Journal of Food Protection***, 59: 96-101.

Hardie, JM and Whiley, RA (1995). The genus *Streptococcus*, in *The genera of Lactic Acid Bacteria* (B. J. B Wood and W. H. Holzapfel, eds), Chapman and Hall, London, pp. 55-124.

Harmsen, HJM; Gibson, GR; ; Elfferich, P.; Raangs, GC; Wildeboer-Veloo, ACM; Argaiz, A.; Roberfroid, MB; Welling, GW (1999). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. ***FEMS Microbiology Letters***; 183: 125–129.

Harmsen, HJM; Raangs, GC; He, T.; Degener, JE.; Welling, GW. (2002). Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. ***Applied and Environmental Microbiology***, 68 (6): 2982–2990.

Harmsen, HJM; Wildeboer-Veloo, ACM; Raangs, GC; Wagendorp, AA; Klijn, N; Bindels, JG; Welling, GW (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. ***Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition***; 30: 61–67.

Hartemink, R.; Domenech, V.R.; Rombouts, F.M. (1997). LAMVAB – A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. ***Journal of Microbiological Methods***, 29: 77–84.

Heilig, GHJ; Zoetendal, EG.; Vaughan, EE.; Marteau, P.; Akkermans, ADL.; de Vos, WM. (2002). Molecular Diversity of *Lactobacillus spp.* and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. ***Applied and Environmental Microbiology***, 68 (1): 114–123.

Hensiek, R.; Krupp, G.; Stackebrandt, E. (1992). Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. ***Systematic applied microbiology***, 15: 123-128.

Hernández, J., Fayos, A., Ferrús, M. A. and Owen, R. J. (1995). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. ***Research in Microbiology***, 146: 685-696.

Hertel, C.; Ludwig, W.; Obst, M.; Vogel, RF.; Hammes, WR.; Schleifer, K.H. (1991). 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meat lactobacilli. ***Systematic and Applied Microbiology***, 14: 173–177.

Hertel, C.; Ludwig, W.; Pot, B.; Kersters, K.; Schleifer, K.H. (1993). Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotides probes and electrophoretic protein profiles. ***Systematic and Applied Microbiology***, 16: 463–467.

Hod, Y. (1992). A simplified ribonuclease protection assay. ***Biotechniques***, 13: 852-854.

Hooper, L. V.; Wong, M. H.; Thelin, A.; Hansson, L.; Falk, P. G.; Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. ***Science*** 291: 881–884.

Hooper, LV; Midtvedt, T; Gordon, JI (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. ***Annual Review of Nutrition***; 22: 283–307.

Horie, M.; Kajikawa, H.S.; Toba, T. (2002). Identification of *Lactobacillus crispatus* by polymerase chain reaction targeting S-layer protein gene. ***Letters in Applied Microbiology***, 35: 57–61.

Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I, Ishiguro S, Miyaoka E, Sobue T, Kakizoe T. (2005). Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. ***International Journal of Cancer***, 20;116(5):762-7.

Islam, M. S., Hasan, M. K., Miah, M. A., Sur, G. C., Felsesnstein, A., Venkatesan, M., Sack, R. B. and Albert, M. J. (1993). Use of the polymerase chain reaction and fluorescence-antibody methods for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I in laboratory microcosms. ***Applied and Environmental Microbiology***, 59: 53-540.

Isolauri, E.; Salminen, S.; Ouwehand, A. C. (2004). Probiotics. ***Best Practice & Research Clinical Gastroenterology***, Vol. 18, No. 2, pp. 299–313.

Isolauri, E; Kirjavainen, PV; Salminen, S (2002). Probiotics—a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. ***Gut***, 50 (supplement III): iii54–iii59.

Johansson, M.L.; Molin, G; Pettersson, B.; Uhlén, M.; Ahrné, S. (1995). Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene, ***Journal of Applied Bacteriology***, 79: 536–541.

Johansson, ML.; Quednau, M.; Ahrné, S.; Molin, G. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. ***Letters in Applied Microbiology***, 21: 155-159.

Joux, Fabien and LeBaron, Philippe (1997). Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. ***Applied and environmental microbiology***, Vol. 63, No. 9, p. 3643–3647.

Juárez, M. (2007). Alimentos funcionales y publicidad. ***Alimentación, nutrición y salud***, Vol. 14, N.º 2, pp. 31-32.

Kalliomäki , S . Salminen , H . Arvilommi , P . Kero , P . Koskinen , E . Isolauri (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. ***The Lancet***, Volumen 357, Issue 9262 , Páginas 1076 - 1079 M.

Kalmbach, S.; Manz, W.; Szewzyk, U. (1997). Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization. **FEMS Microbiology Ecology**, 22: 265–279.

Karner, M., Fuhrman, J. A. (1997). Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography and nucleoid staining. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 1208-1213.

Kaufmann, P.; Pfefferkorn, A.; Teuber, M.; Meile, L. (1997). Identification and Quantification of *Bifidobacterium* Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (4): p. 1268–1273.

Kimura, K; McCartney, AL; McConnell, MA; Tannock, GW (1997). Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigations of the immunological responses to their human hosts to the predominant strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 3394-8.

Klein, P. G. and Juneja, V. K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse-transcriptase PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 4441-4448.

Kogure, K., Simidu, U., and Taga, H. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, 25: 415-420.

Kullen, MJ; Brady, LJ; O'Sullivan, DJ. (1997). Evaluation of using a short region of the recA gene for the rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. **FEMS Microbiology Letters** ; 154: 377–383.

Lane, DL; Field, KG; Olsen, GJ; Pace, NR (1998). Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. **Methods of Enzymology**, 167: 138-144.

Lankaputhra, W.E.V.; Shah, N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Produce Journal**, 30: 2–7.

Larsen, B; Monif, GRG (2001). Understanding the bacterial flora of the female genital tract. ***Clinical Infectious Diseases***; 32: e69–e77.

Lepeuple, S; Delabre, K; Giloupe, S; Intertaglia, L; de Roubin, MR. (2003). Laser scanning detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples. ***Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research***, 47(3):123-129.

Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, Blum AL. (2007). *Helicobacter pylori* and probiotics. ***The Journal of nutrition***; 137 (3 Supplement 2): 812S-8S.

Lick, S., K. Drescher, and K. J. Heller (2001). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. ***Applied Environmental Microbiology***, 67: 4137–4143.

Lick, S.; Brockmann, E.; Heller, K.J. (2000). Identification of *Lactobacillus delbrueckii* and subspecies by hybridization probes and PCR. ***Systematic Applied Microbiology***, 23: 251–259.

Lilly, D; Stillwell, R. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by Microorganisms. ***Science***; 47: 747-8.

Lionetti E, Miniello VL, Castellaneta SP, Magistá AM, de Canio A, Maurogiovanni G, Ierardi E, Cavallo L, Francavilla R. (2006). Lactobacillus reuteri therapy to reduce side-effects during anti-Helicobacter pylori treatment in children: a randomized placebo controlled trial. ***Alimentary pharmacology & therapeutics*** 15;24(10):1461-8. Epub 2006 Oct 10.

Lucchini, F.; Kmet, V.; Cesena, C.; Coppi, L.; Bottazzi, V.; Morelli, L. (1998). Specific detection of a probiotic *Lactobacillus* strain in faecal samples by using multiplex PCR. ***FEMS Microbiology Letters***, 158: 273–278.

Lynch, PA.; Gilpin, BJ.; Sinton, LW.; Savill, MG. (2002). The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human fecal pollution. ***Journal of Applied Microbiology***, 92: 526-533.

Mannu, L.; Comunian, R.; Scintu, M.F. (2000). Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. ***International Dairy Journal***, 10: 383–389.

Marteau, P.; Minekus, M.; Havenaar, R.; Huis in-t Veld, JHJ. (1997). Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. ***Journal of Dairy Science***, 80: 1031-1037.

Masters, C. I.; Shallcross, J. A.; Mackey, B. M. (1994). Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. ***Journal of Applied Bacteriology***, 77: 73-79.

Mater, D. D. G.; Bretigny, L.; Firmesse, O.; Flores, M.-J.; Mogenet, A.; Bresson, J.-L.; Corthier, G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yoghurt. ***FEMS Microbiology Letters***, 250: 185–187.

Mayo, B. y Delgado, S. (2003). ***Alimentación, nutrición y salud- Instituto Danone***, Vol. 10, N.º 3, páginas, 61-70.

McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. ***British Journal of Nutrition***, 88, Suppl. 1, S29–S37.

McCartney, AL; Wang, W; Tannock, GW (1996). Molecular analysis of the composition of the bifido bacterial and lactobacilli microflora of humans. ***Applied Environmental Microbiology***, 62: 4608-13.

McCarty, S. C. and Atlas, R. M. (1993). Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. ***PCR methods and applications***, 3:181-185.

McPherson, JM; Eckstein, PE.; Scoles, GJ.; Gajaonar, AA. (1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers and effects of primer and DNA concentration. ***Molecular and cellular probes***, 7: 293-299.

Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T. Zinn, K and Green, M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. ***Nucleic Acids Research***, 12: 70-35-7056.

Metchnikoff, E. (1907). The prolongation of life: optimistic studies, GP. Putnam and sons, The Knickerbocker Press, 161-183, New York.

Mitsuoka, Tomotari (1992). Intestinal Flora and Aging. ***Nutrition Reviews***; 50 (12): 438-46.

Moreno Espinosa, S. (2001). Características generales de la flora intestinal. ***Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría***, 15 (59): 75-78.

Moschetti, G.; Blaiotta, G.; Aponte, M.; Catzeddu, P.; Villani, F.; Deiana, P.; Coppola, S. (1998). Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. ***Journal of Applied Microbiology***, 85 (1): 25 – 36.

Moter, A. and Göbel, U.B. (2000). Fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. ***Journal of Microbiological Methods***. 41: 85-112.

Muller, M.R.; Ehrmann, M.A.; Vogel, R.F. (2000). Multiplex PCR for the detection of *Lactobacillus pontis* and two related species in a sourdough fermentation. ***Applied Environmental Microbiology***, 66: 2113–2116.

Mullié, C.; Odou, M.F.; Singer, E.; Romond, M.B.; Izard, D. (2003). Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. ***FEMS Microbiology Letters***, 222: 129–136.

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. ***Science of America***, 262: 56-61, 64–65.

Mykkänen, H; Laiho, K; Salminen, S (1998). Variations in faecal bacterial enzyme activities and associations with bowel function and diet in elderly subjects. ***Journal of Applied Microbiology***; 85: 37–41.

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. (2001). Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. ***Caries research***, Nov-Dec; 35 (6): 412-20.

Nebra, Y.; Blanch, A.R. (1999). A new selective medium for *Bifidobacterium spp.* ***Applied Environmental Microbiology***, 65: 5173-5176.

Nilsson, H., Blom, J., Al-Soud, W., Ljungh A., Andersen, L. and Eadström, T. (2002). Effect of cold starvation, acid stress and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. ***Applied Environmental Microbiology***, 68: 11-19.

Nova Rebato, E.; Gómez Martínez, S.; Marcos Sánchez, A. (2006). La actuación de las leches fermentadas sobre el sistema inmune. ***Alimentación, nutrición y salud***, Vol. 13, N.º 1, pp. 15-22.

O'Sullivan, DJ (1999). Methods for analysis of the intestinal microflora. In Probiotics. A Critical Review, pp. 23–44 [GW Tannock, editor]. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press.

O'Sullivan, DJ; Kullen, MJ (1998). Tracking of probiotic bifidobacteria in the intestine. ***International Dairy Journal*** 8, 513–525.

Ouwehand, C. A.; Kirjavainen, V. P.; Shortt, C.; Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. ***International Dairy Journal***. 9: 42-52.

Ouwehand, C. A.; Kurvinen, T.; Rissanen, P. (2004). Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study. ***International Journal of Food Microbiology***, 95: 103-106.

Parker, R. M., Barnes, N. M., (1990). mRNA: detection by in situ and northern hybridization. ***Methods in Molecular Biology***, 106: 247-283.

Parra, D.; Martínez de Morentín, B. E.; Cobo, J. M.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Martínez, J. A. (2006). La carga probiótica del yogur interviene en la asimilación aguda de nutrientes. ***Alimentación, nutrición y salud - Instituto Danone***, 13 (1): 9-14.

Patel, B. K., Banerjee, R. D. and Butcher, P.D. (1993). Determination of *Mycobacterium leprae* viability by polymerase chain reaction amplification of 71 Kda heat shock protein mRNA. ***The Journal of Infectious Diseases***, 168: 799-800.

Pedrosa, M. C.; Golner, B. B.; Goldin, B. R.; Barakat, S.; Dallal, G. E.; Russell, R. M. (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and

their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 61: 353–359.

