

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO
***Bifidobacterium* CON CARÁCTER PROBIÓTICO**

Maria Carmen Collado Amores

Valencia, Noviembre de 2004



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
Área de Microbiología

D. MANUEL HERNÁNDEZ PÉREZ, Titular de Universidad perteneciente al Departamento de Biotecnología (Área Microbiología) de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada “**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO *Bifidobacterium* CON CARÁCTER PROBIÓTICO**” que presenta **Maria Carmen Collado Amores** para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo ha sido realizada en el departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia bajo mi dirección y reúne los requisitos adecuados para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente.

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

Valencia 29 de Noviembre de 2004

Fdo.: D. Manuel Hernández Pérez.

A los que más quiero

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a D. Enrique Hernández, catedrático de Microbiología, su apoyo incondicional y por haber creído siempre en mis posibilidades, también, gracias por ayudarme, guiarme, aconsejarme e incentivar, aun más, mi interés por la microbiología y la investigación. Gracias, también, por haberme proporcionado la oportunidad de entrar a formar parte de su departamento, hace ahora cinco años, y que de ese trabajo y esfuerzo hoy puedo presentar y defender mi tesis doctoral. Gracias por todo D. Enrique, siempre será una referencia para mi.

Gracias a mi director Dr. Manuel Hernández Pérez por su confianza en mi y su ayuda, sin la que no hubiera podido llevar a cabo la realización de mi Tesis Doctoral. Gracias por tu apoyo en aquellos momentos en los que lo necesité y por estar ahí siempre.

Agradecer a todos los componentes del laboratorio de Microbiología, a Dr. Javier Hernández, a M^a Antonia, a Rosa G., a Rosa M., a Salut, a M^a Angeles, a Ana J., Nuria por compartir tantas buenas horas juntos, por haber estado siempre animándome, enseñándome, aconsejándome. A Yolanda M. por su ayuda y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas trabajando. A mis compis, Gonzalo y Ana G. por todo el tiempo que hemos estado juntos y que ha sido mucho mucho, gracias por compartir todo en todo momento y por ser un gran apoyo para mi, gracias por estar siempre ahí.

También quiero dedicar unas líneas a todos aquellos que también han participado en mi formación como investigador, a Dr. Yolanda Sanz, por ofrecerme la posibilidad de hacer una estancia en Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) y trabajar en un tema que tanto me gusta, gracias por tener siempre en cuenta mis ideas, creer en mi, ayudarme a conseguir aquello que quiero, gracias por estar siempre ahí. No me puedo olvidar de Amparo F., por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas en el laboratorio del IATA y por tus ánimos. Gracias también a toda la gente del IATA porque siempre me ayudasteis y me hicisteis sentir como en casa, gracias.

Gracias al Dr. Seppo Salminen y a Miguel Gueimonde por darme la posibilidad de hacer una estancia en Functional Foods Forum de la Universidad de Turku en Finlandia. A Miguel, en especial, quiero darle las gracias por haberme ayudado en todo, por diseñar un plan de trabajo para aprovechar al máximo el tiempo, y como no, por haber hecho más llevadera mi estancia fuera de casa.

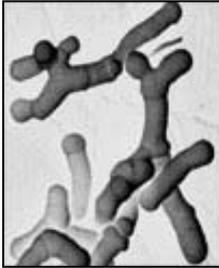
Quiero dar las gracias a todos aquellos que habéis estado compartiendo día a día mis logros y mis derrotas, los que habéis estado ahí en mis momentos bajos, los que habéis estado animándome, siempre me acordaré de vosotros. A mis chicas, Lorena, Maria y Laura, por las horas y horas de trabajo juntas, por buenos y malos momentos que hemos compartido, por vuestro apoyo y ayuda en momentos difíciles, por entenderme y por ayudarme. Gracias por estar ahí. Gracias a todos mis amigos/as que han seguido mi camino en la investigación, espero que todos os deis por aludidos. Din, tu que compartiste tanto conmigo solo te ha faltado estar conmigo en este momento, te echo de menos.

Y como no, dedicar esta tesis a mi familia y a Javi por el tiempo que no habéis podido pasar conmigo por culpa de mis “bios”, por aguantar mi mal humor cuando las cosas no salían, y la alegría de cuando si salían, por estar animándome y apoyándome, por creer en mí, muchas gracias por todo ya que sin vosotros no habría llegado hasta aquí, sois mi referencia, mi apoyo y sois todo para mí. Siempre os llevaré conmigo. Gracias Javi por compartir todo conmigo, por todo lo vivido, por tus ánimos en malos momentos, por creer en mí y por estar siempre a mi lado, muchas gracias, eres parte de esta Tesis. A mis padres, por su comprensión, apoyo, por saber que yo podía, por seguir animándome y por confiar en mí. Papa y Mama gracias por haber hecho de mí lo que soy, os quiero.

Gracias a todos

***“SI NO PUEDES EXPLICAR A TODO EL MUNDO LO QUE HAS HECHO,
TU TRABAJO HA SIDO EN VANO”***

Schödinger, Erwin (1887-1961)



ÍNDICES Y RESÚMENES

INTRODUCCIÓN

1. Alimentos funcionales	1
2. Probióticos	1
2.1. Probióticos: criterios para la evaluación	3
3. Prebióticos y simbióticos	6
4. Efectos beneficiosos de los probióticos	6
5. Antecedentes históricos de las bacterias acidolácticas	8
6. Filogenia de las bacterias acidolácticas	10
7. Género <i>Lactobacillus</i>	12
8. Género <i>Streptococcus</i>	14
9. Género <i>Bifidobacterium</i>	15
9.1. Antecedentes históricos	15
9.2. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	19
9.3. Hábitats	20
9.4. Características culturales y morfológicas	21
9.5. Características fisiológicas	22
9.6. Características bioquímicas	25
9.7. Identificación del género <i>Bifidobacterium</i>	26
9.7.1. Caracterización fenotípica	26
9.7.2. Caracterización genotípica	28
9.7.2.1. Análisis filogenéticos	28
9.7.2.2. Métodos de tipado basados en la PCR	29

OBJETIVOS

Objetivos	39
-----------	----

CAPÍTULO 1: Aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales

1. Introducción	43
2. Material y métodos	45
2.1. Cepas referencia y muestras lácteas analizadas	45
2.2. Recuento y aislamiento de microorganismos contenidos en productos lácteos	46
2.3. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas	46
2.4. Identificación de los microorganismos mediante sondas específicas	46
2.5. Aislamiento del DNA genómico	48
2.6. PCR específicas	48
2.6.1. Género <i>Bifidobacterium</i>	49
2.6.2. Múltiplex PCR para las especies del género <i>Bifidobacterium</i>	49
2.6.3. Múltiplex PCR <i>Bifidobacterium lactis/animalis</i>	50
2.6.4. PCR específica para la especie <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	51
2.7. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)	51

2.7.1. ARDRA géneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	51
2.7.2. ARDRA género <i>Bifidobacterium</i>	52
2.8. RAPDs (amplificación del DNA mediante iniciadores aleatorios)	53
2.9. AFLPs (amplificación de los polimorfismos generados)	53
2.10. Análisis de los datos	54
3. Resultados	55
3.1. Cepas referencia y muestras lácteas analizadas	55
3.2. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas	60
3.3. Identificación de los microorganismos mediante sondas específicas	62
3.3.1. Género <i>Bifidobacterium</i>	62
3.3.2. Género <i>Streptococcus</i>	62
3.3.3. Género <i>Lactobacillus</i>	63
3.4. PCR específicas	65
3.4.1. Género <i>Bifidobacterium</i>	65
3.4.2. Múltiple PCR para las especies del género <i>Bifidobacterium</i>	65
3.4.3. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	66
3.5. ARDRA-PCR	67
3.5.1. Géneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	67
3.5.2. Género <i>Bifidobacterium</i>	69
3.6. RAPDs	71
3.6.1. Leches fermentadas con bifidobacterias	71
3.6.2. Productos lácteos comerciales	73
3.7. AFLPs	78
4. Discusión	78

CAPÍTULO 2: Supervivencia de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C

1. Introducción	83
2. Material y métodos	84
2.1. Muestras	84
2.2. Enumeración de las bacterias lácticas y bifidobacterias	84
2.3. Identificación de las bacterias	85
2.4. Viabilidad de las bacterias lácticas y bifidobacterias a 4°C	86
3. Resultados	87
3.1. Enumeración de bacterias en productos lácteos	87
3.2. Identificación de las cepas aisladas	88
3.3. Viabilidad de las bacterias lácticas y bifidobacterias a 4°C	89
4. Discusión	96

CAPÍTULO 3: Estudio *in vitro* de la viabilidad de las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de leches fermentadas comerciales frente a las condiciones de tránsito gastrointestinal

1.- Introducción	101
2. Material y métodos	102
2.1. Aislamiento e identificación de las cepas comerciales	102
2.2. Preparación del inóculo	103
2.3. Preparación de los jugos gástricos y pancreáticos	103
2.4. Exposición de las cepas del género <i>Bifidobacterium</i> a los jugos gastrointestinales	103
2.5. Recuento de viables mediante técnica de recuento en placa	104
2.6. Recuento de viables mediante técnica de tinción con fluorocromos	104
2.7. Análisis de los resultados	105
3. Resultados	105
3.1. Aislamiento e identificación de las cepas comerciales	105
3.2. Determinación de la tolerancia gastrointestinal	105
4.- Discusión	112

CAPÍTULO 4: Detección molecular de la cepa *Bifidobacterium animalis/lactis* en heces humanas, estudio *in vivo*

1. Introducción	117
2. Material y métodos	119
2.1. Cepas estudiadas	119
2.2. Individuos y administración de la leche fermentada	119
2.3. Análisis muestras fecales	120
2.4. Recuentos en placa	120
2.5. Sondas para detección de bifidobacterias	121
2.6. Condiciones de hibridación <i>in situ</i> FISH	122
2.7. Identificación molecular de <i>Bifidobacterium</i> spp. Aislados	122
3. Resultados	123
3.1. Examen de las muestras fecales	123
3.1.1. Recuentos en placa	123
3.1.2. Recuentos mediante FISH	124
3.2. Recuentos en placa e hibridación <i>in situ</i> (FISH)	129
3.3. Identificación molecular de <i>Bifidobacterium</i> spp. aisladas de muestras fecales	130
3.4. Crecimiento de bifidobacterias endógenas favorecidas por el consumo de exógenas	132
4. Discusión	133

CAPÍTULO 5: Aislamiento, selección e identificación molecular de potenciales cepas probióticas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*

1. Introducción	139
2. Material y métodos	140
2.1. Aislamiento de cepas resistentes a condiciones ácidas	140
2.2. Identificación y caracterización molecular	141

2.2.1. RAPDs	141
2.2.2. ARDRA-PCR	141
2.2.3. Análisis de datos	142
2.2.4. Múltiplex PCR	142
2.3. Resistencia a las sales biliares y NaCl	143
2.4. Estudio de actividad antimicrobiana de cepas del género <i>Bifidobacterium</i>	143
2.5. Susceptibilidad a antibióticos	144
2.6. Actividad enzimática de las cepas de <i>Bifidobacterium</i>	144
3. Resultados	145
3.1. Aislamiento de cepas resistentes	145
3.2. Identificación y caracterización molecular	146
3.2.1. RAPDs	146
3.2.2. ARDRA-PCR	147
3.2.3. Múltiplex PCR	149
3.3. Resistencia a las sales biliares y a NaCl	150
3.4. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas del género <i>Bifidobacterium</i>	152
3.5. Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de <i>Bifidobacterium</i> aisladas	152
3.6. Actividad enzimática de las cepas de <i>Bifidobacterium</i>	153
4. Discusión	155

CAPÍTULO 6: Detección y estudio de actividad antimicrobiana de cepas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*

1. Introducción	161
2. Material y métodos	162
2.1. Cepas y condiciones de cultivo	162
2.2. Tolerancia al ácido y a las sales biliares	164
2.3. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas del género <i>Bifidobacterium</i>	164
2.4. Caracterización de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana	165
3. Resultados	166
3.1. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Bifidobacterium</i>	166
3.2. Estudio de la fase del crecimiento y del medio de cultivo en la producción de sustancias con carácter antimicrobiano	167
3.3. Espectro de inhibición de las cepas ácido resistentes seleccionadas	168
3.4. Caracterización de las sustancias responsables de la actividad enzimática antimicrobiana	172
4. Discusión	172

Suplemento Capítulo 6. Detección y estudio de actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* de cepas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*

S2. Material y métodos	177
S2.1. Cepas, aislamiento y condiciones de crecimiento	177
S2.2. Identificación y caracterización molecular	178
S2.3. Detección de actividad antimicrobiana frente <i>H. pylori</i>	178
S2.4. Caracterización de los compuestos antimicrobianos	179
S2.5. Susceptibilidad a antibióticos	179
S2.6. Análisis estadístico	180
S3. Resultados	180
S3.1. Identificación y caracterización molecular	180
S3.2. Actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por <i>Bifidobacterium</i> frente a las cepas de <i>H. pylori</i>	180
S3.3. Caracterización del compuesto antimicrobiano	182
S3.4. Susceptibilidad a antibióticos	183
S4. Discusión	184

CAPÍTULO 7: Estudio de adhesión a mucus intestinal humano de cepas de *Bifidobacterium* de origen humano, su papel en la exclusión y desplazamiento de patógenos

1. Introducción	189
2. Material y métodos	190
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.	190
2.2. Ensayo de adhesión a mucus intestinal	192
2.3. Inhibición de la adhesión de patógenos	192
2.4. Desplazamiento de patógenos	193
2.5. Caracterización preliminar de los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana	193
2.6. Análisis estadístico	193
3. Resultados	194
3.1. Adhesión de las cepas estudiadas	194
3.2. Inhibición de la adhesión de patógenos a mucus intestinal	195
3.3. Desplazamiento de patógenos	195
3.4. Caracterización preliminar de los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana	196
4. Discusión	197

DISCUSIÓN

203

CONCLUSIONES

213

BIBLIOGRAFÍA

219

ANEXOS

Anexo I: Medios de cultivo	243
Anexo II	245
- Soluciones, reactivos y material de identificación para PCR	
- Soluciones y reactivos para la detección por FISH	
Anexo III: Abreviaturas empleadas	249
Anexo IV: Direcciones de interés en Internet	251

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema del árbol filogenético de las bacterias LAB	11
Figura 2. Morfología del género <i>Bifidobacterium</i>	21
Figura 3. Morfología de distintas especies pertenecientes al género <i>Bifidobacterium</i>	27

CAPÍTULO 1

Figura 1. Medio MRS	56
Figura 2. Medio LS-Diferencial	56
Figura 3. Medio TPY	56
Figura 4. Medio BFM	56
Figura 5. Medio M-17	56
Figura 6. Morfología de bifidobacterias y lactobacilos con tinción Gram	60
Figura 7. Lactobacilos y estreptococos en tinción simple y en tinción Gram, respectivamente	61
Figura 8. Tira API-50 CHL	62
Figura 9. Bifidobacterias hibridadas mediante la sonda específica del 16S marcada con fluorescencia	63
Figura 10. Hibridación <i>in situ</i> de <i>Streptococcus thermophilus</i> de yogur con sonda marcada con fluoresceína	64
Figura 11. Hibridación <i>in situ</i> de <i>L. delbrueckii</i> y <i>L. acidophilus</i> de yogur con sonda marcada con rodamina	64
Figura 12. PCR específica del gen 16S rRNA del género <i>Bifidobacterium</i>	65
Figura 13. Múltiplex PCR de las bifidobacterias aisladas de las leches fermentadas comerciales	66
Figura 14. PCR específica de <i>L. delbrueckii</i> de las cepas de lactobacilos aisladas de las muestras lácteas analizadas en este estudio	67
Figura 15. Ampliación del 16S con primers generales de las cepas de bifidobacterias, lactobacilos y estreptococos aislados de productos lácteos comerciales	67
Figura 16. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción <i>TaqI</i>	68
Figura 17. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción <i>HpaII</i>	68
Figura 18. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción (<i>MwoI</i>)	69
Figura 19. Perfiles ARDRA de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales tras amplificación de un fragmento de 1.35 kb correspondiente al 16S rRNA y digerido con la enzima de restricción <i>MboI</i>	70
Figura 20. Perfiles generados con la técnica RAPD de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales	71

Figura 21. UPGMA dendrograma generado por comparación de los perfiles RAPD-PCR obtenidos para las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales	73
Figura 22. Perfiles obtenidos mediante RAPDs-PCR de bacterias del género <i>Streptococcus</i>	74
Figura 23. Perfiles obtenidos mediante RAPDs-PCR de bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	74
Figura 24. Representación gráfica de la homología genética del DNA amplificado de los estreptococos y lactobacilos aislados de los yogures mediante RAPDs-PCR	75
Figura 25. Representación gráfica de la homología genética del DNA amplificado de los microorganismos contenidos en las leches fermentadas con bifidobacterias mediante RAPDs-PCR	76
Figura 26. Representación gráfica de la homología del DNA amplificado de los estreptococos, lactobacilos y bifidobacterias mediante RAPDs-PCR	77
Figura 27. Perfiles generados con la técnica AFLPs de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales	78
 CAPÍTULO 2	
Figura 1. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp. durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C	90
Figura 2. Viabilidad del producto T (yogur pasteurizado después de la fermentación) analizada tras la tinción con los fluorocromos SYTO9 e ioduro de propidio incluidos en el kit de viabilidad LIVE/DEAD	91
Figura 3. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp. durante su almacenamiento a 4°C	93
Figura 4. Variación de la medida del pH de los productos analizados durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C	93
Figura 5. Viabilidad de las BAL y bifidobacterias durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C obtenidas mediante técnicas de recuento e placa	95
 CAPÍTULO 3	
Figura 1. Tinción de bifidobacterias después de tinción con los fluorocromos contenidos en el kit LIVE/DEAD BacLight	106
Figura 2. Porcentajes de viabilidad celular al transito gastrointestinal	110
 CAPÍTULO 4	
Figura 1. Calendario de toma de muestra en todos los individuos sometidos al estudio <i>in vivo</i> .	120
Figura 2. Hibridación de <i>B. animalis/lactis</i> procedente de la leche fermentada comercial con la sonda Bifa1 marcada con rodamina.	124
Figura 3. Hibridación de <i>Bifidobacterium animalis/lactis</i> procedente de la leche fermentada comercial con la sonda B662 marcada con fluoresceína	124

Figura 4. Recuento total de bifidobacterias y recuento específico de <i>B. animalis/lactis</i> mediante FISH tras consumo de la cepa <i>B. animalis/lactis</i> contenida en la leche fermentada comercial	129
Figura 5. Recuento total de bifidobacterias, mediante el uso de la sonda Bif662 y recuentos en medio de cultivo específico después del consumo de la cepa <i>B. animalis/lactis</i> contenida en la leche fermentada comercial	129
Figura 6. Restricción del 16S rRNA de <i>Bifidobacterium animalis/lactis</i> de uno de los individuos después de una semana de administración del producto	131
Figura 7. Restricción del 16S rRNA de <i>Bifidobacterium animalis/lactis</i> de uno de los individuos después de cuatro semanas de administración del producto	131
Figura 8. Recuperación de bifidobacterias en heces de un individuo tras tratamiento con penicilina y después de consumir leche fermentada con bifidobacterias durante 4 semanas, mediante técnicas culturales y FISH	133

CAPÍTULO 5

Figura 1. Perfiles RAPDs-PCR obtenidos para cepas del género <i>Bifidobacterium</i> aisladas tras incubación en condiciones ácidas durante 16 h.	146
Figura 2. Perfiles obtenidos tras digestión con la enzima de restricción <i>MboI</i> de las cepas seleccionadas del género <i>Bifidobacterium</i>	147
Figura 3. Perfiles obtenidos tras la digestión con la enzima de restricción <i>BamHI</i> de las cepas seleccionadas del género <i>Bifidobacterium</i>	147
Figura 4. Dendrograma derivado de la comparación de los perfiles de ARDRA obtenidos por la enzima <i>MboI</i> de las cepas seleccionadas del género <i>Bifidobacterium</i>	148
Figura 5. Efecto de las distintas concentraciones de Ox gall en el crecimiento de una cepa del género <i>Bifidobacterium</i> aislada tras su incubación en condiciones ácidas durante 16 h	151
Figura 6. Efecto de las distintas concentraciones de NaCl en el crecimiento de una cepa del género <i>Bifidobacterium</i> aislada tras su incubación bajo condiciones ácidas durante 16 h	151
Figura 7. Actividad antimicrobiana detectada mediante el método de overlay frente a <i>Listeria innocua</i> ATC 3309	152
Figura 8. Antibiograma de una cepa del género <i>Bifidobacterium</i> aislada tras incubación bajo condiciones ácidas durante 16 h	153
Figura 9. Actividades enzimáticas de las bifidobacterias seleccionadas mediante el sistema comercial API ZYM.	153

CAPÍTULO 6

Figura 1. Efecto sobre la producción de compuestos antimicrobianos en función de la fase de crecimiento bacteriana.	167
Figura 2. Efecto de los incrementos en la concentración de los SNCs de la cepa <i>Bifidobacterium</i> BIR-0324 frente a <i>Listeria innocua</i> ATC 33090	168
Figura 3. Efecto de los sobrenadantes neutralizados de las cepas del género	170

Bifidobacterium frente a A) *Staphylococcus aureus* y B) *Lactobacillus lactis*

Figura 4. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes neutralizados de *Bifidobacterium* frente a *H. pylori* 181

Figura 5. Actividad antimicrobiana del sobrenadante de cepas de *Bifidobacterium* aisladas de muestras fecales y la acción de la proteinasa K en dicha actividad 183

CAPÍTULO 7

Figura 1. Adhesión de las cepas probióticas (A) y de las cepas patógenas (B) a las glicoproteínas del mucus intestinal humano. 194

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Microorganismos empleados como probióticos.	2
Tabla 2. Características diferenciales de las bacterias acidolácticas	9
Tabla 3. Características del género <i>Lactobacillus</i> .	13
Tabla 4. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	16
Tabla 5. Cronología de la taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	17
Tabla 6. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros <i>Aeriscardovia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Parascardovia</i> y <i>Scardovia</i> pertenecientes a la familia <i>Bifidobacteriaceae</i> .	18
Tabla 7. Porcentaje molar en G+C de las bacterias acidolácticas y de la familia <i>Bifidobacteriaceae</i>	18
Tabla 8. La lista actual de especies incluidas dentro del género <i>Bifidobacterium</i>	19
Tabla 9. La lista actual de especies incluidas dentro del género <i>Bifidobacterium</i> encontradas en diferentes hábitats	20
Tabla 10. Medios no selectivos más empleados para el cultivo de las bifidobacterias	23
Tabla 11. Medios selectivos empleados más para el aislamiento de las bifidobacterias	24
Tabla 12. Técnicas empleadas para identificar las bifidobacterias a nivel de género, especie y cepa	28
Tabla 13. Ventajas y desventajas de las técnicas moleculares empleadas para las bifidobacterias	30

CAPÍTULO 1

Tabla 1. Microbiota contenida en los productos lácteos analizados	58
Tabla 2. Recuentos obtenidos de las leches fermentadas con bifidobacterias	59

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Recuentos iniciales de las bacterias lácticas y bifidobacterias contenidas en los diferentes productos analizados	87
Tabla 2. Viabilidad de las bacterias contenidas en los productos lácteos analizados mediante técnicas de cultivo en placa y recuento directo al microscopio de fluorescencia empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD durante el almacenamiento de los productos a 4°C	92

CAPÍTULO 3

Tabla 1. Efecto simulado del tránsito gastrointestinal en la viabilidad de las cepas del género <i>Bifidobacterium</i> aisladas de productos lácteos comerciales.	106
Tabla 2. Efecto <i>in vitro</i> de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de 13 cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales empleando los recuentos con el fluorocromo SYTO9	107
Tabla 3. Efecto de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de 13 cepas de	108

bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales empleando los recuentos en placa

CAPÍTULO 4

Tabla 1. Concentraciones totales de bifidobacterias y enterobacterias en diez individuos sometidos al ensayo antes, durante y después de la ingesta de 250 ml diarios de leche fermentada con *Bifidobacterium animalis* 124

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante las técnicas de recuento en placa e hibridación *in situ* con las sondas Bif 662 (género *Bifidobacterium*) y Bif aI (especie *B. animalis/lactis*) en el periodo control 125

Tabla 3. Recuentos con las sondas Bif662 y Bif aI para cada individuo durante todo el estudio 127

CAPÍTULO 5

Tabla 1. Células de cepas del género *Bifidobacterium* recuperadas en medios selectivos tras incubación a 37°C durante 16 horas de las muestras fecales. 145

Tabla 2. Origen e identificación de las cepas del género *Bifidobacterium* empleadas en este estudio 148

Tabla 3. Susceptibilidad frente a antibióticos de las cepas de bifidobacterias seleccionadas. 153

Tabla 4. Actividades enzimáticas obtenidas mediante el sistema miniaturizado API ZYM de las cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas. 155

CAPÍTULO 6

Tabla 1. Microorganismos indicadores, origen y condiciones de crecimiento 162

Tabla 2. Espectro de inhibición de las bifidobacterias seleccionadas por su resistencia a las condiciones ácidas frente a cepas indicadoras 170

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los SNCs frente a los diferentes aislados de *H. pylori*. 181

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias frente a metronidazol y claritromicina de las cepas de *H. pylori* y *Bifidobacterium*. 182

CAPÍTULO 7

Tabla 1. Inhibición de la adhesión de patógenos por cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* 195

Tabla 2. Desplazamiento de patógenos del mucus intestinal por cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*. 196

Tabla 3. Efecto de los tratamientos en la adhesión de las bifidobacterias 197

Resumen

El concepto de *alimento funcional* se emplea para describir a aquellos alimentos adicionados con ingredientes de diversas clases y orígenes que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre quien los ingiere. Este concepto surgido en Japón ha ido popularizándose y expandiéndose hacia otros continentes como Europa, fundamentalmente debido al interés de la sociedad actual por la nutrición, la dieta y la salud. Los probióticos representan una gran área dentro de los alimentos funcionales y se ha intensificado la investigación para desarrollar productos probióticos y profundizar en el conocimiento de los efectos sobre la salud humana.

Los probióticos se definen como “suplementos alimentarios microbianos vivos que afectan de forma ventajosa al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal microbiano”. Son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, y también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos, ya que se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. Un microorganismo probiótico efectivo debe poseer una serie de características: no ser patógeno ni tóxico, debe ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de quien lo ingiere, tener origen humano, ser tecnológicamente utilizable, presentar un elevado porcentaje de células viables, debe ser capaz de sobrevivir a la flora intestinal, ha de permanecer viable durante su almacenamiento en refrigeración, y tener capacidad de adherirse a la superficie mucosa, etc. El establecimiento de criterios de selección y controles de calidad para productos probióticos se considera una prioridad debido a la rápida incorporación de estos productos en el mercado y su distribución en el ámbito internacional sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada.

En los últimos años ha aumentado el interés por los productos elaborados con microorganismos probióticos, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, esto ha dado lugar a la explotación comercial de algunas de estas bacterias y a la aparición en el mercado de una gran variedad de productos probióticos. En la actualidad, todavía se desconocen muchos aspectos relativos a su mecanismo de acción; sin embargo si se reconoce su funcionalidad en diversos aspectos, tales como la prevención y tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología; la

reducción de la intolerancia a la lactosa; la modulación de la respuesta inmunitaria; la reducción de los niveles de colesterol, la prevención de ciertos tipos cáncer, la inhibición del desarrollo de la flora competitiva, patógena o alterante. Su actividad antimicrobiana, aunque en gran medida se atribuye a la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), es mucho más compleja y, también, es fruto de su mayor capacidad para competir por nutrientes, adaptarse al nicho ecológico y para sintetizar otros compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, compuestos heterocíclicos, diacetilo y otros.

Por tanto este trabajo aborda por una parte el estudio de las leches fermentadas con bifidobacterias comercializadas en el mercado español, analizando la cantidad de microorganismos que contienen, identificando qué género están incluidos y caracterizándolos molecularmente para conocer las relaciones genéticas entre ellos, además de comprobar su viabilidad a las condiciones de almacenamiento en refrigeración y condiciones simuladas de tránsito gastrointestinal. Y por otra parte, la selección y estudio de cepas de *Bifidobacterium* de origen humano siguiendo los criterios establecidos por la FAO-OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-Organización Mundial de la Salud); tales como la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal, presencia de actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas, alterantes y otros, elevada capacidad de adhesión a mucus; con el fin de obtener cepas de origen humano con posible utilización como cepas probióticas como alternativa a las empleadas en la actualidad para la elaboración de productos lácteos.

Summary

The concept of *functional food* is used to describe foods supplemented with different types of ingredients and origins exercising beneficial effects on who ingests them. This concept was born in Japan and it has been popularized and expanding fundamentally toward other continents as Europe due to the concern of our society about the nutrition, diet and health. Probiotics represents a great field inside the functional foods and scientific investigation regarding the effects of probiotics on human health and new products has been intensified in recent years.

Probiotics are defined as “live microbial food supplements that beneficially affect the host animal by improving its microbial intestinal balance.” They are microorganisms that stimulate protection functions of the digestive tract, they are also known as *biotherapeutics*, *bioprotector* or *bioprophylactics*, and they are used to prevent enteric and gastrointestinal infections. An effective probiotic microorganism should possess characteristics such as: to be non-pathogen and non-toxic, to exercise beneficial effects on the human health, with human origin, to be technologically usable, to present a high percentage of viable cells, to be able to survive the intestinal microflora, to remain viable during its storage in refrigeration, capacity to adhere to the mucus surface, etc. The establishment of selection approaches and quality controls for these products are considered a priority due to the quick incorporation of these products in the market and their distribution in the international environment without the commonly accepted normative.

Recently, the interest for the products that contain probiotic microorganisms belonging to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* has brought the commercial exploitation of some of these bacteria with the appearance in the market of a great variety of probiotic products. Nowadays, many relative aspects are still ignored to their action mechanism; however their functionality is recognized in a lot of aspects, such as the prevention and treatment of gastrointestinal diseases; reduction of the lactose intolerance; modulation of the immune system; reduction of cholesterol levels, prevention certain cancers, inhibition of pathogens, alterants microorganisms and competitive flora. Their antimicrobial activity, is in great measure attributed to the production of organic acids (lactic and acetic acid), but it is much more complex and it

is also, their biggest capacity to compete for nutritional compounds and to adapt to the ecological microflora and to synthesize other antimicrobial compounds like bacteriocins, heterocyclic compounds, dyacetil and others.

For all these, the aim of this work is the study of the fermented milks with bifidobacteria commercialized in the Spanish market under different points of view, we analyze the quantity of microorganisms in these products using molecular techniques. We also look into the study of the impact of different conditions such as refrigeration and simulated gastrointestinal juices on their viability. The selection and study of *Bifidobacterium* strains from human origin with possible use like probiotic strains for the elaboration dairy products was made following the criteria of FAO-WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations- World Health Organization) the resistance to gastrointestinal conditions, antimicrobial activity against pathogens, alterants and other microorganisms, and capacity of adhesion to mucus.

Resum

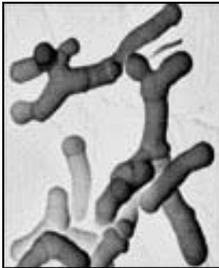
El terme d'*aliment funcional* s'usa per a descriure a aquells aliments que contenen amb ingredients de diverses menes i orígens que poden tindre un efecte beneficiós en qui els consumeix. Aquest concepte que va sorgir al Japó ha anat popularitzant-se i expandint-se cap a altres continents com Europa fonamentalment a causa de la preocupació sobre la salut, la dieta i la nutrició de la societat actual. Els probiòtics representen un gran àrea dins dels aliments funcionals i s'ha intensificat la investigació per desenvolupar nous productes probiòtics i profunditzar en el coneixement el efecte que tenen en la salut humana.

Els probiòtics es defineixen com a “suplements alimentaris microbians vius que afecten de manera profitosa l'animal hoste millorant el seu equilibri microbià”. Són microorganismes que estimulen les funcions protectores del tracte digestiu; també són coneguts com *bioterapèutics*, *bioprotectors* o *bioprotectors*, i s'utilitzen per prevenir les infeccions entèriques i gastrointestinals. Un microorganisme probiòtic efectiu ha de tenir una sèrie de qualitats: no ha de ser patògen ni tòxic, ha de tenir efectes beneficiosos sobre la salut de qui l'ingereix, ha de ser d'origen humà, tecnològicament utilitzable, ha de contenir un elevat percentatge de cèl·lules viables, ha de tenir la capacitat de sobreviure a la flora intestinal, ha de romandre viable durant l'emmagatzematge en refrigeració, ha de presentar capacitat d'adhesió a la superfície mucosa intestinal, etc. L'establiment de criteris de selecció i de controls de qualitat per als productes probiòtics es considera una prioritat a causa de la ràpida incorporació d'aquests productes al mercat i a la distribució que se'n fa en l'àmbit internacional sense que hi haja una normativa acceptada per tothom.

La majoria dels productes probiòtics estan elaborats amb microorganismes que pertanyen als gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Això ha donat lloc a l'explotació industrial d'alguns bacteris i a l'aparició de productes que contenen microorganismes definits i viables en grau suficient per a modificar la microflora, amb la qual cosa exerceixen un efecte beneficiós per a la salut. En l'actualitat es desconeixen molts aspectes relatius al seu mecanisme d'acció; en canvi, si que es reconeix la seua funcionalitat en diversos aspectes com la prevenció i el tractament de

trastorns gastrointestinals, la reducció de la intolerància a la lactosa, la modulació del sistema immune, la reducció dels nivells de colesterol, la prevenció de diversos tipus de càncer i la inhibició del desenvolupament de la flora competitiva, patògena o alterant. La seua activitat antimicrobiana, encara que en gran mesura es atribuïda a la producció d'àcids orgànics (àcid làctic i acètic), és molt més complexa i a més es fruit de la seua major capacitat per a competir pels nutrients i adaptar-se al niu ecològic i per a sintetitzar compostos antimicrobians com són les bacteriocines, compostos heterocíclics, diacetil i altres pèptides.

Per tot això, aquest treball vol abraçar per una banda l'estudi de les llets fermentades amb bifidobacteris comercialitzades en el mercat espanyol, analitzant la quantitat de microorganismes que contenen, identificant en quin gènere microbià estan inclosos aquests, i caracteritzant-los molecularment per conèixer les relacions genètiques entre aquests, a més de comprovar-ne la supervivència en condicions d'emmagatzematge en refrigeració i en les condicions simulades de trànsit gastrointestinal. Per altra banda, la selecció i l'estudi de soques de *Bifidobacterium* d'origen humà seguint els criteris establerts per la FAO-OMS (Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació- Organització Mundial de la Salut); com són la resistència a les condicions del tracte gastrointestinal, la presència d'activitat antimicrobiana enfront a bacteris patògens, alterants u d'altres, la capacitat d'adhesió al mucus intestinal; amb la finalitat de obtindre soques probiòtiques com a alternativa a les emprades en l'actualitat per a l'elaboració de productes làctics.



INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTOS FUNCIONALES

En los últimos veinte años, se han producido importantes avances en el campo de la nutrición debido, en parte, a su expansión hacia otras áreas científicas como la inmunología, y la ecología microbiana y genómica. Los esfuerzos coordinados en estas disciplinas han permitido profundizar en las bases que explican la estrecha relación entre la dieta y el estado de salud, de modo que, actualmente se atribuye no sólo al valor nutritivo de aquella, sino también a los efectos beneficiosos derivados de sus complejas interacciones con el huésped y la microbiota intestinal.

En este contexto, han surgido los llamados “alimentos funcionales”, considerados como aquellos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad. Japón fue el primer país en introducir en el etiquetado de sus productos el término de “alimento funcional”, a finales de la década de 1980, y en estos momentos sus productos representan el 50% del mercado (Stanton *et al.*, 2001). Este concepto ha ido popularizándose y expandiéndose hacia otros continentes como Europa, fundamentalmente debido a la preocupación por la nutrición, dieta y salud de la sociedad actual. Los probióticos representan un gran grupo dentro de los alimentos funcionales y se ha intensificado la investigación para desarrollar productos probióticos y su efecto sobre la salud.

2. PROBIÓTICOS

Los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. La mayoría de los probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces*. (Tabla 1).

El término “probiótico”, derivado de *bios*, palabra griega que significa “vida”, nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva

de determinados microorganismos en la flora intestinal. El término probiótico fue usado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell, para describir a aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otras, en contraposición al término antibiótico.

Tabla 1. Microorganismos empleados como probióticos. (modificado de Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>L.lactis</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>L.lactis</i>	<i>B.longum</i>	<i>L.cremoris</i>	
<i>L.bulgaricus</i>	<i>B.breve</i>	<i>L.diacetylactis</i>	
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B.lactis/animalis</i>		
<i>L.casei</i>	<i>B.adolescentis</i>		
<i>L.kefir</i>			
<i>L.brevis</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.helveticus</i>			
<i>L.plantarum</i>			
<i>L.salivarius</i>			
<i>L.johnsonii</i>			

<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Otras especies
<i>E.faecium</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>B.coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Leuconostoc</i> spp.

La palabra fue aplicada posteriormente para referirse a extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento bacteriano (Sperti, 1971) sin embargo, Parker (1974) fue el primero en usar el término probiótico de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos o sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal. Más adelante, Fuller (1991) acotó más este concepto y redefinió a los probióticos como aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana del intestino. Por otra parte, Saavedra (1994) propuso una definición más general, señalando a los probióticos como microorganismos viables que, ingeridos con la alimentación, pueden tener un efecto positivo en la prevención o en el tratamiento de estados patológicos específicos. Fuller (1999) redefinió el concepto de probióticos como suplementos de origen microbiano que afectan beneficiosamente la fisiología del huésped, modulando la inmunidad y mejorando, además, el balance microbiano y nutricional

del tracto gastrointestinal. Salminen *et al.* (1999) definió los probióticos como preparaciones de células microbianas o componentes de células que tiene un efecto beneficioso sobre la salud de quien los ingiere. Esta definición no implica que los probióticos deban ser viables, ya que se sugiere que las formas no viables también pueden mostrar efectos beneficiosos (Ouwerhand y Salminen, 1998). En la actualidad, la definición que se suele emplear es la elaborada por la FAO/OMS en 2001 con los siguientes términos: los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped.

2.1. PROBIÓTICOS: Criterios para la evaluación

El establecimiento de criterios de selección y controles de calidad para productos probióticos se considera una prioridad debido a la rápida incorporación de estos productos al mercado y su distribución en el ámbito internacional sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada. En concreto, la FAO/OMS, en mayo de 2002, hizo pública una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos; dicha guía incluye los siguientes aspectos:

✓ Identificación del género, la especie y la cepa probiótica

Los lactobacilos y las bifidobacterias incorporados a estos productos se consideran seguros según su clasificación taxonómica. Por ello, es necesaria una correcta identificación a nivel de género y especie, para garantizar que se trata de microorganismos presumiblemente inocuos y de grado alimentario (GRAS). Por otro lado, los efectos beneficiosos no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que son dependientes de cepa. Por eso, es necesario profundizar en su identificación a nivel intraespecífico, mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica, a fin de asociar un determinado efecto con una cepa concreta, y poder realizar su seguimiento en estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos.

✓ **Estudios «in vitro» para la selección de probióticos de uso en humanos**

Dentro de estas pruebas de selección *in vitro* se incluyen: i) la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, que constituyen unas condiciones limitantes para la supervivencia a través del tracto gastrointestinal, de lo contrario los microorganismos probióticos no llegarían viables al final del intestino para ejercer su acción beneficiosa para la salud, ii) la adherencia a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, ya que se consideran propiedades que deben de poseer para ejercer efectos inmunomoduladores. También, se incluyen ciertas habilidades para la reducción de la adhesión de la flora competitiva y actividad microbiana que favorezca el desplazamiento de patógenos; y por último el análisis de la capacidad de hidrolizar las sales biliares.

✓ **Seguridad de los probióticos**

Las cepas utilizadas pertenecen, en su mayoría, a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son comensales humanos que han sido aplicados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos. Éstos son aspectos que garantizan a priori su inocuidad, aunque teóricamente su uso en alimentación podría tener efectos colaterales. Por ello, y pese a que las bacterias utilizadas se consideran seguras, se recomienda que sean sometidas a las siguientes pruebas de caracterización: i) resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles (Danielsen y Wind, 2003); ii) actividades metabólicas perjudiciales (producción de ácido D-láctico); iii) estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores; iv) determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora, y v) ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.

✓ **Estudios «in vivo» utilizando animales y humanos**

Estos estudios están destinados a demostrar las propiedades atribuidas a los probióticos en relación con el bienestar y calidad de vida, la mejoría de una condición clínica y/o síntomas, la reducción del riesgo y rapidez en la recuperación de enfermedades.

✓ Etiquetado

Se ha recomendado la incorporación en el etiquetado de los siguientes aspectos: i) género, especie y nombre de la cepa, para evitar confusiones sobre su funcionalidad; ii) mínimo número de viables de la cepa probiótica al final de la vida útil (10^6 células viables por ml); iii) ingestión recomendada para que la dosis del probiótico sea efectiva en relación con la mejora de salud declarada; iv) efectos beneficiosos que puede proporcionar a la salud; v) condiciones adecuadas de almacenamiento, y vi) dirección de contacto con centros de información al consumidor.

✓ Viabilidad e identidad de cepas declaradas en productos probióticos comerciales

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos (yogures, leche, quesos, etc.); las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila, etc.), y los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas. La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables. Aunque todavía existe poca información sobre las dosis y la frecuencia de consumo necesaria para garantizar la efectividad de estos productos, en general, se sugiere que estos productos mantengan unos valores de viables de 10^6 - 10^7 /ml o g (Sanders *et al.*, 1999; Ouwerhand *et al.*, 2002).

Asimismo, la correcta identificación de las especies utilizadas y su correlación con las declaradas es otro aspecto que se debe exigir en cualquier producto probiótico. Esto requiere la aplicación no sólo de métodos convencionales de identificación, sino también de técnicas moleculares, ya que no siempre es sencillo resolver la posición taxonómica de las cepas probióticas; también es necesario garantizar la existencia de técnicas eficaces que permitan el seguimiento de las introducidas en el mercado (Fasoli *et al.*, 2003). Por ejemplo, en ciertas

preparaciones de probióticos liofilizados se han detectado diferencias entre las especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacillus* declaradas y las detectadas en el producto del mercado, así como la presencia de otras no declaradas (Fasoli *et al.*, 2003).

3. PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS

Como la viabilidad de las bacterias en los alimentos y durante el tránsito gastrointestinal puede ser variable se han desarrollado los prebióticos (Fooks *et al.*, 1999). Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias del colon, que tiene la propiedad potencial de mejorar la salud del huésped (Gomes y Malcata, 1999; Nagendra, 2001). Principalmente estimulan el crecimiento y actividad de lactobacilos y bifidobacterias. Entre ellos encontramos fructooligosacáridos (FOS), inulina, galactooligosacárido (GOS), fibra, lactulosa, azúcares y alcoholes. La combinación de probióticos y prebióticos recibe el nombre de simbióticos.

4. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos afectan a la composición de la flora intestinal y son capaces de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud (Mattila-Sandholm *et al.*, 2000). Entre los beneficios estudiados se incluyen:

- Atenuación de la intolerancia a la lactosa y consiguiente mejora de la digestibilidad: las bacterias productoras de ácido acético presentes en productos como el yogur aumentan la actividad lactasa en el intestino delgado, reduciendo el problema de la asimilación.

- Efectos sobre el sistema inmunológico: algunas cepas muestran una actividad inmunoestimulante en humanos, pudiendo actuar bien como adyuvantes de respuestas inmunes específicas (por intervención de los linfocitos T4), bien

aumentando los mecanismos defensivos no específicos contra las infecciones o tumores (por fenómenos fagocitarios). Existen resultados que sugieren que la aparición de las bacterias probióticas puede contrarrestar los efectos mutagénicos y genotóxicos en el colon y en otros lugares (Salminen *et al.*, 1999).

□ Mantenimiento de la flora intestinal normal: la flora de microorganismos lácticos vivos de los productos probióticos ayuda a repoblar el intestino humano en los casos de alteración de la microflora propia como consecuencia de infecciones intestinales. Su consumo se recomienda en la prevención y tratamiento de la diarrea, enteritis o colitis (Lee y Salminen, 1995). Pero también por el descenso de los niveles de colesterol, por su efecto beneficioso en el tratamiento de la artritis reumatoide, infecciones de orina, etc. (Tannock, 1999; Nagendra, 2001).

□ Prevención del cáncer: estudios epidemiológicos recientes aportan evidencias de que el consumo probióticos pueden reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Salminen *et al.*, 1999; Nagendra, 2001).

□ Reducción en las alergias: la intervención de los probióticos puede ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias alimentarias mediante la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la flora intestinal (Mattila-Sandholm *et al.*, 2000).

□ Reducción del colesterol: elevados niveles sanguíneos de ciertos lípidos son un factor de riesgo para problemas cardiovasculares. El efecto de los probióticos en la reducción de los niveles de colesterol y los mecanismos de acción de estos efectos son desconocidos pero algunas hipótesis sugieren que ciertas cepas pueden asimilar la molécula de colesterol (Salminen *et al.*, 1999).

□ Salud gástrica: La habilidad de las bacterias probióticas para influenciar la colonización y actividad de *Helicobacter pylori*, bacteria asociada a gastritis crónicas, ulcera péptica y un factor de riesgo para el cáncer gastrointestinal, ha sido evaluada por diferentes autores (Hamilton-Miller, 2003; Felley y Michetti, 2003;

Sgouras *et al.*, 2004). Resultados de estudios animales y humanos sugieren que algunos probióticos o sus productos metabólicos pueden inhibir las infecciones por *H.pylori* (Salminen *et al.*, 1999; Collado *et al.*, 2005; Sgouras *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

□ Efectos nutricionales: La fermentación es un proceso que aumenta la biodisponibilidad de proteínas (aminoácidos y péptidos) por la acción proteolítica de las bacterias empeladas como estárter (Fook *et al.*, 1999).

5. ANTECEDENTES HISTÓRICOS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

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 ácido láctica, 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* es en realidad "*Thermobacterium bulgaricum*" (Orla-Jensen, 1931), más tarde denominado *Lactobacillus bulgaricus* (normalmente conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). No obstante, Rettger y Cheplin en 1921 y Rettger *et al.* en 1935, encontraron que *Thermobacterium acidophilin* (*Lactobacillus acidophilus*) era la bacteria acidoláctica que podía asentarse en el intestino y, además, las principales propiedades terapéuticas del yogur se ponían de manifiesto cuando *Lactobacillus acidophilus* era una de las bacterias presentes en el cultivo estárter. (Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects, book).

La clasificación de las bacterias acidolácticas de Orla-Jensen aún se acepta como método estándar de diferenciación 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 manual de Bergey's (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 (1974), que las considera dos familias separadas: *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*. En la edición del manual de Bergey de 1986, los anteriores microorganismos están agrupados en diferentes secciones. Las bacterias acidolácticas (LAB) son un grupo de bacterias Gram-positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos.

Tabla 2. Características diferenciales de las bacterias acidolácticas ^a.

	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i> . ^b
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ a partir de glucosa ^c	- ^e	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crecimiento 6,5% NaCl	ND ^f	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
	L	D, L, DL ^g	L	L	L	D	L, DL ^g	L	L	D, DL ^g

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 denota homofermentativo y heterofermentativo, respectivamente.

e) pequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidas, dependiendo del medio.

f) no crecimiento en 8% de NaCl.

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* forman el corazón del grupo. 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, hablaremos de este género más adelante.

La clasificación de las bacterias acidolácticas en diferentes géneros esta 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; aunque ésta es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos (*Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*...).

6. FILOGENIA DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

Las comparaciones de la secuencia de rRNA son consideradas como una medida óptima para determinar las verdaderas relaciones filogenéticas entre las bacterias (Woose, 1987). Inicialmente, estas comparaciones fueron realizadas con hibridaciones de DNA-rRNA o por catalogación de oligonucleótidos. Los avances en las técnicas moleculares han encabezado los métodos de secuenciación de fragmentos largos de rRNA, 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 rRNA. Los bancos de datos genéticos disponibles para agrupar las grandes cantidades de secuencias hacen posible construir amplios árboles filogenéticos (Woose, 1987). Los datos obtenidos demuestran que la pared celular Gram-positiva posee una fuerte relevancia filogenética. Todas las bacterias Gram-positivas se agrupan en uno de los 11 principales taxones (Woose, 1987).

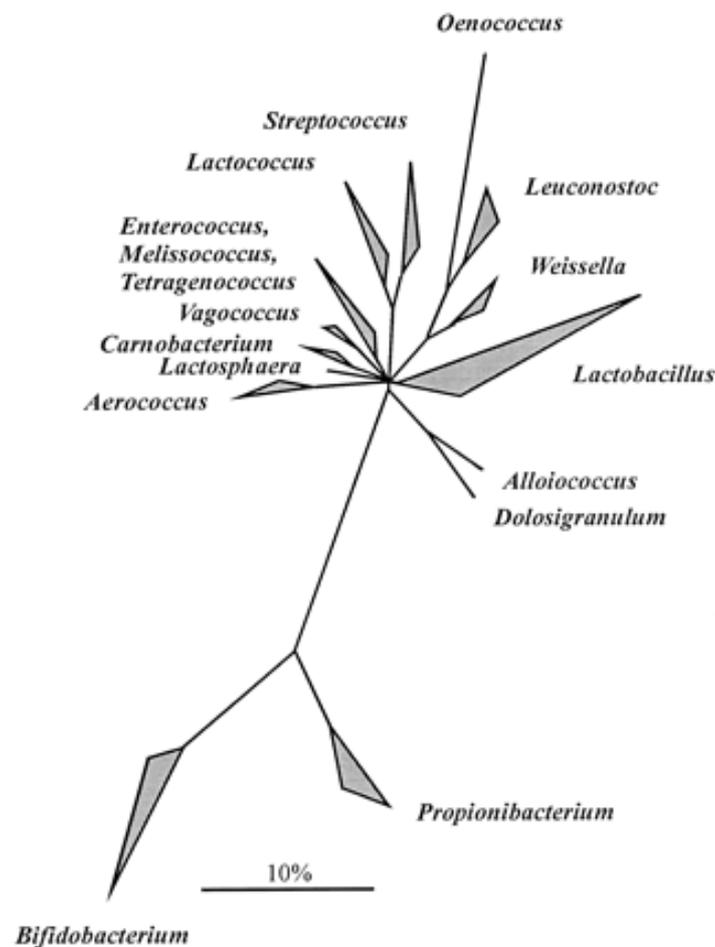


Figura 1. Esquema del árbol filogenético de las bacterias LAB, que también incluye algunos aerobios y anaerobios facultativos Gram-positivos (Ref. Prokaryotes 3ªed.)

La composición global del DNA, entendida como el porcentaje de cada una de las bases presentes en la secuencia y expresada normalmente en % 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, es una de las características requeridas para la delimitación de especies y géneros (Stackebrandt *et al.*, 1992). Las bacterias Gram-positivas se pueden dividir en dos grupos principales. Es común designarlos por su contenido en G+C, expresado como porcentaje molar en G+C en el DNA. El "Punto de Fusión" está frecuentemente fijado en un 50% pero más bien se encuentra dentro del intervalo 53-55%. El

elevado contenido en G+C de la subdivisión *Actinomycetes* engloba a géneros tales como *Bifidobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Microbacterium*, *Cornynebacterium*, *Actinomyces* y *Streptomyces* (Woose, 1987; Stackebrandt y Teuber, 1988). El bajo contenido en G+C o la subdivisión *Clostridium* incluye todas las bacterias acidolácticas, junto con aerobios y anaerobios facultativos tales como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, y anaerobios como *Clostridium*, *Peptococcus*, y *Ruminococcus* (Woose, 1987; Stackebrandt y Teuber, 1988).

Los detalles de las relaciones filogenéticas entre el género de las bacterias acidolácticas (LAB) 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 especies del mismo género el 10-12%.

7. GÉNERO *LACTOBACILLUS*

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora 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...). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceitunas...).

Son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme. Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores. Su

crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5,5-6,2. Se han descrito siete grupos serológicos (A-G) de lactobacilos, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 102 especies y la especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* que pertenece al grupo E.

Tabla 3: Características del género *Lactobacillus*. (Adaptado de Axelsson, 1998)

CARACTERÍSTICAS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
	Homofermentativos Obligados	Heterofermentativos Facultativos	Heterofermentativos Obligados
Fermentación de pentosas.	-	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	+
CO ₂ a partir de gluconato	-	+	+
Presencia de aldolasa.	+	+	-
Presencia de fosfoctolasa.	-	+	+
	<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>

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 medio 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 y por ello se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo.

También se emplea para el aislamiento de los microorganismos del yogur el medio LS- agar diferencial formulado por la CeNAN Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (1982) 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 TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) al 1%. (ver Anexos). 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 ovals 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, MRS y M-17.

8. GÉNERO *STREPTOCOCCUS*

Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*, pero la única especie de estreptococos que está asociada a la tecnología alimentaria es *Streptococcus thermophilus*, que se emplea en la fabricación del yogur (junto con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y con otros microorganismos *Lb. casei*; *Lb. acidophilus*; *Bifidobacterium*). *Streptococcus thermophilus* fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919. Su nombre procede del término griego “*therme*” que significa calor y del término “*philus*” que significa afinidad. Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9 µm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. 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 resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos. *S. thermophilus* está incluido dentro del grupo "otros estreptococos" por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), pero se encuentra actualmente dentro del grupo de los estreptococos orales (Hardie y Whiley, 1995). Farrow y Collins propusieron que *S. thermophilus* fuera considerado como una subespecie de *S. salivarius* porque su homología DNA-DNA era mayor del 70%, de esta forma fue aceptado el nombre de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

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 su 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 ha adoptado este medio de forma paralela con MRS para el examen rutinario del yogur.

9. GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM*

9.1. Antecedentes Históricos

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de bebés una bacteria con una morfología inusual y desconocida, en forma de Y. Entonces se planteó el problema de la ubicación de esta bacteria en la clasificación contemporánea. A principios de siglo, la taxonomía estaba basada por completo en el criterio morfológico y Tissier (1900) denominó a esta bacteria "*Bacillus bifidus*". En ese mismo tiempo, en Italia, Moro descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la que Tissier había observado, y la identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*. A pesar de las diferencias entre esas dos bacterias, Holland en 1920, propuso un nombre común "*Lactobacillus bifidus*", que fue desarrollándose y ganando precisión a lo largo del tiempo en paralelo con el progreso científico.

Orla-Jensen (1924) fue el responsable de la dirección en la historia de la taxonomía de las bifidobacterias y reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* como un taxón separado, pero con muchas similitudes al género *Lactobacillus*, al que las bifidobacterias fueron incluidas en la 7ª ed. Manual Bergey's. La clasificación e identificación de los microorganismos que se basaba en

la morfología cambió su criterio; así la fisiología, los requerimientos nutricionales y las características metabólicas y enzimáticas pasaron a tomar una mayor relevancia.

Tabla 4: Taxonomía del género *Bifidobacterium*

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidobacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies)
	<i>Gardnerella</i> (1 especie)
	<i>Aeriscardovia</i> (1 especie)
	<i>Parascardovia</i> (1 especie)
	<i>Scardovia</i> (2 especies)

En 1967, De Vries y Stothamer demostraron en las bifidobacterias, la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato y la ausencia de aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, dos enzimas que si se encuentran en los lactobacilos. Se pudieron distinguir dos tendencias: la escuela francesa que abogaba por la separación de los dos géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, combinando todas las bifidobacterias bajo una única clasificación de *B. bifidum* (Holland, 1920; Orla-Jensen, 1919-1924; Prevot, 1940-1955), y la escuela anglo-sajona que preferían integrar a las bifidobacterias dentro del género *Lactobacillus*. En 1965, el progreso de la genética molecular y de los equipos de trabajo de Sebald *et al.* (1965) y Werner *et al.* (1966) mostraron que el porcentaje de G+C en el DNA de *Bifidobacterium* difiere de *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*.

En 1974, la 8ª edición del manual de Bergey reconoce a *Bifidobacterium* como un género propio formado por 11 especies (Buchanan y Gibbons, 1974). En la 9ª edición del Manual Bergey se incluyen nuevas especies, constituyéndose el género con 33 especies, 7 de las cuales se descubrieron e incorporaron al género en la década de los años 90.

Tabla 5: Cronología de la taxonomía del género *Bifidobacterium* (Modificado de Ballongue, 1998. *Bifidobacteria and Probiotic action*. Lactic Acid Bacteria, Salminen eds.)

NOMBRE	AUTOR	AÑO
<i>Bacillus bifidus</i>	Tissier	1900
<i>Bacteroides bifidus</i>	Castellani y Chalmers	1919
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Manual Bergey's eds.1-4	1923-1934
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Holland	1920
<i>Bacterium bifidum</i>	Orla-Jensen	1924
<i>Tisseria bifida</i>	Lehmann y Neumann	1927
<i>Nocardia bifida</i>	Pribram	1929
<i>Actynomices bifidus</i>	Vuillemin	1931
<i>Actinobacterium bifidum</i>	Nannizzi	1934
<i>Lactobacillus acidophilus</i> var. <i>bifidus</i>	Puntoni Weiss y Rettger	1937
<i>Lactobacillus parabifidum</i>	Weiss y Rettger	1938
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Prevot	1938
<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	Manual Bergey's eds.5-7	1938
<i>Corynebacterium bifidum</i>	Negrovi y Fischer	1939-1957
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Olsen	1944
5 grupos de bifidobacterias	György	1949
Descripción de especies humanas	Dehnert	1969
Nuevas especies animales	Reuter, Mitsuoka y Scardovi	1969-1972
Familia <i>Actinomycetae</i> , Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 11 especies.	Holdemann y Moore Manual Bergey's eds.8	1974
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 33 especies.	Manual Bergey's eds. 9	1990
Orden <i>Bifidobacteriales</i> , Familia <i>Bifidobacteriaceae</i> , Géneros <i>Bifidobacterium</i> y <i>Gardnerella</i>	Stackebrandt <i>et al.</i>	1997
Géneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Aeriscardovia</i> , <i>Parascardovia</i> y <i>Scardovia</i>	Jiang <i>et al.</i>	2002
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 28 especies.	Actualidad	2004

En 1997 Stackebrandt *et al.* a través del análisis molecular del 16S rRNA propuso la familia *Bifidobacteriaceae* fam. nov., (1997). Esta familia engloba el género tipo *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924) con 28 especies (la especie tipo es *Bifidobacterium bifidum*, Tissier; Orla-Jensen, 1924) y el género *Gardnerella* (Greenwood y Pickett, 1980), que únicamente incluye una especie *Gardnerella*

vaginalis. Actualmente la familia *Bifidobacteriaceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*.

La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son Gram positivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO₂, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, catalasa y oxidasa negativas. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35–39°C.

Tabla 6. Principales características que permiten la diferenciación de los géneros *Aeriscardovia*, *Bifidobacterium*, *Parascardovia* y *Scardovia* pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae*. (adaptado de Simpson *et al.*, 2004).

	<i>Aeriscardovia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Scardovia</i>
Crecimiento en aerobiosis	+	(+)	-	-
Temperaturas de crecimiento (°C)	30-46	25-46	27-44	27-44
Alargamiento de las células después de exposición al oxígeno	+	d	+	+
Arabinosa	+	d	d	-
Celobiosa	-	d	+	-
Lactosa	-	d	+	d
Maltosa	+	d	+	+
Mannitol	-	d	-	-
Mannosa	(+)	d	-	-
Melézitosa	d	d	-	d
Rafinosa	+	d	d	d
Sacarosa	d	+	+	+
Salicina	+	d	+	d
Sorbitol	-	d		
Trehalosa	-	d	d	-
Xylosa	d	d	-	+

+ : Respuesta positiva; (+) : Respuesta débilmente positiva; - : Respuesta negativa; d : Respuesta variable

Tabla 7. Porcentaje molar en G+C de las bacterias acidolácticas y de la familia *Bifidobacteriaceae*

Género	Porcentaje de G+C
<i>Lactobacillus</i>	34,7-50,8 %
<i>Streptococcus</i>	33-44 %
<i>Leuconostoc</i>	39-42 %
<i>Bifidobacterium</i>	55-67 %
<i>Aeriscardovia</i>	54 %
<i>Parascardovia</i>	55%
<i>Scardovia</i>	45 %
<i>Gardnerella</i>	42-55 %

9.2. Taxonomía del Género *Bifidobacterium*.

La clasificación de las bifidobacterias ha sido modificada a lo largo de la historia desde que se descubrió en 1899 el microorganismo denominado *Bacillus bifidus*; y que en la actualidad representa al género *Bifidobacterium* como especie tipo con el nombre de *Bifidobacterium bifidum*. En los últimos años han aparecido nuevas cepas y se han reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por un total de 28 especies.

Tabla 8. La lista actual de especies incluidas dentro del género *Bifidobacterium* (datos obtenidos List of Bacterial names with Standing in Nomenclatura, Noviembre 2004, <http://www.bacterio.cict.fr/>).

<i>Especie</i>	<i>Subespecies</i>	<i>Referencia</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> .		Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium angulatum</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium animalis</i>	subsp. <i>animalis</i>	(Mitsuoka 1969)
	subsp. <i>lactis</i>	Scardovi y Trovatelli 1974 (Meile <i>et al.</i> 1997) Masco <i>et al.</i> 2004
<i>Bifidobacterium asteroides</i>		Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		Tissier, 1900 Orla-Jensen, 1924
<i>Bifidobacterium boum</i> .		Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium breve</i>		Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium choerinum</i> .		Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>		Scardovi y Trovatelli, 1969 Biavati <i>et al.</i> , 1982
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>		Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium dentium</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium gallicum</i>		Lauer, 1990
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>		Watabe <i>et al.</i> , 1983
<i>Bifidobacterium indicum</i>		Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium longum</i>	subsp. <i>longum</i>	Sakata <i>et al.</i> , 2002
	subsp. <i>infantis</i>	
	subsp. <i>suis</i>	
<i>Bifidobacterium magnum</i>		Scardovi and Zani 1974
<i>Bifidobacterium merycium</i>		Biavati y Mattarelli 1991
<i>Bifidobacterium minimum</i> .		Biavati <i>et al.</i> 1982
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>		Scardovi <i>et al.</i> 1979
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	subsp. <i>pseudolongum</i>	Mitsuoka 1969
	subsp. <i>globosum</i>	Yaeshima <i>et al.</i> 1992
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>		Simpson <i>et al.</i> , 2004a
<i>Bifidobacterium pullorum</i>		Trovatelli <i>et al.</i> 1974
<i>Bifidobacterium ruminatum</i>		Biavati y Mattarelli 1991
<i>Bifidobacterium saeculare</i>		Biavati <i>et al.</i> 1992
<i>Bifidobacterium scardovii</i>		Hoyles <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium subtile</i>		Biavati <i>et al.</i> 1982
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	subsp. <i>porcinum</i>	Zhu <i>et al.</i> 2003
	subsp. <i>thermacidophilum</i>	Dong <i>et al.</i> 2000
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>		Mitsuoka 1969

9.3. Habitats

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia* y *Bacteroides*, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10^8 a 10^{11} bacterias por gramo de material del colon.

Tabla 9. La lista actual de especies incluidas dentro del género *Bifidobacterium* encontradas en diferentes habitats (Adaptada de Prokaryotes 3 ed.).

<i>Humanos</i>	<i>Animal</i>	<i>Medioambiental y alimentos</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^a
<i>Bifidobacterium angulatum</i>		<i>Bifidobacterium angulatum</i> ^a
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> ^b
	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium boum</i>	
<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Bifidobacterium breve</i> ^a
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>		<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	<i>Bifidobacterium choerinum</i> ^b
	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	
	<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	
<i>Bifidobacterium dentium</i>		
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	
	<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	
	<i>Bifidobacterium indicum</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> ^a
	<i>Bifidobacterium magnum</i>	
	<i>Bifidobacterium merycium</i>	
		<i>Bifidobacterium minimum.</i>
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>		<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> ^a
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ^b
	<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium pullorum</i>	
	<i>Bifidobacterium ruminatum</i>	
	<i>Bifidobacterium saeculare</i>	
<i>Bifidobacterium scardovii</i>		
	<i>Bifidobacterium subtile</i>	<i>Bifidobacterium subtile</i>
	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i> ^b

^a origen fecal humano;

^b origen fecal animal

La flora intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones: (i) metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta; (ii) protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos, y (iii) tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular (Guarner y Malagelada, 2003; Collins y Gibson, 1999).

9.4. Características culturales y morfológicas.

Son bacilos de variada morfología, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no son esporulados y se tiñen irregularmente con azul de metileno. Son anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (De Vries y Stouthamer, 1969). Esos bacilos, con una pared externa irregular, son usualmente cóncavos y sus extremidades pueden adquirir diversas morfologías con extremos en forma de espátula. En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen.

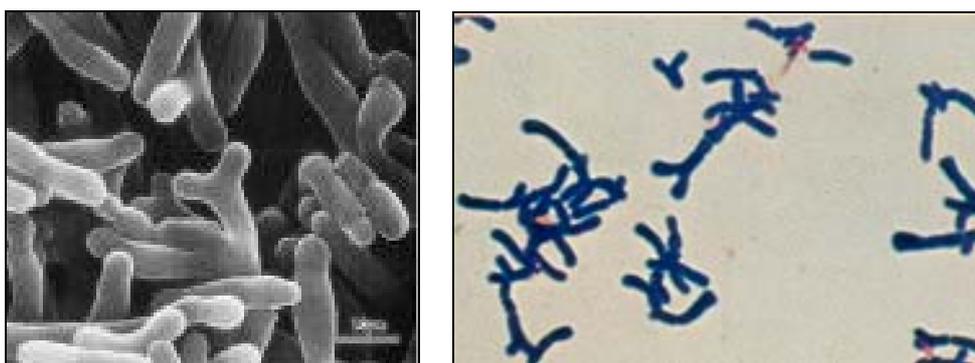


Figura 2. Morfología del género *Bifidobacterium*.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este

género no resisten bien temperaturas mayores de 46°C. Por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* muere a 60°C, (Rasic y Kurmann, 1983).

El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6.5-7 y a pHs menores o iguales el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. No existe crecimiento a pH menor de 4.0 o mayor de 8.0 (Scardovi, 1986). La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero Scardovi (1986) distinguió dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género.

9.5. Características fisiológicas.

Sus exigencias nutritivas y la necesidad de una anaerobiosis estricta hacen que el cultivo de las bifidobacterias sea complicado, por ello en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo para la detección y crecimiento. Además las bifidobacterias también han sido encontradas en aguas fecales e incluso han llegado a multiplicarse en ellas, por ello, se pueden emplear como indicador de contaminación fecal de las aguas (Nebra *et al.*, 2003; Bonjoch *et al.*, 2004). Las bifidobacterias son anaerobias estrictas pero la sensibilidad al oxígeno varía entre especies (De Vries y Stouthamer, 1969). Las bifidobacterias excepto algunas especies de origen animal, son capaces de utilizar como única fuente de nitrógeno, las sales de amonio (Scardovi, 1986). Cuando crecen en ausencia de una fuente de nitrógeno orgánica, segregan grandes cantidades de aminoácidos tales como treonina, alanina, valina y ácido aspártico.

En cuanto a los medios de cultivo se distinguen dos tipos para el aislamiento, cultivo y caracterización de las bifidobacterias: medios no selectivos y medios selectivos.

Medios no selectivos: Estos medios suelen estar constituidos por diversas sustancias tales como extracto de carne, peptonas, extracto de levadura, zumo de tomate, sangre de caballo, leche... que permiten el crecimiento de muchas especies de bifidobacterias. Estos medios pueden ser adicionados con sustancias con bajo potencial redox, como puede ser la cisteína, cistina, ácido ascórbico, sulfato de sodio, etc. Existe un amplio abanico de medios de cultivo, desarrollados en su mayoría en estos últimos años. Destacar el medio **TPY** (Tryptona, Peptona y extracto de levadura), fue descrito inicialmente por Scardovi (1986), como el más adecuado para el aislamiento y cultivo de las bifidobacterias de cualquiera que fuese su origen, ya que todas crecen bien en él. Sin embargo, su riqueza y su falta de selectividad hacen que también aparezcan profusamente lactobacilos, estreptococos y otras bacterias afines. Para conseguir un medio más selectivo, Samona y Robinson (1991) propusieron la adición de mezclas inhibitoras como 3 g/l de cloruro de litio con 0,1 g/l de sulfato de neomicina y con 15 mg/l de ácido nalidíxico, que se añaden al medio en forma de solución, esterilizada por filtración.

Tabla 10. Medios no selectivos más empleados para el cultivo de las bifidobacterias (Adaptado de Prokaryotes 3ed.).

Man, Rogosa y Sharp (MRS)	Man <i>et al.</i> , 1960
Agar jugo de tomate	
Reinforced Clostridial agar	Willis <i>et al.</i> , 1973
Briggs liver (BL)	Mitsuoka <i>et al.</i> , 1984
Columbia blood agar	comercial
Tryptona-Peptona-Extracto de Levadura (TPY) agar	Scardovi, 1986

Medios Selectivos: Los requerimientos físicos de las bifidobacterias son extremadamente variados, es difícil definir un medio selectivo apropiado para todas las especies. El reciente entusiasmo de la incorporación de las bifidobacterias a los productos lácteos fermentados ha favorecido la propuesta de medios selectivos para diferenciar el género *Bifidobacterium* de otros géneros que están relacionados con los productos lácteos y además para aislar las bifidobacterias del resto de flora intestinal. Inicialmente el ácido ascórbico y el sodio son empleados como sustancias selectivas.

Chang *et al.* (1983) modificó el MRS agar, el medio contenía cisteína y tinta china para aislar numerosas especies de bifidobacterias y Matteuzzi *et al.* (1983) sugirió la adición de 80 µg de kanamicina/ml. Sonoike *et al.* (1986) emplearon el principio de que las bifidobacterias son capaces de metabolizar carbohidratos tales como los fructo-oligosacáridos y galactosil-oligosacáridos. Treinta y dos especies de bifidobacterias han podido desarrollarse en este medio que contiene oligosacáridos *trans*-galactosilados como fuente de carbono.

Tabla 11. Medios selectivos empleados para el aislamiento de las bifidobacterias (modificado de Prokaryotes 3ed.).

RCA Reinforced Clostridial agar (pH 5,0)	Willis <i>et al.</i> , 1973
BSI (Panomomicina, neomicina, propionato sódico, cloruro de litio)	Mitsuoka <i>et al.</i> , 1965
NPLN (Panomomicina, neomicina, ácido nalidíxico, cloruro de litio)	Teraguchi <i>et al.</i> , 1978
Ácido nalidíxico, riboflavina, ácido pirúvico	Tanaka y Mutai, 1980
YN-6 (Ácido nalidíxico, neomicina y verde de bromocresol)	Resnick y Levin, 1981
TOS (Transgalacto-oligosacáridos agar)	Sonoike <i>et al.</i> , 1986
BIM-25 (a.nalidíxico, polimixina, kanamicina, ácido iodoacético, trifeniltetrazolio)	Munoa y Pares, 1988
Ácido propiónico pH 5,0	Beerens, 1990
Dicloxacilina	Sozzi <i>et al.</i> , 1990
X- α Gal	Chevalier <i>et al.</i> , 1991
LP (cloruro de litio y propionato sódico)	Lapierre <i>et al.</i> , 1992
mMRS	Arroyo <i>et al.</i> , 1994
RCA con azul Prussia	Ghoddusi y Robinson, 1996
Transgalacto-oligosacáridos y propionato sódico	Ji <i>et al.</i> , 1994
Sangre, glucosa agar con oxgall y gentamicina	Lim <i>et al.</i> , 1995
BFM	Nebra <i>et al.</i> , 1999
MRS-BCD (MRS con oxgall, cisteína y dicloxacilina)	Ingham, 1999
TPY con 50µg/ml mupirocina	Simpson <i>et al.</i> , 2004b

Munoa y Pares (1988) intentaron cuantificar *Bifidobacterium* de aguas mediante el medio *Bifidobacterium* Iodoacetato 25 (**BIM-25**), éste es un medio reforzado de clostridios (**RCM**) que contiene tres antibióticos (ácido nalidíxico, poliximina B, kanamicina), ácido iodoacético y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). El iodoacetato inhibe a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, reduciendo considerablemente el crecimiento de bacterias que no son

Bifidobacterium. El TTC hace posible la diferenciación entre *Bifidobacterium* y otras especies que no son bifidobacterias, ya que las bifidobacterias se desarrollan formando grandes colonias blancas. Mitsuoka (1989) empleó el propionato añadido al agar BL como uno de los agentes selectivos para el recuento de las bifidobacterias de origen intestinal. El medio **Agar BS** así obtenido no era satisfactorio para la detección de todas las especies de bifidobacterias. Beerens (1990 y 1991) propuso un medio selectivo que contiene 5 g/l de ácido propiónico como base del medio. El medio se ajusta a un pH de 5,0. Chevalier *et al.*, (1991), propusieron **X- α -Gal agar** en el que emplearon un sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido para enumerar bifidobacterias en productos lácteos. El medio MRS modificado (**mMRS**) fue descrito por Arroyo *et al.* (1994) consiste en MRS adicionado con cisteína y ácido clorhídrico. La cisteína es considerada como una fuente esencial de nitrógeno para las bifidobacterias (Shah, 1997 y 2000).

El medio **BFM** (Nebra *et al.*, 1999) está libre de antibióticos y emplea la lactulosa como fuente de carbono, además incluye azul de metileno, ácido propiónico (como agente selectivo) y cloruro de litio como inhibidores del crecimiento de otras bacterias. El bajo pH del BFM contribuye a inhibir el crecimiento de bacterias del género *Enterobacteriaceae*. Incluye también vitaminas, tales como tiamina y riboflavina.

9.6. Características bioquímicas

Las bifidobacterias difieren del resto de bacterias acidolácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. No producen CO₂ ni los ácidos butíricos y propiónico. En el género *Bifidobacterium*, las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato descrita por Scardovi y Trovatelli (1965). Las enzimas aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa están ausentes mientras que la fructosa-6-fosfato es la enzima característica del metabolismo de azúcares del género *Bifidobacterium*. (De Vries y Stouthamer, 1967). Generalmente son microorganismos catalasa negativos, no reducen los

nitratos y emplean amonio como fuente de nitrógeno. No licuan la gelatina, no fermentan el glicerol, no atacan las proteínas coaguladas y no forman indol. Producen la rápida y completa coagulación de la leche sin formación de gas. La fermentación de la glucosa, lactosa, levulosa, fructosa y galactosa está marcada por la acidificación de la leche. No producen ácidos a partir de rhamnosa, glicerol, eritriol, adonitol

Deguchi *et al.* (1985) se interesaron en la síntesis de vitaminas por las bifidobacterias de origen humano: tiamina (B1), riboflavina (B2), B6, ácido fólico (B9), B12 y ácido nicotínico. Cinco de esas vitaminas (con la excepción de la riboflavina) son sintetizadas por muchas especies y en gran cantidad, sobre todo B6, B9 y B12. Algunos autores sostienen que *B. bifidum* y *B. infantis* son muy buenos productores de vitaminas, mientras que *B. breve* y *B. longum* sintetizan pequeñas cantidades y *B. adolescentis* no sintetiza ninguna de esas vitaminas (B6, B9 y B12). La producción de vitaminas B2 y B6 por *B. longum* es elevada. *B. breve* y *B. infantis* se caracterizan por su elevado nivel de producción de ácido nicotínico y biotina, respectivamente.

9.7. Identificación del Género *Bifidobacterium*

9.7.1. Caracterización fenotípica

La identificación de las cepas bacterianas como *Bifidobacterium* es difícil, la morfología característica en forma de Y, V, T proporciona una pequeña ayuda en la identificación a nivel de género de un aislado, además también puede ser de gran ayuda para la identificación a nivel de especie ya que existen diferencias morfológicas entre ellas. Generalmente, las células del género *Bifidobacterium* tienen forma bacilar (2–5 µm) frecuentemente en forma de espátula, hueso o cuchara. Las formas en Y y V son frecuentes aunque pueden observarse formas regulares y/o cocoides dependiendo del medio de cultivo y de la especie. El déficit de ciertas sustancias están implicadas en la aparición de las ramificaciones, entre esos factores se encuentran los aminoazúcares como *N*-acetil-glucosamina y aminoácidos como la alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y serina. Las concentraciones en sales de sodio e iones de calcio también pueden influenciar en la aparición de ramificaciones. Una de las prácticas más usuales para la diferenciación

de las bifidobacterias es la propuesta por Holdeman *et al.*, (1977) que esta basada en la identificación mediante cromatografía de gases de los productos de fermentación principalmente ácido acético como producto final. La prueba más empleada para la identificación es el test de la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (F-6-PPK) que se encuentra presente en todas las especies de bifidobacterias. Además, una forma rápida y preliminar de identificación de las bifidobacterias puede ser realizada usando el enzima α -galactosidasa como marcador, este enzima no es detectado en cepas de *Lactobacillus* (Chevalier *et al.*, 1990) lo que puede ser de gran interés para identificar bifidobacterias aisladas de productos lácteos. Este test enzimático esta incluido en el sistema comercial API-ZYM (BioMerieux, Francia). Los perfiles de utilización de fuentes de carbono pueden ser de gran ayuda ya que existen perfiles determinados para cada especie. Existen sistemas miniaturizado comerciales como API ID32, API 50 CHL que puede ser de gran ayuda.

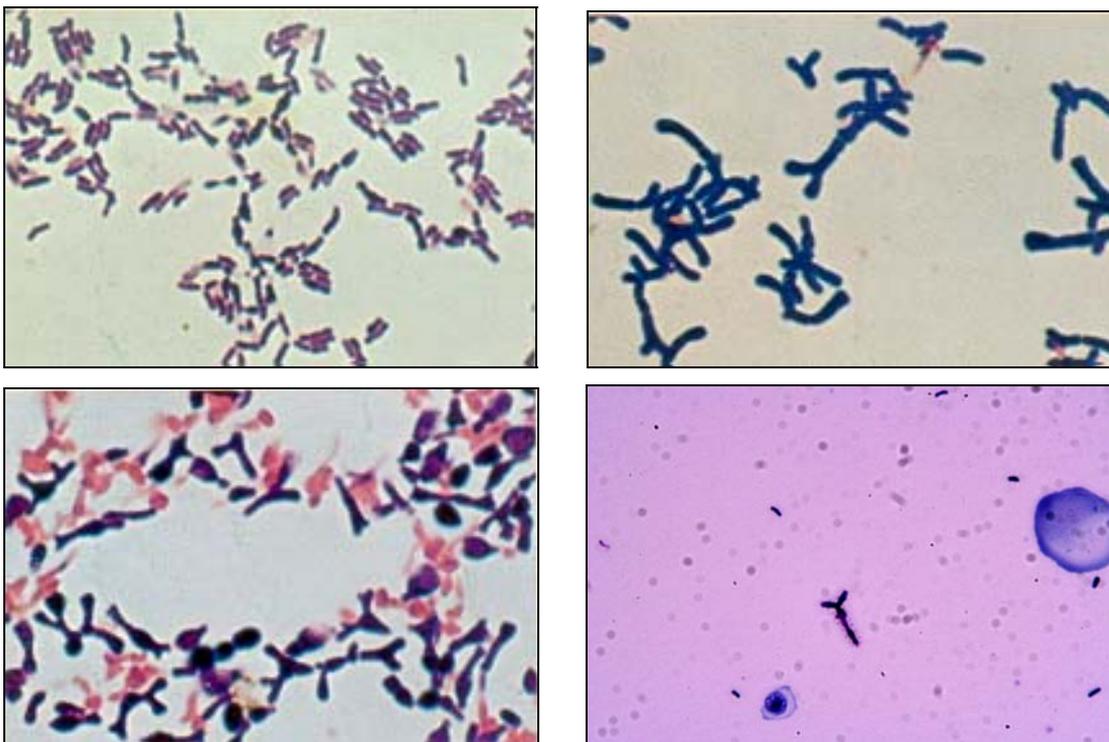


Figura 3. Morfología de distintas especies pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

Aunque la hibridación DNA-DNA es uno de los tests más específicos no suele emplearse de forma rutinaria en los laboratorios. La identificación de las bifidobacterias se realiza mediante test de fermentación, fundamentalmente de

carbohidratos. Tipo de estructura celular y/o perfiles de proteínas y enzimáticos isoenzima transaldolasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) podrían ser empleadas como caracteres adicionales para la distinción de cepas de bifidobacterias. En general, las pruebas empleadas para la identificación de bifidobacterias se presentan en la tabla 12, donde se observan el empleo de las técnicas genotípicas basadas en la PCR en detrimento de las fenotípicas.

Tabla 12. Técnicas empleadas para identificar las bifidobacterias a nivel de género, especie y cepa.

<p style="text-align: center;"><u>Identificación a nivel género</u></p> <p style="text-align: center;">Test de la Fructosa-6-fosfato fosfoetolasa Cromatografía (gas-liquido) de los productos de fermentación PCR específica de género</p> <p style="text-align: center;"><u>Identificación a nivel Especie</u></p> <p style="text-align: center;">Morfología celular Tests de fermentación, Test enzimáticos Perfiles de proteínas (SDS PAGE) Estructura de la pared celular Técnicas moleculares Hibridación <i>in situ</i> FISH</p> <p style="text-align: center;"><u>Identificación a nivel cepa</u></p> <p style="text-align: center;">Campo Pulsado (PFGE); Ribotipado; RAPDs</p>

9.7.2. Caracterización genotípica

9.7.2.1. Análisis filogenéticos

Existen principalmente dos métodos empleados para el análisis filogenético comparativo del género *Bifidobacterium.*, el análisis del gen RecA y el gen 16S del rRNA.

Análisis del gen Rec A.

Un fragmento del gen Rec A, que está presente en las bacterias y está muy conservado, es amplificado mediante la técnica de la PCR y posteriormente

secuenciado. Las relaciones filogenéticas obtenidas se corresponden bien con el análisis del gen completo del rRNA y proporciona con mayor rapidez y facilidad una herramienta muy valiosa para el análisis comparativo de los aislados humanos por su mayor rapidez y facilidad (Kullen *et al.*, 1997).

Análisis del gen 16S rRNA.

Empleando iniciadores universales de regiones conservadas a ambos lados del gen, se puede amplificar mediante PCR el gen 16S rRNA directamente de las colonias crecidas en placa. El amplificado (1.5 kb) se secuencia y se compara con otras secuencias recogidas en bases de datos. Esto permite una adecuada caracterización de aislados desconocidos y proporciona información sobre su posición filogenética. Esta técnica es de gran ayuda para entender las relaciones filogenéticas entre los géneros microbianos presentes en el intestino humano. El análisis del 16S rRNA ha sido una poderosa herramienta para discriminar entre los géneros *Gardnerella* y *Bifidobacterium*.

9.7.2.2. Herramientas moleculares para la detección e identificación de bifidobacterias

El elevado número de cepas que no pueden ser identificadas por técnicas fenotípicas y el tiempo requerido para el desarrollo de estas técnicas, han hecho necesaria la aparición de métodos moleculares para la identificación de bifidobacterias. La llegada de herramientas moleculares ha ampliado la capacidad de identificar cepas del género *Bifidobacterium* de una manera eficaz y fiable, y también ha permitido la evaluación las relaciones evolutivas entre aislados. Esta sección describe las diferentes técnicas moleculares que se han empleado para estudiar la ecología microbiana del tracto gastrointestinal y para analizar las cepas de bifidobacterias contenidas en productos lácteos y en las muestras medioambientales. Las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas más empleadas se describen en la tabla 13.