Pereira DI, Gibson GR (2002). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. ***Critical reviews in biochemistry and molecular biology***, 37(4): 259-81.

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, w. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W. and Albertson, D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. ***Nature Genetics***, 20: 207-211.

Piqueres, P.; Moreno, Y; Alonso, JL.; Ferrús, MA. (2006). A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. ***Research in Microbiology***,157(4): 345-349.

Pochart, P.; Dewit, O.; Desjeux, J. F.; Bourlioux, P. (1989). Viable starter culture, p-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 49: 828-831.

Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourliou, P. & Rambaud, J. C. (1992). Survival of *Bifidobacteria* ingested in a fermented milk during their passage in the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 55: 78- 80.

Pot, B.; Hertel, C.; Ludwig, W.; Descheemaeker, P.; Kersters, K.; Schleifer, KH. (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotide probe hybridization. ***Journal of general microbiology***, vol. 139 (3), pp. 513-517.

Quere, F.; Deschamps, A.; Urdaci, M.C. (1997). DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. ***Journal of Applied Microbiology***, 82: 783–790.

Quiberoni, A.; Tailliez ,P.; Quénée, P.; Suarez, V.; Reinheimer, J. (1998). Genetic (RAPDPCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains, ***Journal of Applied Microbiology***, 85: 591–596.

Rådström, P.; Knutsson R.; Wolffs P. and Löfström C. (2004). Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. ***Molecular Biotechnology***, 26: 133-146

Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P. A., Russek-Cohen, E. and Colwell, R. R. (1994). Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I. ***Applied Environmental Microbiology***, 60: 3573-3578.

Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. and Werb, Z. (1988). Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. ***Science***. 241: 708-712.

Rebecchi, A.; Crivori, S.; Sarra, PG.; Coconcelli, PS. (1998) Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. ***Journal of Applied Microbiology***, 84: 1043–1049.

Recio, I.; López-Fandiño, R. (2005). Efectos en la salud de los ingredientes lácteos funcionales. ***Alimentación, nutrición y salud- Instituto Danone***, Vol. 12, N° 4, pp. 121-131.

Regnault, B.; Martin-Delautre, S.; Grimont, PAD. (2000). Problems associated with the direct viable count procedure applied to gram-positive bacteria. ***International Journal of Food Microbiology***, 55 (1-3): 281-284.

Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. ***FEMS immunology and medical microbiology***, Feb; 30 (1): 49-52.

Reynolds, D. T. and Fricker, C. R. (1999). Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. ***Journal of Applied Microbiology*** 86: 785-795.

Rizkalla, S. W.; Luo, J.; Kabir, M.; Chevalier, A.; Pacher N.; Slama, G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 72: 1474–1479.

Roberfroid, M B (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? ***American Journal of Clinical Nutrition***; 71(suppl): 1682S–7S.

Robins-Browne, R. M.; Levine, M. M. (1981). The fate of ingested lactobacilli in the proximal small intestine. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 34: 514-519.

Rodriguez., G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgwaty, H. F. (1992). Use of fluorescent redox probe for direct visualization of an actively respiring bacteria. ***Applied Environmental Microbiology***, 58: 1801-1808.

Rolfe, RD (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. ***Journal of Nutrition***, 130: 396S-402S.

Roller M, Clune Y, Collins K, Rechkemmer G, Watzl B. (2007). Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients. ***British Journal Nutrition***; 97(4): 676-84.

Roselló-Mora, R; Amann, R (2001).The species concept for prokaryotes. ***FEMS Microbiology Reviews***, 25:39-67.

Roy, D.; Sirois, S. (2000). Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. ***FEMS Microbiology Letters***, 191: 17–24.

Savadogo, A.; Ouattara, CAT.; W. Savadogo, PW.; Barro, N.; Ouattara, AS.; Traoré, AS. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. ***African Journal of Biotechnology***, 3 (3): 189-194.

Saccomanno, C. F., Bordonara, M., Chen, J. S. and Nordstrom, J. L. (1992). A faster ribonuclease protection assay. ***Biotechniques***. 13: 846-850.

Sakai, K.; Mori, M.; Fujii, A.; Iwami, Y.; Chukeatirote, E.; Shirai, Y. (2004). Fluorescent *in situ* hybridization analysis of open lactic acid fermentation of kitchen refuse using rRNA-targeted oligonucleotide probes. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***, 98(1): 48-56.

Salminen, S; Bouley, C.; Boutron-Ruault, M. C. (1998a). Gastrointestinal physiology and function—targets for functional food development. **British Journal of Nutrition**; 80 (supplement): 147–171.

Salminen, S.; von Wright, A.; Morellic, L.; Marteau, P.; Brassarte, D.; de Vos, W.M.; Fondéng, R.; Saxelin, M.; Collins, K.; Mogensen, G.; Birkeland, S.E.; Mattila-Sandholm, T. (1998b). Demonstration of safety of probiotics — a review. **International Journal of Food Microbiology**, 44 (1-2): 93-106.

Sanders, ME (2003). Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**; 61: 91–99.

Sanders, ME; Klaenhammer, TR (2001). Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, 84: 319-331.

Saran S, Gopalan S, Krishna TP. (2002). Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. **Nutrition**, May; 18 (5): 393-6.

Savaiano, D. A.; AbouElAnouar, A.; Smith, D. E.; Levitt, M. D. (1984). Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. **American Journal of Clinical Nutrition**, 40: 1219–1223.

Schleifer, K H; Kandler, O (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their

Selvaratnam, S., Schoedel, B. L., McFarland and Kulpa, C. F. (1995). Application of reverse transcriptase PCR for monitoring expression of the catabolic *dmpN* gene in a phenol-degrading sequencing reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 3981-3985.

Servis, N.A.; Nichols, S.; Adams, J.C. (1995). Development of a direct viable count procedure for some Gram-positive bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, 20 (4): 237 – 239.

Settanni, L.; van Sinderen, D.; Suzzi, G.; Rossi, J.; Corsetti, A. (2005). Rapid Differentiation and In Situ Detection of 16 Sourdough *Lactobacillus* Species by Multiplex PCR. ***Applied and Environmental Microbiology***, 71 (6): 3049–3059.

Sghir, A.; Gramet, G.; Suau, A.; Rochet, V.; Pochart, P.; Dore, J. (2000). Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. ***Applied and Environmental Microbiology***, Vol. 66, No. 5, p. 2263–2266.

Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. ***Journal of Dairy Science***, 83: 894–907.

Sheil B, Shanahan F, O'Mahony L. (2007). Probiotic effects on inflammatory bowel disease. ***The Journal of Nutrition***; 137 (3 Suppl 2): 819S-24S.

Sheridan, G. E., Masters, C. I., Shallcross, J. A., MacKey B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. ***Applied and Environmental Microbiology***, 64:1313-8.

Singh, A.; Pyle, BH.; McFeter, GA. (1989). Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. ***Journal of Microbiological Methods***, 10 (2): 91-101.

Singh, A.; Yu, F P.; McFeters, GA. (1990). Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direct viable count method using image analysis. ***Applied and Environmental Microbiology***, 56 (2): 389–394.

Smiley, K. L.; Niven, C. F.; Sherman, J. M. (1943). The Nutrition of *Streptococcus salivarius*. ***Journal of Bacteriology***, 45(5): 445–454.

Sohier, D.; Coulon, J.; Lonvaud-Funel, A. (1999). Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 49: 1075–1081.

Song, Y.; Kato, N.; Liu, C.; Matsumiya, Y.; Kato, H.; Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. ***FEMS Microbiology Letters***, 187: 167–173.

Stackebrandt, E; Teuber, M (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochimie**, 70: 317-324. Review.

Stackebrandt, E; Fowler, VJ; Woese, RA (1983). A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 4, no. 3, pp. 326-337.

Stackebrandt, E; Liesack, W; Witt, D (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. **Genetica**, 15: 115, 255-260. Review.

Sullivan, A; Edlund, C; Nord, CE (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. **Lancet Infectious Diseases**; 1: 101–114.

Swaminathan, B.; Barrett, TJ (1995). Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. **Journal of Microbiological Methods**, 23 (1): 129-139.

Swaminathan, B.; Matar, GM. (1993). Molecular typing methods. In: Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications”, pp: 26-50. De: DH. Persing, TF Smith, FC Tenover and TJ White. **American Society for Microbiology**. Washington DC.

Takayama, K. and Kjilleberg, S. (2000). The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. **Environmental Microbiology**, 2: 355-65.

Tannock, GW (2001). Molecular assessment of intestinal microflora. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73:410S-414S.

Tannock, GW; Tilsala-Timisjarvi, A.; Rodtong, S.; NG, J; Munro, K.; Alatossava, T. (1999). Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (9): 4264-4267.

Tannock, G. W.; Munro, K.; Harmsen, H. J. M. ; Welling, G. W. ; Smart, J.; Gopal, P. K. (2000). Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and environmental microbiology**, 66 (6): 2578–2588.

Tejeda Rojas, Antonio; Hernández Medel, M^a del Rosario; Solís Fuentes, Julio A. (2003). El microcosmos biológico: ¿aliado o adversario de la salud humana?. **La Ciencia y el hombre**, volumen XVI, número 3.

Tharmaraj, N.; Shah, NP. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, 86: 2288–2296.

Thomas MR, Litin SC, Osmon DR, Corr AP, Weaver AL, Lohse CM. (2001). Lack of effect of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. **Mayo Clinic proceedings**; 76(9): 883-9.

Tilsala-Timisjarvi, A.; Alatossava, T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International journal of food microbiology**, 35 (1): 49-56.

Tilsala-Timisjarvi, A.; Alatossava, T. (1998). Strain-Specific Identification of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with Randomly Amplified Polymorphic DNA-Derived PCR Primers. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (12): 4816-4819.

Torriani, S.; Zapparoli, G.; Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (10): 4351-4356.

Tubelius P, Stan V, Zachrisson A. (2005). Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind placebo-controlled study. **Environmental health: a global access science source**, 7; 4: 25.

Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S, Antoine JM. (2003). Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. **The journal of nutrition, health & aging**; 7 (2): 75-7.

Tynkkynen, S.; Satokari, R.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Saxelin, M. (1999) Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis and pulsed-

field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. ***Applied and Environmental Microbiology***, 65: 3908-3914.

Valmorri, S.; van Sinderen, D.; Suzzi, G.; Paparella, A.; Corsetti, A. (2006). Combination of Multiplex PCR and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Monitoring Common Sourdough-Associated *Lactobacillus* Species. ***Applied and Environmental Microbiology***, 72 (5): 3793–3796.

Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA (2007). *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. ***Pediatrics***; 109(4):678-84.

Van Reenen, C.A.; Dicks, L.M. (1996). Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. ***Current Microbiology***, 32:183–187.

Vandamme, P; Pot, B; Gillis, M; de Vos, P; Kersters, K; Swings, J (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, 60: 407-438.

Ventura, M.; Reniero, R.; Zink, R. (2001). Specific Identification and Targeted Characterization of *Bifidobacterium lactis* from Different Environmental Isolates by a Combined Multiplex-PCR Approach. ***Applied and Environmental Microbiology***, 67 (6): 2760-2765.

Vidal, R. (2006). Probióticos: aspectos microbiológicos y tecnológicos. ***Alimentación, nutrición y salud- Instituto Danone***, Vol. 13, N° 2, pp. 48-52.

Villarino, A., Bouvet, O. M. M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., and Grimont, A. D. (2000). Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat-or UV-killed cells. ***Research in Microbiology***, 151: 755-760.

Vincent, D.; Roy, D.; Mondou, F.; Déry, C. (1998). Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. ***International journal of food microbiology***, 43 (3): 185-193.

Virta, M., Lineri, S., Kankaanpää, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J., Lilius, E. M., D. (1998). Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. ***Applied Environmental Microbiology***, 64: 515-519.

Vlková, E.; Rada, V.; Trojanová, I. (2004). Enumeration, isolation, and identification of bifidobacteria from dairy products. ***Acta agriculturae slovenica***, 84 (1): 31-36.

Vogel, R.; Böcker, G.; Stolz, P.; Ehrmann, M.; Fanta, D.; Ludwig, W.; Pot, B.; Kersters, K.; Schleifer, K.H.; Hammes, W. (1994). Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov.. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 44: 223–239.

Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V. and Kapperud, G. (1999). Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. ***Applied Environmental Microbiology*** 65: 1636-1643.

Walter, J.; Tannock, G.W.; Tilsala-Timisjarvi, A.; Rodtong; S., Loach, D.M.; Munro, K.; Alatosava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. ***Applied Environmental Microbiology***, 66: 297–303.

Wang, RF; Cao, WW; Cerniglia, CE (1996). PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. ***Applied and Environmental Microbiology***; 62: 1242-7.

Ward, L.J.; Timmins, M.J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. ***Letters in Applied Microbiology***, 29 90–92.

Ward, P.; Roy, D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacterias. ***Lait***, 85: 23–32.

Weinsier, R L and Krumdieck, C L (2000). Dairy foods and bone health: examination of the evidence. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 72: 681–9.

Weizman, Z; Asli, G; Alsheikh, A. (2005). Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. ***Pediatrics***. Jan; 115 (1):5-9.

Welling, GW; Elfferich, P; Raangs, GC; Wildeboer-Veloo, AC; Jansen, GJ; Degener, JE. (1997). 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. ***Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement***. 222: 17-9.

Welsh, J.; McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. ***Nucleic Acids Research***, 18:7213-7218.

Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Refalski, JA; Tingey, SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18: 6531-6535.

Wilson, KH and Blichington, RB (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. ***Applied and Environmental Microbiology***; 62: 2273-8.

Winter, D. K. and Slavik, M. F. (2000). Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. ***Mol Cell. Probes***. 14: 95-99.

Woese, CR (1987). Bacterial Evolution. ***Microbiological Reviews***, June, p. 221-271.

Wood, BJB and Holzapfel, WH (1995). The genera of lactic acid bacteria. Volume 2, blackie academic and professional, Glasgow.

Yost, C.K.; Nattress, F.M. (2000). The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. ***Letters in Applied Microbiology***, 31: 129–133.

Yokomaku, D.; Yamaguchi, N.; Nasu, M. (2000). Improved Direct Viable Count Procedure for Quantitative Estimation of Bacterial Viability in Freshwater Environments. ***Applied and Environmental Microbiology***, 66 (12): 5544-5548.

Yuki, N.; Watanabe, K.; Mike, A.; Tagami, Y.; Tanaka, R.; Ohwaki, M.; Morotomi, M. (1999). Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the

Bibliografía

gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal of Food Microbiology*, 48 (1): 51-57.

Yuste, F. J.; Vázquez, C.; Köning, M. Alfredo; Bootello, A.; Coll, J.; González, P.; Baquero, F.; del Campo, R.; Bravo, D.; Abraira, V. (2003). Efectos de dos presentaciones comerciales de yogur sobre la salud de algunos colectivos de población sana. *Medicina Preventiva*, Vol. IX, N.º 4, 4º Trimestre.

Zoetendal EG, Akkermans AD & de Vos WM (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human faecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*; 64: 3854–3859.

LEGISLACIÓN

REAL DECRETO 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt.

Norma del CODEX para leches fermentadas. CODEX STAN 243-2003.

LIBROS Y PUBLICACIONES

Albalat, Concha; Mataix, José; Núñez, Manuel; Hernández, Enrique; Samartín, Sonia; Gómez, Sonia; Nova, Esther; Marcos, Ascensión; Pujol, P; Drobnic, F.; Ruiz, O.; Huguet, J.; Bixquert, Miguel; María, Rosa; Guarner, Franciso; Sastre, Ana. (1998). El hombre y las bacterias saludables. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (FVEA). Valencia.

Aleixandre Benavent, J. L. y García Esparza, M. J. (1999). Industrias agroalimentarias. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

Ashwell, M. (2004). Conceptos sobre los alimentos funcionales. International Life Science Institute (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, ILSI). ILSI Europe Concise Monograph Series. Bélgica.

Bergey's Manual

Collado Amores, M. C. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

Comité FAO-OMS (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canadá, 2002.

Comité FAO-OMS. ESTUDIO FAO Y OMS, ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN, 85 (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma.

European Commission (1998). Functional Food Science in Europe. British Journal of Nutrition, 80 (1): S1-S193.

Instituto Omega 3, Confederación de Consumidores y Usuarios (CECU) y Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (2003). Guía de alimentos funcionales.

Kandler, O.; N. Weiss. 1986. Regular, non-sporing Gram-positive rods, p. 1208–1234. In: P. H. A. Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. William and Wilkins, Baltimore.

Paulus M. Verschuren (2002). Functional foods- Scientific and global perspectives. ILSI Europe Report Series

Piqueres Alfonso, Patricia (2005). Desarrollo de técnicas moleculares de alta precisión para la detección y cuantificación de especies patógenas de *Helicobacter* en muestras ambientales: evidencia del potencial de transmisión de aguas y alimentos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

Salminen, S., and Von Wright, A. (1998). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc. New York.

Sarmiento Rubiano, Luz Adriana (2008). Influencia del consumo de sorbitol en la microbiota intestinal de un modelo animal. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia y Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Valencia.

Bibliografía

Saxelin, M. (2002). LGG Summatim. El Lactobacilo GG y sus efectos en la salud. Valio Ltd, R&D. Helsinki, Finlandia.

Tannock, Gerald W. (1999). Probiotics: a critical review. Horizon scientific press. England.

Yogures pasteurizados después de la fermentación. Educa marketing, 2005

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Asociación para la Autorregulación de la Comunicación Comercial:
www.autocontrol.es

Cinco días, 4/12/2004

Federación nacional de Industrias Lácteas: www.fenil.org

Grupo Leche Pascual: www.lechepascual.com

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: www.mapya.es

Organización Interprofesional Láctea: www.inlac.com

<http://www.usprobiotics.org>

Página web del Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC):
www.eufic.org

<http://www.elpais.com>

- 3 de junio de 2001. El MAPA reserva la denominación 'yogur' para los yogures tradicionales
- VIDAL MATÉ 22/01/2002 Recta final en la guerra por la denominación del yogur Pascual

- 4 de julio de 2003. El Codex Alimentarius rechaza el nombre de yogur para el postre lácteo pasteurizado.
- VIDAL MATÉ 18/02/2007. El yogur se queda en el frío.

Página web del Instituto Tomás Pascual: www.institutotomaspascual.es

Página web del Instituto Danone: www.institutodanone.es

Página web de LA Empresa Nacional MERCASA: www.mercasa.es

Página web de Puleva Salud: www.puleva.salud.com

<http://salud.medicinatv.com>

Página web de la Universidad de Wichita, Estados Unidos: www.wichita.edu

www.pediatraldia.cl

www.saludlandia.com

www.consumer.es

www.juliantrubin.com/encyclopedia/biochemistry/pcr.html

<http://www.international.inra.fr/>

ANEXOS

ANEXO I. Abreviaturas empleadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATCC	American Type CULTures Collection
BAL	Bacterias acidolácticas
CDR	Cantidad diaria recomendada
CeNAN	Centro Nacional de Alimentación y Nutrición
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FA	Formamida
FAO	Food and Agriculture Organization – Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
FLUOS	5(6)-carboxy-fluorescein-N-hidroxisuccinimida éster
FOSHU	Foods for Specific Health Use
FUFOSE	The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe
g	Gramo
G+C	Guanina+Citosina
ILSI	International Life Sciences Institute
IMS	Separación inmunomagnética
Kb	Kilobases (1000 pb)
kDa	KiloDaltons
M	Molar
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	Man Rogosa y Sharp, medio de cultivo
NCTC	National Collection of Type Cultures, England

Anexos

ng	Nanogramo
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PI	Yoduro de propidio
RAPDs	Amplificación aleatoria con iniciadores inespecíficos (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
t	Tiempo
T ^a	Temperatura
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	unidades
u.f.c.	Unidades formadoras de colonia
UPV	Universidad Politécnica de Valencia
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VNC	Viable No Cultivable
µl	Microlitro
µM	Micromolar

ANEXO II.

Lista actual de especies incluidas en el género *Lactobacillus* (datos obtenidos de List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, septiembre 2010, www.bacterio.cict.fr)

Especie	Subespecie	Referencia
<i>Lactobacillus</i>		Beijerinck 1901 (Approved Lists 1980), <i>genus</i> .
<i>L. acetotolerans</i>		Entani <i>et al.</i> 1986, sp. nov.
<i>L. acidifarinae</i>		Vancanneyt <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. acidipiscis</i>		Tanasupawat <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. acidophilus</i>		(Moro 1900) Hansen and Møcquot 1970 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. acidophilus</i>		Johnson <i>et al.</i> 1980, sp. nov.
<i>L. agilis</i>		Weiss <i>et al.</i> 1982, sp. nov.
<i>L. algidus</i>		Kato <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. alimentarius</i>		(ex Reuter 1970) Reuter 1983, sp. nov., nom. rev.
<i>L. amylolyticus</i>		Bohak <i>et al.</i> 1999, sp. nov.
<i>L. amylophilus</i>		Nakamura and Crowell 1981, sp. nov.
<i>L. amylophilus</i>		Naser <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. amylovorus</i>		Nakamura 1981, sp. nov.
<i>L. animalis</i>		Dent and Williams 1983, sp. nov.
<i>L. antri</i>		Roos <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. apodemi</i>		Osawa <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. aquaticus</i>		Mañes-Lázaro <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. arizonensis</i>		Swezey <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. aviarius</i>		Fujisawa <i>et al.</i> 1985, sp. nov.
<i>L. aviarius</i>	subsp. <i>araffinosus</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1986, subsp. nov.
	subsp. <i>aviarius</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1985, subsp. nov.
<i>L. bavaricus</i>		Stetter and Stetter 1980, sp. nov.
<i>L. bifementans</i>		(ex Pette and van Beynum 1943) Kandler <i>et al.</i> 1983, sp. nov., nom. rev.
<i>L. bobalius</i>		Mañes-Lázaro <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. brevis</i>		(Orla-Jensen 1919) Bergey <i>et al.</i> 1934 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. buchneri</i>		(Henneberg 1903) Bergey <i>et al.</i> 1923 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. bulgaricus</i>		(Orla-Jensen 1919) Rogosa and Hansen 1971 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. cacaonum</i>		De Bruyne <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. camelliae</i>		Tanasupawat <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. capillatus</i>		Chao <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. carnis</i>		Shaw and Harding 1986, sp. nov.
<i>L. casei</i>		(Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>alactosus</i>	Mills and Lessel 1973 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
	subsp. <i>casei</i>	(Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .

	subsp. <i>pseudopiantarum</i>	Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
	subsp. <i>rhamnosus</i>	Hansen 1968 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
	subsp. <i>tolerans</i>	Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
<i>L. catenaformis</i>		corrig. (Eggerth 1935) Moore and Holdeman 1970 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. cellobiosus</i>		Rogosa <i>et al.</i> 1953 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. ceti</i>		Vela <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. coleohominis</i>		Nikolaitchouk <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>L. collinoides</i>		Carr and Davies 1972 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. composti</i>		Endo and Okada 2007, sp. nov.
<i>L. concavus</i>		Tong and Dong 2005, sp. nov.
<i>L. confusus</i>		(Holzapfel and Kandler 1969) Sharpe <i>et al.</i> 1972 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. coryniformis</i>		Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>coryniformis</i>	Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
	subsp. <i>torquens</i>	Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
<i>L. crispatus</i>		(Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. crustorum</i>		Scheirlinck <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. curvatus</i>		(Troili-Petersson 1903) Abo-Elnaga and Kandler 1965 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>curvatus</i>	(Troili-Petersson 1903) Abo-Elnaga and Kandler 1965, subsp. nov.
	subsp. <i>melibiosus</i>	Torriani <i>et al.</i> 1996, subsp. nov.
<i>L. cypricasei</i>		Lawson <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>L. delbrueckii</i>		(Leichmann 1896) Beijerinck 1901 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>bulgaricus</i>	(Orla-Jensen 1919) Weiss <i>et al.</i> 1984, comb. nov.
	subsp. <i>delbrueckii</i>	(Leichmann 1896) Beijerinck 1901, subsp. nov.
	subsp. <i>indicus</i>	Dellaglio <i>et al.</i> 2005, subsp. nov.
	subsp. <i>lactis</i>	(Orla-Jensen 1919) Weiss <i>et al.</i> 1984, comb. nov.
<i>L. dextrinicus</i>		(Coster and White 1964) Haakensen <i>et al.</i> 2009, comb. nov.
<i>L. diolivorans</i>		Krooneman <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>L. divergens</i>		Holzapfel and Gerber 1984, sp. nov.
<i>L. durianis</i>		Leisner <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>L. equi</i>		Morotomi <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>L. equicursoris</i>		Morita <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>L. equigenerosi</i>		Endo <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. fabifermentans</i>		De Bruyne <i>et al.</i> 2009, sp. nov.