Tabla 13. Ventajas y desventajas de las técnicas moleculares empleadas para las bifidobacterias. (adaptado Ventura *et al.*, 2004)

TÉCNICAS	Identificación de especies	Identificación de cepa	Ventajas	Inconvenientes
PFGE	+	+	Alta reproducibilidad	Laborioso y lento en la obtención de resultados
RAPD	+	+	Análisis si conocimiento previo de la especie	Baja reproducibilidad
Ribotipado	+	+	Alta reproducibilidad	Muy laboriosa
ERIC-PCR	+	+	Sensible y específica	Dificultad de estandarización de la técnica
ARDRA	+	-	Manejo simultaneo de varios aislados	Requiere cultivo y aislamiento de las bacterias
Primers específicos de 16S	+	-	Identificación de microorganismos no cultivables	No discrimina especies muy cercanas
Dot blot hibridación	+	-	Cuantificación relativa sin cultivo microbiano	Requiere diseño de la sonda, validación, estandarización
Primers específicos de genes que codifican para proteínas	+	-	Adecuado marcador molecular para estudiar las relaciones filogenéticas entre grupos muy cercanos	Existen muy pocas secuencias disponibles
PCR-DGGE (TGGE)	+	-	Diversidad en el ensayo y gran capacidad de análisis comparativo	Dificultad para secuenciar los fragmentos generados
Microarrays	+	+	Análisis automatizado	Dificultad de estandarización de la técnica

i) Técnicas basadas en la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa ("Polimerase Chain Reaction" o PCR) es un procedimiento desarrollado a mediados de los años ochenta, que se basa

en el empleo de una DNA polimerasa dependiente y termoestable. La repetición de ciclos alternos de temperaturas para la desnaturalización, unión de oligonucleótidos y extensión de la cadena permite la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos flanqueada por secuencias homologas a cebadores sintéticos. (Saiki *et al.*, 1988). La ventaja de esta técnica para la detección de bacterias presentes en bajo número, es la capacidad de amplificar cantidades muy pequeñas de DNA (Song *et al.*, 1993; Giesendof *et al.*, 1992). Es posible amplificar un gen o una parte de un gen de un número limitado de células de la secuencia de DNA. La PCR puede ser empleada en combinación con otras técnicas con la ventaja de ser mucho más sensible que la hibridación. En la actualidad existen distintos métodos de tipado molecular basados en la PCR, pero se destacan aquellos que han sido empleados para la realización de este trabajo.

Análisis de Polimorfismos Amplificados (AFLPs). El análisis mediante AFLPs (Amplified-Fragment Length Polymorphism) está basado en la detección de polimorfismos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y puede ser empleado con cualquier muestra de DNA, independientemente de su origen o complejidad. Estos polimorfismos se detectan por la presencia o ausencia de fragmentos de restricción obtenidos con la digestión del DNA genómico y la posterior amplificación de los mismos mediante la técnica de la PCR.

Este método analiza el genoma bacteriano total y no requiere un conocimiento previo de la secuencia genómica de las muestras. Además, puede ser utilizado con cualquier muestra de DNA, independientemente de su origen y complejidad. Hay que destacar su gran facilidad de realización, su capacidad discriminatoria y su reproducibilidad, siempre y cuando las condiciones de digestión, ligado y amplificación de las muestras no varíen. Sin embargo, es muy sensible a la calidad del DNA de la muestra, pudiendo aparecer fragmentos de restricción diferentes derivados de una digestión parcial en caso de encontrarse el DNA genómico en mal estado. Esta técnica combina los principios del análisis de restricción con la elevada especificidad de la PCR y se ha empleado con bacterias acidolácticas (Nokuthula *et*

al., 2000), para *Lactobacillus delbrueckii* (Moschetti *et al.*, 1997), con estreptococos (Van Eldere *et al.*, 1999) y con bifidobacterias (Roy *et al.*, 1996).

Restricción del DNA amplificado mediante enzimas de restricción RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S rRNA Gene) y/o ARDRA, (Amplified Ribosomal DNA Restriction Análisis). Consiste en la amplificación por PCR de una secuencia conocida del DNA genómico, utilizando dos cebadores homólogos a sus regiones extremas, seguido de su digestión con una endonucleasa de restricción y la posterior comparación de los distintos patrones de bandas de restricción obtenidos.

Tiene como ventaja su elevada reproducibilidad inter e intra-laboratorio. Como desventajas cabe destacar la complicación de la metodología a seguir en el análisis, más dificultosa que la que se sigue con RAPD's y la obtención de una información restringida ya que únicamente se analiza una región determinada del genoma.

Esta técnica se ha empleado para la diferenciación entre las distintas especies del género *Lactobacillus* (Zhong *et al.*, 1998; Tynkkynen *et al.*, 1999). Kullen *et al.* (1997) empleó esta técnica para diferenciar bifidobacterias ingeridas de las autóctonas de cada individuo. Kok *et al.* (1996) desarrolló tres iniciadores específicos del 16S rRNA para la cepa LW 420, probablemente *B. animalis*, con el fin de monitorizar la presencia de esta cepa en el intestino humano. Se ha empleado esta técnica para discriminar entre especies del género *Bifidobacterium* (Roy y Sirois, 2000; Ventura *et al.*, 2001)

Amplificación de DNA mediante iniciadores aleatorios, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) o AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR). 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 DNA genómico total de distintas cepas, amplificando al azar regiones del DNA 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 DNA 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.

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 pueden 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 6 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 han empleado con éxito para diferenciar las subespecies de *Lactobacillus delbruekii* (*Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbruekii* subsp. *lactis*) (Torriani *et al.*, 1999) y otros lactobacilos (Ward y Timmins, 1999; Tynkkynen *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000 y Cusick *et al.*, 2000). Las variedades de *Streptococcus thermophilus* han sido diferenciados por RAPD's (Moschetti *et al.*, 1998). Esta técnica ha sido aplicada para caracterizar la variabilidad genética de bifidobacterias aisladas de ratas alimentadas con dietas específicas (Fanedl *et al.*, 1998). El género *Bifidobacterium* ha sido diferenciado por

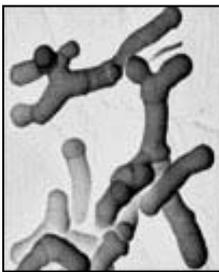
la técnica de RAPDs (Vincent y Roy, 1998 y Kullen *et al.*, 1997), usando cinco iniciadores que distinguen tres especies diferentes (*B. breve*, *B. bifidum* y *B. adolescentis*) en base a la similitud de los perfiles RAPDs obtenidos con cepas de referencia (Vincent *et al.*, 1998). Esta técnica también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

ii) Hibridación *in situ* FISH. La hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con moléculas fluorescentes es una técnica común para la detección e identificación de microorganismos de diferentes ambientes microbianos, incluyendo comunidades mixtas (Amann *et al.*, 1995). Las sondas nos permiten hibridar directamente sobre células fijadas en un portaobjetos, y la morfología celular bacteriana que ha hibridado puede ser observada bajo un microscopio de epifluorescencia.

Esta técnica, basada en la hibridación directa con una sonda complementaria de una región del 16S o 23S rRNA, es una excelente herramienta para la detección, ya que cada microorganismo posee un número elevado de copias de moléculas de rRNA a la que se puede unir una sonda, produciendo una amplificación de la señal. Este método presenta ventajas sobre la hibridación DNA y la detección con anticuerpos al no necesitar el cultivo previo de la bacteria ni la extracción de los ácidos nucleicos, además la hibridación inespecífica con otros microorganismos presentes en la muestras no es habitual. Mediante la técnica de FISH podemos obtener información que no ofrecen otros métodos, como son la morfología, el número y la distribución espacial de la bacteria en el medio en que se encuentra.

La mayor limitación de este método es la sensibilidad, que depende del número de ribosomas existentes, de la penetración de la sonda y de la matriz donde se hibride, ya que en muchos casos es necesario un tratamiento previo de la muestra. El medio empleado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla tienen influencia en la intensidad de la señal.

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 flora gastrointestinal.

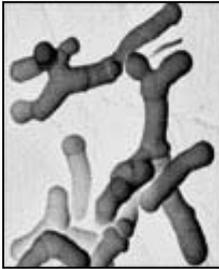


OBJETIVOS

En los últimos años ha aumentado el interés por los productos elaborados con microorganismos probióticos, siendo éstos mayoritariamente bacterias lácticas de origen intestinal humano pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, lo que ha dado lugar a la explotación comercial de algunas de estas bacterias y la aparición en el mercado de una gran variedad de productos. 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, que van más allá de la nutrición básica. Para que estos microorganismos probióticos ejerzan su efecto beneficioso sobre el huésped, han de encontrarse en proporciones elevadas en el y ser capaces de sobrevivir en suficiente cantidad al tránsito gastrointestinal para alcanzar su sitio, adherirse, implantarse y multiplicarse. Estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado que algunas cepas de bifidobacterias son capaces de sobrevivir a su paso a través del tracto gastrointestinal, pudiendo resistir en las condiciones ácidas del estómago (pH 2) durante 90 minutos. Sin embargo, han mostrado escasa viabilidad en los productos fermentados durante su almacenamiento en refrigeración. Por lo tanto, existen marcadas diferencias entre las cepas empleadas en cuanto a su habilidad para tolerar las sales y ácidos biliares, hecho que hace que su supervivencia y viabilidad sea un criterio de selección importante. Además, las exigencias del mercado y el desarrollo de nuevos productos probióticos obligan a la búsqueda de nuevas cepas probióticas que cumplan con los criterios establecidos por la FAO-OMS.

Por ello el trabajo aquí descrito se puede dividir en dos partes, una primera parte donde se realiza una investigación (aislamiento, identificación, caracterización y estudio de viabilidad) de las leches fermentadas con bifidobacterias comercializadas en el mercado español y una segunda parte donde se realiza una selección y estudio de cepas de origen humano en función de algunos de los criterios establecidos por la FAO con el fin de obtener cepas de origen humano con posible utilización como cepas probióticas como alternativa a las empleadas en la actualidad para la elaboración de productos lácteos. Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos de esta investigación son:

1. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales.
 - 1.1. Identificación la microflora de las diferentes variedades de yogur comercializadas en España, realizando recuentos totales de la población microbiana de los yogures para comprobar que cumplen con la normativa legal.
 - 1.2. Aislamiento, mediante el empleo de medios de cultivo selectivos, de los microorganismos existentes en los productos lácteos e identificación mediante pruebas bioquímicas e hibridación con sondas.(Tiras API 50CHL e Hibridación *In Situ*).
 - 1.3. Puesta a punto de diversos métodos de extracción de DNA y aplicación de técnicas moleculares (RAPDs, PCR, AFLPs, ARDRA...) para la caracterización genotípica de estos microorganismos.
2. Estudio de la supervivencia de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C.
3. Estudio *in vitro* de la viabilidad de las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de leches fermentadas comerciales frente a las condiciones de tránsito gastrointestinal.
4. Detección molecular de la especie *Bifidobacterium animalis/lactis* en heces humanas, Estudio *in vivo*.
5. Aislamiento, selección e identificación molecular de potenciales cepas probióticas de origen humano que pertenecen al género *Bifidobacterium*.
6. Detección y estudio de actividad antimicrobiana de cepas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*.
7. Estudio de adhesión a mucus intestinal humano de cepas de *Bifidobacterium* de origen humano, su papel en la exclusión y desplazamiento de patógenos.



CAPÍTULO 1

Aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) y las bifidobacterias son consideradas microorganismos probióticos por las propiedades beneficiosas demostradas por muchos estudios científicos sobre la salud de quien los consume, por ello están siendo empleadas ampliamente para la elaboración de leches fermentadas y otros productos lácteos. Los productos probióticos han de contener un elevado número de células viables, que han de permanecer viables a lo largo de la vida útil del producto y han de ser capaces de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal. Las bifidobacterias son habitantes habituales del tracto gastrointestinal y están presentes en nuestro intestino en cantidades variables durante nuestra vida, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. *Bifidobacterium* constituyen una de las especies predominantes en la microflora del colon, se encuentran presentes en elevado número, del orden de 10^8 - 10^{12} células por gramo de material del colon (Tannock, 1999).

El aumento en el empleo de estas cepas para la elaboración de productos lácteos requiere una correcta identificación de los microorganismos pertenecientes a este género. Los niveles mínimos de bifidobacterias que deben estar presentes en los productos probióticos se ha establecido en 10^6 UFC/ml (Samona y Robinson, 1994), sin embargo estos microorganismos probióticos muestran una disminución en su viabilidad en los productos lácteos, esta pérdida de viabilidad puede ser debida a numerosos factores tales como pH, acidez, oxígeno, presencia de otros microorganismos, sustancias inhibidoras de su crecimiento, etc. (Gueimonde *et al.*, 2004; Shah, 2000; Dave y Shah, 1997). Numerosos estudios han demostrado que los microorganismos señalados en el etiquetado no se corresponden con los detectados realmente en el producto (Temmerman *et al.*, 2003, Hamilton-Miller *et al.*, 1999). Sumándose a esto, es muy importante distinguir e identificar la diversidad de cepas probióticas contenidas en los productos comerciales y los métodos clásicos de identificación basados en sus características fenotípicas no proporcionan resultados claros, y en el caso de las bifidobacterias pueden cambiar su morfología celular y de colonia dependiendo del medio y las condiciones de cultivo (Scardovi, 1986). Los

métodos clásicos de identificación morfológica y bioquímica son tediosos y tienen muchas limitaciones, por ello, es necesario el desarrollo de métodos efectivos y rápidos para la identificación de los microorganismos probióticos de manera rutinaria. Una gran cantidad de métodos han sido empleados en la taxonomía del género *Bifidobacterium*. Los perfiles de fermentación de carbohidratos y enzimáticos proporcionan resultados ambiguos en la diferenciación entre especies (Chevalier *et al.*, 1990) por ello otros métodos basados en el análisis de DNA adquieren una gran relevancia. Diversas técnicas están siendo empleadas para la detección, identificación y clasificación de las bifidobacterias procedentes de diversas muestras tales como la hibridación DNA-DNA, ribotipado, técnicas basadas en la PCR, electroforesis desnaturalizante (DGGE) (Kokotovic y On, 1999; Mangin *et al.*, 1996; Charteris *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1998; Gueimonde *et al.*, 2004). Las bifidobacterias también han sido cuantificadas e identificadas mediante el uso del microscopio de fluorescencia mediante la técnica de hibridación *in situ* con sondas específicas de género marcadas con fluorescencia (Amann *et al.*, 1990; Franks *et al.*, 1998).

En la actualidad la comparación de las secuencias del 16S rRNA adquiere gran relevancia ya que es un método adecuado para la clasificación e identificación de especies bacterianas (Charteris *et al.*, 1997). El análisis de la secuencia del gen del 16S es una poderosa herramienta para determinar relaciones filogenéticas. La digestión de la amplificación generada por PCR del gen del 16S del rRNA se denomina ARDRA y diversos autores la han utilizado (Woese, 1987; Zoetendal *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2001; Ingrassia *et al.*, 2001).

La amplificación del DNA mediante iniciadores aleatorios no específicos (RAPD-PCR) es una técnica que permite la diferenciación bacteriana a nivel de especie y/o cepa y ha sido empleada para la clasificación de bacterias lácticas (Tynkkynen *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1998). Entre las ventajas de esta técnica destacan la facilidad de realización y la rapidez en la obtención de resultados, ya que no es necesario a priori conocer el género o especie del microorganismo a estudiar, como inconvenientes destacan problemas en reproducibilidad de los perfiles

obtenidos en distintos experimentos, este hecho compromete el poder discriminatorio de esta técnica (Gibson *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 1995).

La múltiplex PCR se emplea en el estudio de la ecología bifidobacteriana, es rápida y fácil de realizar y además con ella se obtienen resultados adecuados y repetitivos. Esta técnica identifica a nivel de especie por lo que se ha de combinar con otras técnicas de tipado para diferenciar a nivel de cepa.

Por todo lo anteriormente expuesto y dada la importancia de identificar las bifidobacterias empleadas en la elaboración de productos lácteos a nivel de género, especie y cepa, el objetivo de este trabajo es determinar el contenido en bifidobacterias de productos lácteos comerciales, la identificación y el tipado de los aislados empleando distintas técnicas moleculares (Múltiplex PCR, ARDRA, RAPDs, AFLP) que nos permitan alcanzar la discriminación a todos los niveles (género, especie y cepa) y así poder establecer relaciones entre los aislados. Del mismo modo, también se determina la cantidad de otras bacterias lácticas presentes en productos lácteos comerciales (lactobacilos y estreptococos), y se identifican y tipan los aislados de la misma forma que para las bifidobacterias. De este modo obtendremos un conocimiento completo de las cepas, pertenecientes a distintas especies y géneros microbianos, empleadas en la elaboración de productos lácteos comercializados en España.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas referencia y muestras lácteas analizadas

Un total de 34 muestras de productos lácteos comerciales fueron sometidas a estudio. Los tipos de productos analizados fueron 13 leches fermentadas con bifidobacterias (tipo yogur sólido), 4 leches fermentadas con lactobacilos (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) y 13 yogures tradicionales, dos quesos probióticos y dos yogures pasteurizados después de la fermentación. Además, se emplearon cepas de referencia tales como *Bifidobacterium infantis* (ATCC 15697), *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707) y *Bifidobacterium bifidum*

(ATCC 2952), *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* para la puesta a punto de las técnicas moleculares.

2.2. Recuento y Aislamiento de microorganismos

Las muestras lácteas (10 g) se diluyeron en agua de peptona tamponada (4%) (Sigma) y se homogenizaron en el Stomacher Mix 1 (Aes Laboratoire). A continuación, las muestras son diluidas serialmente en agua con tween 80 (4%). Los medios de cultivo empleados para el aislamiento y enumeración de las bacterias lácteas fueron: para las bifidobacterias el medio selectivo BFM agar (Nebra & Blanch, 1999) y el medio TPY agar (Tryptona, Peptona y Extracto de levadura; Scharlau Schemie) suplementado con una solución de antibióticos que contiene 0.1 g/l sulfato de neomicina (Panreac), 15 mg/ l de ácido nalidíxico (Panreac) y 3 g/ l de cloruro de litio (Panreac). El medio M-17 (Merck) fue empleado para la detección de los estreptococos. Se empleó el medio LS-Differential agar (Scharlau Schemie) para la enumeración total de todas las bacterias lácticas (*Lactobacillus* y *Streptococcus*) y las bifidobacterias (Nebra y Blanch, 1999). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 h bajo condiciones anaerobias obtenidas con los sobres de anaerobiosis AnaeroGen (Oxoid).

2.3. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas

Las colonias crecidas en los medios BFM agar, TPY agar, MRS agar, M-17 agar y LS-Differential agar fueron testadas mediante tinción Gram, prueba de la catalasa, apariencia de colonia, morfología celular y perfiles de fermentación de carbohidratos. El sistema de identificación API 50 CHL (BioMerieux, France) fue empleado para testar la acción de las cepas aisladas sobre 50 sustratos; este sistema fue empleado según instrucciones del fabricante, incubando la galería bajo condiciones anaerobias a 37°C durante 48-72 horas.

2.4. Identificación de los microorganismos mediante sondas específicas

Para la detección de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y la especie *Streptococcus thermophilus* se diseñaron sondas de las secuencias parciales del rRNA 16S y del 23S. Las sondas específicas son marcadas con un fluorocromo

(fluoresceína, color verde y/o rodamina, color rojo) para cada género de microorganismos clasificados e identificados según morfología y perfil de pruebas bioquímicas (lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias). La especificidad se comprobó teóricamente mediante el programa BLAST. Se empleó para bifidobacterias la sonda Bif662 (Langendijk *et al.*, 1997). Para lactobacilos y estreptococos contenidos en productos lácteos se diseñaron sondas correspondientes al 16S y al 23S respectivamente.

1	ccaccgttacaccgggaa 18	BIF662
660	ccaccgttacaccgggaa 643	<i>Bifidobacterium</i> spp.

3	catgccttcgcttacgctaa 22	STH23
1883	catgccttcgcttacgctaa 1864	<i>S.thermophilus</i> 23S rRNA

1	gactcttcggggtgattt 18	Ldel16
83	gactcttcggggtgattt 100	<i>L.delbrueckii</i> 16S rRNA

Las muestras diluidas se fijan con paraformaldehído (PFA 4%) durante 1 hora a 4°C, con el fin de mantener intactos los microorganismos de las muestras. Se depositan 10 µl de la muestra fijada en los pocillos del portaobjetos de hibridación y se deja secar. Para permeabilizar la membrana celular, las muestras son sometidas a deshidrataciones sucesivas en etanol (50, 80 y 100%). Posteriormente se hibrida con la sonda específica diluida en el tampón de hibridación para cada y se mantiene en oscuridad y atmósfera húmeda a 46°C durante 90 minutos siguiendo la metodología de Langjedik *et al.*, 1997. A continuación se procede a la eliminación del resto de sonda no hibridada, esta operación se realiza con el tampón de lavado a 48°C durante 20 minutos. La muestra se deja secar en oscuridad y se observa al microscopio de fluorescencia, empleando para cada fluorocromo el filtro adecuado.

2.5. Aislamiento del DNA genómico

Para el aislamiento del DNA genómico bacteriano de las cepas se emplearon los procedimientos descritos por Wilson (1987) con el uso de CTAB (Bromuro cetil trimetil amonio).

Células de 24 h se resuspenden en 500 µl de tampón de TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM) y se adicionan 20 µl de una solución de lisozima (50 mg/ml), y se incuban a 37°C durante una hora y media. Tras incubación se adicionan 30 µl de SDS (dodecil sulfato sódico 10%) y 3 µl de una solución de proteinasa K (10 mg/ml) y se incuban 1 h. A continuación, se añaden 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de una solución CTAB-NaCl (ver anexo), se mezcla bien y se incuban a 65°C durante 10 min. La purificación del DNA se realiza mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Los ácidos nucleicos se precipitan con isopropanol frío y se lavan con etanol frío al 70%, se seca a vacío y se resuspende en 50 µl de tampón TE y se conserva a -20°C. La concentración de DNA se determina a 230, 260 y 280 nm, y la integridad fue testada en gel de electroforesis al 1% (peso/vol) NuSieve agarosa (FMC Bioproducts, Denmark).

2.6. PCR específicas

Los iniciadores empleados para las técnicas moleculares se detallan a continuación:

Nombre	Secuencia	Gen	Amplificado	Referencia
Lm26	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG	16S rRNA	1350 pb	Kaufmann <i>et al.</i> (1997)
Lm3	CGG GTG CGT GCC CAC TTT CAT G			
Lm3r	CGG GGT GCT GCC CAC TTT CAT G			
B.bif	GCT TGT TGG GTG AGG TAA CGG CT	<i>B. bifidum</i>	1180 pb	
B.bre	AGG GAG CAA GGC ACT TTG TGT	<i>B. breve</i>	991 pb	Dong <i>et al.</i> ,(2000)
B.inf	CTG TTA CTG ACG CTG AGG AGC T	<i>B. infantis</i>	723 pb	
B.adol	GTG GGG ACC ATT CCA CGG TC	<i>B. adolescentis</i>	628 pb	
B.lon	TCC CGA CGG TCG TAG AGA TAC	<i>B. longum</i>	467 pb	
Bflact2	GTG GAG ACA CGG TTT CCC	<i>B. lactis</i>	680 pb	Ventura <i>et al.</i> (2001)
Bflact5	CAC ACC ACA CAA TCC AAT AC			
Lm3	CGG GTG CGT GCC CAC TTT CAT G	<i>Bifidobacterium</i>	1400 pb	Ventura <i>et al.</i> (2001)
P0	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG			
L.del 1	AAT TCC GTC AAC TCC TCA TC	<i>L. delbrueckii</i>	715 pb	Lick <i>et al.</i> (2001)
Ldel 2	TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA			
16S 1a	ATT ACA TGC AAG TCG AAC GA	16S rRNA	1004 pb	Marshall <i>et al.</i> (1999)
16S 1b	TTA ACC CAA CAT CTC ACG AC	universal		
RapdBif	AGT CAG CCA C	RAPDs	-	Tynkkynen <i>et al.</i> (1999)

2.6.1. Género *Bifidobacterium*

Un fragmento específico del gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* de fue amplificado mediante el uso de los iniciadores *Lm26* y *Lm3* (Kaufmann *et al.*, 1997). Estos iniciadores se han empleado para identificar todas las especies de bifidobacterias incluidas en el género y distinguirlas de otros géneros bacterianos. La amplificación de este fragmento específico se realizó para un volumen de 50 µl con las condiciones siguientes:

Taq- DNA polimerasa	2 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	300 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	1.5 mM
Iniciadores <i>Lm3</i> y <i>Lm26</i>	1 µM
DNA muestra	200 ng

La amplificación se realizó con los siguientes ciclos de temperaturas: 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 58°C durante 3 min, y 72°C durante 1 min; y un ciclo de extensión final de 72°C durante 4 min. Los fragmentos amplificados se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (peso/vol) en tampón TAE y visualizadas bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

2.6.2. Múltiplex PCR para las especies del género *Bifidobacterium*

Mediante el uso de los iniciadores descritos por Dong *et al.*, (2000) para *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentes*, *B. longum*, se realizó la múltiplex PCR para detectar e identificar las distintas especies de bifidobacterias. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl con los componentes que se muestran en el cuadro.

La amplificación se realizó con los siguientes ciclos de temperaturas: 1 ciclo a 95°C durante 5 min; 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 65°C durante 30 s, y 72°C

durante 2 min; y un ciclo de extensión final de 72°C durante 5 min. Los fragmentos amplificados se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (peso/vol) en tampón TAE y visualizadas bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Taq- DNA polimerasa	5,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	300 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	2.5 mM
Iniciadores	0,8 µM
DNA muestra	5 µl

2.6.3. *Múltiplex PCR Bifidobacterium lactis/animalis*

Mediante el uso de los iniciadores Bflact2-Bflact5 se obtuvo, tras la amplificación del DNA, un fragmento de 680 pb únicamente para DNA de *Bifidobacterium lactis* (Ventura *et al.*, 2001), mientras que no se detectó ningún fragmento para otras especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. El empleo de los iniciadores Lm3 amplificó un fragmento de 1400 pb específica del género *Bifidobacterium*. La amplificación se realizó en un volumen de 50 µl con los reactivos:

Taq- DNA polimerasa	2,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	1.5 mM
Iniciador Lm3 y P0	10 pM
Iniciador Bflact 1 y Bflact 2	50 pM
DNA muestra	25 ng

La amplificación se realizó con los siguientes ciclos de temperaturas: 1 ciclo a 95°C durante 5 min; 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 61°C durante 1 min, y 72°C durante 4 min; y un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 min. Los fragmentos amplificados se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (w/v) en tampón TAE y visualizadas bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

2.6.4. PCR específica para la especie *Lactobacillus delbrueckii*

Se emplearon los iniciadores específicos para *Lactobacillus delbrueckii* para identificar mediante PCR aquellas cepas que según las pruebas bioquímicas se habían identificado como lactobacilos, se emplearon los iniciadores L.del 1 y Ldel 2 específico de la especie *Lactobacillus delbrueckii* según la metodología empleada por Lick *et al.*, (2001). Las condiciones de la PCR se citan a continuación:

Taq- DNA polimerasa	1,0 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	1.5 mM
Iniciadores	0,5 mM
DNA muestra	5 µl

Las condiciones de amplificación son un primer paso que consta de 10 ciclos de 92°C durante 20 s, 65°C durante 75 s, y 72°C durante 40 s; seguido de 35 ciclos de 90°C durante 20 s, 55°C durante 1 min, y 72°C durante 30 s. Finalizando con una extensión a 72°C durante 3 min.

2.7. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

2.7.1. ARDRA géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*

Se amplificaron 1004 pb del gen del 16 S del rRNA con el empleo de unos iniciadores generales para este gen 16S 1a y 16S 1b descritos por Marshall *et al.*

(1999). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl donde se añadieron los reactivos que se citan a continuación:

Taq- DNA polimerasa	2,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	1.5 mM
Iniciador	1,5 µM
DNA muestra	5 µl

Las condiciones de amplificación son un primer paso que consta de 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 52°C durante 30 s de unión de iniciadores, y 72°C durante 90 s. Finalizando con un ciclo de extensión 72°C durante 10 min.

DNA amplificado digeridos con 10 U de las enzimas de restricción *DdeI*, *HpaII*, *HaeIII*, *HindI*, *HindIII*, *MwoI*, *MboII* (Fermentas) en un volumen final de 20 µl a 37°C durante toda la noche y *AcsI*, *TaqI*, y *BstII* a 60-65°C durante 3 h. La digestión se visualizó bajo luz UV en un gel de electroforesis al 3% de agarosa en tampón TAE tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

2.7.2. ARDRA género *Bifidobacterium*

Un fragmento específico del gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* de 1.35 kb fue amplificado mediante el uso de los iniciadores o primers *Lm26* and *Lm3* (Kaufmann *et al.*, 1997). La amplificación del fragmento específico se realizó para un volumen de 50 µl con las condiciones que se especifican en el apartado 2.4. para el género *Bifidobacterium*.

DNA amplificado fue digerido con 10 U de las enzimas de restricción *DdeI*, *Hinfi*, *EcoRI*, *HpaII*, *MboI*, *BamHI* (Fermentas) en un volumen final de 20 µl a 37°C durante toda la noche. La digestión se visualizó en un gel de electroforesis al

3% de agarosa en tampón TAE tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualización bajo luz UV.

2.8. RAPDs (Amplificación del DNA mediante iniciadores aleatorios)

Se emplea como técnica de caracterización molecular que abarca todo el DNA bacteriano, obteniéndose de este modo una diferenciación más intraespecífica, es decir, se diferencia entre cepas. El iniciador empleado fue 5' - AGT CAG CCA C-3' (Tynkkynen *et al.*, 1999). La reacción de amplificación se llevará a cabo en un volumen total de 50 µl que contiene:

Taq- DNA polimerasa	2,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	1.5 mM
Iniciador	1,5 µM
DNA muestra	5 µl

La reacción de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, a continuación 35 ciclos de amplificación que consisten en 94°C durante 1 min, 32°C durante 2 min y 72°C durante 2 min, finalizando con un ciclo de extensión final de 72°C durante 2 min. Para comprobar la amplificación se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0,6% (agarosa MS-12, HispanLab) a 100 voltios durante 1,5 horas. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

2.9. AFLPs (amplificación de los polimorfismos generados)

El procedimiento empleado es el descrito por Gibson *et al.* (1998). Se toman 10 µg del DNA genómico y se digiere toda la noche a 37°C con 20 U del enzima de

restricción *Hind*III (New England BioLabs, UK) y 5 mM de espermidina (Sigma) en un volumen final de 20 µl.

Una alícuota de 2.5 µg de los fragmentos de restricción fueron ligados con los adaptadores ADH1 (5'- ACG GTA TGC GAC AG -3') y ADH2 (5'- AGC TCT GTC GCA TAC CGT GAG -3') en un volumen de reacción de 20 µl durante 3-4 h a 37°C. La mezcla de ligación consiste en 2.5 µl de DNA digerido, 0.2 µg de cada adaptador, y 1 U de T4 DNA ligasa (New England BioLabs, UK) en tampón para la ligasa. Antes de la reacción de PCR, el DNA ligado se diluye y se calienta a 80°C durante 10 min para inactivar la enzima T4 ligasa. La reacción de PCR para 50 µl contiene:

Taq- DNA polimerasa	1,5 U
Tampón Buffer (10 x)	5 µl
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	200 µM
Cloruro de Magnesio (Cl ₂ Mg)	2.5 mM
Iniciador HIG(5'- GGT ATG CGA ACA GAG CTT G -3')	200 ng
DNA muestra	5 µl

La reacción de amplificación consiste en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 33 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 1 min, unión de iniciador a 60°C durante 1 min y una extensión de 72°C durante 2 min. Los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 2,5% (peso/vol) en tampón TAE y visualizados bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

2.10. Análisis de los datos

Los perfiles obtenidos con las técnicas de ARDRA, RAPDs y AFLPs fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se registrados en un soporte informático. A continuación las bandas se analizan con el programa informático TDI-Lane Manager. La comparación entre microorganismos se realiza mediante el coeficiente de similitud de Dice (S_D), definido como:

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

a = número de bandas comunes para ambas cepas.

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

El coeficiente de similitud de Dice se utiliza 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 para cada combinación de parejas de microorganismos. Aplicando el algoritmo matemático UPGMA (Unweighted-Pair Group Meted with Average linkage) los microorganismos son agrupados en base a la similitud de sus perfiles de bandas y se construye el dendrograma.

3. RESULTADOS

3.1. Cepas referencia y muestras lácteas analizadas

Las pruebas se realizaron por duplicado a 37°C y 42°C no observándose diferencias significativas en cuanto al crecimiento de los microorganismos (lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias). Tras estos resultados se optó por la temperatura de 37°C en la que se pudo observar un mayor crecimiento microbiano de todas las especies incluidas en este estudio. Los microorganismos se desarrollaron en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen de Oxoid) con un tiempo óptimo de incubación entre 72 y 96 horas, tras los que se realiza la lectura de recuento en placa. Para el aislamiento mediante triple estría el tiempo de incubación se redujo a 48 h, a excepción de las bifidobacterias que necesitaron 72 h. Los microorganismos identificados morfológicamente se incubaron durante 24 horas a 37°C para su crecimiento en masa y su posterior identificación bioquímica mediante la tira API-50 CHL.

En el medio de MRS (Fig. 1) la mayoría de las colonias que aparecen son grandes, blancas, con bordes bien definidos. Éstas se corresponden con el género

Lactobacillus; este medio pierde selectividad tras variaciones en el pH. En el medio LS-Diferencial (Fig. 2) *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 formando colonias ovales o redondas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro como máximo con un pequeño halo claro a su alrededor. También pueden crecer bifidobacterias (Nebra *et al.*, 1999).



Figura 1. Medio MRS

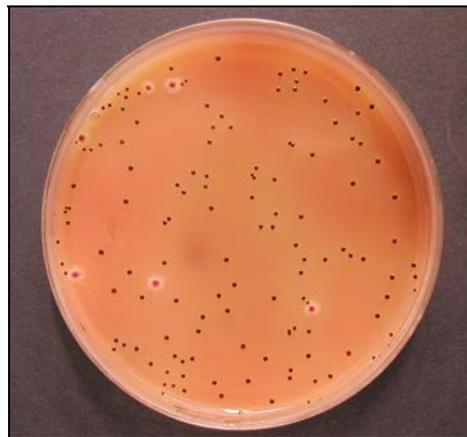


Figura 2. Medio LS-Diferencial.



Figura 3. Medio TPY.

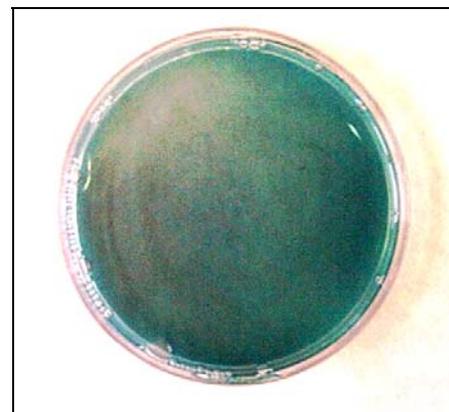


Figura 4. Medio BFM.



Figura 5. Medio M-17.

En el medio TPY (Fig. 3) se observó crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, pero, al adicionar 3 g/l de cloruro de litio, 0,1 g/l de sulfato de neomicina y 15 mg/l de ácido nalidíxico al medio, éste fue selectivo para las bacterias del género *Bifidobacterium* (Samona *et al.*, 1991). El medio BFM (Fig. 4) se empleó para el aislamiento de bifidobacterias, que aparecen formando pequeñas colonias de color blanquecino o semi-transparentes, claramente diferenciables gracias al color azul del medio. En el medio M-17 (Fig. 5) las colonias son color crema y se corresponden con género *Streptococcus*. El mejor medio selectivo para el crecimiento de las cepas de *Bifidobacterium* fue el medio BFM agar (Nebra *et al.*, 1999). El crecimiento de otros géneros en BFM agar ha sido estudiado por Lynch *et al.* 2002, y en este medio únicamente crecen bifidobacteria.

El contenido de bifidobacterias y otras bacterias lácticas como *Lactobacillus* y *Streptococcus* contenidas en los productos lácteos analizados se muestra en la tabla 1. Para obtener la media de los microorganismos del género *Lactobacillus* se emplearon los medios agar MRS con pH apropiado (pH 5,4) para aumentar su selectividad y LS-Diferencial. Para los microorganismos del género *Streptococcus* se usaron los medios agar M-17 y LS-Diferencial, para las bifidobacterias se empleó fundamentalmente el medio BFM, aunque también se tuvo en cuenta el medio LS-Diferencial. Todos los productos lácteos cumplen la normativa legal vigente pues contienen más de 10^7 microorganismos vivos por gramo, capaces de mantener todas sus características durante la vigencia legal del producto (24 días). Todas las muestras varían entre 10^8 - 10^9 células/ml. En las leches fermentadas con bifidobacterias los porcentajes de aislamiento se encuentran entre 6-10% para el género *Bifidobacterium* (BFM agar), 70-90% corresponde al género *Streptococcus* (M-17) y entre 5-10% a *Lactobacillus* (MRS). Existe una gran variabilidad en el contenido en bifidobacterias en los productos analizados; el bajo número de bifidobacterias en algunos productos podría limitar su efecto probiótico. Los productos con adición de otros microorganismos (*L. casei*, *L. acidophilus*, etc.) son muy semejantes entre sí, poseen un número de bacterias similar.

Tabla 1. Microbiota contenida en los productos lácteos analizados.

	TIPO DE MUESTRA	RECUESTO TOTAL	Lactobacilos (UFC/ml)	Estreptococos (UFC/ml)	Bifidobacterias (UFC/ml)
BIO 1	Leche fermentada	9,20 x 10 ⁸	1,21 x 10 ⁷	7,04 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁶
BIO 2	Leche fermentada	1,80 x 10 ⁸	3,10 x 10 ⁷	1,40 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁵
BIO 3	Leche fermentada	8,50 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁶	1,92 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁴
BIO 4	Leche fermentada	3,20 x 10 ⁸	4,40 x 10 ⁷	2,50 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁷
BIO 5	Leche fermentada	3,00 x 10 ⁸	8,00 x 10 ⁶	2,20 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁴
BIO 6	Leche fermentada	2,50 x 10 ⁸	2,15 x 10 ⁷	1,70 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁶
BIO 7	Leche fermentada	9,70 x 10 ⁸	2,40 x 10 ⁷	7,30 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸
BIO 8	Leche fermentada	3,60 x 10 ⁷	3,00 x 10 ⁷	4,00 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁷
BIO 9	Leche fermentada	2,30 x 10 ⁸	7,00 x 10 ⁷	2,30 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁷
BIO 10	Leche fermentada	1,00 x 10 ⁹	5,80 x 10 ⁸	6,00 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁶
BIO 11	Leche fermentada	1,90 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁷	1,20 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁷
BIO 12	Leche fermentada	9,00 x 10 ⁸	4,10 x 10 ⁷	7,80 x 10 ⁸	7,1 x 10 ⁶
BIO 13	Leche fermentada	3,00 x 10 ⁸	1,60 x 10 ⁶	1,90 x 10 ⁸	8,2 x 10 ⁶
YOGUR 1	Yogur Natural	1,30 x 10 ⁸	2,01 x 10 ⁷	1,30 x 10 ⁸	-
YOGUR 2	Yogur Natural	3,05 x 10 ⁸	8,30 x 10 ⁸	3,05 x 10 ⁸	-
YOGUR 3	Yogur Natural	4,00 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁸	-
YOGUR 4	Yogur Natural	4,50 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁷	4,20 x 10 ⁸	-
YOGUR 5	Yogur Natural	5,00 x 10 ⁸	3,50 x 10 ⁷	4,70 x 10 ⁸	-
YOGUR 6	Yogur Natural	6,10 x 10 ⁸	5,60 x 10 ⁸	5,50 x 10 ⁸	-
YOGUR 7	Yogur Natural	5,90 x 10 ⁸	4,00 x 10 ⁷	5,50 x 10 ⁸	-
YOGUR 8	Yogur Natural	8,30 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁷	8,00 x 10 ⁸	-
YOGUR 9	Yogur Natural	1,20 x 10 ⁹	4,50 x 10 ⁷	1,10 x 10 ⁹	-
YOGUR 10	Yogur Natural	8,80 x 10 ⁸	4,00 x 10 ⁶	8,80 x 10 ⁸	-
YOGUR 11	Yogur Natural	1,00 x 10 ⁹	2,10 x 10 ⁸	7,90 x 10 ⁸	-
YOGUR 12	Yogur Natural	8,70 x 10 ⁸	4,00 x 10 ⁷	8,30 x 10 ⁸	-
YOGUR 13	Yogur Natural	4,00 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁸	-
YOGUR PR. 1	Yogur Líquido	4,45 x 10 ⁸	3,50 x 10 ⁸	4,45 x 10 ⁸	-
YOGUR PR. 2	Yogur Líquido	1,04 x 10 ⁸	7,03 x 10 ⁷	5,04 x 10 ⁷	-
YOGUR PR. 3	Yogur Líquido	2,50 x 10 ⁸	8,00 x 10 ⁷	1,10 x 10 ⁸	-
YOGUR PR. 4	Yogur Líquido	3,50 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁸	2,55 x 10 ⁸	-
QUESO	Queso	3,60 x 10 ⁷	3,00 x 10 ⁷	4,00 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶
QUESO	Queso	2,30 x 10 ⁸	7,00 x 10 ⁷	2,30 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁶

En los productos pasteurizados después de la fermentación no se observó ningún crecimiento después del período de incubación de las placas, con ello

podemos afirmar que en este tipo de productos no poseen microorganismos viables, con ello exista la posibilidad de que algún microorganismo viable pueda reproducirse en la matriz del producto por contaminación externa o por problemas en el proceso tecnológico. Los resultados obtenidos de los recuentos en placa de las leches fermentadas con bifidobacterias se muestran en la Tabla 2.

En general, para todos los productos se observa que los estreptococos predominan en la matriz, a excepción de los productos líquidos adicionados microorganismos (YOGUR PR. 1, 2, 3 y 4) en los que los lactobacilos y estreptococos se encuentran en la misma proporción. En leches fermentadas con bifidobacterias no existe una normativa que regule la cantidad de bacterias del género *Bifidobacterium* que deben contener, aunque el Codex Alimentarius recomienda que la cantidad de bifidobacterias ha de ser del orden de 10^7 bifidobacterias por g o ml.

Tabla 2. Recuentos obtenidos de las leches fermentadas con bifidobacterias.