<i>L. farciminis</i>	(ex Reuter 1970) Reuter 1983, sp. nov., nom. rev.
<i>L. farraginis</i>	Endo and Okada 2007, sp. nov.
<i>L. ferintoshensis</i>	Simpson <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>L. fermentum</i>	Beijerinck 1901 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. florum</i>	Endo <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>L. fornicalis</i>	Dicks <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. fructivorans</i>	Charlton <i>et al.</i> 1934 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. fructosus</i>	Kodama 1956 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. frumenti</i>	Müller <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. fuchuensis</i>	Sakala <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>L. gallinarum</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1992, sp. nov.
<i>L. gasseri</i>	Lauer and Kandler 1980, sp. nov.
<i>L. gastricus</i>	Roos <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. ghanensis</i>	Nielsen <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. graminis</i>	Beck <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>L. halotolerans</i>	(ex Reuter 1970) Kandler <i>et al.</i> 1983, nom. rev., comb. nov.
<i>L. hammersii</i>	Valcheva <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. hamsteri</i>	Mitsuoka and Fujisawa 1988, sp. nov.
<i>L. harbinensis</i>	Miyamoto <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. hayakitensis</i>	Morita <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. helveticus</i>	(Orla-Jensen 1919) Bergey <i>et al.</i> 1925 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. heterohiochii</i>	Kitahara <i>et al.</i> 1957 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. hilgardii</i>	Douglas and Cruess 1936 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. homohiochii</i>	Kitahara <i>et al.</i> 1957 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. hordei</i>	Rouse <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. iners</i>	Falsen <i>et al.</i> 1999, sp. nov.
<i>L. ingluviei</i>	Baele <i>et al.</i> 2003, sp. nov.
<i>L. intestinalis</i>	(ex Hemme 1974) Fujisawa <i>et al.</i> 1990, sp. nov., nom. rev.
<i>L. jensenii</i>	Gasser <i>et al.</i> 1970 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. johnsonii</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1992, sp. nov.
<i>L. kalixensis</i>	Roos <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. kandleri</i>	Holzappel and van Wyk 1983, sp. nov.
<i>L. kefiranofaciens</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1988, sp. nov.
<i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Fujisawa <i>et al.</i> 1988, subsp. nov.
subsp. <i>kefirgranum</i>	(Takizawa <i>et al.</i> 1994) Vancanneyt <i>et al.</i> 2004, comb. nov.
<i>L. kefirgranum</i>	Takizawa <i>et al.</i> 1994, sp. nov.
<i>L. kefiri</i>	corr. Kandler and Kunath 1983, sp. nov.
<i>L. kimchii</i>	Yoon <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. kisonensis</i>	Watanabe <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. kitasatonis</i>	Mukai <i>et al.</i> 2003, sp. nov.

Anexos

<i>L. kunkeei</i>		Edwards <i>et al.</i> 1998, sp. nov.
<i>L. lactis</i>		(Orla-Jensen 1919) Bergey <i>et al.</i> 1934 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. leichmannii</i>		(Henneberg 1903) Bergey <i>et al.</i> 1923 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. lindneri</i>		(ex Henneberg 1901) Back <i>et al.</i> 1997, sp. nov., nom. rev.
<i>L. malefermentans</i>		(ex Russell and Walker 1953) Farrow <i>et al.</i> 1989, sp. nov., nom. rev.
<i>L. mali</i>		Carr and Davies 1970 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. maltaromicus</i>		Miller <i>et al.</i> 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. manihotivorans</i>		Morlon-Guyot <i>et al.</i> 1998, sp. nov.
<i>L. mindensis</i>		Ehrmann <i>et al.</i> 2003, sp. nov.
<i>L. minor</i>		(ex Abo-Elnaga and Kandler 1965) Kandler <i>et al.</i> 1983, nom. rev., comb. nov.
<i>L. minutus</i>		(Hauduroy <i>et al.</i> 1937) Moore and Holdeman 1972 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. mucosae</i>		Roos <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. murinus</i>		Hemme <i>et al.</i> 1982, sp. nov.
<i>L. nagelii</i>		Edwards <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. namurensis</i>		Scheirlinck <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. nantensis</i>		Valcheva <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. nodensis</i>		Kashiwagi <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. oeni</i>		Mañes-Lázaro <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. oligofermentans</i>		Koort <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. oris</i>		Farrow and Collins 1988, sp. nov.
<i>L. otakiensis</i>		Watanabe <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. panis</i>		Wiese <i>et al.</i> 1996, sp. nov.
<i>L. pantheris</i>		Liu and Dong 2002, sp. nov.
<i>L. parabrevis</i>		Vancanneyt <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. parabuchneri</i>		Farrow <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>L. paracasei</i>		Collins <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>L. paracasei</i>	subsp. <i>paracasei</i>	Collins <i>et al.</i> 1989, subsp. nov.
	subsp. <i>tolerans</i>	(Abo-Elnaga and Kandler 1965) Collins <i>et al.</i> 1989, comb. nov.
<i>L. paracollinooides</i>		Suzuki <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>L. parafarraginis</i>		Endo and Okada 2007, sp. nov.
<i>L. parakefiri</i>		corrig. Takizawa <i>et al.</i> 1994, sp. nov.
<i>L. paralimentarius</i>		Cai <i>et al.</i> 1999, sp. nov.
<i>L. paraplantarum</i>		Curk <i>et al.</i> 1996, sp. nov.
<i>L. paucivorans</i>		Ehrmann <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>L. pentosus</i>		(ex Fred <i>et al.</i> 1921) Zanoni <i>et al.</i> 1987, sp. nov., nom. rev.
<i>L. perolens</i>		Back <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>L. piscicola</i>		Hiu <i>et al.</i> 1984, sp. nov.
<i>L. plantarum</i>		(Orla-Jensen 1919) Bergey <i>et al.</i> 1923 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. plantarum</i>	subsp. <i>argenteratensis</i>	Bringel <i>et al.</i> 2005, subsp. nov.

	subsp. <i>plantarum</i>	(Orla-Jensen 1919) Bergey <i>et al.</i> 1923, subsp. nov.
<i>L. pobuzihii</i>		Chen <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>L. pontis</i>		Vogel <i>et al.</i> 1994, sp. nov.
<i>L. psittaci</i>		Lawson <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>L. rapi</i>		Watanabe <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. rennini</i>		Chenoll <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. reuteri</i>		Kandler <i>et al.</i> 1982, sp. nov.
<i>L. rhamnosus</i>		(Hansen 1968) Collins <i>et al.</i> 1989, comb. nov.
<i>L. rimae</i>		Olsen <i>et al.</i> 1991, sp. nov.
<i>L. rogosae</i>		Holdeman and Moore 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. rossiae</i>		corrig. Corsetti <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. ruminis</i>		Sharpe <i>et al.</i> 1973 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. saerimneri</i>		Pedersen and Roos 2004, sp. nov.
<i>L. sakei</i>		corrig. Katagiri <i>et al.</i> 1934 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. sakei</i>	subsp. <i>carnosus</i>	corrig. Torriani <i>et al.</i> 1996, subsp. nov.
<i>L. sakei</i>	subsp. <i>sakei</i>	corrig. Katagiri <i>et al.</i> 1934, subsp. nov.
<i>L. salivarius</i>		Rogosa <i>et al.</i> 1953 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>salicinii</i>	Rogosa <i>et al.</i> 1953 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
	subsp. <i>salivarius</i>	Rogosa <i>et al.</i> 1953 (Approved Lists 1980), <i>subspecies</i> .
<i>L. sanfranciscensis</i>		corrig. (ex Kline and Sugihara 1971) Weiss and Schillinger 1984, sp. nov., nom. rev.
<i>L. satsumensis</i>		Endo and Okada 2005, sp. nov.
<i>L. secaliphilus</i>		Ehrmann <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. senmaizukei</i>		Hiraga <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>L. sharpeae</i>		Weiss <i>et al.</i> 1982, sp. nov.
<i>L. siliginis</i>		Aslam <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. similis</i>		Kitahara <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>L. sobrius</i>		Konstantinov <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. spicheri</i>		Meroth <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>L. suebicus</i>		Kleynmans <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>L. sucicola</i>		Irisawa and Okada 2009, sp. nov.
<i>L. sunkii</i>		Watanabe <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. suntoryeus</i>		Cachat and Priest 2005, sp. nov.
<i>L. taiwanensis</i>		Wang <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. thailandensis</i>		Tanasupawat <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>L. thermotolerans</i>		Niamsup <i>et al.</i> 2003, sp. nov.
<i>L. trichodes</i>		Fornachon <i>et al.</i> 1949 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. tuccei</i>		Chenoll <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. uli</i>		Olsen <i>et al.</i> 1991, sp. nov.
<i>L. ultunensis</i>		Roos <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>L. uvarum</i>		Mañes-Lázaro <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>L. vaccinostercus</i>		Kozaki and Okada 1983, sp. nov.
<i>L. vaginalis</i>		Embley <i>et al.</i> 1989, sp. nov.

Anexos

<i>L. versmoldensis</i>	Kröckel <i>et al.</i> 2003, sp. nov.
<i>L. vini</i>	Rodas <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>L. viridescens</i>	Niven and Evans 1957 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. vitulinus</i>	Sharpe <i>et al.</i> 1973 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. xylosus</i>	Kitahara 1938 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>L. yamanashiensis</i>	(ex Nonomura <i>et al.</i> 1965) Nonomura 1983, sp. nov., nom. rev.
subsp. <i>mali</i>	(Carr and Davies 1970) Nonomura 1983, comb. nov.
subsp. <i>yamanashiensis</i>	(ex Nonomura <i>et al.</i> 1965) Nonomura 1983, subsp. nov., nom. rev.
<i>L. zaeae</i>	(ex Kuznetsov 1959) Dicks <i>et al.</i> 1996, nom. rev., comb. nov.
<i>L. zymae</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> 2005, sp. nov.

ANEXO III.

Lista actual de especies incluidas en el género *Streptococcus* (datos obtenidos de List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura, septiembre 2010, www.bacterio.cict.fr)

Especie	Subespecie	Referencias
<i>Streptococcus</i>		Rosenbach 1884 (Approved Lists 1980), <i>genus</i> .
<i>S. acidominimus</i>		Ayers and Mudge 1922 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. adjacens</i>		Bouvet <i>et al.</i> 1989, <i>sp. nov.</i>
<i>S. agalactiae</i>		Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. alactolyticus</i>		Farrow <i>et al.</i> 1985, <i>sp. nov.</i>
<i>S. anginosus</i>		(Andrewes and Horder 1906) Smith and Sherman 1938 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. australis</i>		Willcox <i>et al.</i> 2001, <i>sp. nov.</i>
<i>S. bovis</i>		Orla-Jensen 1919 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. caballi</i>		Milinovich <i>et al.</i> 2008, <i>sp. nov.</i>
<i>S. canis</i>		Devriese <i>et al.</i> 1986, <i>sp. nov.</i>
<i>S. caprinus</i>		Brooker <i>et al.</i> 1996, <i>sp. nov.</i>
<i>S. castoreus</i>		Lawson <i>et al.</i> 2005, <i>sp. nov.</i>
<i>S. cecorum</i>		Devriese <i>et al.</i> 1983, <i>sp. nov.</i>
<i>S. constellatus</i>		(Prévot 1924) Holdeman and Moore 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
	subsp. <i>constellatus</i>	(Prévot 1924) Holdeman and Moore 1974, <i>subsp. nov.</i>
	subsp. <i>pharyngis</i>	Whiley <i>et al.</i> 1999, <i>subsp. nov.</i>
<i>S. cremoris</i>		Orla-Jensen 1919 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. criceti</i>		corrig. Coykendall 1977 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. cristatus</i>		corrig. Handley <i>et al.</i> 1991, <i>sp. nov.</i>
<i>S. defectives</i>		Bouvet <i>et al.</i> 1989, <i>sp. nov.</i>
<i>S. dentapri</i>		Takada <i>et al.</i> 2010, <i>sp. nov.</i>
<i>S. dentirosetti</i>		Takada and Hirasawa 2008, <i>sp. nov.</i>
<i>S. devriesei</i>		Collins <i>et al.</i> 2004, <i>sp. nov.</i>
<i>S. didelphis</i>		Rurangirwa <i>et al.</i> 2000, <i>sp. nov.</i>
<i>S. difficilis</i>		corrig. Eldar <i>et al.</i> 1995, <i>sp. nov.</i>
<i>S. downei</i>		Whiley <i>et al.</i> 1988, <i>sp. nov.</i>
<i>S. durans</i>		(ex Sherman and Wing 1937) Knight <i>et al.</i> 1984, <i>sp. nov.</i> , <i>nom. rev.</i>
<i>S. dysgalactiae</i>		(ex Diernhofer 1932) Garvie <i>et al.</i> 1983, <i>sp. nov.</i> , <i>nom. rev.</i>
	subsp. <i>dysgalactiae</i>	(ex Diernhofer 1932) Garvie <i>et al.</i> 1983, <i>subsp. nov.</i>
	subsp. <i>equisimilis</i>	Vandamme <i>et al.</i> 1996, <i>subsp. nov.</i>
<i>S. entericus</i>		Vela <i>et al.</i> 2002, <i>sp. nov.</i>

<i>S. equi</i>	Sand and Jensen 1888 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	Sand and Jensen 1888, subsp. nov.
<i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i>	Fernández <i>et al.</i> 2004, subsp. nov.
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	(ex Frost and Englebrecht 1936) Farrow and Collins 1985, nom. rev., comb. nov.
<i>S. equinus</i>	Andrewes and Horder 1906 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. faecalis</i>	Andrewes and Horder 1906 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. faecium</i>	Orla-Jensen 1919 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. ferus</i>	(ex Coykendall 1977) Coykendall 1983, sp. nov., nom. rev.
<i>S. gallinaceus</i>	Collins <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>S. gallinarum</i>	Bridge and Sneath 1982, sp. nov.
<i>S. gallolyticus</i>	Osawa <i>et al.</i> 1996, sp. nov.
subsp. <i>gallolyticus</i>	Osawa <i>et al.</i> 1996, subsp. nov.
subsp. <i>macedonicus</i>	(Tsakalidou <i>et al.</i> 1998) Schlegel <i>et al.</i> 2003, comb. nov.
subsp. <i>pasteurianus</i>	(Poyart <i>et al.</i> 2002) Schlegel <i>et al.</i> 2003, comb. nov.
<i>S. garvieae</i>	Collins <i>et al.</i> 1984, sp. nov.
<i>S. gordonii</i>	Kilian <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>S. halichoeri</i>	Lawson <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>S. hansenii</i>	Holdeman and Moore 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. henryi</i>	Miliovich <i>et al.</i> 2008, sp. nov.
<i>S. hyointestinalis</i>	Devriese <i>et al.</i> 1988, sp. nov.
<i>S. hyovaginalis</i>	Devriese <i>et al.</i> 1997, sp. nov.
<i>S. ictaluri</i>	Shewmaker <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>S. infantarius</i>	Schlegel <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
subsp. <i>coli</i>	Schlegel <i>et al.</i> 2003, subsp. nov.
subsp. <i>infantarius</i>	Schlegel <i>et al.</i> 2003, subsp. nov.
<i>S. infantis</i> Kawamura <i>et al.</i> 1998, sp. nov.	
<i>S. iniae</i>	Pier and Madin 1976 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. intermedius</i>	Prévot 1925 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. intestinalis</i>	Robinson <i>et al.</i> 1988, sp. nov.
<i>S. lactis</i>	(Lister 1873) Löhnis 1909 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
subsp. <i>cremoris</i>	(Orla-Jensen 1919) Garvie and Farrow 1982, comb. nov.
subsp. <i>diacetilactis</i>	(ex Matuszewski <i>et al.</i> 1936) Garvie and Farrow 1982, nom. rev., comb. nov.
subsp. <i>lactis</i>	(Lister 1873) Löhnis 1909, subsp. nov.
<i>S. lutetiensis</i>	Poyart <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>S. macacae</i>	Beighton <i>et al.</i> 1984, sp. nov.

<i>S. macedonicus</i>	Tsakalidou <i>et al.</i> 1998, sp. nov.
<i>S. marimammalium</i>	Lawson <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>S. massiliensis</i>	Glazunova <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>S. merionis</i>	Tappe <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>S. minor</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>S. mitis</i>	Andrewes and Horder 1906 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. morbillorum</i>	(Prévot 1933) Holdeman and Moore 1974 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. mutans</i>	Clarke 1924 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. oligofermentans</i>	Tong <i>et al.</i> 2003, sp. nov.
<i>S. oralis</i>	Bridge and Sneath 1982, sp. nov.
<i>S. orisratti</i>	Zhu <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>S. orisuis</i>	Takada and Hirasawa 2007, sp. nov.
<i>S. ovis</i>	Collins <i>et al.</i> 2001, sp. nov.
<i>S. parasanguinis</i>	corrige. Whiley <i>et al.</i> 1990, sp. nov.
<i>S. parauberis</i>	Williams and Collins 1990, sp. nov.
<i>S. parvulus</i>	(Weinberg <i>et al.</i> 1937) Cato 1983, comb. nov.
<i>S. pasteurianus</i>	Poyart <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>S. peroris</i>	Kawamura <i>et al.</i> 1998, sp. nov.
<i>S. phocae</i>	Skaar <i>et al.</i> 1994, sp. nov.
<i>S. plantarum</i>	Collins <i>et al.</i> 1984, sp. nov.
<i>S. pleomorphus</i>	Barnes <i>et al.</i> 1979 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. pluranimalium</i>	Devriese <i>et al.</i> 1999, sp. nov.
<i>S. plurextorum</i>	Vela <i>et al.</i> 2009, sp. nov.
<i>S. pneumoniae</i>	(Klein 1884) Chester 1901 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. porci</i>	Vela <i>et al.</i> 2010, sp. nov.
<i>S. porcicus</i>	Collins <i>et al.</i> 1985, sp. nov.
<i>S. pseudopneumoniae</i>	Arbique <i>et al.</i> 2005, sp. nov.
<i>S. pseudoporcinus</i>	Bekal <i>et al.</i> 2007, sp. nov.
<i>S. pyogenes</i>	Rosenbach 1884 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. raffinolactis</i>	Orla-Jensen and Hansen 1932 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. ratti</i>	corrige. Coykendall 1977 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. saccharolyticus</i>	Farrow <i>et al.</i> 1985, sp. nov.
<i>S. salivarius</i>	Andrewes and Horder 1906 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	Andrewes and Horder 1906, subsp. nov.
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	(Orla-Jensen 1919) Farrow and Collins 1984, comb. nov.
<i>S. sanguinis</i>	corrige. White and Niven 1946 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. shiloi</i>	Eldar <i>et al.</i> 1995, sp. nov.
<i>S. sinensis</i>	Woo <i>et al.</i> 2002, sp. nov.

Anexos

<i>S. sobrinus</i>	(ex Coykendall 1974) Coykendall 1983, nom. rev., comb. nov.
<i>S. suis</i>	(ex Elliot 1966) Kilpper-Bälz and Schleifer 1987, sp. nov., nom. rev.
<i>S. thermophilus</i>	Orla-Jensen 1919 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. thoralensis</i>	Devriese <i>et al.</i> 1997, sp. nov.
<i>S. uberis</i>	Diernhofer 1932 (Approved Lists 1980), <i>species</i> .
<i>S. urinalis</i>	Collins <i>et al.</i> 2000, sp. nov.
<i>S. vestibularis</i>	Whiley and Hardie 1988, sp. nov.
<i>S. waius</i>	Flint <i>et al.</i> 1999, sp. nov.

ANEXO IV. Medios de cultivo

A continuación, se describe la composición de cada uno de los medios de cultivos empleados, referida a un litro de agua destilada.

1. AGAR MRS O MAN, ROGOSA AND SHARPE AGAR (SCHARLAU)

Composición (g/l):	
Peptona proteosa	10,0 g
Extracto de Carne	8,0 g
Extracto de Levadura	4,0 g
D(+) Glucosa	20,0 g
Acetato de Sodio	5,0 g
Citrato triamónico	2,0 g
Sulfato Magnésico	0,2 g
Sulfato manganoso	0,05 g
Fosfato dipotásico	2,0 g
Polisorbato 80	1 ml
Agar	14,0 g
pH final aproximado	6,2±0,2

Preparación:

Suspender 66 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar durante 15 minutos a 121°C en autoclave.

2. MRS CALDO (MERCK):

Composición (g/l):	
Citrato triamónico	2,0 g
Extracto de Carne	8,0 g
Extracto de Levadura	4,0 g
D(+)-Glucosa	20,0 g
Sulfato Magnésico	0,2 g
Sulfato manganoso	0,05 g
Peptona	10,0 g
Acetato de Sodio	5,0 g
Polisorbato 80	1 ml
pH final aproximado	6,3

Medio esterilizado a 121 °C durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 20 minutos.

3. AGAR M17 (MERCK):

Composición (g/l):	
Glicerofosfato sódico	19,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Triptona	2,5 g
Peptona de carne	2,5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Ácido ascórbico	0,5 g
Sulfato magnésico	0,25 g
Agar	18,0 g
pH final aproximado	7

Medio esterilizado a 121 °C durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 20 minutos.

4. M-17 CALDO (MERCK):

Composición (g/l):	
Glicerofosfato sódico	19,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Triptona	2,5 g
Peptona de carne	2,5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Ácido ascórbico	0,5 g
Sulfato magnésico	0,25 g
pH final aproximado	7

Medio esterilizado a 121 °C durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 20 minutos.

5. MEDIO LS DIFFERENTIAL

Composición (g/l):	
Triptona	10,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Cisteína	0,3 g
Agar	18,0 g
pH final aproximado	6,7

En frasco aparte y se añade una vez atemperado al medio:

Composición (g/l):	
Leche descremada	10,0 g
Solución estéril de TTC al 1%	10 ml

6. CALDO GLICERINADO 20%

Composición (g/l):	
Polvo "Lab-Lemco"	10,0 g
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Glicerol	2,0 g

7. AGAR ROGOSA (OXOID):

Composición (g/l):	
Acetato sódico	25,0 g
Glucosa	20,0 g
Triptona	10,0 g
Fosfato monopotásico	6,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Citrato amónico	2,0 g
Mono-oleato de sorbitan	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,575 g
Sulfato de manganeso	0,12 g
Sulfato férrico	0,034 g
Agar-agar	20,0 g
Agua destilada	1L
pH final aproximado	5,4±0,2

Preparación:

Suspender 75 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Añadir 1,32 ml de ácido acético al 96% y mezclar bien. Calentar hasta 90-100°C durante 2 minutos. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Distribuir asépticamente.

8. AGUA DE PEPTONA TAMPONADA (MERCK):

Composición (g/l):	
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Tampón fosfato	10,5 g
Agua destilada	1 L

Preparación:

Disolver 25.5 g en 1 litro de agua desmineralizada; eventualmente introducir en recipientes pequeños; tratar en autoclave (15 minutos a 121°C).

9. MEDIO BASE DE AGAR SANGRE COLUMBIA (SCHARLAU)

Composición (g/l):	
Peptona caseína	12,0 g
Peptona de carne	11,0 g
Almidón	1,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 L
pH	7,3±0,2

Preparación:

Suspender 44,5 g de polvo en 950 ml de agua destilada. Llevar a ebullición y distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45-50 °C y añadir asepticamente sangre estéril desfibrinada en una proporción del 5%.

10. MEDIO AGAR MACCONKEY N° 3 (OXOID)

Composición (g/l):	
Peptona	23,0 g
Lactosa	10,0 g
Sal biliar n° 3	1,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 L
pH	7,1±0,2

Preparación:

Suspender 51,5 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y distribuir en placas. Conservar el medio preparado a temperaturas de entre 2 y 8°C.

11. MEDIO WILKINS-CHALGREN PARA ANAEROBIOS (WILKINS-CHALGREN ANAEROBE) (OXOID)

Composición (g/l):	
Triptona	10,0 g
Peptona de gelatina	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	1,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
L-arginina	1,0 g
Piruvato sódico	1,0 g
Menadiona	0,0005 g
Haemina	0,005 g
Agua destilada	1 L
pH	7,1±0,2

Preparación:

Suspender 33 g de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 50-55°C y distribuir en placas de Petri estériles.

12. MEDIO AGAR PLATE COUNT(SCHARLAU)

Composición (g/l):	
Peptona caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 L
pH	7,0±0,2

Preparación:

Suspender 23,5 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta ebullición y hervir hasta disolución total. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

13. MEDIO BFM

Composición (g/l):	
Extracto de levadura	7 g
Cloruro sódico	5 g
Peptona	5 g
Lactulosa	5 g
Cloruro de litio	2 g
Extracto de carne	2 g
Ácido propiónico	5 ml
Triptona	2 g
Almidón	2 g
Cisterna	0,5 g
Tiamina	1 mg
Riboflavina	1 mg
Azul de metileno	16 mg
Agar	18 g
pH	5,5

Preparación:

Todos los componentes excepto el ácido propiónico se disuelven en agua destilada y son esterilizados en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente, se deja atemperar el medio hasta 55°C aproximadamente, momento en que se añade el ácido propiónico y se ajusta el pH con hidróxido sódico 10 M hasta pH igual a 5,5.

ANEXO IV

Soluciones, reactivos y material para identificación con PCR

Solución CTAB/CINa

CTAB 10% en CINa 0,7M

Proteinasa K

20 mg/ml de agua estéril e incubar a 37°C durante 1 hora aproximadamente.