PRODUCTO	LS log UFC/ ml	BFM log UFC/ ml	MRS log UFC/ ml	M-17 log UFC/ ml
B1	9.05 ± 0.2	6.18 ± 0.1	8.11 ± 0.5	8.86 ± 0.3
B2	9.03 ± 1.0	5.00 ± 0.5	6.00 ± 0.5	8.28 ± 1.2
B3	8.95 ± 0.5	4.54 ± 0.6	7.33 ± 0.8	8.23 ± 1.0
B4	9.02 ± 0.3	7.00 ± 0.4	7.49 ± 0.4	8.15 ± 0.2
B5	8.77 ± 0.2	4.90 ± 0.6	6.90 ± 0.1	8.34 ± 0.3
B6	8.92 ± 0.2	6.56 ± 0.8	7.64 ± 0.6	8.40 ± 0.6
B7	9.31 ± 0.1	8.00 ± 0.1	7.18 ± 0.3	8.81 ± 0.5
B8	9.00 ± 0.5	7.46 ± 1.0	7.36 ± 0.4	8.83 ± 0.5
B9	9.00 ± 0.8	7.32 ± 0.9	6.83 ± 0.8	8.18 ± 0.6
B10	8.95 ± 0.4	7.82 ± 0.6	6.52 ± 0.1	8.40 ± 0.3
B11	8.00 ± 0.2	7.53 ± 0.7	6.30 ± 0.2	7.98 ± 0.1
B12	9.07 ± 0.6	7.71 ± 0.5	7.30 ± 0.3	8.48 ± 0.5
B13	9.30 ± 0.1	7.72 ± 0.8	7.51 ± 0.2	8.05 ± 0.2

Los productos que contienen bifidobacterias en un mayor número fueron las leches fermentadas BIO 1 con 1×10^8 UFC/ml, BIO 4, BIO 8 con 1×10^7 UFC/ml respectivamente, BIO 9 con 1.5×10^7 UFC y BIO 11 con 3.2×10^7 UFC/ml. El resto de productos analizados presentan unos niveles de bifidobacterias entre $<1 \times 10^7$ UFC/ml y 3.5×10^4 UFC/ml. La cantidad de microorganismos del género *Bifidobacterium* es muy dispar en los diversos productos lácteos analizados.

3.2. Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas

El *kit* comercial API 50 CHL no fue válido para la diferenciación entre distintas cepas de bifidobacterias. Las cepas analizadas presentaron diferentes perfiles en la fermentación de carbohidratos a diferentes tiempos. Esto dificulta la identificación de cepas y refuerza la necesidad de desarrollar técnicas moleculares que permitan la diferenciación clara entre cepas.

Ya que los sistemas bioquímicos no son aplicables a bacterias del género *Bifidobacterium*, éstas se identificaron usando la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes para el gen 16S, tal y como describió Langendijk *et al.*, 1995. Los resultados de FISH fueron adecuados para la identificación de bifidobacterias; todas las cepas aisladas del medio BFM presentaron una señal cuando se hibridaron con esta sonda (Franks *et al.*, 1998).

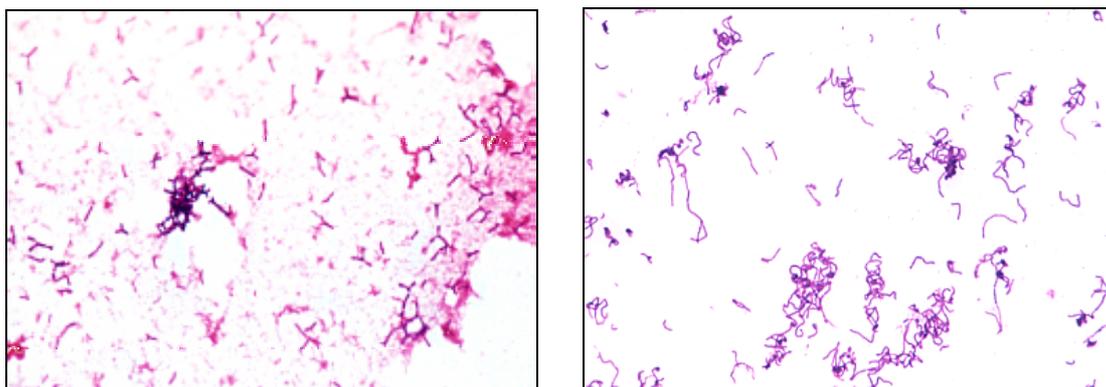


Figura 6. Morfología de Bifidobacterias y Lactobacilos con tinción Gram.

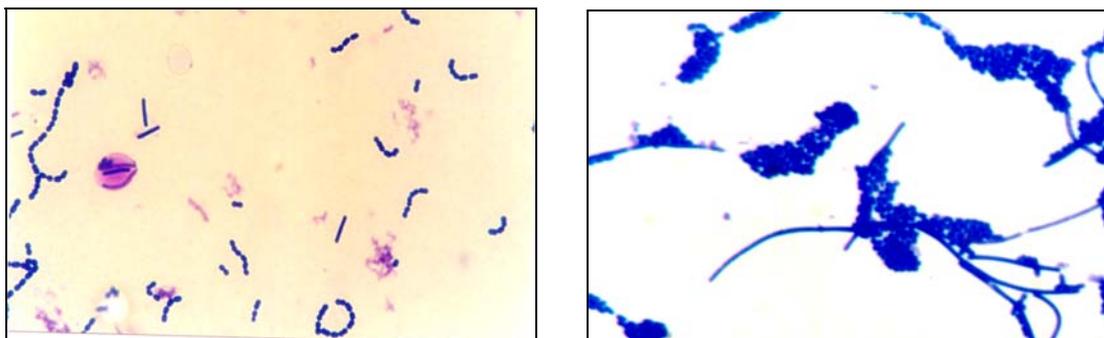


Figura 7. Lactobacilos y estreptococos, en tinción simple y en tinción Gram, respectivamente.

Las bacterias aisladas en función de su morfología se siembran en su medio selectivo correspondiente (MRS, M-17, BFM) con el método de triple estría para la obtención de colonias aisladas, con las que se realizaran las identificaciones bioquímicas mediante el sistema API-50 CHL y las correspondientes pruebas moleculares. El sistema API-50 CHL realiza un estudio de fermentación de los 49 azúcares que posee la galería. El microorganismo a estudiar se inocula en cada microtubo de la galería. A continuación se incubó a 37°C, realizando 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 constituyen el perfil bioquímico de la cepa y se utilizan para su identificación.

La mayoría de los lactobacilos fueron identificados correctamente a nivel de especie como *L. delbrueckii*, mientras que a nivel de subespecie encontramos numerosas diferencias debido a las cuales únicamente se ha diferenciado a nivel de especie. 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 provoca grandes variaciones en la identificación del microorganismo. De cualquier forma no se tuvo en cuenta la subespecie se identificaron los microorganismos a nivel de especie. En el caso de *L. casei* y *L. rhamnosus* no hubo ningún problema en su identificación, ya que por las características de las colonias y por su morfología, observada al microscopio mediante tinciones simples y Gram, quedaron claramente identificadas. En la tira API, *L. casei* subsp. *rhamnosus* aparece como *Lactobacillus rhamnonus*, nombre

reconocido también actualmente (Collins *et al.*, 1989). Las bacterias del género *Bifidobacterium* no fueron identificadas mediante las pruebas bioquímicas, ya que no se encuentran incluidas en su base de datos.

Todos los microorganismos identificados mediante pruebas bioquímicas fueron comprobados mediante el empleo de sondas específicas marcadas con fluorocromos (Ver 5.- Hibridación in situ). Destacar que la tira API 50-CHL no es apropiada para la identificación de bacterias acidolácticas y es necesaria una revisión de las pruebas para incluir nuevas especies microbianas.

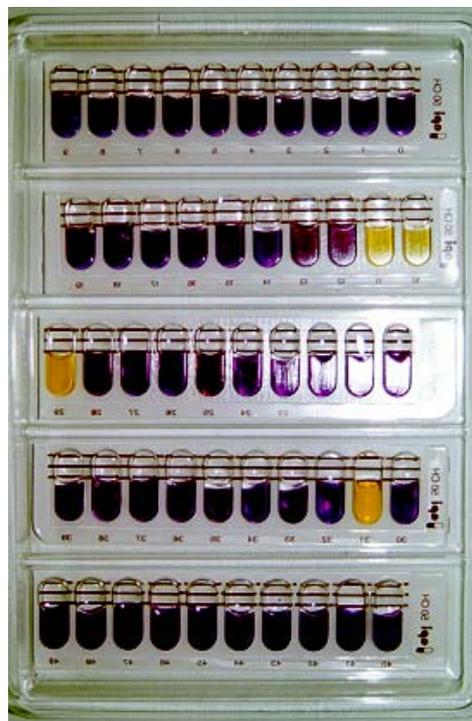


Figura 8. Tira API-50 CHL.

3.3. Identificación de los microorganismos mediante sondas específicas

Las sondas utilizadas en esta técnica, basadas en secuencias complementarias al rRNA de los microorganismos, se emplean para la detección y recuento de las bacterias acidolácticas en la propia matriz del producto.

3.3.1. Género *Bifidobacterium*.

Se diseñó una sonda específica del 16S del rRNA las bacterias del género *Bifidobacterium* marcada con fluoresceína. Se identificaron todas las cepas aisladas de las leches fermentadas con bifidobacterias mediante la hibridación de las mismas con la sonda. Con ello se confirma los resultados obtenidos en tras crecimiento en medio selectivo y observación de la morfología de colonia y celular. Este método de evaluación de las bifidobacterias mediante sondas específicas del género marcadas con fluorocromos proporciona un elevado porcentaje de identificación de las bifidobacterias, observándose al mismo tiempo la morfología de las mismas (Fig. 9).

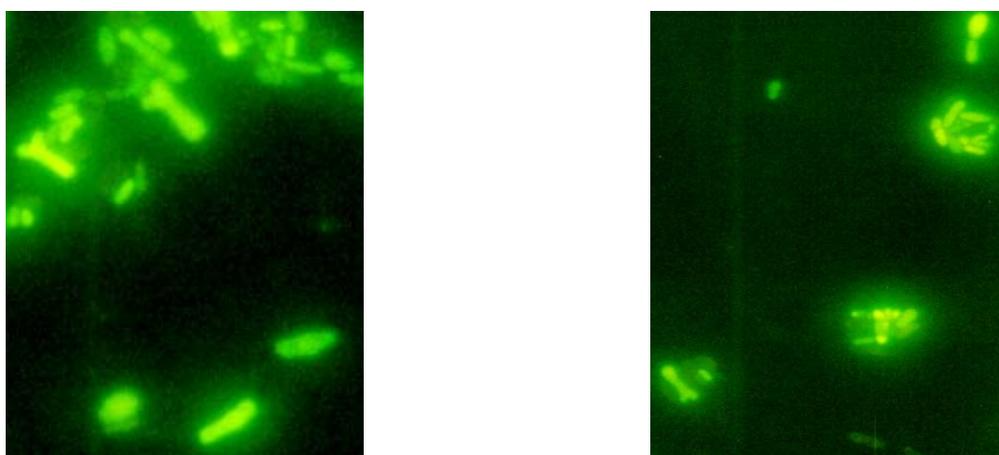


Figura 9. Bifidobacterias hibridadas mediante la sonda específica del 16S marcada con fluoresceína.

3.3.2. Género *Streptococcus*.

Para la comprobación de las bacterias identificadas como estreptococos se empleó una sonda complementaria del 23S rRNA de *Streptococcus thermophilus* que se marcó con fluoresceína. La especificidad de la sonda se comprobó con cepas de colección (cultivos puros) y con las aisladas de las muestras de lácteos estudiadas. Esta sonda resultó adecuada para la detección de estreptococos en la matriz de los productos, confirmándose los resultados anteriores obtenidos mediante técnicas de identificación bioquímica.

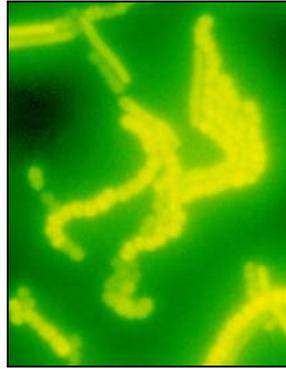


Figura 10. Hibridación *in situ* de *Streptococcus thermophilus* de yogur con sonda marcada con fluoresceína.

3.3.3. Género *Lactobacillus*.

Para la comprobación de las bacterias identificadas como lactobacilos se empleó una sonda complementaria del 16S rRNA que se marcó con rodamina. La sonda inicialmente diseñada para *L.delbrueckii* también hibridó con *L.acidophilus* y *L.casei* aunque en el BLAST no se alineaban las secuencias. Esta sonda nos permitió detectar los lactobacilos presentes en muestras lácteas. Todas las bacterias identificadas como lactobacilos, independientemente de la especie, hibridaron con la sonda, con lo que confirma los resultados de los test bioquímicos. Se observaron diversas morfologías de lactobacilos, las identificadas mediante tira API-50 CHL como *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* se muestra en la Figura 11.

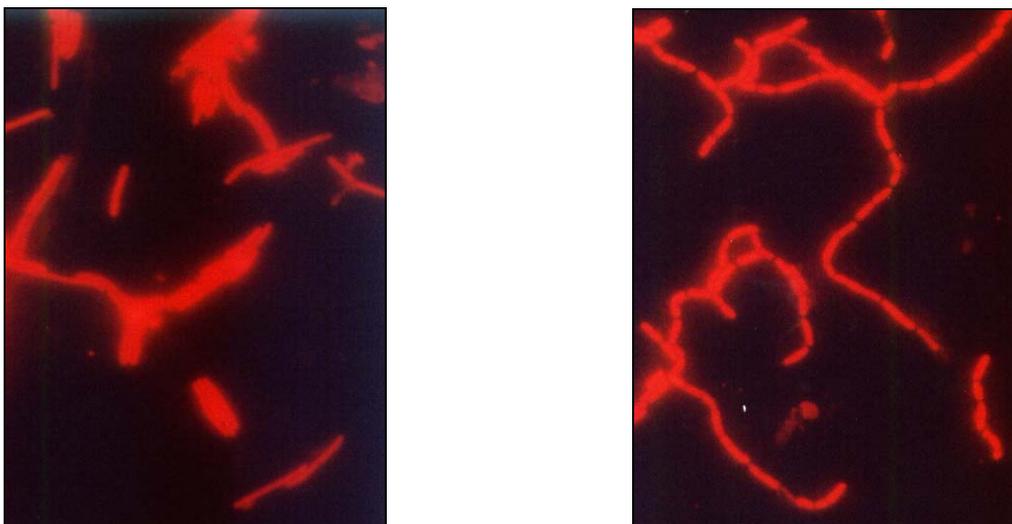


Figura 11. Hibridación *in situ* de *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* de yogur con sonda marcada con rodamina.

3.4. PCR específicas

Únicamente se realizaron las reacciones de PCR específicas de género para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ya que para *S. thermophilus* la morfología y el sistema API -50 CHL es suficiente para su identificación.

3.4.1. Género *Bifidobacterium*

Todas las cepas aisladas a partir de las 13 leches fermentadas con bifidobacterias presentaron tras la reacción de PCR con los iniciadores Lm3 y Lm26 según el procedimiento descrito por Kaufmann *et al.*, (1997) un fragmento de 1.35 Kb específico del gen del 16S del género *Bifidobacterium* (Fig.12). Este fragmento no se detectó para las cepas de lactobacilos y estreptococos.

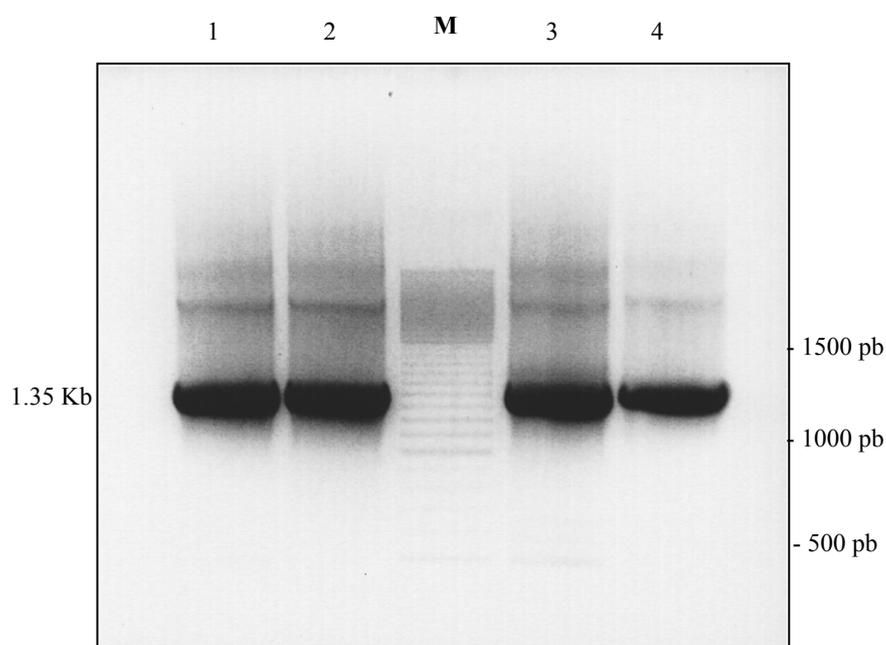


Figura 12. PCR específica del gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium*. Calles 1 a 4 bifidobacterias aisladas de productos lácteos.

Por tanto esta técnica puede ser empleada para la identificación directa y específica de de bifidobacterias.

3.4.2. *Múltiplex PCR para las especies del género Bifidobacterium*

No se obtuvo amplificación con la reacción de múltiplex PCR para los iniciadores descritos por Dong *et al.*, (2000) que identifican bifidobacterias de

origen humano. Por ello, se procedió a la evaluación de la presencia de *B. animalis/lactis* en las leches fermentadas comerciales con bifidobacterias, ya que esta especie es la mejor adaptada a los productos lácteos. Tras la múltiplex PCR para *B. animalis/lactis* según procedimiento descrito por Ventura et al., (2001) se amplificaron dos fragmentos de 1.40 Kb específico del género y otro fragmento de 680 pb específico de especie. En todas las muestras de leches fermentadas con bifidobacterias se detectó la presencia *B. animalis/lactis* (Fig. 13). Luego todas las cepas de bifidobacterias detectadas en los productos comerciales pertenecen a la especie *B. animalis/lactis*.

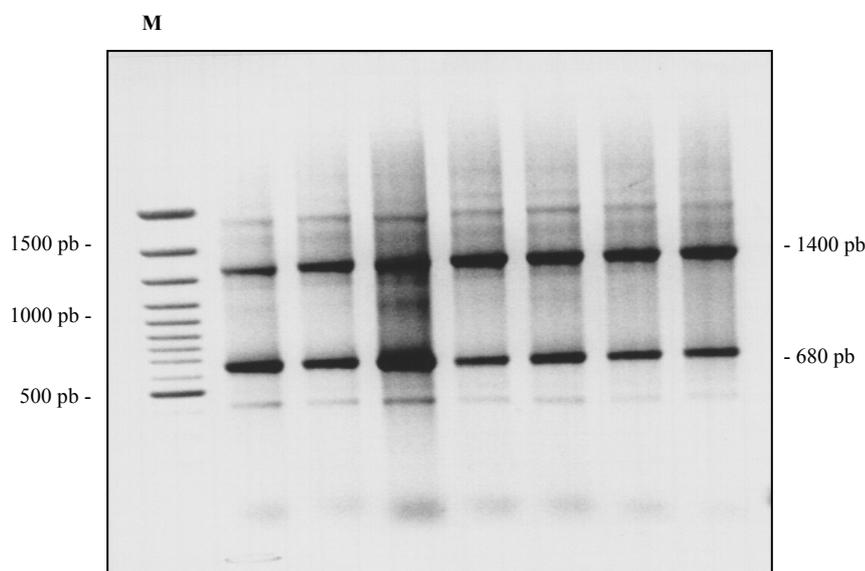


Figura 13. Múltiplex PCR de las bifidobacterias aisladas de las leches fermentadas comerciales. Línea M, 100 bp marcador DNA de pesos moleculares.

3.4.3. *Lactobacillus delbrueckii*

Todas las cepas de lactobacilos aisladas de los productos lácteos identificadas mediante pruebas bioquímicas como *L. delbrueckii*, presentaron tras la reacción de PCR con los iniciadores descritos por Lick et al., (2001) un fragmento de 715 pb específico (Fig.14). Este fragmento no se detectó para las cepas de estreptococos y bifidobacterias. De esta forma se confirman los resultados de la identificación mediante pruebas bioquímicas sin poder distinguir entre subespecies.

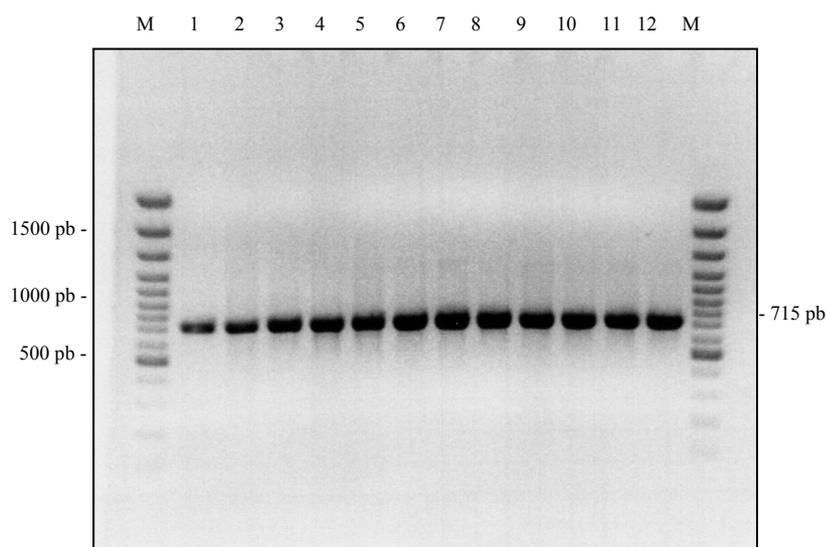


Figura 14. PCR específica de *L. delbrueckii* de las cepas de lactobacilos aisladas de las muestras lácteas analizadas en este estudio. Lane M, 100 bp DNA marcador de pesos moleculares.

3.5. ARDRA-PCR

3.5.1. Géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*:

Se amplificaron 1004 pb correspondientes al gen del 16 S del rRNA de todos los microorganismos de productos lácteos analizadas, lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos, con el empleo de unos iniciadores generales descritos por Marshall *et al.*, (1999). (Fig.15). Los amplificados fueron digeridos y visualizados en un gel de electroforesis al 3% de agarosa y visualización bajo luz UV. Se puede observar en la figura 16 los perfiles ARDRA obtenidos de la digestión con la enzima *HpaII*.

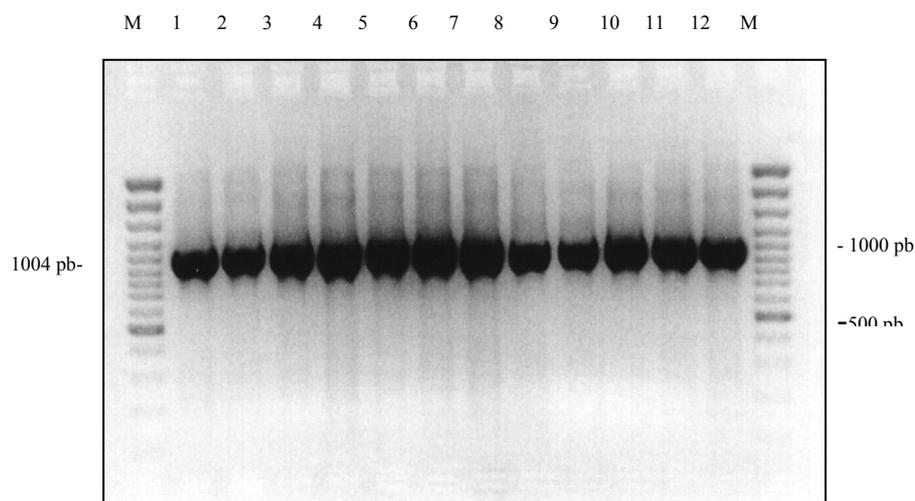


Figura 15. Amplificación del 16S con primers generales de las cepas de bifidobacterias, lactobacilos y estreptococos aislados de productos lácteos comerciales.

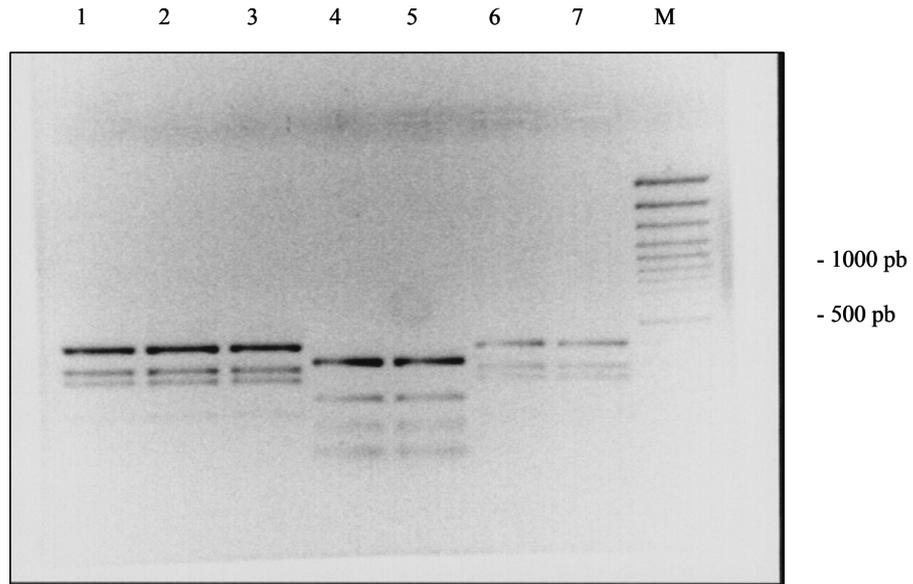


Figura 16. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción *TaqI*. Líneas 1, 2, 3 son lactobacilos; Líneas 4 y 5 estreptococos y líneas 6 y 7 bifidobacterias.

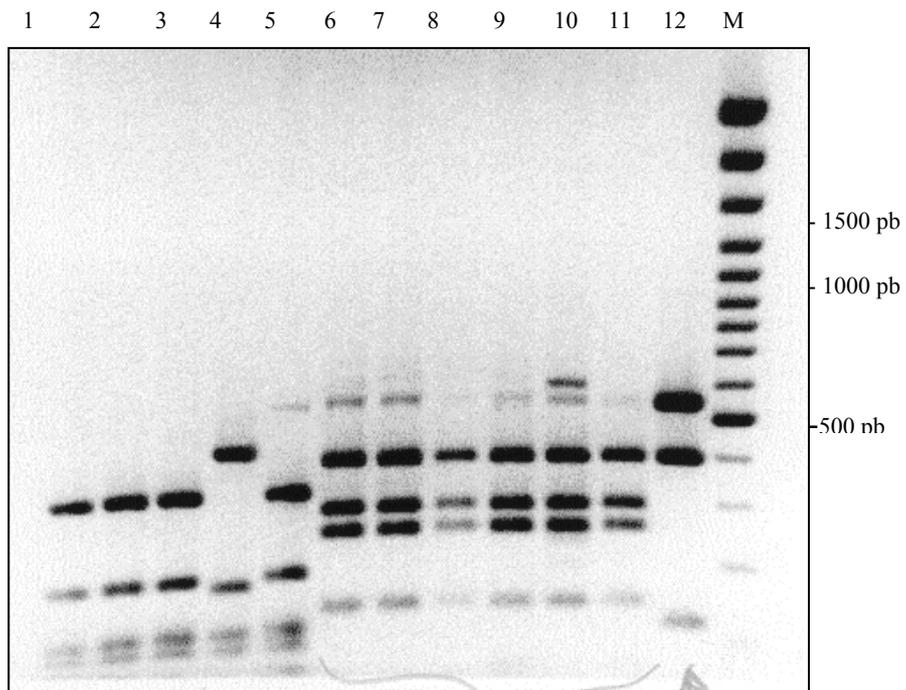


Figura 17. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción *HpaII*. Líneas 1, 2, 3, 4, 5 estreptococos, Líneas 6, 7, 8, 9 lactobacilos y Líneas 10, 11, 12 bifidobacterias.

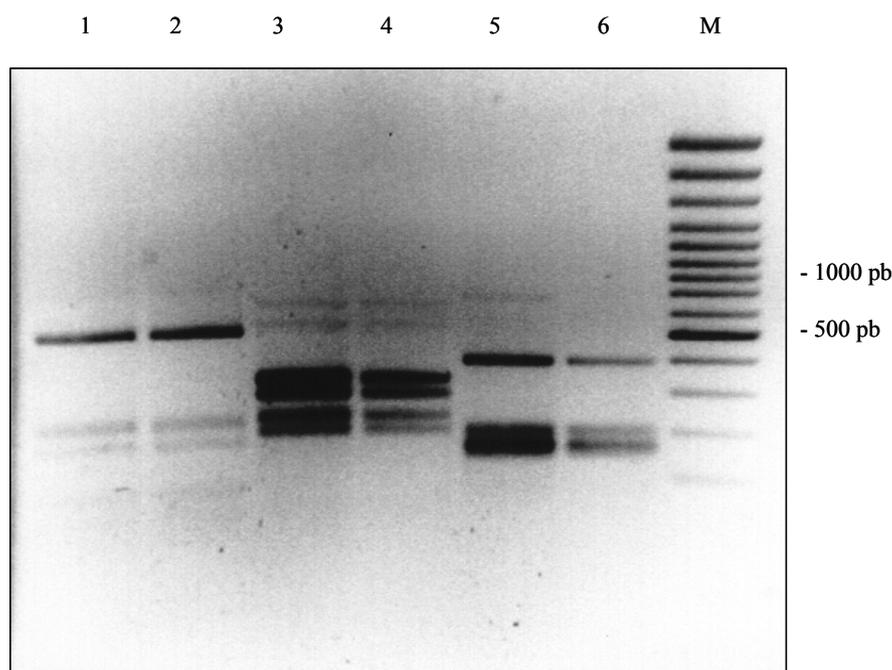


Figura 18. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión del 16S de lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos con la enzima de restricción HpyF-10VII (*MwoI*). Líneas 1, 2, 3 son estreptococos, Líneas 4 y 5 lactobacilos y líneas 6 y 7 bifidobacterias.

La restricción del fragmento de 1004pb con la mayoría de las enzimas (*HinI*, *MboII*, *TaqI*, *HpaII*) de restricción nos permitió diferenciar a los lactobacilos y bifidobacterias de los estreptococos, mientras que únicamente con la enzima *MwoI* se diferenciaron los tres géneros, generándose para los estreptococos 3 bandas de pesos moleculares aproximados de 550, 225 y 200 pb, para los lactobacilos se generaron seis 650, 600, 350, 300, 250 y 200pb. Mientras que para las bifidobacterias se generaron 3 fragmentos de 400, 200 y 150 pb. No se pudo diferenciar ningún género mediante la restricción del fragmento con *HindIII*, *AcsI*, *BstII*.

Esta técnica es una forma rápida y sencilla de diferenciar los tres géneros de microorganismos presentes en una leche fermentada con bifidobacterias utilizando la enzima de restricción *MwoI*.

3.5.2. Género *Bifidobacterium*

Un fragmento de 1.35 kb correspondiente al gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* fue detectado en todas las bifidobacterias. Se realizó la restricción

de los fragmentos amplificados mediante el empleo de las enzimas de restricción (*EcoRI*, *DdeI*, *HpaII*, *HinfI*, *MboI* y *BamHI*). Después de la digestión, para cada bifidobacteria existe un perfil de restricción específico de cada enzima de restricción. Siendo los perfiles iguales entre cepas de bifidobacterias digeridas con la misma enzima. (Fig. 2).

Esta técnica indica que se emplea una única especie en la elaboración de la leche fermentada, *Bifidobacterium animalis/lactis*, aunque hay algunas de estos bifidobacteria que son las distintas cepas (ve resultados de RAPDs). Estas cepas se identificaron como el *B. animalis* y *B. lactis*. Estas dos especies son consideradas idénticas por algunos autores (Cai *et al.*, 2000; Klein, 2001); Estudios recientes han propuesto recientemente a *Bifidobacterium lactis* como una nueva especie o subespecie (Ventura y Zink, 2002). Estas especies se han empleado en la elaboración de productos lácteos fermentados en lugar de otras especies de *Bifidobacterium* debido a sus excelentes características tecnológicas (Meile *et al.*, 1997; Klein y Goldberg, 2002, Gueimonde *et al.*, 2004). El análisis comparativo de las cepas generó un dendrograma en el que todas las cepas de *Bifidobacterium* aisladas de los productos comerciales presentaban entre un 90-95% de homología.

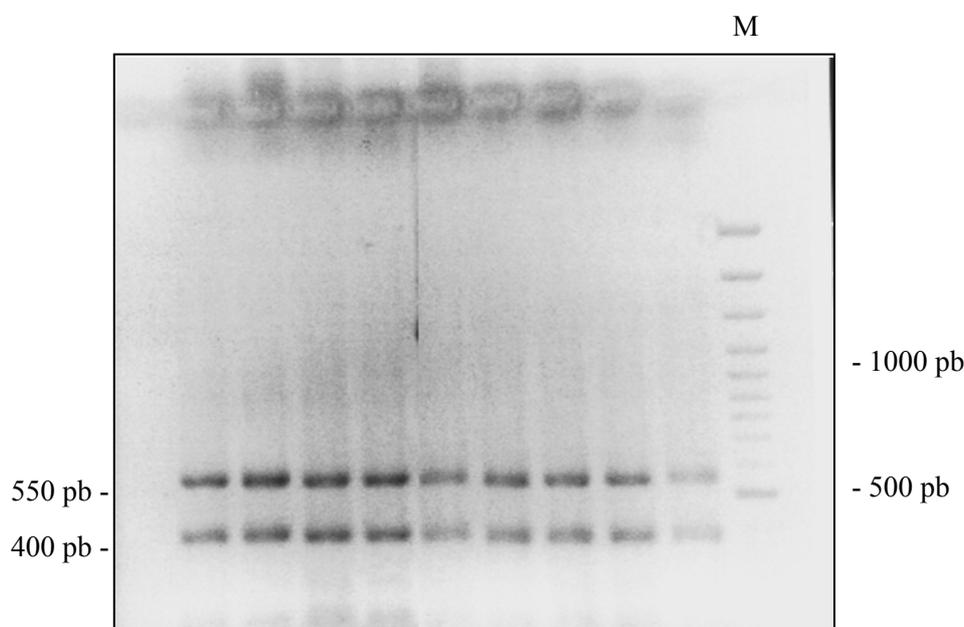


Figura 19. Perfiles ARDRA de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales tras la amplificación de un fragmento de 1.35 kb correspondiente al 16S rRNA y digerido con la enzima de restricción *MboI*. Línea M, 100 pb DNA marcador molecular.

La técnica de ARDRA es adecuada para diferenciar las bifidobacteria a nivel de especie. Nos ha permitido observar que las bifidobacteria aisladas de los productos lácteos pertenecen, principalmente, a la misma especie.

3.6 RAPDs

3.6.1. Leches fermentadas con bifidobacterias

Los perfiles obtenidos mediante la técnica RAPDs se observan en la fig.20 tras la amplificación con el iniciador descrito por Tynkkynen *et al.*, (1999). Tal y como se observa, el 80% de las cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos presentan el mismo perfil, con lo que suponemos que es la misma cepa o que son cepas generadas a partir de la misma cepa de bifidobacteria.

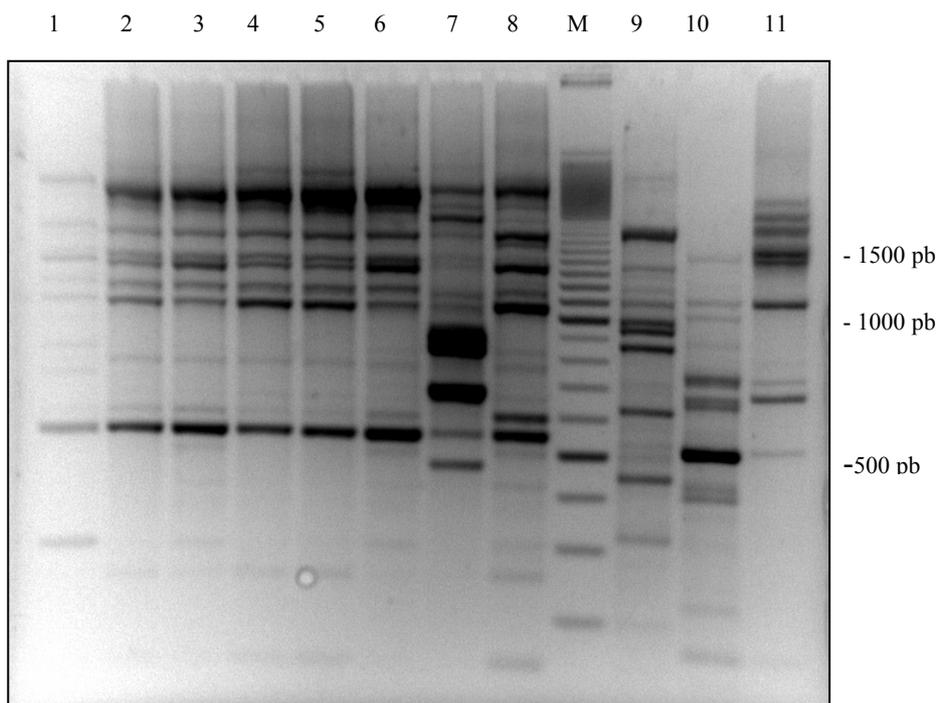


Figura 20. Perfiles generados con la técnica RAPD de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales. B1 (Línea 1), B2 (Línea 2), B3 (Línea 3), B4 (Línea 4), B5 (Línea 5), B6 (Línea 6), B7 (Línea 7), B8 (Línea 8), Línea M, marcador DNA 100 pb. *B. bifidum* ATCC 2952 (Línea 9), *B. longum* ATCC 15707 (Línea 10), *B. infantis* ATCC 15697 (Línea 11).

Únicamente, la cepa aislada del producto B7 presentó un perfil distinto al resto de las bifidobacterias aisladas. La similitud entre las cepas de bifidobacterias basada en los perfiles obtenidos mediante esta técnica RAPD fue evaluada

generando un dendrograma mostrado en la Fig.21. Todas las bifidobacterias se agruparon con un nivel de similitud del 56.6% (Fig.21), existiendo dos grupos diferenciados, el primer grupo presenta una homología del 65% y agrupa a las cepas B7, B9, B10, B11, B12, B13 y a las cepas de referencia *B.bifidum*, *B.infantis* y *B.longum*. El segundo grupo presenta un porcentaje de similitud 83% y en este grupo se encuentran las cepas B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8. Esto demuestra que las cepas de bifidobacterias utilizadas en la elaboración de productos comerciales son diferentes, con la excepción de B1, B2, B3, B4, B5 y B6 que presentan perfiles idénticos.

De la misma manera, B9, B10, B11, B12 y la cepa B13 mostraron un grado alto de similitud entre sus perfiles RAPD de alrededor del 72%. La técnica de RAPDs generó varias bandas de 8 a 14 con pesos moleculares entre 1725 bp y 238 bp. Todo las cepas comparten 10-12 bandas cuyos pesos moleculares son 2500, 2150, 1700, 1510, 1395, 1250, 1120, 867, 550, 499 y 234 bp.

El perfil RAPD de la cepa contenida en el producto B7 presenta bandas diferentes de pesos moleculares 796 bp y 900-800 pb que son exclusivas de esta cepa. Las cepas de referencia mostraron perfiles RAPDs diferentes entre ellas y a su vez diferentes a los obtenidos para las cepas aisladas de los productos lácteos.

Una de las desventajas característica de esta técnica es la falta de reproducibilidad, ésta se comprobó y se evaluó con los datos obtenidos comparando los resultados de dos termocicladores de PCR diferentes (Cycler PHC3 Termal, Real; y el termociclador FPROGOSD, TECHNE). No se observó ningún cambio en los perfiles entre las reacciones realizadas con termocicladores, tiempo, y concentraciones de DNA distintas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

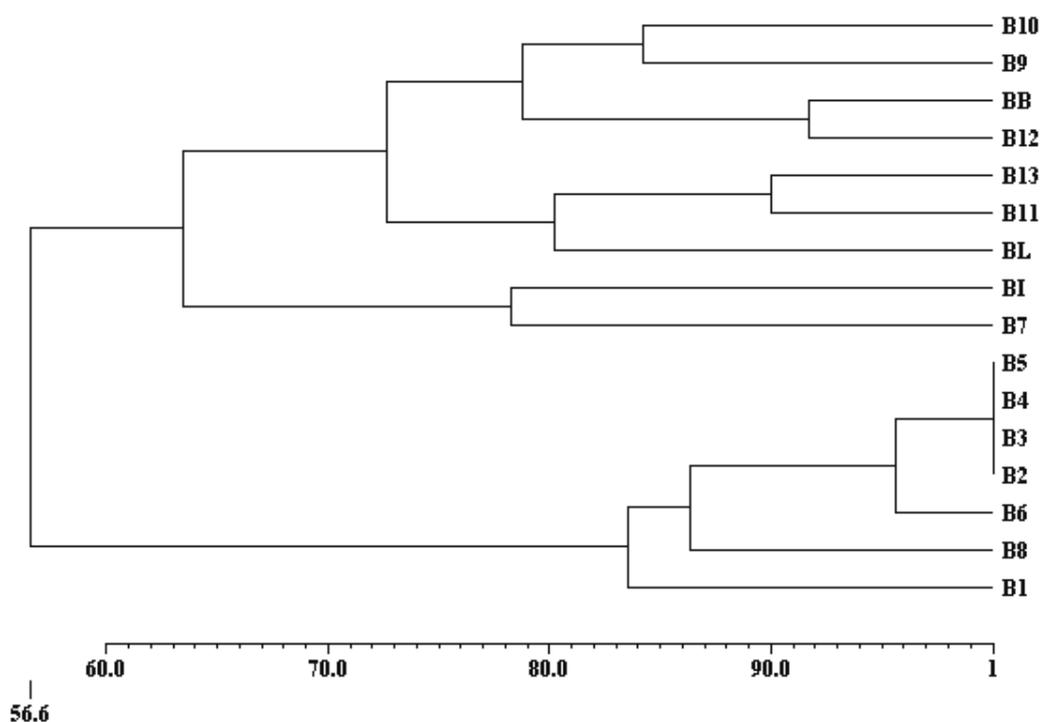


Figura 21. UPGMA dendrograma generado por comparación de los perfiles RAPD-PCR obtenidos para las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales.

3.6.2. Productos lácteos comerciales.

Los perfiles obtenidos mediante RAPDs obtenidos tras la amplificación con el iniciador descrito por Tynkkynen *et al.*, (1999) para los lactobacilos y estreptococos aislados de las leches fermentadas con bifidobacterias y de los otros productos lácteos tipo yogur analizados, se muestran en la figura 22 y 23. En los perfiles se observan diferencias entre bacterias pertenecientes a la misma especie procedentes de distintas marcas comerciales (Figuras 22 y 23). Se han analizado por separado las distintas especies obteniéndose perfiles muy dispares entre ellas. 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 (Figura 24 y 25).

Los estreptococos aislados de los productos lácteos (Figura 24) presentan una gran homogeneidad en sus patrones de bandas. Los perfiles presentan un número de

banda entre 6 y 10 con pesos moleculares que oscilan entre 2000 y 500 pb. Todas las cepas tienen en común 3 bandas de pesos moleculares: 900, 850 y 570 pb. Como se puede observar en la figura 24 existe una gran similitud en los perfiles obtenidos mediante RAPDs para los lactobacilos (todos ellos *L. delbrueckii*).

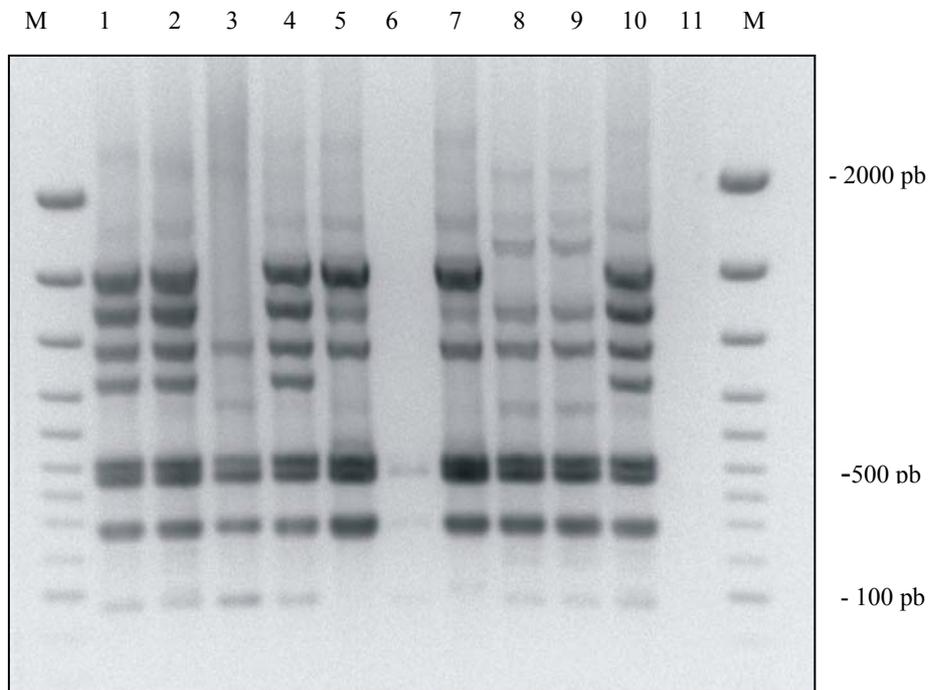


Figura 22. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género *Streptococcus*.

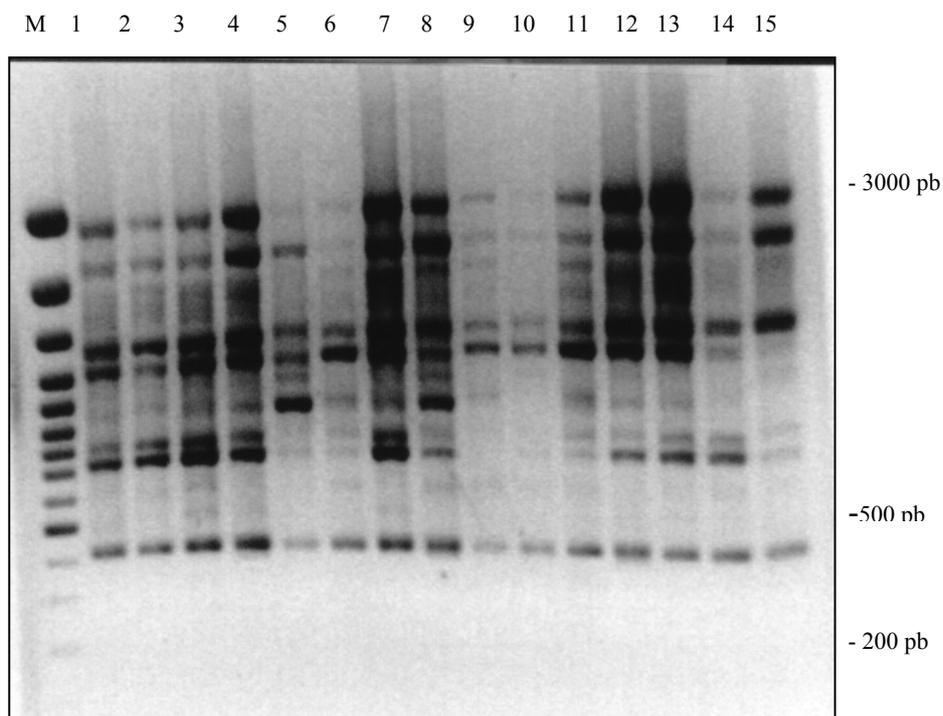


Figura 23. Perfiles obtenidos mediante RAPDs de bacterias del género *Lactobacillus*

Existen cepas de estreptococos y lactobacilos procedentes de distintos productos lácteos que comparten un elevado porcentaje de similitud tal como se puede observar en el dendrograma generado (fig.24). La tipabilidad del método se estableció en un 80% y la reproducibilidad se estimó por estudio de la cepa de estreptococo del producto B7 como control en los experimentos independientes, así como por otras cepas cuyo análisis se realizó por duplicado. En el caso de los estreptococos aislados de las leches fermentadas comerciales (fig. 24), la similitud entre las cepas es de un 75 %; en el dendrograma se observan dos grupos unidos a un 80% y un 100% de similitud, que agrupan respectivamente 8 y 3 cepas. Como se puede observar los todos los lactobacilos se encuentran englobados con un 80% de homología. Existen dos grupos o clusters, el primero de ellos, con una homología del 90%, engloba un total de 3 cepas y el segundo subgrupo con un 95% de similitud aparecen englobadas 7 cepas identificadas como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La homología entre las cepas de los lactobacilos es muy elevada.

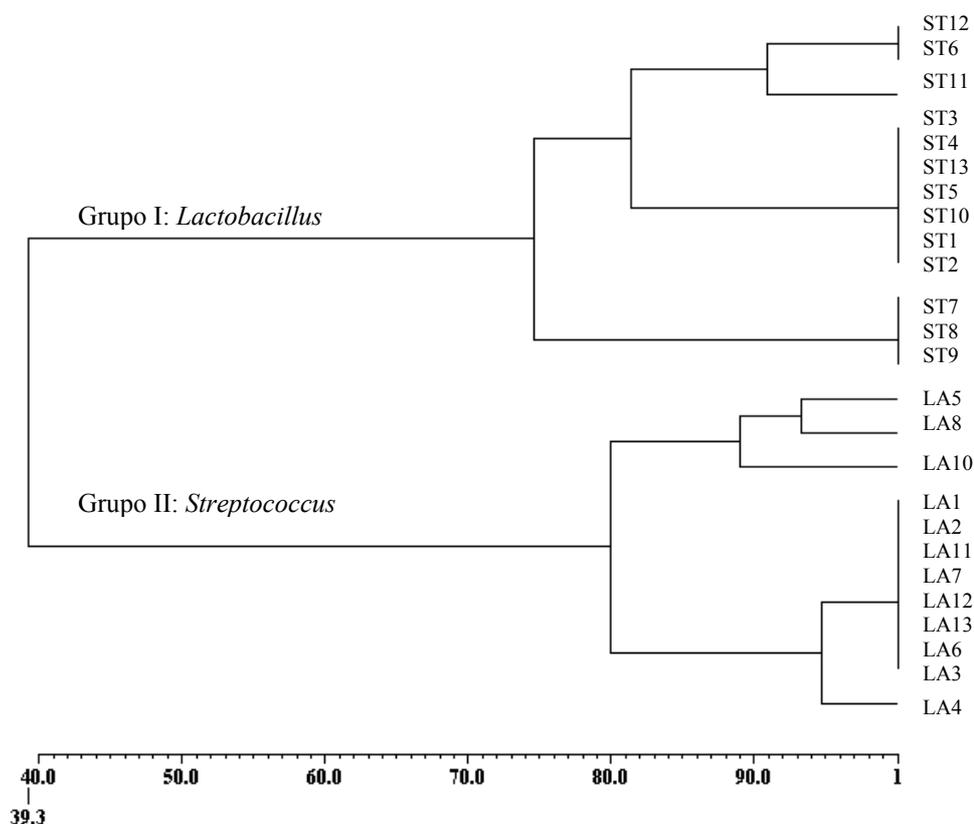


Figura 24. Representación gráfica de la homología genética del DNA amplificado de los estreptococos y lactobacilos aislados de los yogures mediante RAPDs.

El dendrograma generado por agrupación de todos los microorganismos aislados de las leches fermentadas con bifidobacterias se puede observar en la figura 25, en la que los lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias se agrupan con un 27.5% de homología, el empleo de esta técnica y la elección del iniciador, nos ha permitido poder diferenciar entre los géneros (género *Lactobacillus*, género *Streptococcus* y género *Bifidobacterium*) de microorganismos empleados en la elaboración de yogures.

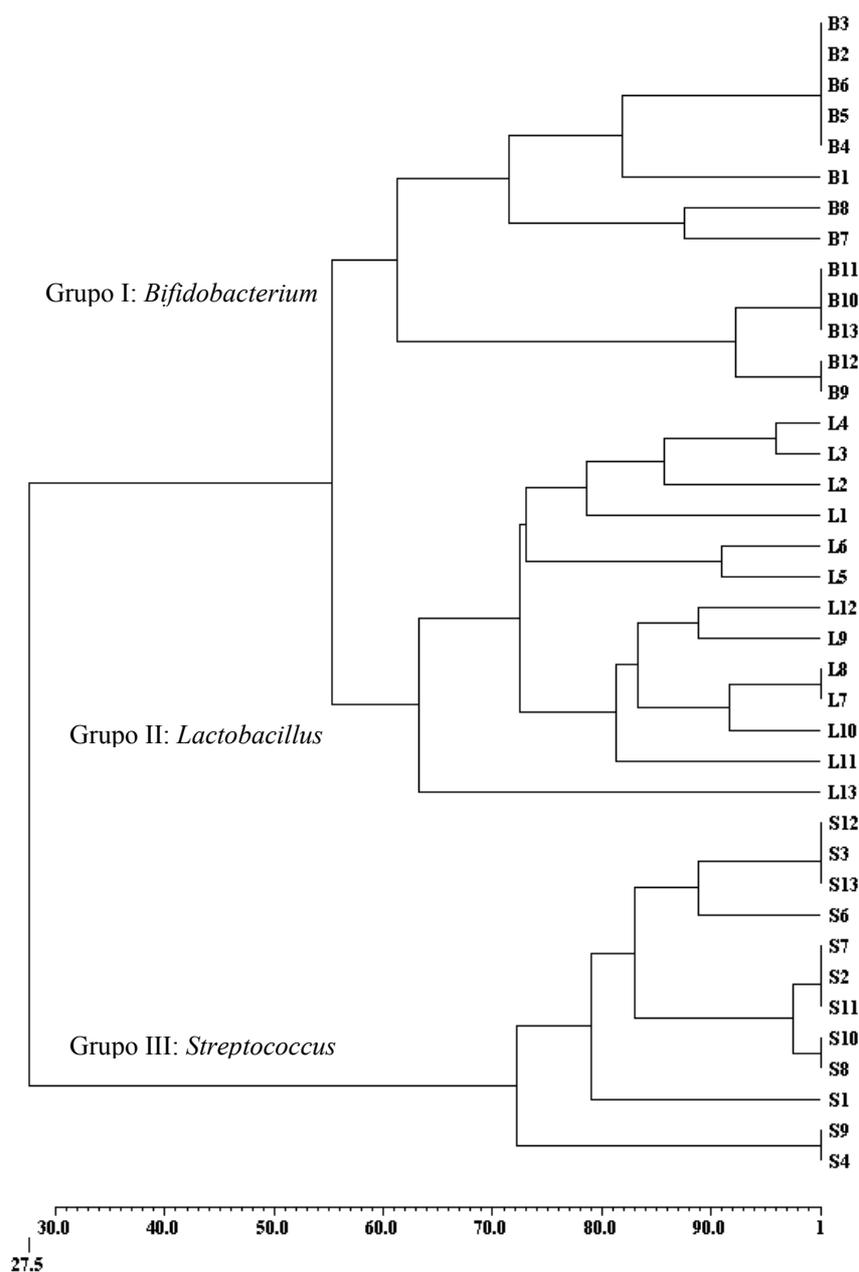


Figura 25. Representación gráfica de la homología genética del DNA amplificado de los microorganismos contenidos en las leches fermentadas con bifidobacterias mediante RAPDs.

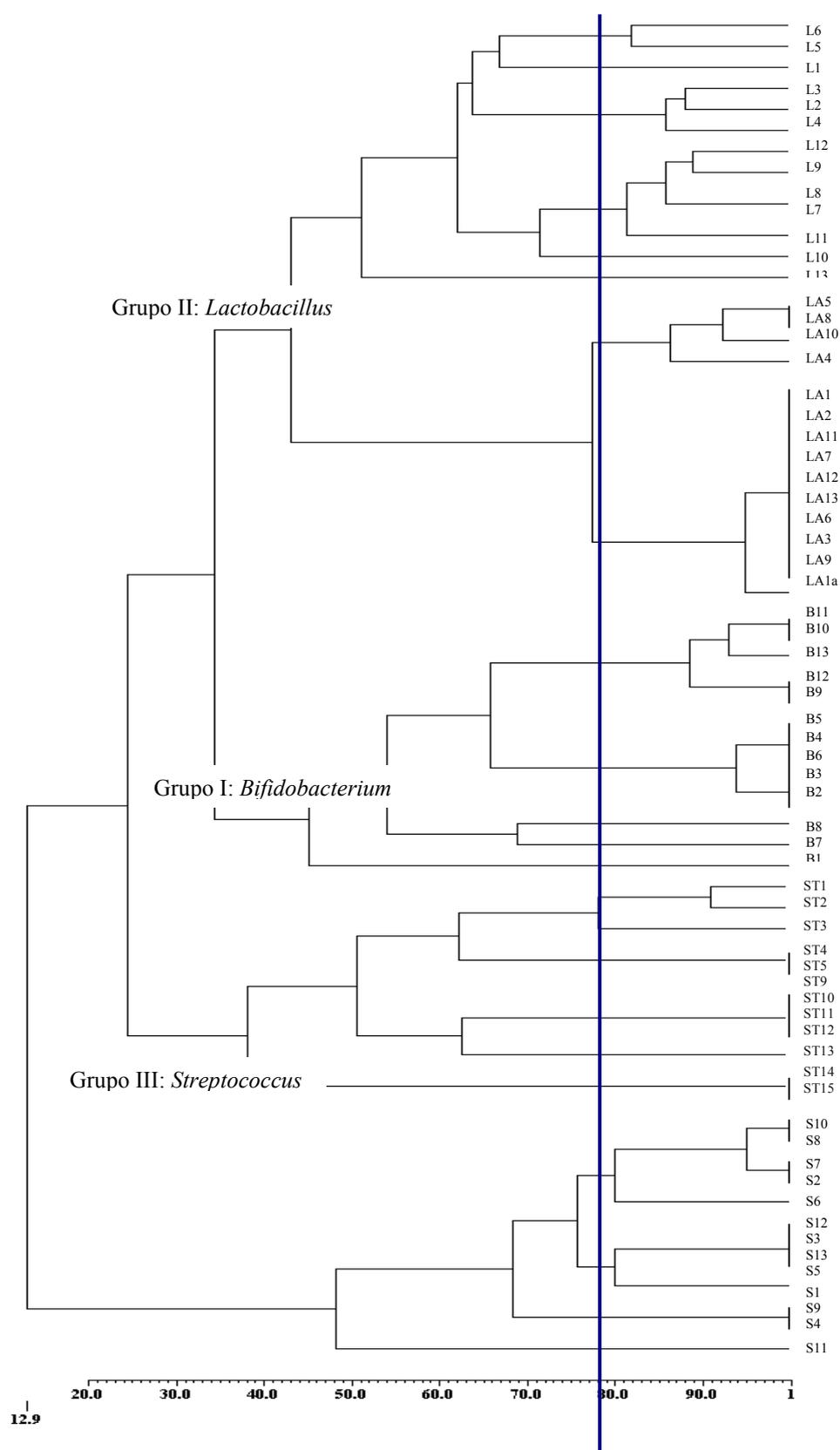


Figura 26. Representación gráfica de la homología genética del DNA amplificado de los estreptococos, lactobacilos y bifidobacterias mediante RAPDs.

3.7. AFLPs

La técnica de AFLP fue empleada para diferenciar las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de leches fermentadas comerciales. Se observó que el mismo perfil AFLP se presenta para el 85% de las cepas. Los resultados son similares a los obtenidos por medio de la técnica de RAPD, por lo que dada la complejidad y los requisitos involucrados para la realización de esta técnica (digestión, ligado, amplificación), se seleccionó la técnica de RAPD para la diferenciación a nivel de cepa de las bifidobacterias presentes en las leches comerciales.

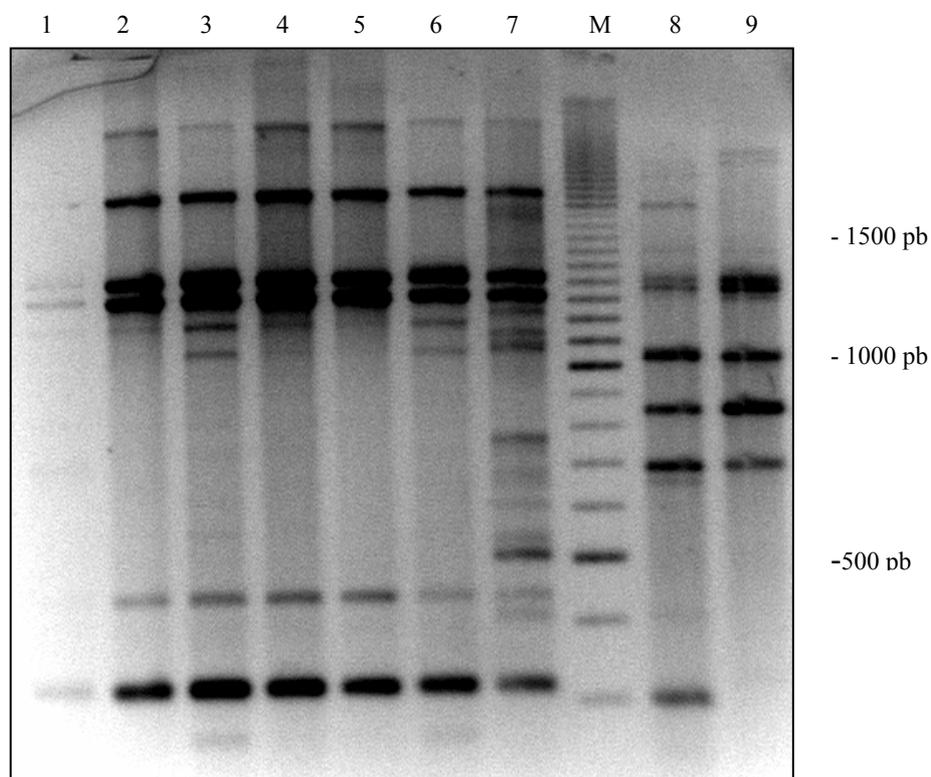
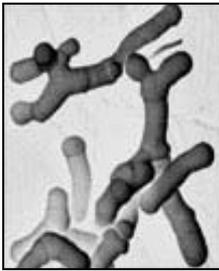


Figura 27. Perfiles generados con la técnica AFLPs de las bifidobacterias aisladas de leches fermentadas comerciales. B1 (Línea 1), B2 (Línea 2), B3 (Línea 3), B4 (Línea 4), B5 (Línea 5), B6 (Línea 6), B7 (Línea 7), Línea M, marcador DNA 100 pb. *B. bifidum* ATCC 2952 (Línea 8), *B. longum* ATCC 15707 (Línea 9).

4. DISCUSIÓN

En conclusión, la aplicación de la técnica de múltiplex-PCR para el análisis de producto lácteos comerciales puede ser una herramienta muy útil para la detección rápida de la especie *B. animalis/lactis*.

La técnica de ARDRA permite la identificación intra-específicamente, mientras la técnica de RAPDs ha permitido diferenciar de bifidobacteria al nivel de cepa. La combinación de estas dos técnicas permite identificar las bifidobacteria a nivel de especie con la técnica de ARDRA, y a nivel de cepa con la técnica de RAPD. Esta identificación a nivel de cepa es más 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 especies, porque estas propiedades son dependientes de cada cepa. Por esta razón es muy importante encontrar una técnica buena para la correcta identificación a nivel de cepa; y emplear métodos diferentes caracterización fenotípica y genotípica con el fin de poder asociar un efecto específico a una cepa concreta y poder llevar a cabo las investigaciones necesarias en diferentes estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos. Por consiguiente, la combinación de las técnicas de RAPDs y ARDRA nos proporciona una herramienta adecuadas para la identificación de las bacterias lácticas.



CAPÍTULO 2

Supervivencia de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C.

1. INTRODUCCIÓN

Los yogures y las leches fermentadas tienen la propiedad de contener microorganismos vivos que proporcionan características organolépticas y nutritivas a estos productos. Estos productos están considerados probióticos porque cuando son consumidos en ciertas cantidades, proporcionan efectos beneficiosos sobre la salud del que los ingiere, efectos como el mantenimiento de la flora intestinal, digestión de la lactosa, actividades inmunomodulantes y anticancerígenas, reducción de los niveles de colesterol, etc. (Sanders 1993; Schaafsma 1996 a, b).

Los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus spp.* son empleados frecuentemente para la elaboración de productos lácteos y muchas especies son consideradas probióticas, para ello se sugiere que deberían llegar al final del intestino viables y en suficiente número (10^6 - 10^7 microorganismos/ml) para que sus efectos puedan ser apreciados por el consumidor (Kurman y Rasic 1991, Bounnik 1993). Por ello, la efectividad de los productos probióticos implica el estudio y análisis de la viabilidad de los microorganismos durante la vida útil de los productos probióticos y durante el tracto gastrointestinal. Existe un gran número de estudios en los que se ha investigado la viabilidad de las bacterias lácticas en diferentes productos lácteos (Shin *et al.*, 2000, Defives *et al.*, 1999, Nighswonger *et al.*, 1996) usando las técnicas tradicionales de cultivo en medios selectivos. Sin embargo, estas técnicas presentan desventajas tales como el periodo de tiempo en obtener resultados y las bacterias dañadas o muertas que no pueden ser detectadas con los métodos clásicos de recuento en placa, desestimando el número real de microorganismos presentes en una muestra. La detección y recuento de microorganismos mediante tinción con fluorocromos presenta grandes ventajas destacando la rapidez en la obtención del número de microorganismos presentes en una muestra, la observación directa de la morfología bacteriana y la valoración directa del estado fisiológico de las células, es decir, la viabilidad bacteriana, permitiendo de este modo un recuento exacto del número de microorganismos presentes en una muestra. El kit de viabilidad LIVE/DEAD^R BacLight (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.) ha sido desarrollado para diferenciar las bacterias viables de las no viables en función de la permeabilidad de la membrana celular y

esta técnica ha sido empleada para monitorizar el crecimiento de poblaciones bacterianas (Franks *et al.*, 1998, McFeters *et al.*, 1995). El kit de viabilidad incluye dos fluorocromos de ácidos nucleicos: SYTO9 y ioduro de propidio. SYTO9 es un fluorocromo que presenta una fluorescencia verde (excitación y emisión máxima a 480 y 500 nm), que penetra en las membranas de bacterias viables y no viables (Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.) mientras que el fluorocromo ioduro de propidio presenta una fluorescencia roja (excitación y emisión máxima a 490 y 635 nm) y únicamente penetra en aquellas bacterias que presentan las membranas celulares dañadas o con lesiones, desplazando así la fluorescencia de SYTO9 y proporcionando fluorescencia roja. De este modo, las células que presenten la pared celular dañada se detectarían por el color rojo del fluorocromo mientras aquellas que presenten una fluorescencia verde tendrán intacta su pared celular y por tanto serán viables. Los objetivos de esta técnica de tinción de bacterias mediante fluorocromos consisten en determinar la proporción de bacterias lácticas viables (vivas) y no viables presentes en diversas muestras de productos lácteos o de cepas aisladas de los mismos, sin tener que recurrir al empleo de otras técnicas y con ello reducir el tiempo necesario para el estudio de viabilidad.

El objetivo de este estudio es determinar la viabilidad de las bacterias lácticas presentes en productos lácteos comerciales durante toda la vida útil del producto almacenados en refrigeración 4°C mediante el empleo del kit de viabilidad LIVE/DEAD^R y de las técnicas clásicas de recuento en placa con el uso de medios de cultivos generales y específicos para cada grupo de especies bacterianas presentes en los productos lácteos analizados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Muestras

Se analizó una muestra de los productos lácteos comerciales estudiados en el capítulo 1. Los productos seleccionados fueron 4 leches fermentadas con bifidobacterias (productos A, E, F y G) que además de contener bifidobacterias

contenían también los fermentos clásicos del yogur, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*, cuya presencia viene señalada en la etiqueta del producto. Dos muestras de yogur clásico (productos C y H) que contienen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*; y dos muestras de leches fermentadas con los fermentos clásicos del yogur adicionados con otros fermentos tales como *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* (productos B y D respectivamente). Además, se analizaron dos muestras (T y M) de yogures pasteurizados después de la fermentación según B.O.E. n° 135, 3 junio 2002 y B.O.E. n° 42, 18 febrero 2003, como productos lácteos que han sufrido un proceso de pasteurización. Todos los productos fueron almacenados a 4°C durante el análisis. En el etiquetado de los productos analizados (a excepción de T y M) se indicaba la presencia de las bacterias lácticas y bifidobacterias en estado viable. Las muestras fueron monitorizadas semanalmente en intervalos de 2-3 semanas antes y después de la fecha de caducidad. El pH de los productos fue medido mediante el empleo del pHmetro 507 (Crison).

2.2. Enumeración de las bacterias lácticas y bifidobacterias

(Ver capítulo 1.) Para los recuentos en placa se tomaron 10 g de cada muestra que se diluyeron en 90 ml de agua de peptona y a continuación fueron homogenizados. Se realizaron las diluciones apropiadas (10^2 - 10^8) que fueron sembradas en diferentes medios de cultivo por duplicado. Estos recuentos fueron realizados en dos experimentos independientes. Los lactobacilos fueron enumerados en el medio MRS Agar (Merck) y los estreptococos en M-17 Agar (Merck). *Bifidobacterium spp.* se enumeraron empleando BFM agar (Nebra y Blanch, 1999) y TPY Agar (Scharlau Schemie) suplementado con una solución de antibióticos que contenía 0.1 g/l de sulfato de neomicina, 15 mg/l de ácido nalidíxico y 3 g/l de cloruro de litio (Panreac, Barcelona, España). LS-Differential agar (Scharlau Schemie) fue empleado como medio general para enumerar las bacterias lácticas incluyendo también las bifidobacterias presentes en los productos lácteos analizados. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 días en condiciones de anaerobiosis mediante el uso de los sobres AnaeroGen (Oxoid Ltd., England).

2.3. Identificación de las bacterias

Los aislados de MRS agar, LS-Differential, M-17 agar y BFM agar fueron testados mediante tinción Gram y la prueba de la catalasa. El sistema de identificación API 50 CHL (BioMerieux, France) fue empleado para la designación de género y especie. Mediante la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes descrita por Langendijk *et al.* (1995) se identificaron a nivel de género los aislados. (Ver capítulo 1).

2.4. Viabilidad de las bacterias lácticas y bifidobacterias a 4°C

Para valorar la viabilidad de las bacterias se tomó como variable la integridad de la membrana celular. Para ello se empleó el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Texas, USA). Las muestras fueron asépticamente homogeneizadas y diluidas serialmente en tampón PBS (130 mM/l de cloruro de sodio, 10 mM/l fosfato de sodio, pH 7.2). Los recuentos totales, viables y no viables fueron obtenidos mediante el uso del kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Texas, USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Un total de 0.8 µl de la mezcla de fluorocromos del kit L/D (SYTO9 y PI) fue añadida a las muestras diluidas (250 µl), que fueron agitadas en el vortex y se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota de 5 µl se añadió a un portaobjetos recubierto con poli-L-lisina (SIGMA, Barcelona, España), se protegió con un cubreobjetos y se selló con vaselina para evitar pérdidas de la muestras por evaporación.

La población total es enumerada mediante el recuento de las células rojas y verdes bajo el microscopio de epifluorescencia Olympus (BX50) con un conjunto de filtros múltiples (U-MWIB). Se realizó el recuento de un mínimo de 20 campos por muestra y por duplicado. Únicamente las células que presentaban fluorescencia verde se consideraron viables.

3. RESULTADOS

3.1. Enumeración de bacterias en productos lácteos

Los recuentos en medio de cultivo general y específico para cada uno de los géneros contenidos en los productos lácteos analizados se muestran en la Tabla 1. Los recuentos totales de las bacterias lácticas y bifidobacterias presentes en los productos lácteos fueron obtenidos en LS-Differential agar. (Ver capítulo 1. Aislamiento de bacterias). El número total de bacterias viables fue de 10^7 - 10^8 UFC/g para todos los productos analizados (Tabla 1) excepto para el producto T en el que no se detectó crecimiento en placa.

Tabla 1. Recuentos iniciales de las bacterias lácticas y bifidobacterias contenidas en los diferentes productos analizados. *Media \pm SEM (Error estándar de la media)*

Muestra	Medio LS Log UFC / g	pH	BFM Log UFC / g	MRS Log UFC / g	M-17 Log UFC / g	TPY Log UFC / g
A	8,96 \pm 0,01	4,31	7,74 \pm 0,02	7,28 \pm 0,02	8,88 \pm 0,06	8,95 \pm 0,01
B	8,65 \pm 0,05	3,93	-	8,56 \pm 0,01	8,05 \pm 0,05	-
C	8,05 \pm 0,02	3,90	-	7,30 \pm 0,10	7,78 \pm 0,01	-
D	8,02 \pm 0,03	3,94	-	6,90 \pm 0,09	7,54 \pm 0,05	-
E	8,99 \pm 0,03	4,23	6,18 \pm 0,01	7,38 \pm 0,03	8,86 \pm 0,06	8,80 \pm 0,01
F	8,40 \pm 0,10	4,38	4,54 \pm 0,05	7,38 \pm 0,04	8,86 \pm 0,10	8,80 \pm 0,02
G	8,51 \pm 0,09	4,19	6,56 \pm 0,01	7,64 \pm 0,06	8,40 \pm 0,05	8,18 \pm 0,01
H	8,48 \pm 0,01	4,06	-	6,75 \pm 0,05	8,55 \pm 0,03	-

En el medio LS diferencial se realizó el recuento total de microorganismos contenidos en las muestras lácteas, ya que en este medio general crecen bien lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias; el medio MRS se empleó para el recuento de lactobacilos, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. casei*, mientras que en el medio M-17 crecieron únicamente los estreptococos. Los medios BFM (selectivo para bifidobacterias) y TPY (general de bifidobacterias) fueron usados para el recuento de bifidobacterias, obteniéndose una unidad exponencial más en el medio

TPY, ya que este medio es menos selectivo que el BFM y algunas bifidobacterias dañadas pueden crecer en él y no en BFM agar. Los productos lácteos analizados contenían *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*, aunque no en todas las etiquetas se señalaba la presencia de estos fermentos. En las leches fermentadas con bifidobacterias (productos A, E, F y G), se encuentran en unos porcentajes que varían entre 6-10% para el género *Bifidobacterium* en BFM agar, 70-90% correspondiente a los estreptococos en M-17 y entre 5-10% correspondiente a *Lactobacillus spp.* en MRS. En los productos C, G y H que son yogures que contienen los fermentos clásicos (*L. delbrueckii* y *S. thermophilus*), los porcentajes de aislamiento fueron de 80-90% para estreptococos y 10-20% para lactobacilos.

Se observó una gran variabilidad en el contenido en bifidobacterias presentes en los productos estudiados; el bajo número de células de bifidobacterias en algunos productos podría limitar su efecto probiótico. Las bifidobacterias y otras bacterias lácticas deben llegar viables y en suficiente cantidad al intestino para poder apreciar sus efectos beneficiosos y alcanzar su sitio, adherirse, implantarse o multiplicarse en el tracto intestinal (Bouhnik, 1993). El producto F no podría ser considerado probiótico debido a que su nivel en bifidobacterias es menor de 10^6 bifidobacterias/ml. La viabilidad de las bacterias lácticas y de las bifidobacterias contenidas en las muestras analizadas mediante técnicas tradicionales fue alrededor de 10^6 - 10^7 células/ml hasta el final de la vida útil (fecha de caducidad). Esta concentración microbiana es la cantidad mínima recomendada para que las células lleguen al final del intestino y puedan ejercer los efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor. Por consiguiente, es necesario que el contenido inicial de bacterias lácticas y bifidobacterias en los productos lácteos sea elevado (del orden de 10^8 - 10^7 células por gramo en el volumen intestinal), de forma que tras el paso gastrointestinal, en el que existen pérdidas en la viabilidad bacteriana, lleguen suficientes bacterias al final del intestino para poder ejercer sus efectos probióticos sobre la salud de quien los consume.

3.2. Identificación de las cepas aisladas

Todos los aislados fueron identificados mediante la galería miniaturizada de carbohidratos API 50-CHL (BioMerieux, France), técnicas basadas en la PCR y con

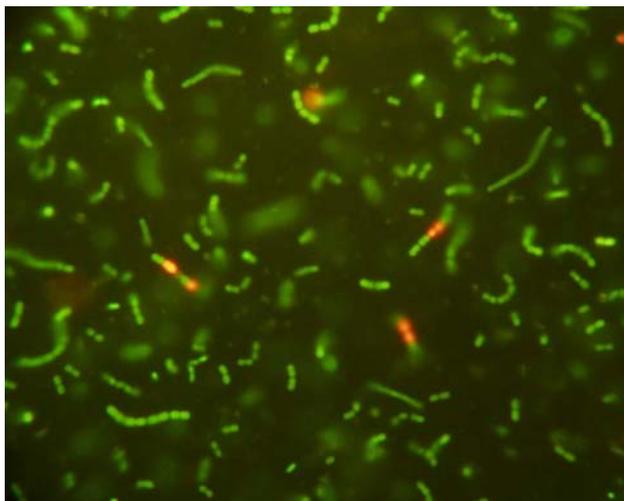
sondas marcadas con fluorescencia (hibridación *in situ*). (Ver capítulo 1. pag. 48). Todos los lactobacilos aislados (8 cepas de 8 productos lácteos fermentados) fueron identificados como *L. delbrueckii* y los estreptococos (uno por cada producto) como *S. thermophilus*. *L. casei* fue aislado en el producto B y *L. acidophilus* fue encontrado en el producto D.

El género *Bifidobacterium* fue encontrado en 4 muestras en las que se señalaba la presencia de este género en la etiqueta (productos A, E, F y G). El sistema API fue muy útil para lactobacilos y estreptococos pero no para las bifidobacterias. Las colonias de bifidobacterias crecidas en medio selectivo (BFM) fueron identificadas mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes específicas del gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* (Langendijk *et al.*, 1995). Todas las cepas aisladas de BFM agar dieron señal positiva cuando se hibridaron con la sonda, confirmando de este modo su pertenencia al género *Bifidobacterium*. La reproducibilidad de la identificación bioquímica de los aislados empleando el sistema API 50-CHL fue baja e imprecisa, sin embargo algunos autores consideran este sistema apropiado para la identificación de bifidobacterias (Shin *et al.*, 2000, Nighswonger *et al.*, 1999). Por ello, es necesario el uso de técnicas alternativas tales como la PCR o la hibridación *in situ* (FISH) para identificar las bifidobacterias presentes en productos lácteos.

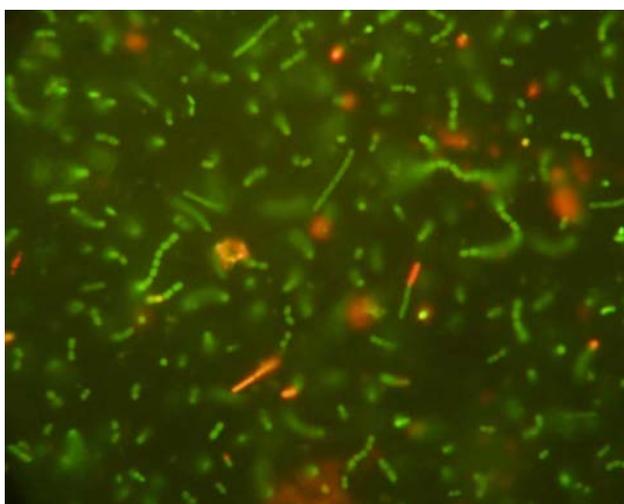
3.3. Viabilidad de las bacterias lácticas y bifidobacterias a 4°C

Los recuentos totales de bacterias lácticas y bifidobacterias estimados con el kit de viabilidad L/D fueron del orden de 10^8 - 10^9 bacteria/ml para todos los productos analizados al inicio del estudio y alrededor del 80-97% de esas bacterias (lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias) son viables (Fig. 1, Tabla 2). Los resultados muestran que los recuentos en placa son aproximadamente uno o dos ordenes menor que los recuentos obtenidos con la tinción con fluorocromos (SYTO9-PI) (Tabla 2), estos resultados sugieren que no todas las células viables en la muestra son cultivables en medio de cultivo.

I)



II)



III)

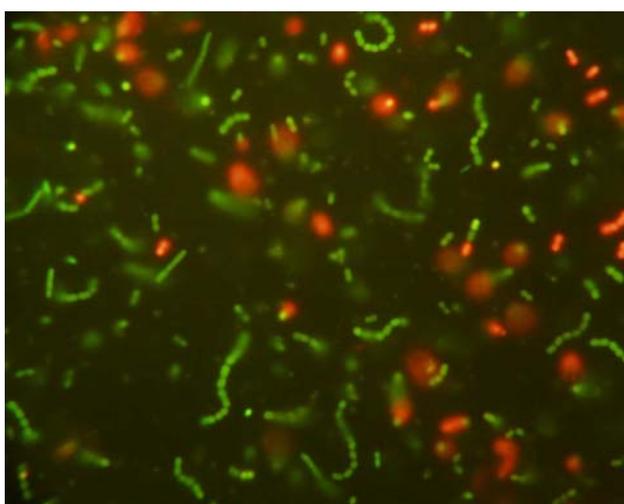


Figura 1. Viabilidad de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C. I) 2 semanas antes de la caducidad del producto II) 1 semana antes de la caducidad; III) caducidad.

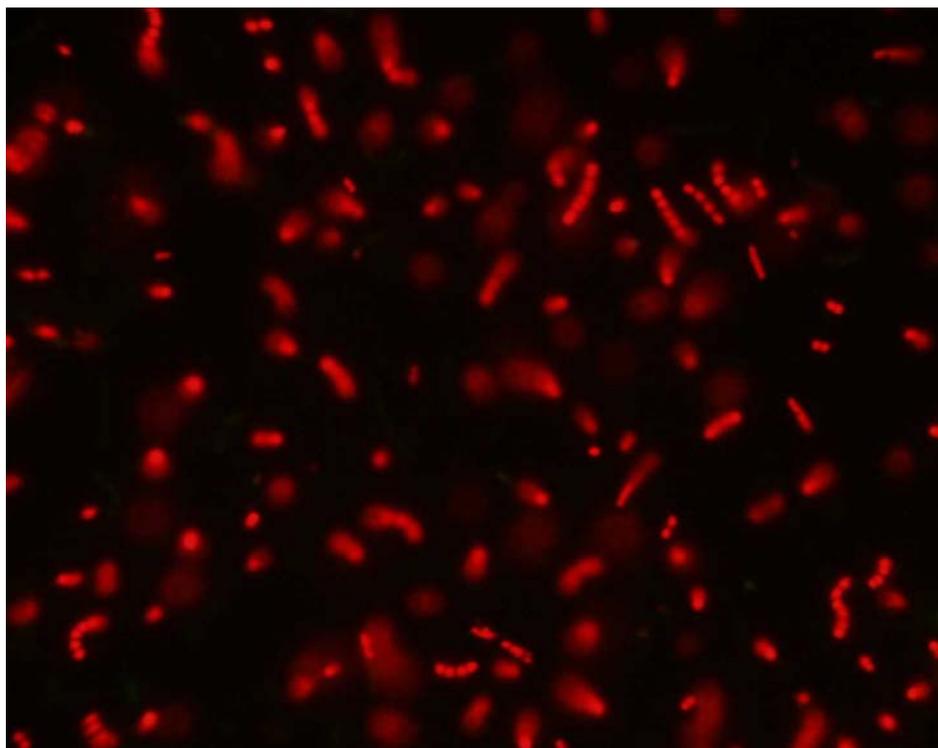


Figura 2. Viabilidad del producto T (yogur pasteurizado después de la fermentación) analizada tras la tinción con los fluorocromos SYTO9 e ioduro de propidio incluidos en el kit de viabilidad LIVE/DEAD.

Los recuentos de lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias van disminuyendo gradualmente durante el periodo previo a su caducidad (Fig. 1, Tabla 2). Después de la fecha de caducidad se observa un importante descenso en las células viables, se observa que solo entre el 15-8% de las células iniciales permanecen viables. Se observan diferencias en la viabilidad de los fermentos en función del producto analizado; la disminución es más acusada en los productos lácteos con menor pH (Tabla 2).

En los producto T y M (yogur pasteurizado después de la fermentación) todas las células muestran una fluorescencia roja tras la tinción con los fluorocromos SYTO9 e ioduro de propidio (Fig. 2, Tabla 2). Por lo que todas las bacterias son no viables.