Cloroformo/alcohol isoamílico

Solución de proporción 24:1 (v/v) de cloroformo y alcohol isoamílico.

Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico

Solución de proporción 25:24:1 (v/v/v) de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico.

Lisozima (Sigma)

Concentración 5 mg/ml, introducir en un baño a 37°C durante 10 minutos antes de su uso.

Espermidina

Solución de espermidina (SIGMA) 0,1 M en TRIS-HCl 0,1 M, pH 7.

Tampón TE

Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM

Solución RNAsa

Composición	
RNAsa A (Boehringer)	5 mg
EDTA 0,5 M	15 ml
NaCl 0,1 M	6 ml
Tris 1 M (pH 8,3)	1,5 ml
Agua MilliQ	77 ml

Calentar a 100° C durante 5 min para inactivar las DNAsas y enfriar. Conservar a – 20°C.

Tampón TAE 1X

Composición	
Tris-CHI	0,04 M
EDTA	0,002 M
Ácido acético glacial	0,02 M

Tampón de carga

Composición	
Azul bromofenol 1%	2,5 ml
Ficoll	2,5 g
EDTA 0,5M	1 ml
Agua MilliQ	4 ml

Gel de Agarosa

Agarosa SEAKEM LE (FMC Products) 1% y Agarosa NuSieve 3%.

Solución de bromuro de etidio, 10 mg/ml (IBERLABO)

Pesar la agarosa y transferir a un matraz. Añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y atemperar hasta 50° C. Añadir 5 µl de solución de bromuro de etidio por cada 50 ml de tampón TAE 1X y verter en el molde.

Marcadores de pesos moleculares

100 pb DNA Ladder (BioLabs L-101): de 100 a 4000 pb

Marcador L-101	50 µl
Tampón TE	750 µl
Tampón de carga	200 µl

ANEXO IV. Soluciones y reactivos para FISH

PBS 3X

Compuesto	Cantidad
NaCl	22,8 g
NaH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	2,88 g
Agua destilada	1L
pH 7.5	

Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado. Esterilizar a 115°C, 20 min.

Paraformaldehido (Panreac)

Calentar 30 ml de agua destilada a 60° C.

Añadir 2 g de PFA al agua precalentada y agitar. Se adiciona unas gotas de NaOH 5M para disolver el polvo.

Completar hasta 50 ml con PBS 3X. Ajustar el pH hasta 7,5. Eliminar los posibles cristales mediante filtración.

Guardar a 4° C durante un máximo de 48 h, o a -20° C varias semanas.

Solución de gelatina

Compuesto	Cantidad
Gelatina bacteriológica (Cultimed 170-180)	0,1%
Sulfato potásico cromato (Sigma C-5926)	0,01%

Calentar previamente 40 ml de agua destilada en agitación, añadir 50 mg de gelatina y 5 mg de sal de cromato. Una vez disuelta dejar atemperar a 45° C.

Portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld 9782100)

Lavar los portaobjetos con desengrasante, enjuagar con agua destilada y secar al aire.

Sumergir los portaobjetos en gelatina al 0.1% y dejar escurrir.

Secar al aire.

Tampón de hibridación

NaCl 5M	360 µl (0.9M)
HCl-Tris 1M	40 µl (20 mM)
SDS 10%	2 µl (0.01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	X µl (0-50%)
Agua milliQ	completar hasta 2 ml

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml y agitar.

Tampón de lavado

NaCl 5M*	(9000-100 µl)
HCl-Tris 1M	1000 µl
SDS 10%	50 µl
EDTA 0,5M**	500 µl
Agua milliQ	completar hasta 50 ml

* La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

0%	formamida	9000 µl NaCl
20%	formamida	2150 µl NaCl
30%	formamida	1020 µl NaCl
35%	formamida	700 µl NaCl

** Solo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

Sondas

Diluir en agua MilliQ la solución madre de sondas marcadas con fluorocromos (MWG Biotech, Germany) hasta una concentración 50 ng/ μ l. Tanto la solución madre como la de trabajo se almacenan a -20°C en oscuridad.

ANEXO V.
Otros reactivos

PARA DVC

Antibióticos:

Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, novobiocina, moxifloxacino y amoxicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis,)

PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Glutaraldehído (Sigma-Aldrich, Madrid, España) En PBS 0.1 M (pH 7,2)

Tetroxido de Osmio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

Membranas de policarbonato de 25mm de diámetro y 0,2 μm de tamaño de poro (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

ANEXO VI.

Secuenciación parcial de los genes 16S y 23S de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* Y7

16S CEPA Y7 - DN100 182 (about 1500 bp)

gagttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcgagctgaattcaaagatc
ccttcgggggtgattgttgacgctagcggcggatgggtgagtaacacgctgggcaatctgcctaagactgggatac
cacttgaaacaggtgctaataccggataacaacatgaatcgcgatgattcaagttgaaagggcggyaagctgtca
ctftaggatgagcccggcgcattagctagtgtggggtaaaggcctaccaaggcaatgatgctagccgagttg
agagactgatcggccacattgggactgagacacggccaaactcctacgggaggcagcagtagggaatctccac
aatggacgcaagtctgatggagcaacgcccgtgagtgaagaaggtttcggatcgtaaagctctgttgggtgaag
aaggatagaggcagtaactggtcttatttgacgtaataaccagaaagtcacggtaactacgtgccagcagccg
cgtaatacgtaggtggcaagcgtgtccggtatttgggctaaagcgcagcaggcggatgataagtctgatgt
gaaagcccacggctcaaccgtggaactgcatcggaaactgcatctctgagtcgagaaggagagtggaattccat
gtgtagcggtggaatgcgtagatataatggaagaacaccagtgggcgaaggcggctctctggtctgcaactgacgctga
ggctcgaagcatgggtagcgaacaggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgatgagcgtaggtgttg
ggacttccggtcctcagtgccgagcaaacgcattaagcgtccgcctggggagtacgaccgcaaggtgaaactc
aaaggaattgacggggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttaccag
gtcttgacatcctgygctacacctagagataggtggtccctcggggacgcagagacaggtggtgcatggctgctgc
agctcgtgctgtagatgttgggttaagtcccgaacgagcgaaccctgtctttagttgccatcattaagttgggcact
ctaaagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtgggatgacgtcaagtcacatgcccttatgacctgggct
acacacgtgctacaatgggcagtacaacgagaagcgaacccgcgagggtaagcggatctctaaagctgttctcag
ttcggactgcaggctgcaactgcctgcacgaagctggaatcgctagtaatcgcgatcagcacgcccgggtgaata
cgttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatggaagtctgcaatgcccaaagtcgggtgggataaccttata
ggagtcagccgctaaggcagggcagatgactgggtgaagtcgtaacaaggtagccgta

23S CEPA Y7 - DN100 182 (first 500 bp on the left)

cgaaagaacaaactgcaaggtcaagtgaaagaagggcgcacggatgacctggcactggaagccgatgaagg
acgcgactaaccgcgaaagtctcggggagccgtaagtaggctttgatccggaggtctccgaatgggggaacccag
catgtgcagacatgctatcctaagtgaatacatagcttaaggarggaacacgcagtgaaactgaaacatctaagtagc
tgcaggaagagaagaaatatcgatttccaagtagcggcagcgaacaggaaagagcccaaaccggcagattt
atctccggggtgttaggactgagacatggcactcagaggatagcagaagcgtttgggaaagcgcgcccagagag
ggtgagagcccgtgaagcgaatccaaagaaggcctatcagatcctgagtagggcgggacacgtgaaatcccgtt
tgaatccgcgaggaccatctcgaaggctaaactaaccagtgaccgatagtgaaaccagtagcgggaaag
gtgaaaagaaccccgggagggtgaa

ANEXO VII.**Recuentos de la microbiota en las heces de los individuos sometidos al ensayo *in vivo*****Lactobacilos**

INDIVIDUO	T1		T2		T3	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	6,10E+05	5,79	5,30E+05	5,72	8,70E+05	5,94
1	3,00E+05	5,48	1,10E+07	7,04	9,40E+06	6,97
2	2,20E+04	4,34	3,00E+05	5,48	5,50E+05	5,74
3	6,50E+04	4,81	1,00E+05	5,00	2,00E+04	4,30
4	2,50E+05	5,40	2,00E+05	5,30	1,70E+06	6,23
5	2,10E+06	6,32	2,50E+06	6,40	3,50E+06	6,54
6	5,30E+05	5,72	5,00E+05	5,70	2,90E+05	5,46
7	2,60E+04	4,41	4,00E+05	5,60	2,40E+07	7,38
8	7,00E+05	5,85	5,20E+06	6,72	2,00E+04	4,30
9	2,20E+04	4,34	1,90E+05	5,28	2,40E+05	5,38
10	2,50E+04	4,40	8,00E+05	5,90	1,70E+06	6,23
11	8,50E+05	5,93	2,50E+06	6,40	3,80E+06	6,58
12	1,00E+05	5,00	4,70E+06	6,67	2,10E+05	5,32
13	9,30E+04	4,97	5,80E+05	5,76	1,40E+07	7,15
14	9,00E+03	3,95	7,00E+04	4,85	2,00E+04	4,30
15	3,00E+05	5,48	7,00E+05	5,85	2,00E+04	4,30
16	2,20E+04	4,34	2,00E+05	5,30	1,70E+06	6,23
17	2,10E+04	4,32	2,90E+04	4,46	3,30E+06	6,52
18	2,50E+05	5,40	7,00E+05	5,85	2,50E+05	5,40
19	1,10E+06	6,04	1,30E+07	7,11	2,40E+07	7,38
20	7,60E+03	3,88	8,00E+04	4,90	2,00E+04	4,30
21	6,50E+05	5,81	9,10E+05	5,96	4,50E+06	6,65
22	3,10E+05	5,49	2,00E+06	6,30	1,70E+06	6,23
23	4,20E+05	5,62	6,00E+05	5,78	9,40E+05	5,97
24	5,70E+04	4,76	5,00E+05	5,70	2,50E+05	5,40
25	8,10E+05	5,91	1,90E+07	7,28	1,40E+07	7,15
26	3,00E+05	5,48	7,00E+05	5,85	2,00E+04	4,30
27	2,80E+05	5,45	3,30E+06	6,52	2,70E+06	6,43
28	2,00E+05	5,30	6,00E+05	5,78	7,30E+05	5,86
29	4,90E+05	5,69	1,50E+06	6,18	3,50E+06	6,54
30	2,90E+04	4,46	5,80E+05	5,76	2,50E+05	5,40
promedio	3,45E+05	5,15	2,45E+06	5,89	3,91E+06	5,87
mediana	2,50E+05	5,40	6,50E+05	5,81	1,32E+06	6,10

Lactobacilos (continuación)

INDIVIDUO	T4		T5		T6	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	8,20E+05	5,91	7,90E+05	5,90	6,50E+05	5,81
1	1,70E+07	7,23	1,40E+07	7,15	5,30E+06	6,72
2	3,20E+06	6,51	1,80E+06	6,26	2,20E+05	5,34
3	7,00E+05	5,85	8,30E+05	5,92	9,50E+04	4,98
4	1,10E+06	6,04	9,60E+06	6,98	2,50E+05	5,40
5	6,40E+06	6,81	3,30E+06	6,52	2,10E+06	6,32
6	8,80E+05	5,94	1,70E+06	6,23	5,30E+05	5,72
7	3,50E+07	7,54	7,70E+04	4,89	2,60E+04	4,41
8	4,10E+06	6,61	1,50E+06	6,18	7,00E+05	5,85
9	1,20E+05	5,08	8,70E+05	5,94	2,20E+05	5,34
10	8,20E+05	5,91	7,20E+05	5,86	2,50E+05	5,40
11	9,10E+05	5,96	1,10E+06	6,04	8,50E+05	5,93
12	7,70E+05	5,89	9,30E+05	5,97	4,70E+06	6,67
13	9,60E+06	6,98	7,60E+05	5,88	9,30E+04	4,97
14	1,20E+06	6,08	1,30E+06	6,11	1,40E+05	5,15
15	7,80E+04	4,89	4,10E+05	5,61	3,30E+05	5,52
16	4,40E+06	6,64	9,20E+06	6,96	2,20E+04	4,34
17	1,80E+07	7,26	8,40E+04	4,92	8,60E+04	4,93
18	9,00E+04	4,95	1,70E+05	5,23	2,50E+05	5,40
19	1,50E+07	7,18	5,80E+06	6,76	1,10E+06	6,04
20	4,20E+05	5,62	4,20E+05	5,62	1,80E+04	4,26
21	1,10E+07	7,04	4,10E+04	4,61	6,50E+05	5,81
22	6,60E+06	6,82	6,60E+05	5,82	3,10E+05	5,49
23	4,30E+04	4,63	4,30E+04	4,63	8,90E+05	5,95
24	9,00E+05	5,95	3,00E+05	5,48	5,40E+04	4,73
25	2,20E+07	7,34	9,40E+05	5,97	8,10E+05	5,91
26	7,50E+06	6,88	6,60E+05	5,82	3,00E+05	5,48
27	4,10E+06	6,61	5,40E+05	5,73	1,80E+05	5,26
28	1,70E+06	6,23	3,50E+05	5,54	7,50E+05	5,88
29	1,40E+07	7,15	4,70E+06	6,67	6,90E+06	6,84
30	8,20E+04	4,91	8,20E+04	4,91	4,90E+04	4,69
promedio	6,26E+06	6,28	2,10E+06	5,87	9,39E+05	5,49
mediana	2,45E+06	6,37	7,95E+05	5,90	2,75E+05	5,44