Tabla 2. Viabilidad de las bacterias contenidas en los productos lácteos analizados mediante técnicas de cultivo en placa y recuento directo al microscopio de fluorescencia empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD durante el almacenamiento de los productos a 4°C. *Media ± (SEM) error estándar de la media.*

Muestra	2 semanas antes caducidad		1 semana antes caducidad		caducidad		1 semana después caducidad	
	Log UFC/ g	Células viables (SYTO)	Log UFC/ g	Células viables (SYTO)	Log UFC/ g	Células viables (SYTO)	Log UFC/ g	Células viables (SYTO)
A	8.96 (0.01)	9.16 (0.04)	7.89 (0.02)	8.80 (0.02)	7.75 (0.01)	8.74 (0.05)	7.20 (0.10)	7.81 (0.09)
B	8.65 (0.05)	9.01 (0.04)	7.90 (0.01)	8.70 (0.07)	7.45 (0.05)	8.49 (0.05)	7.30 (0.04)	6.21 (0.10)
C	8.05 (0.02)	8.77 (0.09)	7.75 (0.03)	8.42 (0.04)	7.30 (0.01)	8.36 (0.07)	6.90 (0.03)	7.96 (0.09)
D	8.02 (0.03)	8.36 (0.04)	7.35 (0.02)	7.25 (0.04)	6.75 (0.02)	6.83 (0.08)	6.72 (0.02)	6.79 (0.09)
E	8.99 (0.03)	9.25 (0.08)	8.00 (0.02)	7.89 (0.07)	7.65 (0.01)	7.84 (0.07)	7.00 (0.10)	7.02 (0.04)
F	8.40 (0.10)	8.77 (0.09)	8.20 (0.05)	8.44 (0.04)	7.15 (0.08)	7.27 (0.09)	7.10 (0.12)	7.25 (0.10)
G	8.51 (0.09)	8.72 (0.05)	8.00 (0.10)	8.30 (0.45)	7.94 (0.09)	8.24 (0.06)	7.50 (0.05)	7.60 (0.06)
H	8.48 (0.01)	8.56 (0.06)	8.16 (0.10)	8.26 (0.08)	7.92 (0.02)	8.15 (0.15)	7.01 (0.02)	7.46 (0.08)
T	-	-	-	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-

La viabilidad de las bacterias contenidas en las muestras lácteas analizadas empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD permaneció alrededor de 10^6 - 10^7 células/ml hasta la fecha de caducidad de los productos. Así, todas las muestras podrían ser consideradas como probióticos ya que el nivel de bifidobacterias es mayor de 10^6 - 10^7 células/ml antes de la fecha de caducidad a excepción de los productos T y M (yogures pasteurizados después de la fermentación) en los que las bacterias están muertas. Los métodos tradicionales de recuento en placa y la observación morfológica tras la tinción con fluorocromos contenidos en el kit de viabilidad muestran que los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* sufren pérdidas de viabilidad más acusadas que el género *Streptococcus* durante el almacenamiento en refrigeración de las muestras lácteas (desde 2 semanas antes de la caducidad hasta una semana después de la caducidad). (Fig.4)

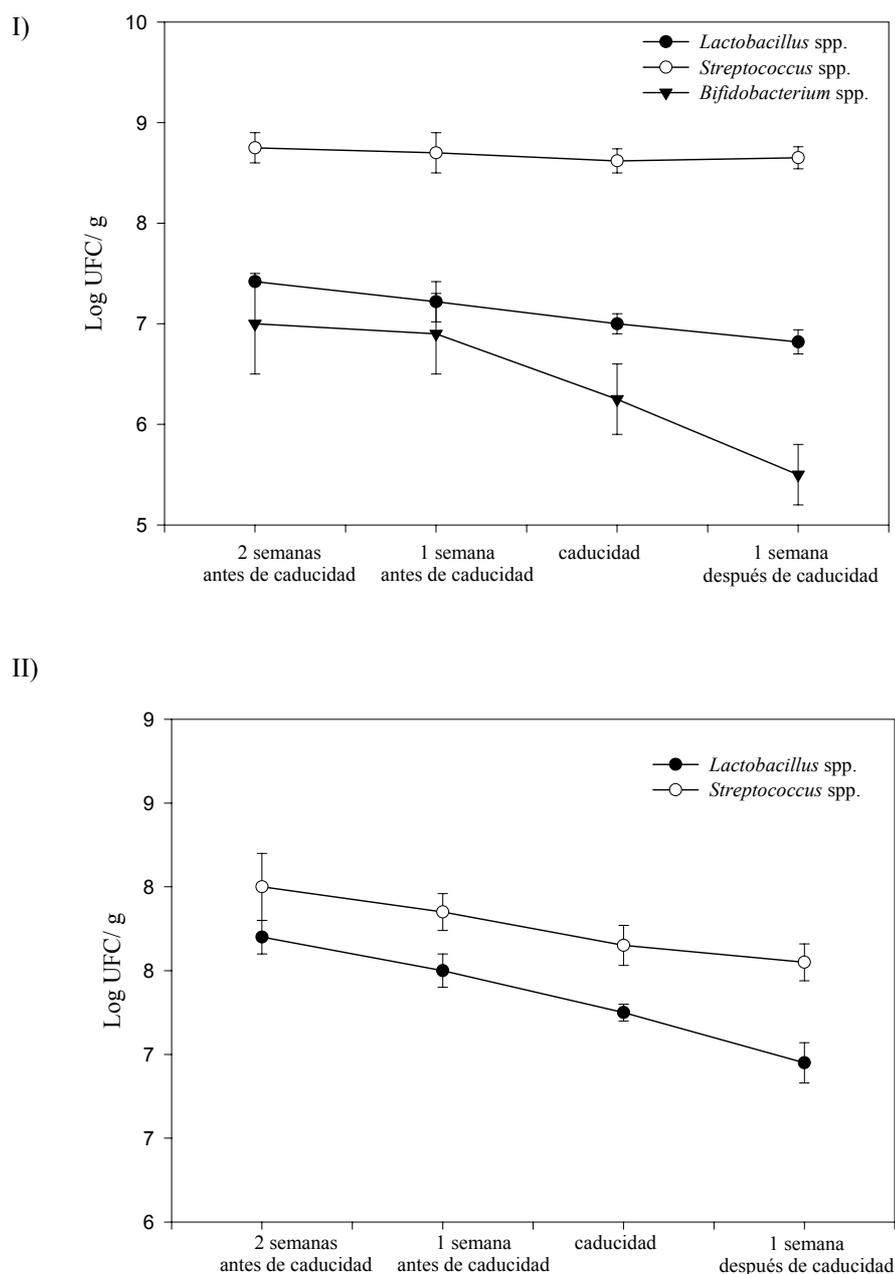


Figura 3. Viabilidad de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. durante su almacenamiento a 4°C. I) Leches fermentadas con bifidobacterias (Productos A, E, F, G) y II) Yogures tradicionales y otras leches fermentadas con otros lactobacilos (Productos B, C, D, H). Media \pm Error de la media.

La comparación de la supervivencia durante el almacenamiento de los lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias de las muestras lácteas analizadas indican la diferente viabilidad de las cepas empleadas en los procesos industriales. La variabilidad de las cepas empleadas en la elaboración de productos lácteos y los

procesos de producción de los mismos pueden contribuir a esas pequeñas diferencias en la viabilidad y en la actividad de las bifidobacterias y también de las otras bacterias contenidas en los productos lácteos. De este modo, el contenido inicial bacteriano en los productos lácteos, especialmente de lactobacilos y bifidobacterias, debe ser el suficiente para que exista un número de células viables del orden de 10^8 - 10^7 por mililitro. En la Fig.5 se observa la disminución del pH durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración de los productos lácteos analizados, como se observa, la disminución de pH es más acusada en los productos del grupo I que son leches fermentadas con bifidobacterias pasan de un pH aproximadamente de 4.0 a un $\text{pH} < 3.8$, también se observa una disminución más ligera pero para el resto de productos. Los productos T y M mantienen el pH durante el estudio en torno a 4.0.

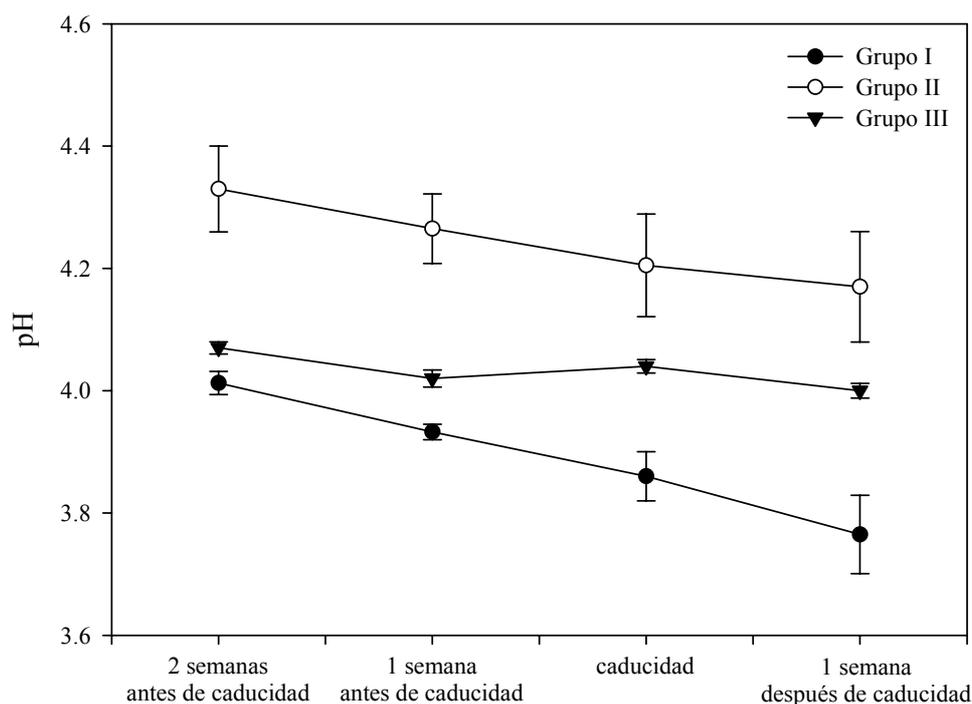


Figura 4. Variación de la medida del pH de los productos analizados durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C. Grupo I) Leches fermentadas con bifidobacterias (Productos A, E, F, G) y Grupo II) Yogures tradicionales y otras leches fermentadas con otros lactobacilos (Productos B, C, D, H) y Grupo III) Yogur pasteurizado después de la fermentación. Media \pm Error de la media.

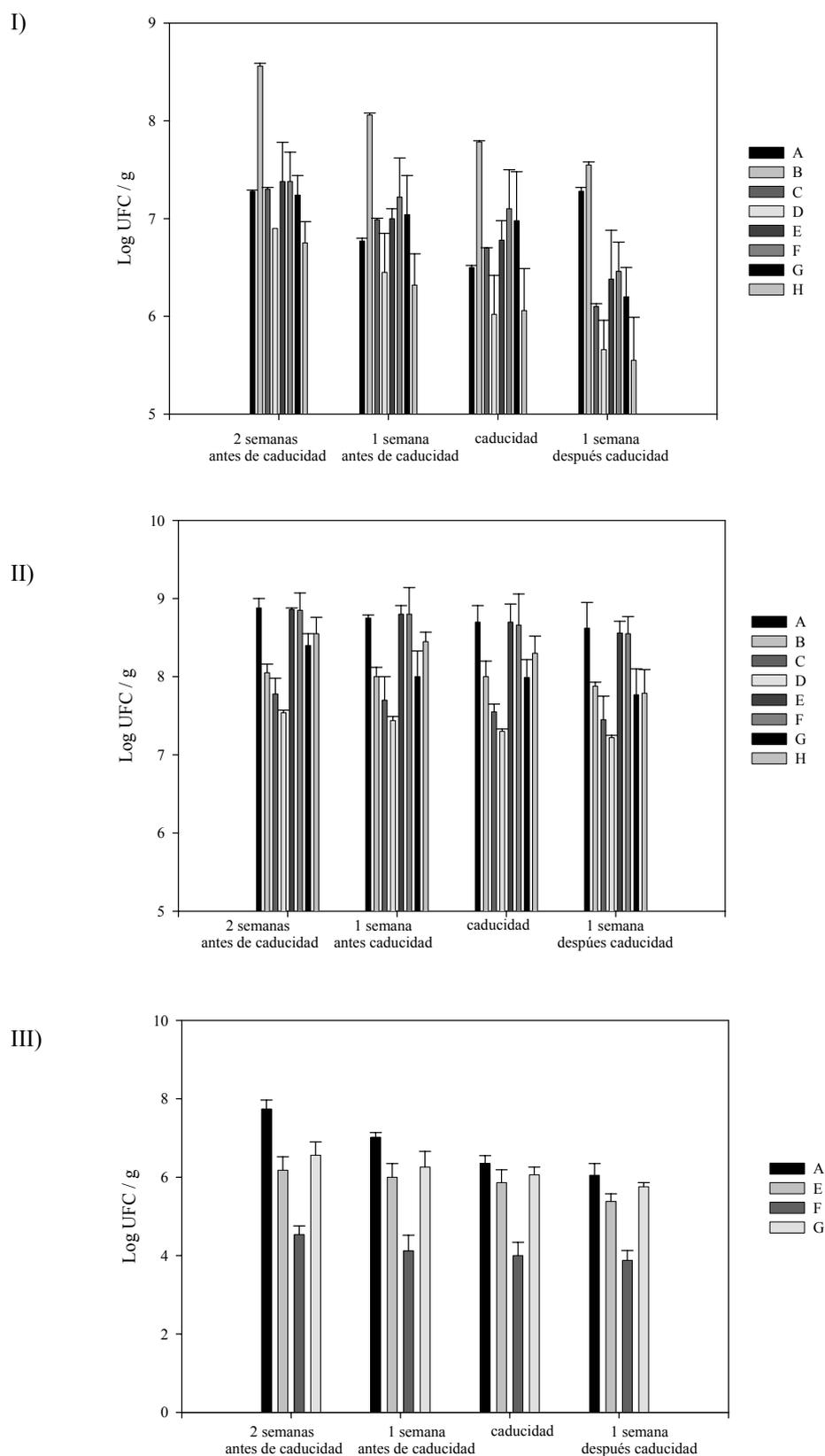


Figura 5. Viabilidad de las BAL y bifidobacterias contenidas en los productos lácteos durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C obtenidas mediante técnicas de recuento e placa. I) Lactobacilos; II) Estreptococos; III) Bifidobacteria. Los resultados se expresan como la media y el error estándar de la media. Leches fermentadas con bifidobacterias (Productos A, E, F, G); Yogures tradicionales y otras leches fermentadas con otros lactobacilos (Productos B, C, D, H).

La figura 6 muestra las células viables recuperadas en medios específicos para cada uno de los microorganismos y en función de los productos lácteos, se observa que el número de bifidobacterias disminuye mucho más durante el almacenamiento que el resto de microorganismo. En la fig.6 también se observa la variabilidad en el contenido de bifidobacterias para los distintos productos analizados y su recuperación en medios de cultivo. Los estreptococos mantienen sus niveles durante el estudio en torno a 10^7 - 10^9 UFC/ml.

4. DISCUSIÓN

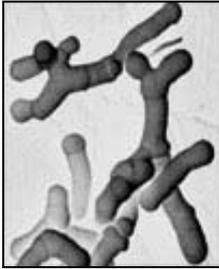
La viabilidad de las bacterias lácticas medida con el kit LIVE/DEAD® permaneció alrededor del 50-60% (10^5 - 10^6 células /ml) hasta el final de la vida comercial de los productos lácteos analizados. Una disminución significativa ($P<0.05$) fue observada tras la caducidad de los productos, especialmente en los productos de menor pH, este hecho ha sido observado por otros autores empleando técnicas tradicionales de recuento en placa (Shin *et al.*, 2000, Nighswonger *et al.*, 1999). De acuerdo con otras investigaciones (Auty *et al.*, 2001) el número de bacterias detectadas tras su crecimiento en placa es menor que los recuentos directos debido a la presencia de bacterias viables pero no cultivables.

Los resultados demuestran que las células con mayor resistencia a condiciones ácidas podrían sobrevivir al tránsito gastrointestinal, característica necesaria para la elaboración de productos lácteos probióticos y que ha de ser analizada para conocer la resistencia de cada cepa empleada. Del mismo modo, será necesario modificar las cantidades de inóculo en éstos productos en función de esa resistencia, con el fin que puedan llegar al final del intestino un número determinado de células viables para que ejerzan sus efectos beneficiosos sobre la salud de consumidor.

En resumen, la viabilidad de las cepas empleadas en la elaboración de productos lácteos es muy importante y por ello es necesario el desarrollo de métodos que nos permitan establecer esa viabilidad de forma rápida y eficaz, es por ello que el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight se considera una herramienta potente

para este fin; es un método mucho más rápido que el recuento en placa siendo suficientes unas horas frente a los más de tres días necesarios para obtener resultados con técnicas tradicionales mientras que con el kit en un par de horas ya los hemos obtenido. Además este método se considera más fiable y preciso porque nos permite estimar todas las bacterias viables y no viables en los productos lácteos, y también, es posible obtener recuentos más precisos de todas las bacterias viables aunque éstas no puedan ser cultivables. Este estudio confirma las diferencias en contenido inicial de bacterias, tanto de lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias, en los productos comerciales analizados que a su vez pueden comprometer las características probióticas de algunos productos comerciales. Además, se observan diferencias en la viabilidad de las bacterias de los productos, detectándose una disminución mayor en la viabilidad de aquellos productos comerciales con pH más bajo, confirmando, así, que el pH ácido es una barrera que limita la viabilidad bacteriana.

Es de gran interés para la industria láctea la selección de cepas resistentes a la acidez y capaces de permanecer viables durante el tiempo de vida útil del producto (24 días). Los resultados obtenidos en este estudio muestran la necesidad de nuevas investigaciones con el fin de poder establecer más detalladamente las características de las cepas empleadas con carácter probiótico por la industria láctea. Por ello son necesarios un mayor número de estudios para conocer la viabilidad de las cepas durante su almacenamiento con el fin de poder establecer las características de las cepas empleadas con carácter probiótico por la industria láctea.



CAPÍTULO 3

Estudio *in vitro* de la viabilidad de las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de leches fermentadas comerciales frente a las condiciones de tránsito gastrointestinal.

1. INTRODUCCIÓN

El interés por los productos probióticos está aumentando con la consiguiente explotación comercial de algunas de estas bacterias y la aparición en el mercado de una gran variedad de productos. La principal característica de estos productos es que a los fermentos lácticos tradicionales (*L. delbrueckii* y *S. thermophilus*), se les asocian otros microorganismos. Un probiótico es un suplemento dietético microbiano, compuesto mayoritariamente por bacterias lácticas de origen intestinal humano pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que consumido en cierta cantidad es capaz de ejercer beneficios sobre la salud (Schaafsma, 1996).

Un microorganismo probiótico efectivo debe no ser patógeno ni tóxico, ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de quien lo ingiere, presentar un elevado porcentaje de células viables, ser capaz de sobrevivir a la flora intestinal, permanecer viable durante su almacenamiento en refrigeración, etc. Diversos estudios científicos han investigado la viabilidad de las bacterias lácticas en distintos productos lácteos 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 bifidobacterias durante el tránsito gastrointestinal son el ambiente ácido del estómago y los efectos inhibitorios de las sales biliares secretadas en el duodeno. Algunas especies del género *Bifidobacterium* presentes en leches fermentadas han mostrado una buena capacidad de supervivencia en el íleon cuando son ingeridas (Hove *et al.*, 1994). El porcentaje de viabilidad de las bifidobacterias a través de su paso por el tracto gastrointestinal ha sido estimada en torno al 30% (Charteris *et al.*, 1997).

La metodología *in vitro* que simula el tránsito a través del tracto gastrointestinal ha sido empleada para la selección de cepas del género *Bifidobacterium* para su uso en alimentos probióticos. Este estudio compara los efectos de los diferentes pH de los jugos gastrointestinales en las bifidobacterias aisladas de productos lácteos empleando dos técnicas, técnicas tradicionales y de fluorescencia. El estudio de la viabilidad de las cepas probióticas es, por tanto, de

gran interés para averiguar si éstas pueden sobrevivir a través de su paso gastrointestinal. La viabilidad ha sido frecuentemente analizada mediante técnicas de recuento en placa pero éstas presentan un gran número de desventajas ya comentadas en el capítulo anterior (capítulo 2). Una mayor y más directa aproximación al recuento de los microorganismos presentes en un producto es el empleo del microscopio de epifluorescencia que posee la ventaja de permitir un análisis rápido y directo de la viabilidad celular permitiendo al mismo tiempo la observación directa de la morfología bacteriana. El kit de viabilidad LIVE/DEAD^R BacLightTM (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.) ha sido desarrollado para diferenciar las bacterias viables de las no viables en función de la permeabilidad de la membrana celular y esta técnica ha sido empleada para monitorizar el crecimiento de poblaciones bacterianas (Franks *et al.*, 1998, McFeters *et al.*, 1995) (capítulo 2). Los objetivos de esta técnica de tinción de bacterias mediante fluorocromos consisten en determinar la proporción de bacterias lácticas viables (vivas) y no viables presentes en diversas muestras de productos lácteos o de cepas aisladas de los mismos, sin tener que recurrir al empleo de otras técnicas y con ello reducir el tiempo necesario para el estudio de viabilidad.

Por lo anteriormente expuesto y dada la importancia de la supervivencia de las bacterias probióticas a las barreras gastrointestinales, el objetivo de este estudio es analizar *in vitro* la viabilidad de las bifidobacterias presentes en un grupo de leches fermentadas comercializadas actualmente en España mediante el empleo del kit de viabilidad LIVE/DEAD^R y de las técnicas clásicas de recuento en placa.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento e identificación de las cepas comerciales

Un total de 13 cepas de bifidobacterias aisladas (enumeradas de B1 a B13) de cada una de las leches fermentadas estudiadas fueron analizadas, también se empleó *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 2952) como referencia para comparar su viabilidad con la obtenida para las cepas aisladas. El aislamiento e identificación de las cepas fue realizado tal y como se describe en el capítulo 1.

2.2. Preparación del inóculo

Las cepas de bifidobacterias fueron incubadas en caldo TPY (Scharlau Schemie) a 37°C durante 24 horas. Se toma 1 ml que se centrifuga a 7.000 rpm durante 5 minutos y se lavó con tampón fosfato PBS (ver anexos) para eliminar los restos de caldo TPY. Finalmente, las células de bifidobacterias fueron resuspendidas en 300µl PBS 1X. Se ajustó el contenido de células a una concentración de 10^8 - 10^9 bifidobacterias/ml y se realizó el recuento de viables en TPY agar antes del ensayo de viabilidad celular frente al tracto gastrointestinal, este recuento se considera el control.

2.3. Preparación de los jugos gástricos y pancreáticos

Los jugos gástricos y pancreáticos se prepararon en el momento de su utilización resuspendiendo pepsina (Sigma) extraída de la mucosa estomacal porcina (3 g/l) y pancreatina (Sigma) del páncreas porcino (1 g/l) en suero salino estéril (0.5 % vol/vol) de acuerdo con los procedimientos descritos por Charteris *et al.* (1998). El pH de las soluciones fue ajustado a pH 2.0 y 8.0 usando HCl (concentrado) y 0.1 M NaOH mediante el uso del pH-metro MicropH 2001 (Crison).

2.4. Exposición de las cepas del género *Bifidobacterium* a los jugos gastrointestinales

Las células de bifidobacterias se resuspendieron en tampón PBS 1X fueron mezcladas con 1.5 ml de jugos gastrointestinales, jugo gástrico (pH 2) o jugo pancreático (pH 8). Esta mezcla se incubó a 37°C durante el transcurso del estudio a distintos tiempos en función del jugo a estudiar.

Diversas tomas de muestra de las bacterias aisladas se realizan a distintos tiempos de contacto con dichos jugos tomando como referencia los tiempos de exposición a los jugos gástricos e intestinales que tienen lugar en un proceso de digestión real humana. El tránsito por el estómago tiene una duración aproximada de 3 horas, mientras que el tránsito intestinal tiene una duración de 6 horas desde que el alimento entra en el sistema digestivo. En definitiva, las tomas de muestra se realizaron para los jugos gástricos a los 0 minutos, 5 minutos, 40 minutos y a los 180

minutos (3 horas), mientras que para los jugos intestinales son 0 minutos, 5 minutos, 4 horas y 6 horas.

2.5. Recuento de viables mediante técnica de recuento en placa

Se parte de 100 µl de muestra incubada a distintos tiempos en función del jugo estudiado que se diluye para realizar recuentos en placa usando el medio TPY agar. Las experiencias se realizaron por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días en condiciones anaerobias.

2.6. Recuento de viables mediante técnica de tinción con fluorocromos

Los recuentos totales de bacterias, viables y no viables fueron obtenidos con el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability stain Kit (Molecular Probes). Las muestras se toman directamente de las diluciones de las cepas de bifidobacterias en tampón fosfato PBS 1X para cada uno de los tiempos y para cada uno de los jugos empleados en el estudio de viabilidad.

Las células de *Bifidobacterium* con los jugos son lavadas con PBS buffer (900 µl). A las muestras diluidas (250 µl) se añaden 0.8 µl de la mezcla de los fluorocromos SYTO9 y PI en proporción 1:1, que fueron mezclados e incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La metodología es igual que la descrita en el capítulo anterior (capítulo 2) Una alícuota de 5 µl se deposita en un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina (SIGMA), a continuación se cubre y se sella con vaselina para evitar la evaporación. Las bacterias viables, marcadas con SYTO9, se observan en el microscopio de epifluorescencia de color verde, mientras que las bacterias no viables, marcadas con Ioduro de Propidio, se observan de color rojo. Mediante una sencilla fórmula matemática se calcula 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 los jugos gastrointestinales.

La población de bifidobacterias es enumerada en el microscopio de epifluorescencia Olympus (BX50) con un set de filtros (U-MWIB). Un mínimo de 20 campos son contados por cada experimento, los experimentos se realizaron por triplicado.

2.7. Análisis de los resultados

Los resultados para los recuentos en placa se expresan como la media y el error estándar de la media de dos determinaciones, mientras que para los recuentos con fluorescencia el error es para 20 determinaciones.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento e identificación de las cepas comerciales

(Ver capítulo 1) En general, el número de bacterias viables obtenido por recuento en placa es menor que el obtenido mediante el kit de viabilidad debido a la presencia de bacterias viables no cultivables. Todos los productos analizados contienen bifidobacterias pero en cantidades variables, algunos productos podrían ver limitado su efecto probiótico ya que es necesario que las bifidobacterias lleguen en cantidad suficiente y vivas al final del intestino. Las bifidobacterias se identificaron como *B. animalis/lactis* mediante PCR y FISH (ver capítulo 1).

3.2. Determinación de la tolerancia gastrointestinal

Las bacterias viables se recuperaron tras incubación durante 36-72 h a 37°C en el medio TPY agar después de la exposición a los jugos gastrointestinales. La supervivencia de las células de *Bifidobacterium* a la exposición a los jugos intestinales varía entre especies y cepas. Para todas las cepas, la pérdida de viabilidad varía entre el 80 y 30% tras la exposición a los jugos gastrointestinales (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran que el número de células viables recuperadas en medio de cultivo es menor que el número de células obtenidas con el kit de fluorescencia entre una y dos unidades logarítmicas (Tabla 2 y 3).

El kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight se presenta como un método rápido y apropiado para la enumeración total de las bacterias viables incluyendo los recuentos de las bacterias viables pero no cultivables que también podrían ejercer efecto probiótico. Las células que presentan fluorescencia verde son consideradas viables mientras que las que presentan fluorescencia roja son consideradas no viables o dañadas (Fig. 1). En general, todas las cepas son más sensibles a la acción

de los jugos gástricos que a los intestinales (Tabla 2 y 3) pero esta respuesta es dependiente de cada cepa.

Tabla 1. Efecto simulado del tránsito gastrointestinal en la viabilidad de las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de productos lácteos comerciales.

Cepas	bifidobacteria por gramo de producto	% viabilidad tras tránsito gastrointestinal	Nº bifidobacteria viable tras tránsito gastrointestinal	Nº bifidobacteria viable en 125 g
B1	1.5×10^6	24.5	3.68×10^5	4.60×10^7
B2	1.0×10^5	6.8	6.95×10^3	8.68×10^5
B3	3.5×10^4	7.4	2.60×10^3	3.25×10^5
B4	1.0×10^7	52.8	5.28×10^6	6.60×10^8
B5	8.0×10^4	53.0	4.24×10^4	5.30×10^6
B6	3.6×10^6	26.6	9.59×10^5	1.20×10^8
B7	7.0×10^7	27.2	1.91×10^7	2.38×10^9
B8	1.0×10^7	55.0	5.50×10^6	6.87×10^8
B9	1.5×10^7	16.7	2.51×10^6	3.14×10^8
B10	1.2×10^6	29.6	3.55×10^5	4.44×10^7
B11	3.2×10^7	42.9	1.37×10^6	1.72×10^8
B12	5.1×10^6	28.7	1.47×10^6	1.83×10^8
B13	5.2×10^6	30.2	1.57×10^6	1.97×10^8

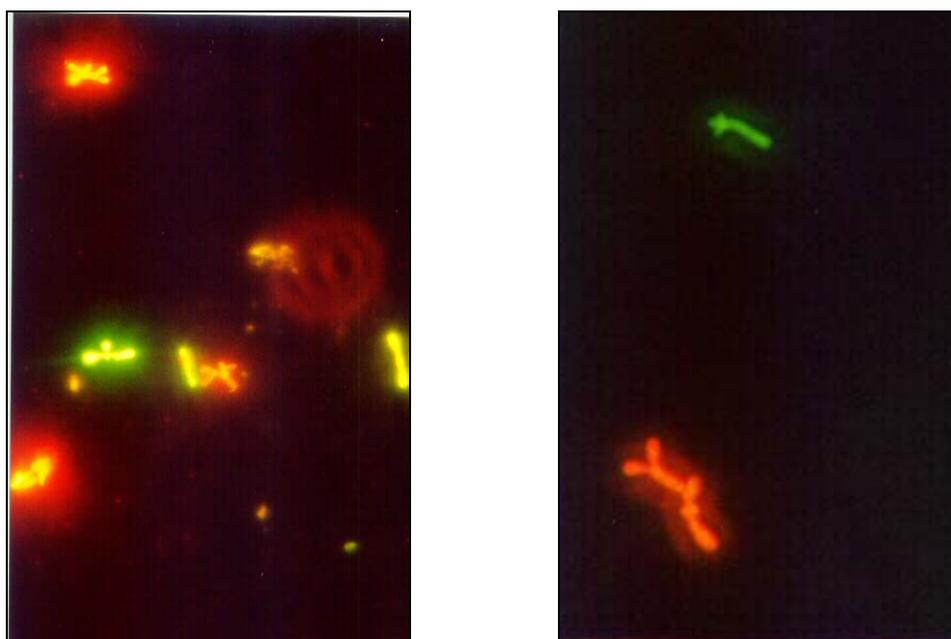


Figura 1. Tinción de bifidobacterias después de tinción con los fluorocromos contenidos en el kit LIVE/DEAD BacLight.

Tabla 2. Efecto *in vitro* de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de 13 cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales empleando los recuentos con el fluorocromo SYTO9. ^{A)} media \pm SEM (error estándar de la media).

Cepas	Log células viables / ml durante tránsito gastrointestinal simulado				
	Tránsito gástrico				
	0 min	1 min	5 min	90 min	180 min
B1	8.34(0.02) ^A	7.15(0.03)	6.40(0.02)	4.20(0.05)	2.50(0.03)
B2	8.18(0.01)	7.12(0.02)	6.50(0.04)	5.52(0.05)	2.26(0.04)
B3	8.22(0.00)	5.10(0.01)	2.41(0.02)	2.35(0.02)	2.02(0.03)
B4	8.18(0.02)	7.32(0.03)	7.12(0.01)	6.55(0.04)	6.09(0.20)
B5	8.26(0.01)	7.35(0.04)	7.26(0.03)	6.25(0.02)	5.96(0.01)
B6	8.37(0.02)	6.55(0.02)	5.30(0.03)	4.69(0.10)	3.55(0.03)
B7	8.24(0.03)	7.06(0.02)	6.25(0.05)	5.80(0.03)	4.02(0.10)
B8	8.20(0.01)	7.42(0.01)	7.12(0.02)	6.35(0.03)	5.95(0.02)
B9	8.26(0.02)	7.08(0.03)	6.25(0.01)	3.21(0.02)	2.26(0.02)
B10	8.30(0.01)	6.86(0.03)	5.25(0.02)	5.00(0.04)	4.22(0.03)
B11	8.10(0.02)	6.96(0.01)	6.05(0.02)	5.85(0.03)	5.26(0.02)
B12	8.25(0.01)	6.56(0.03)	6.20(0.04)	5.70(0.02)	4.55(0.03)
B13	8.18(0.03)	5.86(0.03)	5.20(0.02)	4.90(0.04)	4.12(0.03)
B.Bif 2952	8.45(0.00)	8.30(0.03)	5.02(0.02)	4.89(0.05)	3.21(0.04)

Cepas	Log células viables / ml durante tránsito gastrointestinal simulado				
	Tránsito intestinal				
	0 min	1 min	5 min	240 min	360 min
B1	8.50(0.01)	7.89(0.04)	7.55(0.02)	7.42(0.10)	6.95(0.02)
B2	8.55(0.02)	6.89(0.03)	5.86(0.02)	3.25(0.01)	2.15(0.03)
B3	8.30(0.01)	5.06(0.02)	4.02(0.03)	3.39(0.02)	2.51(0.01)
B4	8.29(0.03)	7.26(0.10)	6.96(0.02)	6.75(0.01)	5.88(0.01)
B5	8.20(0.01)	7.48(0.03)	7.40(0.04)	6.75(0.03)	6.02(0.03)
B6	8.15(0.01)	6.89(0.02)	6.36(0.03)	5.76(0.01)	5.12(0.01)
B7	8.35(0.03)	7.12(0.04)	5.97(0.20)	5.23(0.03)	4.66(0.02)
B8	8.12(0.01)	7.12(0.02)	6.95(0.02)	6.45(0.04)	6.15(0.02)
B9	8.22(0.02)	7.06(0.01)	7.00(0.00)	5.86(0.02)	5.03(0.01)
B10	8.40(0.00)	7.56(0.03)	7.03(0.00)	5.12(0.10)	4.89(0.05)
B11	8.10(0.01)	7.86(0.02)	7.55(0.02)	6.10(0.04)	5.29(0.02)
B12	8.15(0.03)	7.26(0.03)	7.13(0.04)	5.55(0.02)	4.99(0.04)
B13	8.20(0.01)	7.70(0.02)	7.22(0.02)	5.02(0.05)	4.56(0.05)
B.Bif 2952	8.32(0.02)	7.23(0.02)	6.78(0.03)	5.86(0.02)	5.02(0.06)

Tabla 3. Efecto *in vitro* de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de 13 cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales empleando los recuentos en placa. ^{A)} media \pm SEM (error estándar de la media)

Cepas	Recuento viables (log UFC/ ml) tolerancia gástrica				
	Tránsito gástrico				
	0 min	1 min	5 min	90 min	180 min
B1	7.34(0.02)	6.25(0.01)	5.23(0.03)	3.05(0.04)	1.55(0.10)
B2	7.23(0.03)	6.01(0.03)	5.03(0.05)	4.45(0.04)	1.06(0.07)
B3	7.12(0.04)	4.23(0.01)	1.22(0.03)	1.00(0.04)	0.98(0.02)
B4	7.20(0.02)	6.02(0.10)	5.98(0.02)	4.23(0.03)	4.12(0.01)
B5	7.32(0.02)	6.32(0.03)	6.12(0.06)	5.33(0.04)	4.66(0.10)
B6	7.55(0.03)	5.21(0.03)	4.11(0.02)	3.15(0.01)	2.24(0.07)
B7	7.02(0.03)	6.13(0.02)	5.09(0.01)	4.28(0.03)	3.06(0.02)
B8	7.55(0.02)	6.55(0.04)	6.35(0.04)	5.15(0.02)	3.99(0.01)
B9	7.71(0.03)	6.47(0.02)	5.18(0.02)	2.02(0.03)	1.20(0.05)
B10	7.03(0.03)	5.26(0.01)	4.24(0.03)	4.26(0.03)	2.98(0.02)
B11	7.20(0.02)	5.25(0.01)	5.05(0.02)	4.45(0.03)	4.20(0.02)
B12	7.30(0.01)	5.56(0.02)	5.15(0.03)	4.20(0.02)	3.55(0.03)
B13	7.18(0.03)	5.86(0.01)	5.20(0.02)	4.90(0.04)	4.00(0.02)
B.Bif 2952	7.70(0.01)	7.22(0.0)	3.86(0.2)	3.55(0.02)	2.02(0.02)

Cepas	Recuento viables (log UFC/ ml) tolerancia intestinal				
	Tránsito intestinal				
	0 min	1 min	5 min	240 min	360 min
B1	7.55(0.02)	6.29(0.01)	6.00(0.01)	5.95(0.02)	5.23(0.03)
B2	7.65(0.01)	6.77(0.02)	4.89(0.01)	2.85(0.02)	1.89(0.01)
B3	7.23(0.01)	4.53(0.03)	3.83(0.04)	2.68(0.03)	2.51(0.01)
B4	7.49(0.02)	6.32(0.01)	6.96(0.03)	5.65(0.04)	5.12(0.01)
B5	7.66(0.01)	6.02(0.02)	5.78(0.02)	5.48(0.01)	5.06(0.02)
B6	7.06(0.02)	5.49(0.01)	5.26(0.03)	4.98(0.02)	3.99(0.01)
B7	7.25(0.13)	6.21(0.02)	4.89(0.10)	4.23(0.01)	4.05(0.12)
B8	7.06(0.02)	5.89(0.03)	5.76(0.08)	5.16(0.10)	4.86(0.02)
B9	6.99(0.02)	5.76(0.03)	5.75(0.01)	5.03(0.05)	5.02(0.02)
B10	7.03(0.02)	6.05(0.10)	6.00(0.05)	5.12(0.04)	4.89(0.02)
B11	7.00(0.02)	6.20(0.02)	6.10(0.02)	6.00(0.04)	5.15(0.01)
B12	7.11(0.02)	6.26(0.04)	6.05(0.02)	4.80(0.01)	4.20(0.02)
B13	7.10(0.01)	6.02(0.03)	5.75(0.02)	4.32(0.04)	3.86(0.02)
B.Bif 2952	7.77(0.03)	6.03(0.04)	5.99(0.02)	5.86(0.01)	5.02(0.02)

Todas las cepas de *Bifidobacterium animalis/lactis* perdieron viabilidad justo en el mismo instante de su exposición a los jugos gastrointestinales debido al shock ácido y básico causado por la acción inmediata de los jugos. Esta respuesta es más acusada frente a la acción del jugo gástrico, pepsina fundamentalmente (pH 2.0).

Los porcentajes de viabilidad se calculan como la relación entre el número de células viables obtenidas a distintos tiempos y frente a los jugos gastrointestinales frente al número de viables del control que es el inóculo (10^8 - 10^9 células/ml). La viabilidad frente a pH ácido se sitúa, en general, para todas las cepas en torno al 85-75% y este porcentaje decrece con el tiempo de exposición a este jugo, siendo la viabilidad del orden de 75-25% tras 180 min de exposición. Las cepas B4, B5, B8 y B11 son las que mejor toleran la exposición a pH ácido y su viabilidad tras 180 min de exposición es del orden del 75%. Este hecho contrasta con la alta sensibilidad de las cepas B1, B3 y B9 cuya viabilidad disminuye considerablemente ($P < 0.05$) hasta valores del orden del 25%, presentando una pérdida de viabilidad del 50% aproximadamente. Como puede observarse de nuestros resultados la tolerancia a condiciones de estrés es dependiente de cada cepa. (Ver Fig. 2).

Los porcentajes de tolerancia a las sales biliares del intestino se calcularon de la misma forma que para los jugos gástricos. En general, se observa que las bifidobacterias toleran mucho mejor las condiciones del tránsito intestinal, todas las cepas estudiadas presentan una viabilidad del orden del 90% a excepción de la cepa B3 que presenta un 60% de viabilidad en el justo momento de su exposición a la bilis. Tras 360 min de exposición a los jugos intestinales la viabilidad se mantiene en general del orden del 80-60% con la excepción de las cepas B3 y B5 que presentan viabilidades $< 30\%$. (ver Fig.2).

La respuesta frente al estrés ácido es dependiente de cada cepa aun cuando estas pertenecen a la misma especie *B.animalis/lactis*. (ver capítulo 1).

Los resultados de la viabilidad acumulada (viabilidad celular al final del intestino) se muestran en la Tabla 1. La cepa B7 demuestra una buena resistencia a ambos jugos gastrointestinales con unos porcentajes de supervivencia de 50% y 55% a los jugos gástricos e intestinales respectivamente, lo que implica que entre el 27-30% de las células podrían llegar vivas al final del intestino, estos porcentajes se

corresponden con los descritos por otros autores como el porcentaje de células que puede ejercer efecto beneficiosos para la salud.

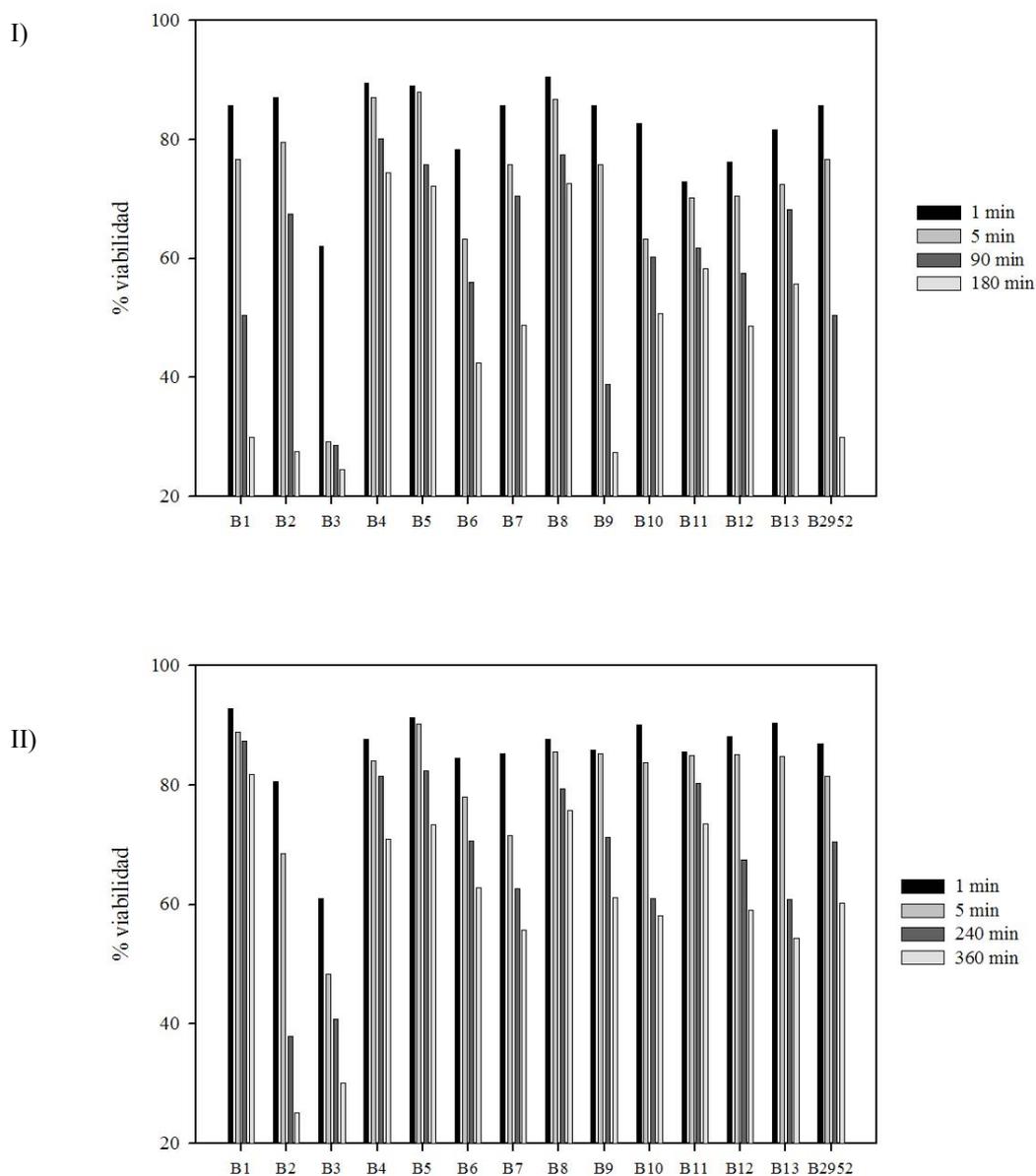


Figura 2. Porcentajes de viabilidad celular al tránsito gastrointestinal. I) frente pepsina (pH 2.0) y II) frente a pancreatina (pH 8.0).

Sin embargo, las cepas de los productos B1, B3 y B9 muestran una mayor sensibilidad a los jugos gástricos. B2 y B3 también son muy sensibles a los jugos intestinales. La viabilidad final de estas cepas a través del intestino humano se ha calculado y se muestra en la Tabla 1.

La mayoría de las cepas son resistentes a los jugos intestinales y no muestran una reducción en la viabilidad después de 4 horas. Las cepas de *Bifidobacterium* B4, B5, B8 y B11 fueron las más resistentes frente a la acción de los jugos gastrointestinales presentando altos porcentajes de viabilidad 58-50% después de la exposición durante 3 horas a pepsina y 6 horas a pancreatina. De otro lado, las cepas B2 y B3 fueron las más sensibles a la acción de los jugos mostrando una viabilidad menor del 25% tras 360 min de exposición a los jugos. La viabilidad de las cepas comerciales identificadas como *Bifidobacterium lactis* (ver capítulo 1) al tránsito gastrointestinal es superior a la viabilidad de la cepa de referencia *Bifidobacterium bifidum*.

La comparación de la supervivencia de las bifidobacterias nos indica que existen diferencias en la viabilidad de los productos lácteos analizados. Estos resultados demuestran que las bifidobacterias son más sensibles a los jugos gástricos, pH ácidos que a los jugos intestinales, pH básicos. Estos resultados demuestran que únicamente las células resistentes podrían sobrevivir al tránsito gastrointestinal y llegar vivas al final de intestino para ejercer su efecto beneficioso. De este modo, la selección de cepas tolerantes a medios ácidos es necesaria para la elaboración de productos probióticos. La cantidad de inóculo en el producto debe variar en función de la resistencia a condiciones ácidas.

Por todo ello, es necesario que el contenido inicial de bifidobacterias en las leches fermentadas comerciales sea lo suficientemente elevado, en torno a 10^6 - 10^7 células viables por gramo de producto, para que sobrevivan al tránsito gastrointestinal y lleguen vivas al intestino donde ejercerán sus efectos beneficiosos sobre el consumidor. La viabilidad de las bifidobacterias comerciales se ve muy afectada por los jugos gástricos (pH ácidos) pero las cepas testadas toleran en mayor o menor medida estas condiciones, el problema podría ser el bajo contenido en bifidobacterias de algunos productos comerciales, ya que el bajo número y la baja viabilidad a condiciones ácidas limitan o merman el efecto probiótico de dichos productos. Por esta razón, los fabricantes deberían proveer cepas ácido resistente en elevado número al elaborar estos productos probióticos.

4. DISCUSIÓN

Este estudio compara el efecto de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de 13 cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales durante su exposición 180 min a las condiciones gástricas y 360 min a las condiciones intestinales. En general todas las bifidobacterias estudiadas resultan más sensibles a los jugos gástricos que a los intestinales. Estos resultados muestran que el paso de estas bacterias por la cavidad gástrica es crítico para que estas 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.

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 bifidobacterias 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.

Las técnicas de recuento total (vivas y muertas) mediante la tinción con los fluorocromos SYTO9 y yoduro de propidio, proporciona un porcentaje real de supervivencia de bifidobacterias ya que permite también detectar las bacterias viables no cultivables que no podrían detectarse mediante cultivo en placa y que sin embargo pueden ejercer la misma función beneficiosa. Además, los resultados mediante esta técnica pueden obtenerse en menos de una hora mientras que las técnicas tradicionales de cultivo tardan 2-3 días.

Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de las cepas son intrínsecamente tolerantes tanto a la pepsina como a la pancreatina y por tanto podrían atravesar el tracto digestivo, sobre todo ayudada por la protección que ofrecen los otros componentes de la leche fermentada. Su tolerancia a los jugos intestinales indica que podría colonizar el epitelio intestinal y ejercer sus efectos como probióticos.

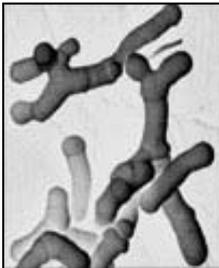
El pH podría ser empleado como una medida apropiada para la selección de cepas probióticas. La presencia de ingredientes alimenticios o los propios alimentos ejercen de protección de los microorganismos probióticos durante su tránsito gastrointestinal cuando son consumidos a través de productos alimenticios,

aumentando de este modo la viabilidad de los mismos frente a condiciones gastrointestinales (Charteris *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Huang y Adams, 2004).

La mejora de la viabilidad de los microorganismos durante su tránsito simulado a través del estómago (pH 2.0) con la adición de alimentos podría indicar que las cepas probióticas con baja tolerancia a las condiciones ácidas no deberían ser excluidas de las aplicaciones probióticas, ya que podrían llegar al intestino en elevado número como parte de un alimento o liofilizados en cápsulas (Huang y Adams, 2004).

La tolerancia al tránsito intestinal es también muy importante para la que las cepas probióticas puedan colonizar el intestino. La mayoría de las cepas testadas en este estudio han demostrado su elevada capacidad frente a las condiciones intestinales ya que no presentan pérdidas de viabilidad significativas tras exposición durante 360 min a la pancreatina (Tabla 1). Únicamente las cepas B3 y B2 presentan disminuciones de entre 3 y 4 unidades logarítmicas.

En este estudio se ha de mostrado que la viabilidad de algunas cepas de bifidobacterias aisladas de productos lácteos comerciales no se ve afectada significativamente por la acción de los jugos gástricos; todas las cepas, a excepción de la B2 y B3, poseen la capacidad suficiente para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales.



CAPÍTULO 4

Detección molecular de la especie *Bifidobacterium animalis/lactis* en heces humanas. Estudio *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de microorganismos vivos como coadyuvantes de la dieta o “probióticos” esta sujeto a un intenso y creciente interés. Los organismos empleados como probióticos son principalmente bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, que son además uno de los principales componentes de la microflora intestinal humana (Simon y Gorbach, 1986). La contribución de estas bacterias a la salud humana ha sido reconocida durante mucho tiempo y ha propiciado su empleo como probióticos en el mantenimiento y prevención de la salud humana y animal (Stanton *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 1996; Rafter, 1995). Este creciente interés sobre los efectos beneficiosos ha hecho que se incluyan en la elaboración de alimentos, fundamentalmente de productos lácteos y se haya incrementado su ingesta (Puhan, 1990). Se sugiere que para que un probiótico ejerza sus efectos beneficiosos debe llegar al intestino en cierta cantidad, para que puedan ser capaces de adherirse, implantarse o multiplicarse en el tracto intestinal (Bouhnik, 1993). Este hecho requiere el desarrollo de técnicas de control de calidad para cuantificar la cantidad de microorganismos probióticos que un producto contiene, su capacidad para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales para poder llegar vivos al final del intestino. Por esta razón, son necesarias técnicas de identificación de microorganismos probióticos a nivel de especie y cepa, técnicas de identificación adecuadas que podrían ayudar a monitorizar el progreso de la población de cepas probióticas a través del tracto gastrointestinal humano.

Para mejorar la eficiencia de los métodos de detección y enumeración, existen en la actualidad una gran cantidad de técnicas moleculares que nos podrían ayudar. Existen muchas técnicas basadas en el análisis de DNA como las técnicas basadas en la PCR, destacando, las múltiplex PCR, PCR específicas de género y especie, RAPD-PCR, RFLPs, electroforesis en gradiente térmico (TGGE), electroforesis desnaturizante (DGGE) y otras muchas han sido empleadas para comparar e identificar las bacterias aisladas de productos lácteos y aisladas muestras fecales humanas (Mangin *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1996; Charteris *et al.*, 1997; Vincent *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2001; Ingrassia *et al.*, 2001; O’Sullivan, 1999; Sakotari *et al.*, 2003; Temmerman *et al.*, 2003; Gueimonde *et al.*, 2004). También,

la hibridación del rRNA mediante sondas está siendo ampliamente empleado para la detección de grupos específicos bacterianos en poblaciones heterogéneas (Amann *et al.*, 1995). Las bifidobacterias también se han cuantificado mediante el empleo del microscopio de epifluorescencia gracias a la hibridación *in situ* (FISH) con sondas específicas de género (Amann *et al.*, 1990; Franks *et al.*, 1998). El análisis de la secuencia del 16S rRNA es una potente y adecuada herramienta para determinar las relaciones filogenéticas entre bacterias y también, esta siendo muy empleada para determinar las relaciones inter- e intra- géneros (Charteris *et al.*, 1997). El análisis de los fragmentos de restricción generados por la digestión de fragmentos de DNA amplificados por PCR (RFLP) también llamado ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), es una herramienta adecuada, rápida y reproducible para la identificación de bacterias del género *Bifidobacterium* aisladas de diversos ambientes (Ventura *et al.*, 2001), y aun más cuando el fragmento que se amplifica es el 16S del rRNA. Dadas las dificultades en la obtención de datos que evidencien los supuestos efectos beneficiosos de la ingesta de bifidobacterias exógenas a través de distintos vehículos, destacando las leches fermentadas y/u otros productos lácteos, existe una gran especulación y se pone en entredicho el posible empleo de estos alimentos como profilácticos y/o terapéuticos. Una de las mayores dificultades es la presencia en el organismo humano de bifidobacterias endógenas que habitan el tracto gastrointestinal, con lo que complica la tarea de diferenciar estas bifidobacterias de las ingeridas (exógenas) y demostrar que las exógenas son capaces de atravesar el tracto gastrointestinal y sobrevivir a dichas condiciones con el fin de llegar vivas al intestino y ser capaces de adherirse e implantarse para ejercer de esta manera sus efectos sobre la salud.

Este capítulo describe los resultados de un estudio *in vivo* con individuos sanos a los que se les administró durante un periodo de tiempo una leche fermentada con bifidobacterias. Nuestro objetivo es demostrar que las bifidobacterias contenida en el producto lácteo es capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal para ello, se emplearán diversos métodos tales como las técnicas de cultivo en medios selectivos, técnicas moleculares basadas en la amplificación de gen 16S rRNA específico del género *Bifidobacterium* y su posterior digestión con enzimas de restricción con el fin de poder diferenciar la bifidobacteria del producto

de las bifidobacterias endógenas y además, el uso de sondas específicas de la región del 16S rRNA a nivel de género *Bifidobacterium* y de especie *B.animalis/lactis* con el fin de monitorizar las bifidobacterias, totales y específicas (de la leche fermentada ingerida) en las heces de los individuos sometidos a estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas estudiadas

Se escogió la cepa *Bifidobacterium animalis/lactis* contenida en la leche fermentada comercial B7 para realizar el estudio *in vivo* porque es el producto con mayor contenido en bifidobacterias entre todos los analizados y porque presentaba unos buenos porcentajes de viabilidad frente a los jugos gastrointestinales (Ver capítulo 1 y 3), también se emplearon cuatro cepas de referencia, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 2952, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* ATCC 11842 y bacterias pertenecientes aisladas de las leches fermentadas con bifidobacterias comerciales analizadas en el capítulo 1 para la puesta a punto de las técnicas y validación de las sondas. Todas estas cepas fueron empleadas comprobar la especificidad de las técnicas moleculares. Las cepas fueron cultivadas en TPY y MRS agar bajo condiciones anaerobias a 37°C durante 24-48 h.

2.2. Individuos y administración de la leche fermentada

Doce voluntarios sanos (6 mujeres y 6 hombres), entre 25 y 60 años de edad (media 45.4 años) participaron en el estudio. La duración del estudio fue de 3 meses, con tres periodos diferenciados: (periodo control) 4 semanas sin ingestión de ninguna leche fermentada con bifidobacterias ni ningún otro producto lácteo; (periodo de administración) 4 semanas en las que se administra la leche fermentada con *B.animalis/lactis*; (periodo post-administración) 4 semanas sin administrar leche fermentada con bifidobacteria. El control positivo consumió leche fermentada durante todo el estudio incluyendo el periodo de control mientras que el control negativo no ingirió el producto en ningún periodo. Se administró diariamente a 10 individuos 250 ml de una leche fermentada con *B.animalis*, el numero de bifidobacterias viables en el producto fue mayor de 1.4×10^8 células/ml. Durante el

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

2.3. Análisis de las muestras fecales

Se realizaron un total de ocho tomas de muestra durante las 12 semanas que duró el ensayo tal y como se señala en la figura 1. Todas las muestras fueron recogidas en fresco y almacenadas en recipientes estériles de plástico, refrigeradas y transportadas inmediatamente al laboratorio para procesarlas con la mayor brevedad.

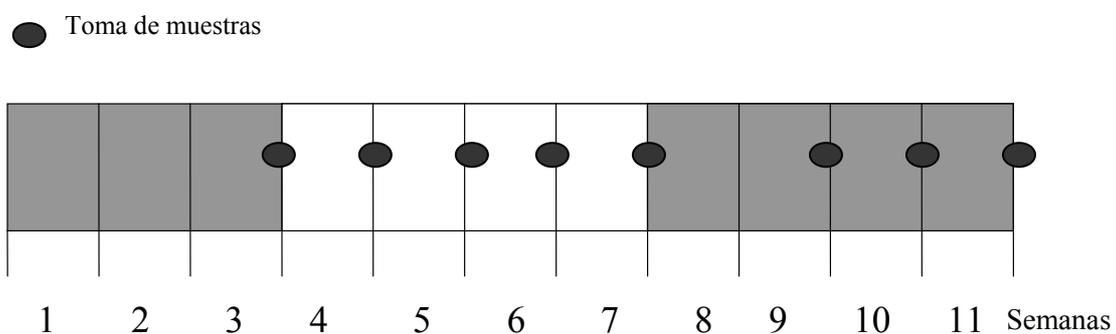


Figura 1. Calendario de toma de muestra de heces en todos los individuos sometidos al estudio *in vivo*. Periodo de no ingesta ■ , periodo de ingesta □

Las muestras de heces se atemperan y se toman 2 gramos de muestra de cada individuo y se homogenizan en tampón fosfato (PBS 1X). Se realizaron diluciones seriadas por duplicado hasta 10^{-8} de los homogenizados de las muestras fecales y se realizó el recuento en placa en medios de cultivo apropiados para cada una de las bacterias a estudiar.

2.4. Recuentos en placa

Las bifidobacterias fueron enumeradas en BFM Agar (Nebra y Blanch, 1999) y tras incubación en condiciones anaerobias a 37°C durante 72 h. *Enterobacteraceae* fueron enumeradas empleando McConckey (Merck) agar e incubadas en

condiciones aerobias a 37°C durante 24 h. Los recuentos se realizaron por triplicado, los resultados se calcularon como la media de los tres recuentos y fueron expresados como logaritmo del número de UFC por gramo de heces frescas. Después de la incubación, 10-12 colonias de BFM agar fueron seleccionadas y resembradas en el mismo medio. Las colonias fueron sometidas a tinción Gram y se comprobó la morfología característica de las bifidobacterias.

2.5. Sondas para detección de bifidobacterias

Se diseñó una sonda específica para la especie *Bifidobacterium animalis/lactis* basándonos en el análisis comparativo de las secuencias RNA ribosómico 16S del género *Bifidobacterium* contenidas en las bases de datos RDP (Ribosomal Data Project II) y GeneBank/EMBL. Se comprobó la especificidad teórica de la sonda Bifa1, 5'- CGT GTC TCC ACG GCG AT -3', correspondiéndose la secuencia con una región del 16S de la especie *Bifidobacterium* contenida en el producto B7. Asimismo, la especificidad se valoró *in situ* mediante la hibridación de la sonda con una batería de cepas pertenecientes a distintas especies de LAB (aisladas de producto, heces y de referencia) y con otras especies de bifidobacterias. La sonda Bif662 específica del género *Bifidobacterium* fue empleada como sonda para el recuento total de bifidobacterias contenidas en las muestras fecales (Langendijk *et al.*, 1995).

2	cgtgtctccacggcgat	18	Bif a1
988	cgtgtctccacggcgat	972	<i>B. animalis</i> 16S rRNA gene
1001	cgtgtctccacggcgat	985	<i>B.lactis</i> 16S rRNA gene

1	ccaccgttacaccgggaa	18	Bif 662
678	ccaccgttacaccgggaa	661	<i>Bifidobacterium</i> spp.

La sonda universal EUB 338, complementaria a la región 16S rRNA del dominio *Bacteria* (Amann *et al.*, 1995), fue empleada como control positivo para todas las bacterias presentes en la muestra. Las sondas fueron sintetizadas y

marcadas con FICT (fluorescencia verde) y CY3 (fluorescencia roja) por MOLBIOL (Berlin, Alemania).

2.6. Condiciones de hibridación *in situ* FISH

Para testar las sondas se toma 1 ml de los cultivos bacterianos en crecimiento exponencial se centrifuga (1000 rpm a 4°C durante 10 min), el pellet se resuspende en tampón PBS, y se fija en tres volúmenes de paraformaldehído (4%) a 4°C durante 2 horas. A continuación las muestras fijadas se centrifugan de nuevo y se lavan con tampón PBS, para finalmente resuspenderlas en una solución 1:1 PBS/etanol (vol/vol). Para las muestras fecales se toma 1 ml de la primera dilución y se fija con PFA (4%) en refrigeración toda la noche. Las muestras una vez fijadas se almacenan a -20°C.

Una alícuota de 5 µl de células fijadas fue depositada en un portaobjetos de hibridación recubierto de gelatina para facilitar la adhesión de las células, se dejan secar a temperatura ambiente y a continuación se deshidratan con alcohol (50, 80, 100% etanol) y se realiza la hibridación según Amann *et al.* (1995). Para aumentar la hibridación específica de la sonda la concentración de formamida se estableció en un 20 % en el tampón de hibridación (0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6). Finalmente, una vez realizada la hibridación, los portaobjetos se enjuagan con agua destilada, se secan en oscuridad y se procede a observar la muestra al microscopio, para ello se coloca en el portaobjetos una gota del reactivo FluoroGuard™ Antifade Reagent (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Los portaobjetos se examinaron bajo el microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 equipado con los filtros U-MWIB y U-MWIG. Se contaron veinte campos por muestra, las fotografías en color se realizaron con la cámara digital PM10SP camera (Olympus Optical CO., Alemania).

2.7. Identificación molecular de *Bifidobacterium spp* aislados

Las colonias con características positivas de bifidobacterias se subcultivaron en medio TPY para obtener masa y realizar la extracción del DNA de acuerdo con el procedimiento de descrito en el capítulo 1, pag. 48.

Los aislados fueron identificados mediante la amplificación por PCR de un fragmento específico del gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* según Kaufmann *et al.*, (1997). (Ver capítulo 1, pag. 46).

Los aislados positivos fueron sometidos a la digestión del fragmento amplificado con enzimas de restricción según la técnica ARDRA (ver capítulo 1, pag. 51). Para ello, 10 µl del DNA amplificado se digirió con 10 U de las enzimas de restricción *MboI* (Fermentas) en un volumen final de 20 µl a 37°C durante toda la noche. La digestión se visualizó en un gel de electroforesis al 3% de agarosa en tampón TAE tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualización bajo luz UV.

3. RESULTADOS

3.1. Examen de las muestras fecales

3.1.1. Recuentos en placa

Todas las colonias crecidas en BFM (Nebra y Blanch, 1999) fueron identificadas morfológicamente como bifidobacterias y se seleccionaron 12 colonias de cada placa e individuo para su posterior análisis por técnicas moleculares. El contenido en bifidobacterias del producto B7 fue de 10^7 - 10^8 bifidobacterias/ml. Los efectos de la ingesta de *Bifidobacterium animalis/lactis* en la población de bifidobacterias y enterobacterias endógenas se muestran en la tabla 1.

El número de bifidobacterias en el periodo control fue de 6.22 ± 0.34 log UFC/g (media \pm desviación estándar) para todos los individuos expresado como el valor medio de los 10 individuos sometidos a ensayo. Los recuentos para el control positivo fue de 7.70 ± 0.42 log UFC bifidobacteria por gramo y 7.34 ± 0.42 log UFC enterobacteria por gramo, mientras que para el control negativo fue de 6.98 ± 0.24 log UFC bifidobacteria por gramo y 7.12 ± 0.24 log UFC enterobacteria por gramo de muestra fecal.

Tabla 1. Concentraciones totales de bifidobacterias y enterobacterias en diez individuos sometidos al ensayo antes, durante y después de la ingesta de 250 ml diarios de leche fermentada con *Bifidobacterium animalis* DN-173010. Media \pm S.D. (desviación estándar).

Tiempo (semanas)	Recuentos en placa (log UFC/g)	
	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Enterobacteraceae</i>
Periodo control	6.22 \pm 0.34	6.86 \pm 0.64
1 semana de administración	8.45 \pm 0.71 ^a	6.36 \pm 1.11
2 semanas de administración	8.09 \pm 0.70 ^a	6.06 \pm 0.86 ^b
3 semanas de administración	8.70 \pm 0.78 ^a	6.25 \pm 0.89 ^b
4 semanas de administración	8.86 \pm 0.44 ^a	6.10 \pm 1.25 ^b
3 semanas de no administración	8.35 \pm 0.37 ^a	7.37 \pm 1.36 ^a
4 semanas de no administración	6.95 \pm 3.71	7.39 \pm 0.54 ^a

^asignificativamente superior que el periodo control ($P < 0.05$)

^bsignificativamente inferior al periodo control ($P < 0.05$)

Durante el periodo de consumo de la leche fermentada se detectó un importante incremento en el número de bifidobacterias en placa (BFM agar) y también se observó una disminución en los recuentos de bifidobacterias tras la interrupción del consumo de la leche fermentada, obteniéndose resultados similares a los del periodo control. El número de enterobacterias varia e a lo largo del experimento dependiendo del individuo. El número de enterobacterias aumenta significativamente ($P < 0.05$) cuando la ingestión de *B. animalis/lactis* cesa.

3.1.2. Recuentos mediante FISH

Las muestras fijadas se procesaron para el análisis mediante hibridación *in situ*. Se empleó la sonda específica de género Bif662 para el recuento total de bifidobacterias por FISH y la sonda específica Bifa1 para la especie *B. animalis/lactis* contenida en la leche fermentada B7 empleada en este estudio. La media total de bifidobacterias en el periodo control fue de 8.81 ± 0.60 log células/ml (media \pm desviación estándar), este número depende de cada individuo. Los resultados obtenidos para cada individuo en el periodo control se muestran en la tabla 2. La leche fermentada contiene del orden de 10^7 - 10^8 células de *Bifidobacterium animalis/lactis* por gramo, y todas ellas dieron señal positiva con las sondas Bif662 y Bifa1.

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante las técnicas de recuento en placa e hibridación *in situ* con las sondas Bif 662 (género *Bifidobacterium*) y Bif a1 (especies *B. animalis/lactis*) en el periodo control (4 semanas sin ingestión de la leche fermentada). ^{A)} media (SEM, Error estándar de la media)

		Periodo Control Log células/ml	
Individuos		Bifidobacteria Bif662 (n=20)	Bifidobacteria Bif a1 (n=20)
Individuo A	Hombre	9.03 (0.12)	-
Individuo B	Hombre	9.00 (0.99)	-
Individuo C	Hombre	8.08 (1.87)	-
Individuo D	Hombre	8.93 (0.42)	-
Individuo E	Hombre	8.51 (0.28)	-
Individuo F	Hombre	8.98 (0.65)	-
Individuo G	Mujer	9.41 (1.07)	-
Individuo H	Mujer	9.45 (1.38)	-
Individuo I	Mujer	9.20 (0.94)	-
Individuo J	Mujer	7.56 (0.39)	-
Control +	Hombre	8.53 (0.38)	8.68 (1.43)
Control -	Mujer	8.36 (1.87)	-

El límite de detección de la técnica FISH para la cepa *Bifidobacterium animalis* fue de 10^4 células por gramo. Durante todo el estudio también se monitorizaron los controles positivo y negativo. Para el control positivo la mayoría de las bifidobacterias hibridaron con las sondas Bif662 y Bifa1, mientras que para el control negativo únicamente dio señal positiva para la sonda Bif662 pero no para la específica Bifa1. La hibridación de la especie *Bifidobacterium animalis*, contenida en la leche fermentada comercial analizada, se muestra en las figuras 2 y 3.

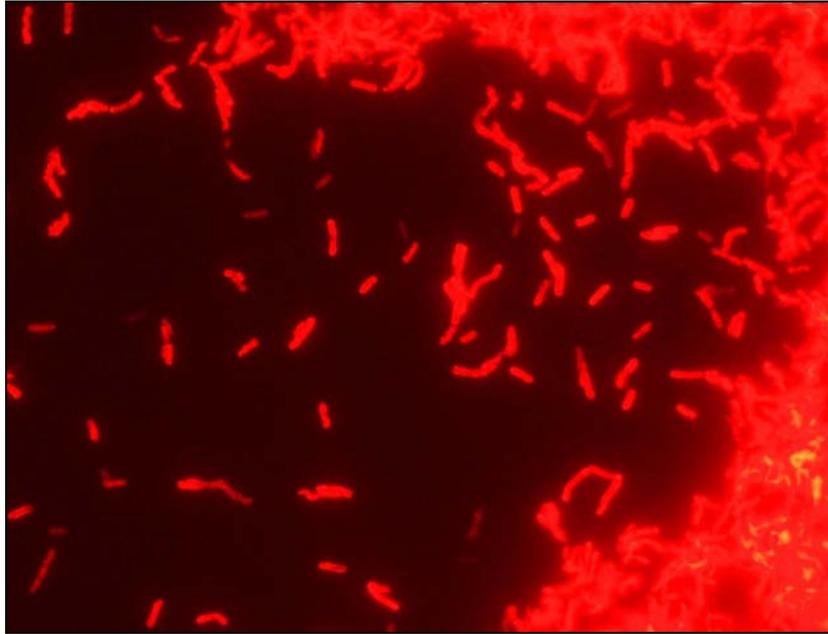


Figura 2. Hibridación de *Bifidobacterium animalis/lactis* procedente de la leche fermentada comercial con la sonda Bifa1 marcada con rodamina.

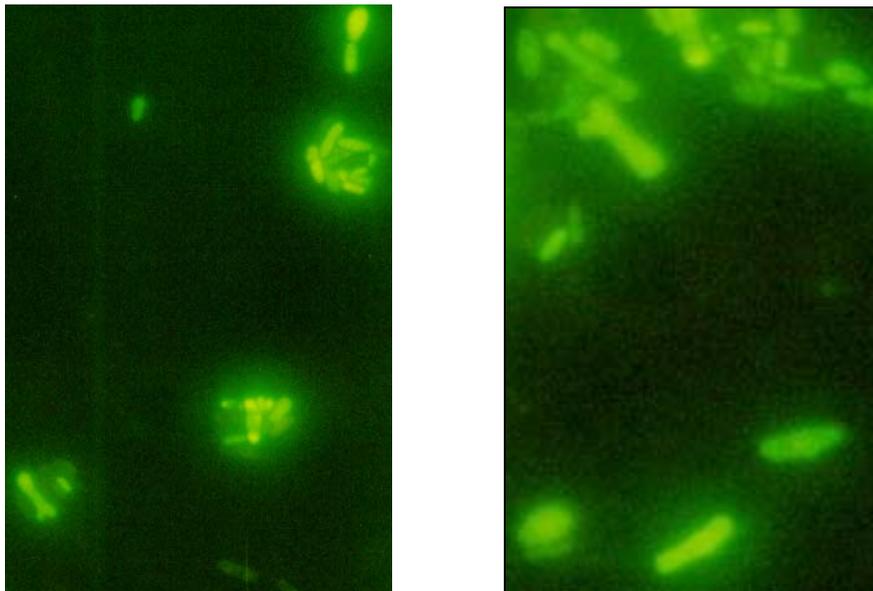


Figura 3. Hibridación de *Bifidobacterium animalis/lactis* procedente de la leche fermentada comercial con la sonda B662 marcada con fluoresceína.

A pesar del hecho que las muestras fecales mostraban un fondo de fluorescencia no específico, las células de *Bifidobacterium* podían visualizarse fácilmente. Los recuentos de bifidobacterias durante el estudio *in vivo* obtenido mediante la técnica FISH para cada uno de los individuos se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Recuentos con las sondas Bif662 y Bifal para cada individuo durante todo el estudio. Resultados expresados como la media (error estándar).

Log <i>Bifidobacterium</i> células/ml												
	1 semana ingestión		2 semana ingestión		3 semanas ingestión		4 semanas ingestión		2 semanas no ingestión		3 semanas no ingestión	
	Bif662	Bif al	Bif662	Bif al	Bif662	Bif al	Bif662	Bif al	Bif662	Bif al	Bif662	Bif al
A	9.44 (0.32) ^A	-	9.02 (1.00) ^A	8.66 (0.50)	9.55 (0.36)	8.85 (0.13)	10.24 (1.20) ^A	9.77 (0.46)	10.00 (0.93)	8.90 (0.27)	9.54 (0.06) ^A	8.06 (0.33)
B	9.57 (0.44)	-	9.59 (2.56)	8.28 (0.34)	11.00 (0.67)	9.91 (0.89)	10.50 (0.74)	9.62 (0.62)	10.48 (1.77)	8.69 (0.13)	-	-
C	9.39 (0.23)	-	9.23 (1.25)	8.67 (0.57)	10.61 (2.63)	10.14 (1.32)	10.77 (0.59)	9.49 (0.30)	10.42 (0.42)	8.86 (0.15)	9.04 (0.04)	6.83 (0.11)
D	9.18 (0.40)	-	9.63 (2.80)	8.74 (0.75)	10.86 (0.26)	10.60 (4.90)	10.32 (1.63)	9.56 (0.34)	9.90 (0.57)	8.56 (0.14)	8.80 (0.06)	7.46 (0.17)
E	9.57 (3.61)	-	10.16 (0.64)	8.64 (0.51)	11.09 (0.79)	9.81 (0.62)	11.51 (1.06)	9.68 (0.36)	10.87 (0.85)	8.31 (0.16)	10.89 (0.02)	8.23 (0.02)
F	10.20 (0.30)	-	10.67 (0.25)	9.48 (0.34)	10.34 (2.29)	10.05 (1.70)	10.65 (1.45)	9.97 (0.67)	10.33 (1.22)	8.61 (0.18)	10.60 (0.02)	8.19 (0.06)
G	10.23 (1.70)	-	10.82 (0.09)	9.41 (0.25)	10.78 (1.81)	9.79 (0.48)	10.87 (0.28)	9.36 (0.17)	11.10 (0.85)	8.61 (0.14)	10.99 (0.05)	8.61 (0.10)
H	10.54 (3.20)	-	10.78 (0.40)	9.52 (0.26)	10.54 (1.56)	9.74 (1.75)	10.90 (0.70)	9.84 (0.55)	10.14 (0.99)	9.19 (0.13)	11.08 (0.02)	8.89 (0.06)
I	-	-	9.78 (0.01)	8.52 (0.43)	9.09 (0.40)	8.79 (0.28)	9.89 (0.53)	9.27 (0.30)	10.01 (0.76)	8.49 (0.11)	10.09 (0.03)	8.31 (0.09)
J	9.21 (0.23)	-	8.48 (0.28)	7.95 (0.19)	9.87 (1.73)	9.74 (1.55)	8.44 (0.26)	8.19 (0.30)	-	-	-	-
Control +	8.53 (0.94)	8.59 (0.11)	9.00 (1.64)	8.68 (0.83)	9.63 (0.86)	9.57 (0.70)	9.74 (0.49)	9.62 (0.39)	9.16 (0.47)	9.16 (0.47)	9.31 (0.08)	9.16 (0.07)
Control -	8.13 (0.33)	-	8.69 (1.17)	-	8.83 (1.56)	-	8.37 (1.70)	-	7.68 (0.49)	-	8.20 (0.50)	-

Tras dos semanas de administración la leche fermentada, la cantidad de bifidobacterias procedentes del producto obtenida con la sonda específica Bifa1 resultó de un orden menor que la obtenida mediante la sonda Bif662 (Tabla 3 y figura 4), excepto para el control + donde todas las bifidobacterias que hibridaban con la sonda Bif662 también lo hacían con la sonda Bifa1, por tanto en su mayoría procedían del producto. En todas las muestras se observa un incremento de las bifidobacterias endógenas y exógenas durante el periodo de ingesta de la leche fermentada comercial.

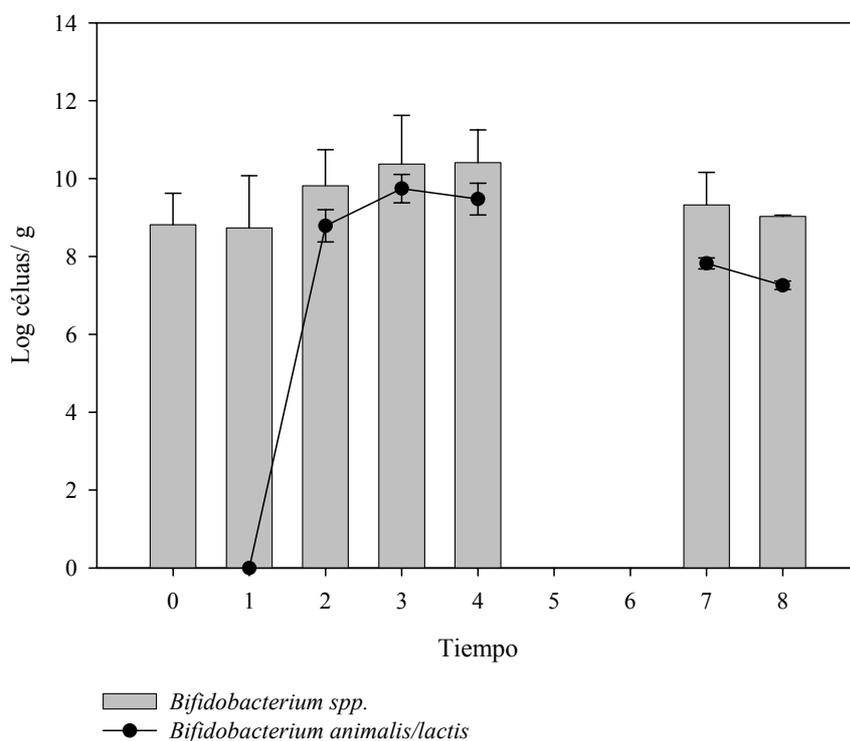


Figura 4. Recuento total de bifidobacterias y recuento específico de *B. animalis/lactis* (células/g) mediante FISH tras consumo de la cepa *B. animalis/lactis* contenida en la leche fermentada comercial B7. 0 Control período; 1°, 2°, 3°, 4° semanas (período de ingesta), y 5ª, 6ª, 7ª, 8ªsemanas (período no ingesta)

A las tres semanas de consumo diario de la leche fermentada, el número de bifidobacterias exógenas había aumentado en un orden de magnitud en todos los individuos. A partir de la primera semana de ingesta se observa un incremento en los recuentos con la sonda Bifa1 para todos los individuos. Después de cesar la ingesta, se observa una disminución progresiva en los recuentos de células de la bifidobacteria contenida en el producto (Fig.4). Tras cuatro semanas de ingesta ya no nos fue posible detectar la especie *B. animalis/lactis* en las muestras fecales, este

hecho puede deberse a las limitaciones del método, sin embargo no podemos asegurar que la cepa contenida en la leche fermentada no se encuentre en las muestras fecales de los individuos ya que únicamente podemos asegurar que no la detectamos en las heces posiblemente por el límite de detección de la técnica que hemos empleado.

3.2. Recuentos en placa e hibridación *in situ* (FISH)

Los recuentos iniciales de bifidobacterias en heces empleando el medio BFM (Nebra y Blanch, 1999) como medio selectivo fueron de uno a dos ordenes menor que los obtenidos para el mismo periodo con la hibridación *in situ* (Tabla 3 y Fig.5). Estas diferencias en los recuentos de bifidobacterias empleando técnicas culturales y FISH están en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2000). Estos hechos demuestran que FISH es una técnica útil para detectar bacterias viables o viables pero no cultivables, o dañadas por las adversas circunstancias tales como el tránsito gastrointestinal.

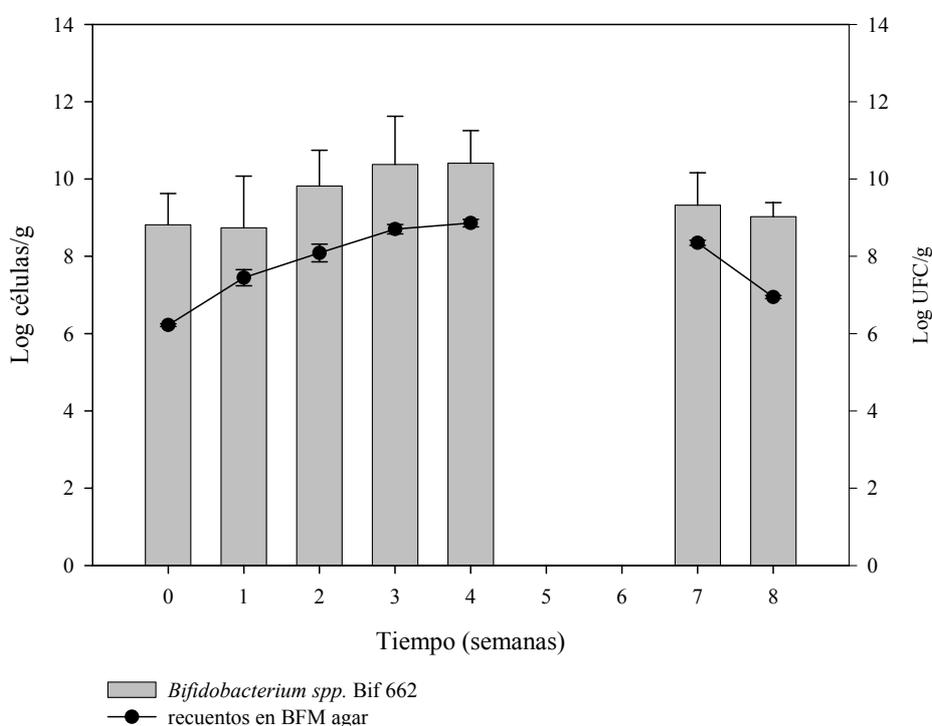


Figura 5. Recuento total de bifidobacterias, mediante el uso de la sonda Bif662 y recuentos en medio de cultivo específico, después del consumo de la cepa *B. animalis/lactis* contenida en la leche fermentada comercial. 0 Control período; 1°, 2°, 3°, 4° semanas (periodo de ingesta), y 5°, 6°, 7°, 8° semanas (periodo no ingesta)

Tanto en cultivo en placa en medio selectivo como mediante FISH se observa un progresivo incremento en el número de bifidobacterias, aunque este incremento varía en función de cada individuo. Los elevados recuentos obtenidos durante la ingesta de producto se ven disminuidos después de dos semanas de no ingestión, además esta disminución ocurre para todos los individuos. Con la aplicación de la técnica FISH a muestras humanas fecales para detectar bifidobacterias se demuestra que este grupo de bacteria podría ser enumerado con más exactitud que empleando técnicas de cultivo convencionales (Langendijk *et al.*, 1995).