Anaerobios

INDIVIDUO	T1		T2		T3	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	1,60E+09	9,20	9,80E+08	8,99	1,40E+09	9,15
1	8,30E+09	9,92	7,50E+09	9,88	1,90E+08	8,28
2	7,20E+08	8,86	4,20E+09	9,62	4,40E+09	9,64
3	1,40E+09	9,15	6,60E+09	9,82	5,10E+09	9,71
4	2,50E+09	9,40	5,40E+09	9,73	4,40E+07	7,64
5	4,20E+09	9,62	6,40E+09	9,81	1,30E+08	8,11
6	2,40E+08	8,38	7,20E+08	8,86	2,80E+08	8,45
7	7,40E+07	7,87	9,90E+08	9,00	1,90E+08	8,28
8	6,40E+09	9,81	2,50E+09	9,40	4,20E+09	9,62
9	2,50E+09	9,40	4,20E+09	9,62	2,40E+08	8,38
10	8,30E+09	9,92	6,60E+09	9,82	5,40E+09	9,73
11	7,20E+08	8,86	2,50E+09	9,40	1,90E+08	8,28
12	9,90E+08	9,00	1,30E+08	8,11	4,20E+09	9,62
13	2,50E+09	9,40	2,80E+08	8,45	1,20E+10	10,08
14	4,20E+09	9,62	1,90E+08	8,28	6,40E+09	9,81
15	6,60E+09	9,82	4,20E+09	9,62	2,40E+09	9,38
16	1,20E+10	10,08	2,40E+08	8,38	7,20E+08	8,86
17	6,40E+09	9,81	7,70E+07	7,89	9,90E+08	9,00
18	2,50E+09	9,40	6,40E+09	9,81	2,50E+09	9,40
19	1,30E+10	10,11	9,50E+09	9,98	8,30E+09	9,92
20	6,20E+08	8,79	8,30E+09	9,92	6,60E+09	9,82
21	8,00E+08	8,90	6,60E+09	9,82	2,50E+09	9,40
22	1,90E+08	8,28	2,50E+09	9,40	3,70E+09	9,57
23	4,20E+09	9,62	3,70E+09	9,57	2,80E+08	8,45
24	1,10E+09	9,04	2,80E+08	8,45	2,10E+10	10,32
25	6,20E+09	9,79	4,20E+09	9,62	7,20E+08	8,86
26	6,40E+09	9,81	1,90E+08	8,28	2,80E+08	8,45
27	2,50E+09	9,40	4,20E+09	9,62	2,50E+09	9,40
28	3,70E+09	9,57	5,10E+09	9,71	4,20E+09	9,62
29	6,40E+09	9,81	7,90E+07	7,90	2,80E+08	8,45
30	2,50E+09	9,40	6,40E+09	9,81	4,20E+09	9,62
promedio	3,94E+09	9,36	3,67E+09	9,25	3,47E+09	9,14
mediana	2,50E+09	9,40	4,20E+09	9,62	2,50E+09	9,40

Anaerobios (continuación)

INDIVIDUO	T4		T5		T6	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	4,40E+09	9,64	3,80E+09	9,58	3,70E+09	9,57
1	6,40E+09	9,81	2,00E+08	8,30	1,40E+10	10,15
2	7,20E+08	8,86	1,00E+08	8,00	2,50E+09	9,40
3	9,90E+08	9,00	2,50E+09	9,40	4,20E+09	9,62
4	2,50E+09	9,40	1,40E+09	9,15	2,40E+08	8,38
5	4,20E+09	9,62	4,00E+08	8,60	9,20E+07	7,96
6	2,40E+08	8,38	1,10E+09	9,04	2,40E+09	9,38
7	5,10E+09	9,71	2,40E+07	7,38	2,40E+08	8,38
8	8,10E+07	7,91	2,20E+08	8,34	2,00E+08	8,30
9	1,30E+09	9,11	1,10E+09	9,04	1,00E+08	8,00
10	2,80E+08	8,45	2,40E+09	9,38	2,50E+10	10,40
11	1,90E+08	8,28	2,40E+09	9,38	2,80E+08	8,45
12	7,20E+08	8,86	2,00E+08	8,30	1,90E+08	8,28
13	2,80E+09	9,45	1,00E+08	8,00	1,20E+10	10,08
14	1,90E+08	8,28	2,50E+09	9,40	2,40E+08	8,38
15	4,20E+09	9,62	1,40E+09	9,15	5,40E+09	9,73
16	1,40E+10	10,15	4,00E+09	9,60	1,40E+10	10,15
17	8,30E+09	9,92	1,10E+09	9,04	4,00E+08	8,60
18	6,60E+09	9,82	2,40E+09	9,38	1,10E+09	9,04
19	1,00E+10	10,00	2,20E+08	8,34	2,40E+09	9,38
20	3,70E+09	9,57	1,10E+09	9,04	2,20E+10	10,34
21	2,80E+08	8,45	2,40E+09	9,38	7,70E+07	7,89
22	1,20E+10	10,08	2,40E+08	8,38	6,40E+09	9,81
23	6,60E+09	9,82	4,20E+09	9,62	9,50E+09	9,98
24	2,50E+09	9,40	6,60E+09	9,82	8,30E+09	9,92
25	3,70E+09	9,57	4,20E+09	9,62	6,60E+09	9,82
26	7,20E+08	8,86	6,60E+09	9,82	6,30E+09	9,80
27	2,80E+08	8,45	1,20E+10	10,08	2,20E+09	9,34
28	8,50E+09	9,93	6,40E+09	9,81	7,10E+08	8,85
29	1,90E+08	8,28	2,50E+09	9,40	2,00E+09	9,30
30	4,20E+09	9,62	3,30E+10	10,52	1,90E+08	8,28
promedio	3,72E+09	9,22	3,43E+09	9,09	4,98E+09	9,18
mediana	2,65E+09	9,42	1,90E+09	9,26	2,30E+09	9,36

Aerobios

INDIVIDUO	T1		T2		T3	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	7,10E+06	6,85	6,30E+06	6,80	8,10E+06	6,91
1	5,30E+06	6,72	8,80E+06	6,94	5,80E+06	6,76
2	2,20E+06	6,34	3,50E+06	6,54	7,00E+06	6,85
3	6,50E+06	6,81	4,10E+06	6,61	7,50E+06	6,88
4	2,50E+07	7,40	1,20E+07	7,08	2,00E+07	7,30
5	7,00E+06	6,85	8,20E+06	6,91	2,90E+06	6,46
6	1,10E+07	7,04	7,20E+06	6,86	7,80E+06	6,89
7	6,40E+06	6,81	1,10E+07	7,04	4,40E+06	6,64
8	8,80E+06	6,94	9,30E+06	6,97	1,80E+07	7,26
9	3,50E+06	6,54	7,60E+06	6,88	9,00E+06	6,95
10	1,70E+07	7,23	1,30E+07	7,11	1,50E+07	7,18
11	3,80E+06	6,58	7,80E+06	6,89	2,50E+07	7,40
12	2,10E+06	6,32	4,40E+06	6,64	7,00E+06	6,85
13	1,40E+06	6,15	1,80E+07	7,26	1,10E+07	7,04
14	2,00E+07	7,30	9,00E+06	6,95	6,40E+06	6,81
15	4,10E+06	6,61	1,50E+07	7,18	8,80E+06	6,94
16	9,20E+06	6,96	2,00E+06	6,30	3,80E+06	6,58
17	8,40E+06	6,92	2,40E+06	6,38	2,10E+06	6,32
18	1,70E+07	7,23	1,70E+07	7,23	8,20E+06	6,91
19	5,80E+06	6,76	3,80E+06	6,58	9,10E+06	6,96
20	4,20E+06	6,62	2,10E+06	6,32	7,70E+06	6,89
21	1,10E+07	7,04	8,20E+06	6,91	7,60E+06	6,88
22	6,60E+06	6,82	9,10E+06	6,96	1,30E+07	7,11
23	4,30E+06	6,63	7,70E+06	6,89	7,80E+06	6,89
24	9,00E+06	6,95	9,60E+06	6,98	4,40E+06	6,64
25	4,70E+06	6,67	1,20E+07	7,08	1,80E+07	7,26
26	5,80E+06	6,76	2,40E+06	6,38	1,20E+07	7,08
27	7,00E+06	6,85	2,00E+07	7,30	8,20E+06	6,91
28	7,50E+06	6,88	2,40E+06	6,38	7,20E+06	6,86
29	2,00E+07	7,30	1,70E+07	7,23	1,10E+07	7,04
30	2,90E+06	6,46	3,80E+06	6,58	9,30E+06	6,97
promedio	8,25E+06	6,82	8,61E+06	6,85	9,50E+06	6,92
mediana	6,55E+06	6,82	8,20E+06	6,91	8,00E+06	6,90

Aerobios (continuación)

INDIVIDUO	T4		T5		T6	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	1,40E+07	7,15	9,50E+06	6,98	5,50E+06	6,74
1	2,50E+07	7,40	7,80E+06	6,89	9,10E+06	6,96
2	7,00E+06	6,85	6,50E+06	6,81	7,70E+06	6,89
3	1,10E+07	7,04	2,50E+07	7,40	7,60E+06	6,88
4	6,40E+06	6,81	7,00E+06	6,85	1,30E+07	7,11
5	8,80E+06	6,94	1,10E+07	7,04	7,80E+06	6,89
6	1,10E+07	7,04	4,10E+06	6,61	4,40E+06	6,64
7	9,30E+06	6,97	1,20E+07	7,08	1,80E+07	7,26
8	7,60E+06	6,88	8,20E+06	6,91	1,20E+07	7,08
9	1,30E+07	7,11	7,20E+06	6,86	8,20E+06	6,91
10	7,80E+06	6,89	1,10E+07	7,04	7,20E+06	6,86
11	6,50E+06	6,81	7,70E+06	6,89	1,10E+07	7,04
12	2,50E+07	7,40	9,60E+06	6,98	4,70E+06	6,67
13	7,00E+06	6,85	1,20E+07	7,08	9,30E+06	6,97
14	1,10E+07	7,04	2,40E+06	6,38	1,40E+07	7,15
15	6,40E+06	6,81	2,00E+07	7,30	3,30E+07	7,52
16	2,00E+07	7,30	8,80E+06	6,94	2,20E+06	6,34
17	2,90E+06	6,46	1,10E+07	7,04	7,00E+06	6,85
18	7,80E+06	6,89	9,30E+06	6,97	1,10E+07	7,04
19	4,40E+06	6,64	7,60E+06	6,88	6,40E+06	6,81
20	1,80E+07	7,26	1,30E+07	7,11	8,80E+06	6,94
21	5,80E+06	6,76	4,10E+07	7,61	3,80E+06	6,58
22	7,00E+06	6,85	6,60E+06	6,82	2,10E+06	6,32
23	7,50E+06	6,88	4,30E+06	6,63	8,20E+06	6,91
24	2,00E+07	7,30	3,00E+07	7,48	2,90E+06	6,46
25	2,90E+06	6,46	9,40E+06	6,97	7,80E+06	6,89
26	1,80E+07	7,26	6,60E+06	6,82	4,40E+06	6,64
27	9,00E+06	6,95	5,40E+06	6,73	1,80E+07	7,26
28	1,50E+07	7,18	3,50E+07	7,54	5,80E+06	6,76
29	2,50E+07	7,40	4,70E+06	6,67	7,00E+06	6,85
30	7,00E+06	6,85	8,20E+03	3,91	4,90E+06	6,69
promedio	1,11E+07	6,98	1,15E+07	6,88	8,91E+06	6,87
mediana	8,30E+06	6,92	8,50E+06	6,93	7,75E+06	6,89

Bifidobacterias

INDIVIDUO	T1		T2		T3	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	8,50E+08	8,93	8,30E+08	8,92	8,70E+08	8,94
1	3,50E+09	9,54	3,30E+09	9,52	9,40E+08	8,97
2	2,90E+08	8,46	3,30E+08	8,52	6,60E+08	8,82
3	2,40E+09	9,38	1,70E+08	8,23	5,40E+08	8,73
4	2,00E+08	8,30	7,70E+08	8,89	3,50E+08	8,54
5	2,40E+08	8,38	1,50E+08	8,18	4,70E+08	8,67
6	1,70E+08	8,23	8,70E+08	8,94	8,20E+07	7,91
7	3,80E+09	9,58	7,20E+08	8,86	9,40E+07	7,97
8	2,10E+08	8,32	1,10E+09	9,04	6,60E+08	8,82
9	1,40E+09	9,15	9,30E+08	8,97	5,40E+08	8,73
10	2,00E+09	9,30	7,60E+08	8,88	3,50E+08	8,54
11	2,00E+08	8,30	1,30E+09	9,11	4,70E+08	8,67
12	4,40E+08	8,64	1,40E+08	8,15	8,20E+07	7,91
13	1,80E+09	9,26	3,30E+08	8,52	1,40E+09	9,15
14	9,00E+07	7,95	2,20E+08	8,34	7,70E+08	8,89
15	1,50E+09	9,18	8,60E+08	8,93	1,50E+09	9,18
16	4,20E+08	8,62	2,50E+09	9,40	8,70E+08	8,94
17	1,10E+09	9,04	1,20E+09	9,08	7,20E+07	7,86
18	6,60E+08	8,82	1,80E+09	9,26	1,10E+09	9,04
19	4,30E+08	8,63	6,50E+08	8,81	9,30E+07	7,97
20	7,60E+08	8,88	3,10E+08	8,49	7,60E+08	8,88
21	6,50E+08	8,81	8,90E+08	8,95	1,30E+08	8,11
22	3,10E+09	9,49	5,40E+09	9,73	4,10E+08	8,61
23	4,20E+08	8,62	8,10E+08	8,91	9,20E+08	8,96
24	5,70E+08	8,76	5,00E+08	8,70	8,40E+07	7,92
25	8,10E+08	8,91	9,40E+08	8,97	1,70E+09	9,23
26	3,00E+08	8,48	6,60E+08	8,82	5,80E+08	8,76
27	2,80E+08	8,45	5,40E+08	8,73	4,20E+08	8,62
28	2,00E+08	8,30	3,50E+08	8,54	2,10E+09	9,32
29	4,90E+08	8,69	4,70E+09	9,67	1,40E+09	9,15
30	2,90E+08	8,46	8,20E+07	7,91	2,00E+09	9,30
promedio	9,57E+08	8,76	1,11E+09	8,84	7,18E+08	8,67
mediana	4,65E+08	8,67	7,65E+08	8,88	5,60E+08	8,75

Bifidobacterias (continuación)

INDIVIDUO	T4		T5		T6	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	1,20E+09	9,08	9,90E+08	9,00	6,50E+08	8,81
1	1,40E+08	8,15	7,70E+08	8,89	7,20E+08	8,86
2	1,80E+09	9,26	1,50E+09	9,18	1,10E+09	9,04
3	8,30E+07	7,92	8,70E+08	8,94	9,30E+08	8,97
4	9,60E+08	8,98	7,20E+08	8,86	7,60E+08	8,88
5	3,30E+08	8,52	1,10E+09	9,04	1,30E+09	9,11
6	1,70E+08	8,23	9,30E+08	8,97	1,40E+08	8,15
7	7,70E+07	7,89	7,60E+08	8,88	3,30E+08	8,52
8	1,50E+09	9,18	1,30E+08	8,11	2,20E+08	8,34
9	8,70E+08	8,94	4,10E+08	8,61	8,60E+08	8,93
10	7,20E+08	8,86	9,20E+08	8,96	2,50E+09	9,40
11	1,10E+09	9,04	3,50E+08	8,54	1,20E+09	9,08
12	9,30E+07	7,97	4,70E+08	8,67	4,40E+08	8,64
13	7,60E+08	8,88	8,20E+07	7,91	1,80E+08	8,26
14	1,30E+08	8,11	9,40E+08	8,97	9,00E+07	7,95
15	7,80E+08	8,89	6,60E+08	8,82	1,50E+08	8,18
16	4,40E+08	8,64	5,40E+08	8,73	4,20E+08	8,62
17	1,80E+09	9,26	3,50E+08	8,54	1,10E+08	8,04
18	9,00E+07	7,95	4,70E+08	8,67	6,60E+08	8,82
19	1,50E+09	9,18	8,20E+07	7,91	4,30E+08	8,63
20	4,20E+08	8,62	1,40E+09	9,15	9,00E+07	7,95
21	1,10E+09	9,04	1,80E+09	9,26	2,20E+08	8,34
22	6,60E+08	8,82	6,50E+09	9,81	5,40E+08	8,73
23	4,30E+08	8,63	3,10E+08	8,49	3,50E+08	8,54
24	9,00E+07	7,95	3,00E+08	8,48	4,70E+08	8,67
25	2,20E+09	9,34	9,40E+08	8,97	8,20E+08	8,91
26	7,50E+08	8,88	6,60E+08	8,82	7,80E+07	7,89
27	4,10E+08	8,61	5,40E+08	8,73	4,40E+09	9,64
28	1,70E+09	9,23	3,50E+08	8,54	1,80E+09	9,26
29	1,40E+08	8,15	4,70E+08	8,67	9,00E+08	8,95
30	8,20E+07	7,91	8,20E+07	7,91	4,90E+08	8,69
promedio	7,11E+08	8,63	8,47E+08	8,74	7,57E+08	8,67
mediana	5,50E+08	8,73	6,00E+08	8,78	4,80E+08	8,68

Enterobacterias

INDIVIDUO	T1		T2		T3	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	8,50E+06	6,93	1,80E+07	7,26	1,30E+07	7,11
1	9,20E+05	5,96	1,70E+06	6,23	9,40E+05	5,97
2	8,40E+05	5,92	3,30E+05	5,52	5,50E+05	5,74
3	1,70E+07	7,23	2,50E+07	7,40	2,00E+06	6,30
4	5,80E+06	6,76	2,40E+06	6,38	1,70E+06	6,23
5	4,20E+06	6,62	2,00E+06	6,30	6,60E+05	5,82
6	4,10E+06	6,61	4,50E+06	6,65	2,90E+06	6,46
7	6,60E+06	6,82	1,70E+05	5,23	9,90E+05	6,00
8	4,30E+07	7,63	9,40E+06	6,97	2,00E+06	6,30
9	3,00E+07	7,48	2,50E+06	6,40	2,40E+06	6,38
10	9,40E+06	6,97	1,40E+07	7,15	1,70E+07	7,23
11	6,60E+06	6,82	2,00E+06	6,30	3,80E+06	6,58
12	5,40E+06	6,73	2,70E+06	6,43	2,10E+06	6,32
13	3,50E+06	6,54	7,30E+05	5,86	1,40E+06	6,15
14	4,70E+07	7,67	3,50E+07	7,54	2,00E+07	7,30
15	8,20E+05	5,91	2,50E+05	5,40	2,00E+06	6,30
16	1,10E+07	7,04	9,40E+06	6,97	1,70E+07	7,23
17	3,00E+06	6,48	5,50E+05	5,74	3,30E+05	5,52
18	1,00E+07	7,00	2,00E+06	6,30	9,50E+05	5,98
19	2,00E+06	6,30	1,70E+06	6,23	6,80E+05	5,83
20	2,50E+07	7,40	3,50E+06	6,54	1,20E+06	6,08
21	5,00E+06	6,70	2,90E+06	6,46	4,50E+06	6,65
22	4,00E+06	6,60	2,40E+06	6,38	1,70E+06	6,23
23	5,20E+06	6,72	2,00E+06	6,30	9,40E+05	5,97
24	1,90E+07	7,28	2,40E+06	6,38	9,30E+05	5,97
25	8,00E+06	6,90	1,70E+06	6,23	1,40E+06	6,15
26	2,50E+07	7,40	3,80E+06	6,58	2,00E+06	6,30
27	4,70E+07	7,67	2,10E+06	6,32	2,70E+06	6,43
28	5,80E+06	6,76	1,40E+07	7,15	2,70E+05	5,43
29	7,00E+06	6,85	2,00E+06	6,30	3,50E+06	6,54
30	7,00E+06	6,85	2,00E+06	6,30	2,50E+06	6,40
promedio	1,23E+07	6,85	5,17E+06	6,40	3,37E+06	6,26
mediana	6,60E+06	6,82	2,25E+06	6,35	1,85E+06	6,27

Enterobacterias (continuación)

INDIVIDUO	T4		T5		T6	
	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g	ufc/g	log ₁₀ ufc/g
Control	6,60E+06	6,82	4,10E+06	6,61	1,40E+07	7,15
1	1,50E+06	6,18	2,40E+06	6,38	4,50E+06	6,65
2	8,70E+05	5,94	1,70E+07	7,23	1,70E+07	7,23
3	7,20E+05	5,86	3,80E+06	6,58	9,40E+06	6,97
4	1,10E+06	6,04	2,10E+06	6,32	2,50E+06	6,40
5	9,30E+05	5,97	1,40E+07	7,15	1,50E+07	7,18
6	7,60E+05	5,88	2,00E+06	6,30	2,00E+07	7,30
7	1,30E+05	5,11	2,00E+06	6,30	2,70E+06	6,43
8	4,10E+05	5,61	1,70E+07	7,23	7,30E+06	6,86
9	1,20E+06	6,08	3,30E+06	6,52	3,50E+07	7,54
10	8,40E+05	5,92	2,50E+07	7,40	2,50E+06	6,40
11	1,70E+06	6,23	2,40E+07	7,38	9,40E+06	6,97
12	5,80E+05	5,76	2,00E+06	6,30	5,50E+06	6,74
13	4,20E+05	5,62	4,50E+07	7,65	2,00E+07	7,30
14	1,20E+06	6,08	8,70E+06	6,94	7,20E+06	6,86
15	1,40E+06	6,15	7,20E+07	7,86	1,10E+07	7,04
16	2,00E+07	7,30	1,10E+07	7,04	9,30E+06	6,97
17	1,70E+06	6,23	9,30E+05	5,97	7,60E+06	6,88
18	3,30E+05	5,52	7,60E+06	6,88	1,30E+07	7,11
19	2,50E+05	5,40	1,30E+06	6,11	4,10E+06	6,61
20	2,40E+06	6,38	4,10E+06	6,61	9,20E+06	6,96
21	2,00E+06	6,30	9,20E+06	6,96	8,40E+06	6,92
22	7,00E+06	6,85	8,40E+06	6,92	1,70E+06	6,23
23	2,20E+05	5,34	1,70E+07	7,23	5,80E+07	7,76
24	2,50E+05	5,40	5,80E+07	7,76	4,20E+06	6,62
25	8,50E+05	5,93	4,20E+06	6,62	1,20E+07	7,08
26	4,70E+05	5,67	1,20E+07	7,08	2,00E+07	7,30
27	9,30E+05	5,97	2,00E+06	6,30	2,00E+06	6,30
28	1,40E+06	6,15	2,00E+06	6,30	1,70E+07	7,23
29	3,30E+05	5,52	1,70E+07	7,23	3,30E+07	7,52
30	8,20E+05	5,91	3,30E+06	6,52	2,50E+07	7,40
promedio	1,76E+06	6,24	1,33E+07	6,84	1,31E+07	6,96
mediana	8,60E+05	5,93	8,00E+06	6,90	9,35E+06	6,97

ANEXO VIII. Direcciones de interés en Internet

Direcciones de grupos especializados consultadas en este trabajo:

<i>Dirección</i>	<i>Portal</i>
National Center for Biotechnology Information (USA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/
European Molecular Biology Laboratory (Europe)	www.embl.org/

Buscadores de publicaciones periódicas utilizados en este trabajo:

<i>Dirección</i>	<i>Portal</i>
Buscador investigación genómica	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
BioMedNet Journal Collection	http://journals.bmn.com/journals
Science Direct	www.sciencedirect.com/
Ingenta	www.ingenta.com
Journal search	www.blackwell-science.com/
Journal of Nutrition	www.nutrition.org/
Biblioteca UPV	www.upv.es/revistas/

Herramientas de análisis:

<i>Dirección</i>	<i>Portal</i>
1. ARB	www.mikro.biologie.tu-muenchen.de
2. BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
3. RNA world	www.imb-jena.de/RNA.html
4. PCR electrónica	www.ncbi.nlm.nih.gov/STS/