3.3. Identificación molecular de *Bifidobacterium spp* aisladas de muestras fecales

Todas las cepas aisladas en BFM agar amplificaron un fragmento específico del género *Bifidobacterium* de 1.35 kb y dieron señal positiva cuando se hibridaron con la sonda Bif662 (Franks *et al.*, 1998). Se escogió la técnica ARDRA (análisis de restricción del rDNA amplificado) por ser más apropiada para la diferenciación entre las bifidobacterias a nivel de especie (Ventura *et al.*, 2001), ya que como *B.animalis/lactis* no es una especie que se encuentre de forma natural en el intestino humano se pueden diferenciar de las endógenas de cada individuo. Es una técnica molecular basada en una primera amplificación del gen del 16S del rRNA específico del género *Bifidobacterium* y una posterior digestión con enzimas de restricción genera perfiles específicos para cada especie de bifidobacteria que permiten una diferenciación interespecífica, es decir, entre especies. Se seleccionaron las enzimas de restricción *MboI* y *BamHI* para la digestión del 16S del rRNA, ya que nos permite una clara diferenciación de la cepa aislada de producto del resto de bifidobacterias. La cepa procedente del producto presento un único perfil reproducible diferente del resto de perfiles de bifidobacterias aisladas de heces (Fig.6). Las colonias que habían dado reacción positiva a la hibridación con la sonda específica Bifal presentaron el mismo perfil ARDRA que la cepa aislada de producto. Las colonias que no hibridaron con la sonda específica no presentaron el perfil característico de la cepa B7 (Fig.6).

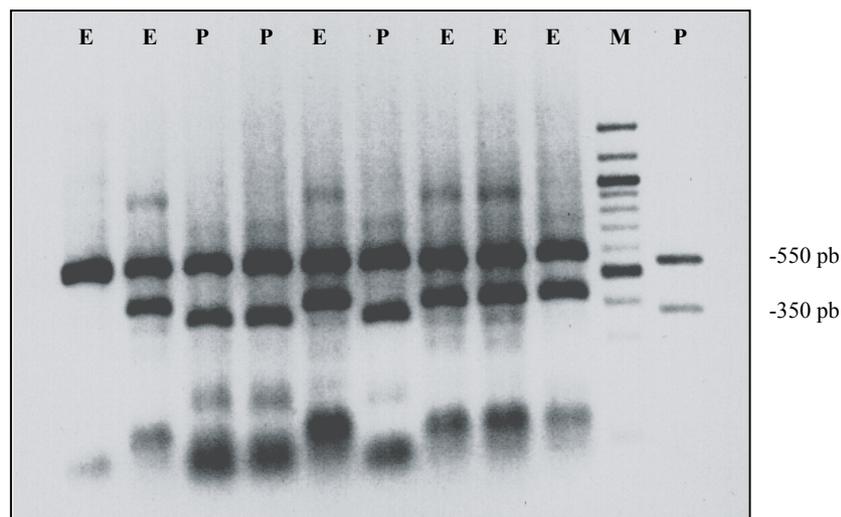


Figura 6. Restricción del 16S rRNA de *Bifidobacterium animalis/lactis* de uno de los individuos después de una semana de administración del producto. (M) marcador 100bp; (E) bifidobacterias endógenas; (P) bifidobacteria contenida en el producto.

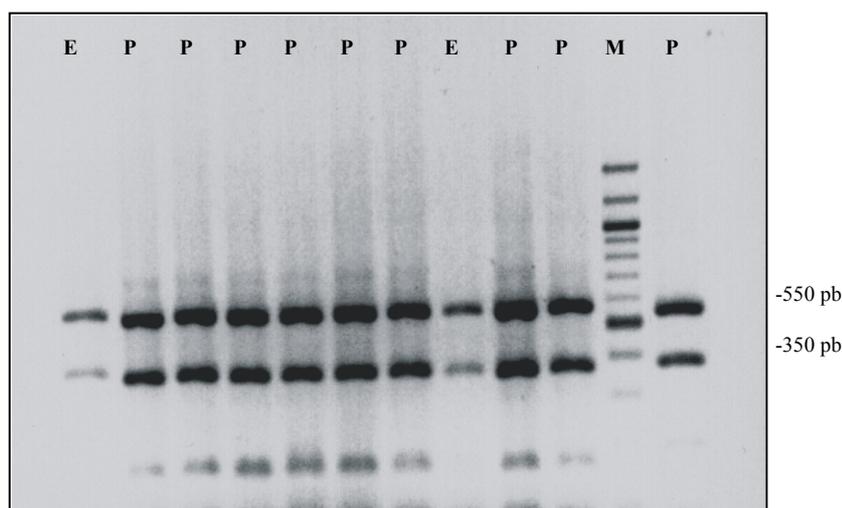


Figura 7. Restricción del 16S rRNA de *Bifidobacterium animalis/lactis* de uno de los individuos después de cuatro semanas de administración del producto. (M) marcador 100bp; (E) bifidobacterias endógenas; (P) bifidobacteria contenida en el producto.

Estos resultados demuestran que las bifidobacterias seleccionadas de las heces de los individuos que consumen la bifidobacteria B7 tienen el mismo perfil ARDRA que la cepa del producto, esto nos sugiere que la cepa B7 puede sobrevivir al tránsito gastrointestinal humano. La cepa *B.animalis/lactis* fue detectada en las heces de todos los individuos después de dos semanas de ingestión empleando técnicas moleculares e hibridación con sondas específicas. La proporción de las colonias con perfil ARDRA igual al perfil del producto aumentó rápidamente

durante el periodo de ingesta y tras cuatro semanas de ingesta fue el perfil mayoritario (Fig. 6 y 7). Sin embargo, cuando la ingesta se interrumpió, la proporción del microorganismo contenido en la leche fermentada disminuyó y no se pudo detectar tras cuatro semanas de no consume empleando las técnicas moleculares descritas en el trabajo. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos por Bouhnik *et al.* (1992).

3.4. Crecimiento de bifidobacterias endógenas favorecidas por el consumo de exógenas

Uno de los individuos durante la experiencia se vio afectado por una infección y en lugar de eliminarlo del estudio se decidió continuar con la administración de la leche fermentada con bifidobacterias para observar cual es el efecto de este producto después de un tratamiento con antibióticos. El individuo S con un contenido inicial de 9.0×10^8 bifidobacteria/g de muestra fecal fue tratado con penicilina durante dos semanas, tras las cuales el número de bifidobacterias en placa disminuyó a 10^2 UFC/g y a $<10^4$ células/g con FISH (límite de detección) ya que las bifidobacterias son sensibles a la penicilina (Charteris *et al.*, 1998; Yazid *et al.*, 2000; Kheadr *et al.*, 2004). A continuación, se le administraron 250 ml de leche fermentada por día durante 4 semanas, tras las cuales se pudo observar una rápida recuperación de las bifidobacterias endógenas durante la primera semana y las exógenas no fueron detectadas hasta la tercera semana de ingestión, este hecho puede ser debido a varias causas: i) el límite de detección de la técnica de FISH es de 10^4 células por g y el nivel de bifidobacterias exógenas puede ser menor a este límite y por eso no se detectan (Fig. 8), o ii) porque no están presentes en el intestino hasta la 3ª semana de ingesta diaria; los resultados parecen sugerir que es el límite de detección el que nos impide detectarlas antes, ya que con recuento en placa desde la primera semana de ingesta se observa un incremento en el número de bifidobacterias recuperadas en BFM agar. Este ensayo parece evidenciar el efecto beneficioso que ejercen las bifidobacterias procedentes del producto en la recuperación de la microbiota propia tras su disminución o pérdida debida a diversas causas, en este caso, tras tratamiento antibiótico.

Este pequeño estudio aporta datos significativos, aunque será necesario realizar estudios e investigaciones con un mayor número de individuos, individuos con diversos desórdenes y con más repeticiones para conseguir datos que puedan demostrar las posibilidades de empleo de las leches fermentadas con bifidobacterias en tratamiento y/o prevención de trastornos gastrointestinales y su efecto sobre la microbiota intestinal.

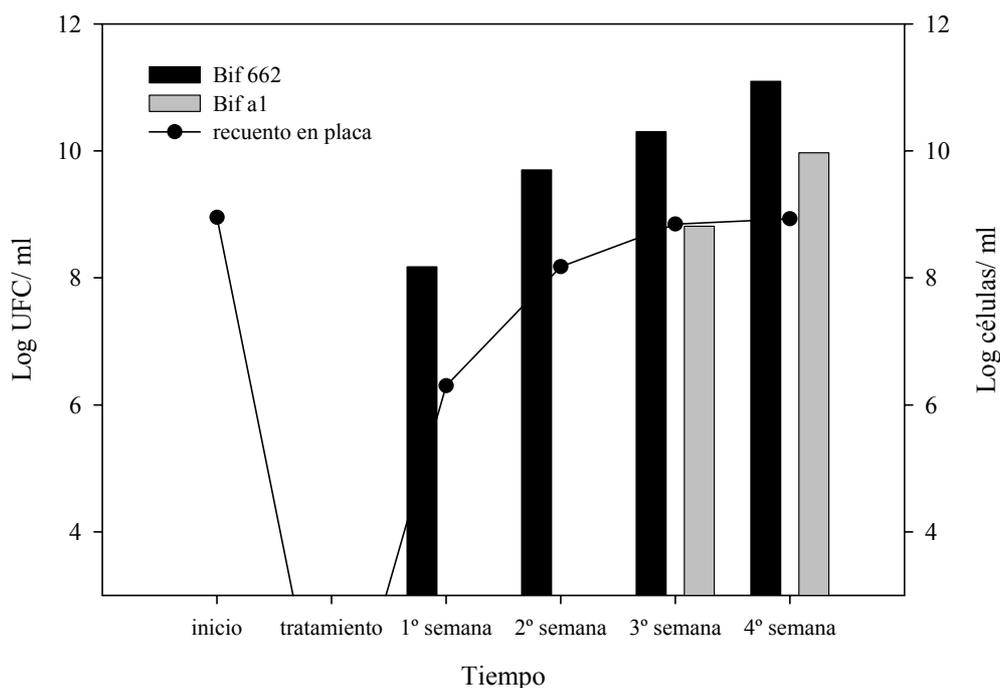


Figura 8. Recuentos de bifidobacterias en las heces del individuo tras tratamiento con penicilina y después de consumir leche fermentada con bifidobacterias durante 4 semanas, mediante técnicas culturales y FISH .

4. DISCUSIÓN

En este estudio, a diez individuos sanos se les administró de manera continuada una leche fermentada comercial con bifidobacterias seleccionada de entre las analizadas en los anteriores capítulos. Se monitorizaron las bifidobacterias contenidas en las heces de los individuos durante todo el estudio empleando técnicas tradicionales de cultivo en medios selectivos y técnicas moleculares, entre las que seleccionamos la hibridación *in situ* con sondas específicas de género y de especie y la técnica basada en la PCR denominada ARDRA que nos permitió diferenciar las bifidobacterias endógenas de cada individuo de las exógenas pertenecientes a la

especie *B.animalis/lactis*, contenidas en la leche fermentada ingerida, ya que presentan perfiles de digestión ARDRA diferentes y *B.animalis/lactis* no se encuentra de natural en la población bifidobacteriana habitual humana (ver introducción. pag. 20). Además, esta especie *B.animalis/lactis* no se encontró en la población microbiana intestinal de ninguno de los individuos sometidos a estudio.

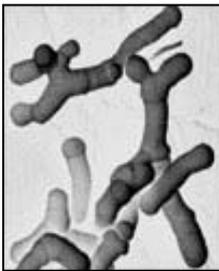
Se pudo observar un incremento en la población bifidobacteriana total tras el consumo continuado de *B.animalis/lactis* para todos los individuos, esto sugiere que dicho incremento podría ser debido al incremento por consumo de esta especie de bifidobacteria, que puede sobrevivir al tránsito gastrointestinal. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Bouhnik *et al.*, 1992; Mangin *et al.* 1994), que recuperó únicamente un 30% de las bacterias ingeridas en las muestras fecales.

La especie *B.animalis/lactis* fue detectada en las heces de todos los individuos después de dos semanas de ingesta diaria de la leche fermentada mediante el uso de las técnicas moleculares y de la hibridación con sondas específicas de especie. La proporción de colonias seleccionadas que presentaban el mismo perfil ARDRA que la especie *B.animalis/lactis* aumentó durante el estudio llegando a ser la detectada mayoritariamente tras 4 semanas de ingesta. Empleando las técnicas de cultivo en medios selectivos, se pudo observar un incremento en los recuentos totales de bifidobacterias durante el periodo de ingesta de la leche fermentada con *B.animalis/lactis*, de igual forma que se detectó con ARDRA, este hecho sugiere que el incremento en la población total de bifidobacterias podría ser debido al aumento de la especie *B.animalis/lactis* en las heces, que sugiere que esta especie es capaz de sobrevivir al tránsito gastrointestinal.

Sin embargo, cuando se cesó el consumo de *B.animalis/lactis*, la proporción de esta especie disminuyó tras 3 semanas de no ingestión la leche fermentada comercial, estos resultados son similares a los descritos por Bouhnik *et al.* (1992) y Biavati *et al.*, (1995) que observaron una disminución gradual en el recuento de bifidobacterias hasta no poder ser detectadas tras 8 días de no consumo de la bifidobacteria. Los resultados demuestran que las colonias de bifidobacterias seleccionadas de las heces de los individuos que han consumido la bifidobacteria exógena presentan el mismo perfil ARDRA que la bifidobacteria contenida en la

leche fermentada con bifidobacterias, sugiriendo que las colonias que presentan el perfil de la especie *B.animalis/lactis* son capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal. Después de 4 semanas de no consumir la leche fermentada con *B.animalis/lactis* no se pudo detectar esta especie en ninguno de los individuos, este hecho podría ser debido a que la cantidad de células de *B.animalis/lactis* es menor de los niveles que pueden detectar la técnica FISH y la técnica ARDRA, no pudiendo asegurar que esta especie no se encuentra en las heces en ese momento. Una mayor cantidad de investigaciones que emplean otras técnicas moleculares y amplíen el número de individuos son necesarias para confirmar estos resultados.

Para concluir, en este estudio se demuestra que especie *B.animalis/lactis* de la leche fermentada comercial B7, escogida para este estudio, es capaz de sobrevivir al tránsito gastrointestinal y ser detectada y recuperada viable en las heces de todos los individuos que la consumieron mediante el empleo de técnicas moleculares tales como FISH y ARDRA.



CAPÍTULO 5

Aislamiento, selección e identificación molecular de potenciales cepas probióticas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Bifidobacterium* se encuentra en el tracto gastrointestinal humano y animal y constituye una de las poblaciones predominantes del mismo (Scardovi, 1986; Biavati *et al.*, 2000) por lo que las muestras fecales de humanos y animales constituyen una fuente para aislar nuevas cepas. La identificación a nivel de género de las bifidobacterias esta siendo realizada de forma rutinaria mediante la detección de la única enzima que se encuentra implicada en la ruta de degradación de las hexosas: la fructosa-6-fosfato fosfoetolasa. Diversos métodos fenotípicos han sido descritos para diferenciar las distintas especies del género como son los perfiles de fermentación de carbohidratos (Scardovi, 1986), análisis de componentes de la pared celular, etc. Sin embargo, con estas técnicas no se obtienen resultados claros y son además, largos y pesados de realizar. Por todo ello, se están empleando técnicas moleculares, tales como los métodos basados en el análisis del DNA incluyendo la hibridación DNA-DNA, amplificación aleatoria con iniciadores inespecíficos (RAPD-PCR) (Tynkkynen *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1998), restricción de los fragmentos amplificados (RFLPs), PCR de género, múltiplex PCR, hibridación *in situ* con sondas específicas y otras técnicas, para comparar e identificar las bifidobacterias aisladas de productos lácteos y de muestras fecales humanas (Matsuki *et al.*, 1998, 1999; Ventura *et al.*, 2001, 2004).

La contribución de las bifidobacterias a la salud humana ha sido reconocida por numerosos estudios y ha dado lugar a la explotación comercial de algunas de las cepas como probióticos para mantener y/o mejorar la salud humana y animal (Gomes *et al.*, 1997; Muirhead, 2000., Stanton *et al.*, 2001) por ello es de interés para la industria la búsqueda de nuevas cepas probióticas. Ciertas revisiones describen cuales son los criterios que deben de poseer las bacterias para poder ser consideradas como probióticos (Ouwerhand *et al.*, 2000; FAO/OMS, 2002). Generalmente, es necesario que las bacterias probióticas sean capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal para poder apreciar sus efectos beneficiosos sobre la salud. La habilidad de los probióticos para sobrevivir al tránsito gastrointestinal varía considerablemente entre especies y entre cepas como ya hemos podido observar en el capítulo 3. Las condiciones ácidas del medio estomacal y los efectos

inhibitorios de las sales biliares secretadas en el duodeno son los mayores impedimentos para la supervivencia de las bifidobacterias consumidas. El porcentaje de supervivencia de las bifidobacterias a través del tracto gastrointestinal se ha estimado en torno al 30% (Charteris *et al.*, 1998). Es necesario establecer un método adecuado y rápido para evaluar la viabilidad de microorganismos con características probióticas ya que la supervivencia al tránsito gastrointestinal se considera uno de los criterios de selección de probióticos más importantes. Uno de los criterios de selección de bifidobacterias es por su tolerancia a condiciones ácidas y por la supervivencia frente a los efectos de las sales biliares producidas en el intestino. Existe una gran variabilidad en la habilidad para resistir a condiciones ácidas o a las sales biliares, parece que la tolerancia a estas condiciones es dependiente de cepa (Clark *et al.*, 1993; Clark y Martin, 1994; Chung *et al.*, 2004). Por ello, la propuesta de este trabajo es el desarrollo de una metodología para la selección de cepas de bifidobacterias resistentes a las condiciones gastrointestinales (ácido y sales biliares) a partir de muestras fecales. Se investigará y evaluará las características probióticas de las cepas de bifidobacterias seleccionadas, se caracterizarán empleando distintas técnicas moleculares y se determinará su resistencia frente a otras sustancias como antibióticos y NaCl.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento de cepas resistentes a condiciones ácidas

Se aislaron cepas del género *Bifidobacterium* de muestras fecales procedentes de individuos sanos, 2 adultos (edad entre 25-30 años) y 2 niños (entre 6-12 meses). Las muestras fueron procesadas en el mismo día y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento. Aproximadamente, 2 gramos de muestra fecal fueron pesados, se diluyeron en tampón PBS estéril y se homogenizaron durante 3-4 minutos en el estomacher. Se realizaron diluciones apropiadas y se sembraron en medios selectivos como BFM agar (Nebra *et al.*, 1999) y BSM agar (Fluka) por duplicado. Todas las placas fueron incubadas a 37°C durante 3-4 días en condiciones anaerobias conseguidas mediante el uso de sobre de anaerobiosis AnaeroGen (Oxoid).

El resto de homogenizados se pre-incubaron en MRS suplementado con 0.05% (peso/vol) de cisteína (Sigma) (MRSC) ajustado a pH 2.0 (una alícuota se ajustó con pepsina y otra con HCl 1N) a 37°C durante 2 horas y durante 16 horas en condiciones anaerobias. La mezcla fue, también, diluida serialmente y sembrada en medios de cultivo específicos BFM agar (Nebra *et al.*, 1999) y BSM agar (Fluka) por duplicado.

Después de la incubación a 37°C durante 72 horas en condiciones anaerobias, entre 8 y 10 colonias fueron seleccionadas y re-sembradas en los mismos medios. Transcurrida la incubación, las colonias fueron examinadas mediante tinción Gram y aquellas que presentaban morfología característica de las bifidobacterias se subcultivaban en medio MRSC con el fin de obtener biomasa y seguir trabajando con ellas.

2.2. Identificación y caracterización molecular

Para el aislamiento del DNA genómico bacteriano y la identificación molecular de las cepas se emplearon los procedimientos descritos en el capítulo 1, pag. 48-54.

2.2.1. RAPDs

El análisis de RAPDs se realizó con el iniciador descrito por Tynkynnen *et al.*, (1999) y con la metodología descrita en el capítulo 1, pag. 53.

2.2.2. ARDRA-PCR

Los fragmentos específicos correspondientes al gen 16S rRNA del género *Bifidobacterium* se digirieron con las enzimas de restricción *MboI*, *BamHI* (Fermentas) según procedimiento descrito en el capítulo 1, pag. 51.

2.2.3. Análisis de los datos

Los perfiles moleculares obtenidos mediante las técnicas RAPDs y ARDRA fueron fotografiados bajo luz UV y las imágenes fueron almacenadas para ser

procesadas con el programa informático TDI-Lane Manager. 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. Aplicando el algoritmo matemático UPGMA (Unweighted-Pair Group Meted with Average linkage) los microorganismos son agrupados en base a la similitud de sus perfiles de bandas y se construye el dendrograma.

2.2.4. Múltiplex PCR

(Ver capítulo 1, pag. 49-50) Mediante el uso de los iniciadores descritos por Dong *et al.*, (2000) para *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B.adolescentis*, *B.longum* se realizó la múltiplex PCR para detectar e identificar las distintas especies.

También, se emplearon los iniciadores descritos por Matsuki *et al.*, (2003) para *B.adolescentis* BiADO-1 5' CTC CAG TTG GAT GCA TGT C 3' y BiADO-2 5' CGA AGG CTT GCT CCC AGT 3' que amplifican un fragmento de 279 pb. Para *B.bifidum* BiBif-1 5' CCA CAT GAT CGC ATG TGA TTG 3' y BiBif-2 5' CCG AAG GCT TGC TCC CAA A 3' que amplifican un fragmento de 278 pb. Para *B.breve* BiBre-1 5' CCG GAT GCT CCA TCA CAC 3' y BiBre-2 5' ACA AAG TGC CTT GCT CCC T 3' que amplifican un fragmento de 288 pb. Para *B.longum* grupo BiLON-1 5' TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC 3' y BiLON-2 5' GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA 3' que amplifican un fragmento de 831 pb. Para *B.catenulatum* grupo BiCAT-1 5' CGG ATG CTC CGA CTC CT 3' y BiCAT-2 5' CGA AGG CTT GCT CCC GAT 3' que amplifican un fragmento de 285 pb. La amplificación se realizó con los siguientes ciclos de temperaturas: 1 ciclo a 95°C durante 5 min; 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 4 min; y un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 min. Los fragmentos amplificados se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (peso/vol) en tampón TAE y visualizadas bajo luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

2.3. Resistencia a sales biliares y a NaCl

Se analizó la resistencia a sales biliares Ox-gall mediante el análisis del crecimiento de las cepas de bifidobacterias en presencia de un 1% y al 1.5% de sales biliares. Para ello, se preparó caldo MRSC con las distintas concentraciones que se deseaban testar. Las cepas resistentes a estas concentraciones fueron analizadas en mayor profundidad, para ello se siembran las cepas a estudiar al 1% (vol/vol) en medio MRSC con Oxgall y a cloruro sódico y se monitoriza su crecimiento en presencia de diversas concentraciones de estas sustancias, para ello se emplearon placas multipocillo de 96 pocillos (BioRad). A cada pocillo se le añadió 175 µl del medio de MRSC suplementado con 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 % (peso/vol) Ox-gall y 2.0, 3.0, 6.0, 8.0, y 10.0% de NaCl, inoculados al 1% (vol/vol) con las cepas a estudiar y se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 24h. Las densidades ópticas (DO) que se alcanzaban durante el crecimiento microbiano fueron medidas 650 nm empleando un lector de microplacas (Microplate reader, Roche).

2.4. Estudio de actividad antimicrobiana de cepas del género *Bifidobacterium*

Para determinar la actividad de los compuestos antimicrobianos secretados por las bifidobacterias, se emplearon cultivos de 24 h de cada cepa que fueron previamente sub-cultivados tres veces, se inocularon al (1% vol/vol) en 10 ml de caldo MRSC. El primer ensayo para detectar actividad antimicrobiana se evaluó empleando el método de overlay o también llamado de cuerdas, para ello se siembran las bifidobacterias en cuerdas de 2 cm de longitud en el medio MRSC y se incuban a 37 °C durante 24 h en condiciones anaerobias. Se inactivarán los microorganismos con los vapores de 2.5 ml de cloroformo y se verterá sobre la placa 10 ml de agar semisólido (MRS o BH) inoculado al 1% con *L. lactis* MG1363 o *L. innocua* ATCC3309.

Las placas serán incubadas a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa indicadora, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se observarán los halos de inhibición.

2.5. Susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos se determinó mediante la técnica de difusión en agar mediante discos impregnados con diversas concentraciones de antibióticos. Una alícuota de 100 µl de un cultivo puro de bifidobacterias de 24h se inoculó en 10 ml MRSC semisólido (0.7% agar) que se vertió sobre una placa de MRSC agar, se empleó semisólido con el fin que el antibiótico pudiera difundir mejor en el agar. Los discos de antibióticos se colocan sobre la superficie del agar y se incuban a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Después de incubarlas durante 24-48 h, se determinó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Un total de 16 antibióticos se utilizaron para testar la susceptibilidad a antibióticos: (i) Inhibidores de la síntesis de la pared celular: amoxicilina (30 µg), carbencilina (100 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 UI) y vancomicina (30 µg); (ii) Inhibidores de la síntesis proteica: cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 UI), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg) y tetraciclina (30 UI); (iii) Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: metronidazol (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), rifampicina (5 µg) y trimetoprim (5 µg); (iv) Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática: polimixina (300 µg); y (v) Inhibidores del metabolismo: sulfamida (200 µg).

2.6. Actividad enzimática de las cepas de *Bifidobacterium*

Se empleó el sistema miniaturizado comercial API ZYM (BioMerieux, Francia) para detectar las actividades enzimáticas de las cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas. Este sistema es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas que permite estudiar al mismo tiempo 19 actividades enzimáticas. Este sistema fue empleado de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez inoculadas las galerías se incubaron a 37°C durante 4 horas, y las reacciones producidas durante la incubación se traducen en cambios de color tras la adición de los reactivos ZYM A y ZYM B.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de cepas resistentes

Los resultados de los recuentos totales tras incubación a pH ácido muestran que las bifidobacterias son mucho más sensibles a la acción del ácido clorhídrico puro que a la acción de los ácidos gástricos (pepsina) tal y como se puede observar en la tabla 1. En general, se observan disminuciones entre 3-4 unidades logarítmicas de las bifidobacterias tratadas a condiciones de estrés ácido en comparación con las muestras no tratadas. La resistencia a las condiciones de ácidas, en general, es mayor para las bifidobacterias de origen infantil que para las de adulto. También, la acción del HCl disminuye mucho más la viabilidad de las bifidobacterias que la exposición a la pepsina al mismo pH e incubadas durante el mismo tiempo.

Tabla 1. Células de cepas del género *Bifidobacterium* recuperadas en medios selectivos tras incubación a 37°C durante 16 horas de las muestras fecales.

Muestras	Recuentos iniciales (UFC/gr)	Exposición pepsina (UFC/gr)	Exposición HCl (UFC/gr)
A (niño)	3.0×10^8	1.6×10^5	1.6×10^5
B (niño)	3.0×10^8	7.6×10^5	8.0×10^4
C (adulto)	8.0×10^8	1.3×10^5	2.4×10^4
D (adulto)	4.0×10^8	5.6×10^5	2.8×10^4

Un total de sesenta cepas de bifidobacteria fueron aisladas de las muestras fecales. La identidad de los aislados se confirmó mediante PCR específica de género *Bifidobacterium* según Kaufmann *et al.*, (1997) que amplifica un fragmento de 1.35 Kb, todas las cepas aisladas en BFM y BSM presentaron este fragmento.

La tolerancia a las condiciones ácidas de las bifidobacterias seleccionadas se confirmó mediante la exposición de las cepas a condiciones ácidas pH 2.0 durante 90 y 120 min. Se tomó una alícuota de cultivo puro de 24 horas con una concentración celular de 10^8 células/ml, se expone pH 2.0, transcurridos los periodos de incubación, se siembra en MRSC y los recuentos obtenidos son del orden de 10^7 - 10^8 células/ml tras incubación ácida. Todas las cepas testadas mostraron una ligera o nula reducción en el crecimiento en placa tras incubación a 90 min en MRSC caldo a

pH 2.0, estos mismos recuentos se compararon con los recuentos obtenidos en el mismo medio a pH 6.8. Ninguna de las cepas mostró disminuciones en la viabilidad celular.

3.2. Identificación y caracterización molecular

3.2.1. RAPDs

En los perfiles obtenidos mediante esta técnica se observan diferencias entre las bifidobacterias pertenecientes a la misma muestra (Figura 5). De las sesenta cepas se obtuvieron 24 perfiles distintos que se correspondían a 24 cepas de bifidobacterias, de las cuales 7 cepas pertenecían al individuo A (niño), 3 cepas al individuo B (niño), 8 cepas al individuo C (adulto) y 6 cepas al individuo D (adulto).

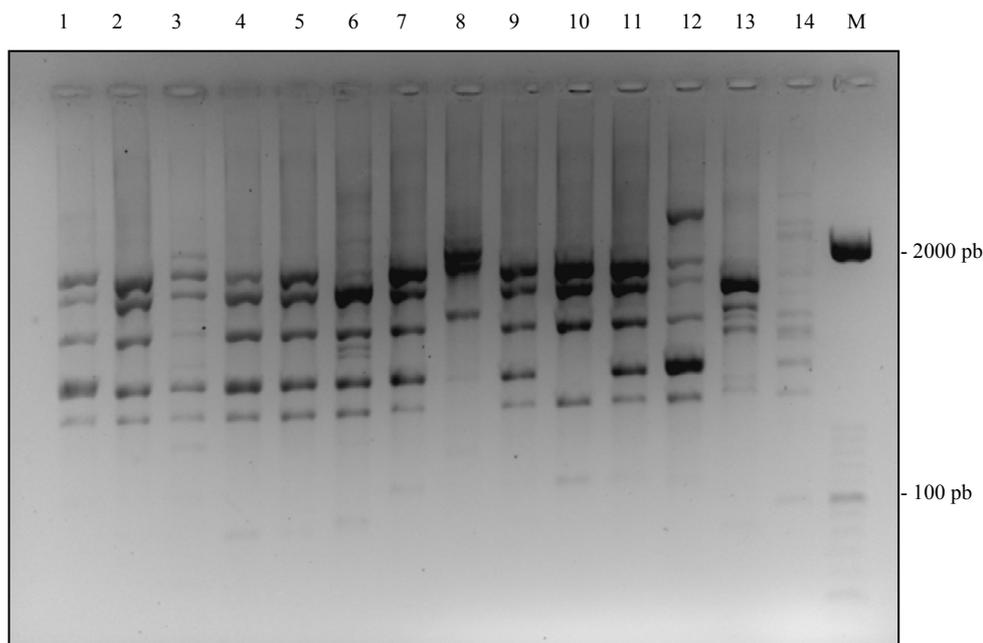


Figura 1. Perfiles RAPDs obtenidos para las cepas del género *Bifidobacterium* aisladas tras incubación en condiciones ácidas durante 16h.

Estos resultados demuestran que hay una mayor variabilidad de cepas en las muestras procedentes de individuos adultos, esto puede ser debido a que en los adultos existe una mayor variabilidad de especies de bifidobacterias que en niños (Matsuki *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2001). 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 (Gráficos 1 y 2).

3.2.2. ARDRA-PCR

Para cada una de las enzimas empleadas aparecieron perfiles de digestión distintos (Fig.6). Con la enzima *MboI* obtuvimos perfiles de restricción con un mayor número de fragmentos (entre 4 y 10) que con *BamHI* con lo que fue más fácil y específico realizar las comparaciones entre cepas. (Fig. 2 y 3).

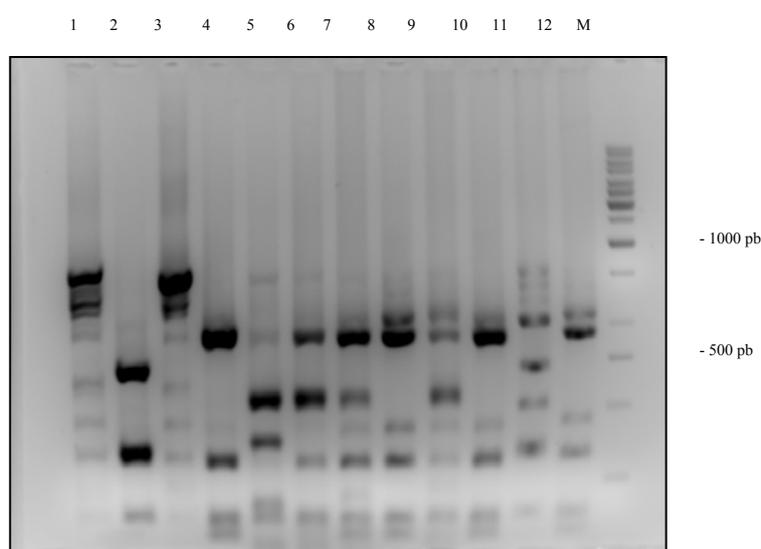


Figura 2. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión con la enzima de restricción *MboI* de las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium*

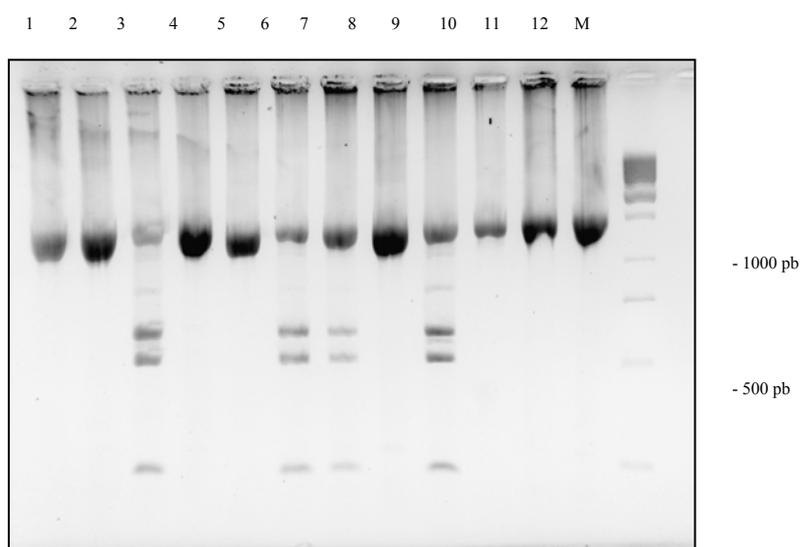


Figura 3. Perfiles ARDRA obtenidos tras digestión con la enzima de restricción *BamHI* de las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium*

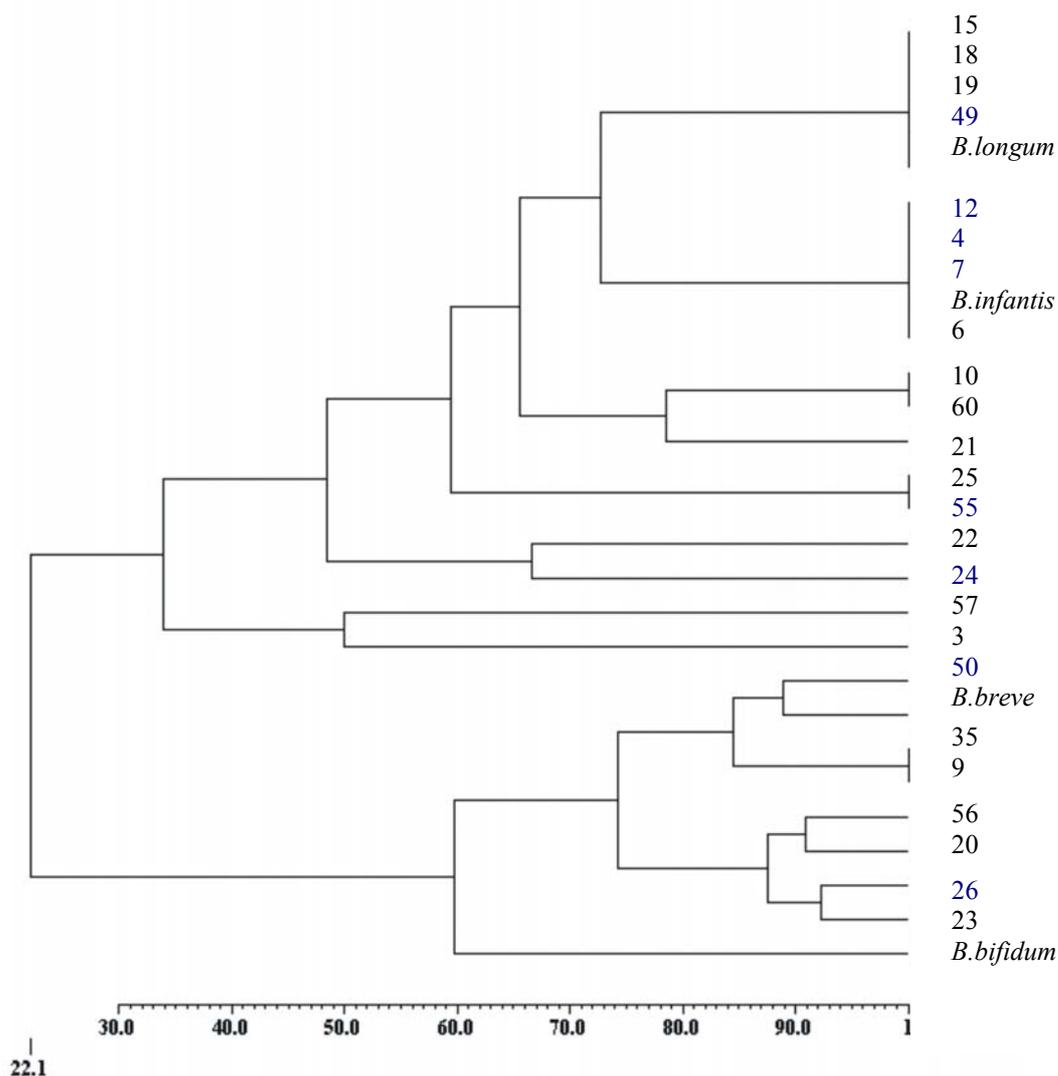


Figura 4. Dendrograma derivado de la comparación de los perfiles ARDRA obtenidos tras digestión con la enzima de restricción *MboI* de las cepas seleccionadas del género *Bifidobacterium*

De los perfiles de restricción obtenidos y con el programa TDI se realizaron los dendrogramas generados de la comparación de dichos perfiles (Fig.4). En el dendrograma generado con los perfiles obtenidos con la enzima *MboI* se observa que todas las cepas se agrupan a un 22.1% de homología, observándose al 35% de similitud dos grupos diferenciados, uno de los cuales agrupa a 17 de las 24 cepas de bifidobacterias ácido resistentes analizadas, que a su vez se subdivide en otros dos grupos al 50% de homología, en uno de ellos se agrupan las cepas que presentan perfiles de similitud semejantes a las cepas de referencia *B. longum* ATCC 15707 y *B. infantis* ATCC 15697. El segundo grupo se une a una homología del 60% donde encontramos agrupadas al resto de las bifidobacterias seleccionadas, que presentan

perfiles similares a la cepa de referencia *B.bifidum* ATCC 2952. En estos resultados se observa la similitud de las cepas agrupadas como *B.longum* y *B.infantis* reclasificadas en la actualidad como la misma especie pero con distintas subespecies (Sakata *et al.*, 2002).

3.2.3. *Múltiplex-PCR*

Empleando la metodología de Dong *et al.*, 2001 y Matsuki *et al.*, 2003 los resultados obtenidos para las cepas seleccionadas se muestran en la tabla 2. Se observa que tanto en las muestras de niños como en las de adultos la especie predominante es *B.longum/infantis*, aunque en las muestras de niños también podemos encontrar *B.bifidum* y *B.breve*. En las muestras de adulto encontramos cepas de *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.catenulatum*, *B.bifidum*. No se detectó ninguna cepa de *B.breve* en muestras procedentes de adultos.

Tabla 2. Origen e identificación de las cepas del género *Bifidobacterium* empleadas en este estudio.

<i>Cepa</i>	<i>Origen</i>	<i>Muestra</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>
IATA-303	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.adolescentis</i>
IATA-304	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.infantis</i>
IATA-306	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-307	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.infantis</i>
IATA-309	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.breve</i>
IATA-310	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-312	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-315	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-318	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-319	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-320	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>
IATA-321	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-322	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.catenulatum</i>
IATA-323	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>
IATA-324	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.catenulatum</i>
IATA-325	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-326	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>
IATA-335	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.breve</i>
IATA-349	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>
IATA-350	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.breve</i>
IATA-355	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>
IATA-356	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>
IATA-357	Humano	Heces adulto	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.adolescentis</i>
IATA-360	Humano	Heces niño	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B.longum/infantis</i>

Los resultados obtenidos por Matsuki *et al.*, (2004) en los que detectaron que especies predominantes en las heces de individuos adultos eran *B.adolescentis*,

B.catenulatum y *B.longum* difieren de las nuestras, ya que en las muestras de adultos únicamente se han podido aislar dos cepas de *B.adolescentis*, este hecho podría deberse a dos posibles causas, i) el medio empleado para su selección (medio BFM) no recupera bien las cepas de *B.adolescentis* (Lynch *et al.*, 2002) y ii) que la especie *B.adolescentis* no pueda resistir bien al tratamiento ácido y por ello no se ha podido recuperar en medios de cultivo en la proporción descrita por otros autores aunque nuestros resultados si concuerdan con los obtenidos por Ventura *et al.*, (2001) que obtuvo que *B.longum*, *B.bifidum* y *B.catenulatum* eran las especies predominantes en el intestino humano. Sin embargo, para las muestras procedentes de niños los resultados están en concordancia con los descritos en bibliografía (Matsuki *et al.*, 2004) siendo las especies *B.infantis* y *B.breve* las predominantes en la población bifidobacteriana.

3.3. Resistencia a las sales biliares y a NaCl

Se analizó la tolerancia a las sales biliares de las todas cepas de bifidobacterias ácido resistentes. Todas las cepas fueron capaces de crecer en MRSC con 1% y 1.5% Oxgall. A continuación, se sometió a las cepas de bifidobacterias a mayores concentraciones de sales biliares con el fin de estudiar su tolerancia, las concentraciones ensayadas fueron 0.5, 1, 2, 3% de Ox gall y se monitorizó el crecimiento en placas multipocillo de poliestireno mediante la medición de la densidad óptica (DO 650nm). Todas las cepas pudieron crecer a todas las concentraciones de Ox gall testadas (Fig.9). Este estudio señala que la tolerancia a condiciones ácidas y básicas puede obtenerse aplicando condiciones de estrés (ácido o sales biliares). Existen algunos artículos sobre estudios de tolerancia a condiciones ácidas y a sales biliares, sin embargo, la diferencia de este estudio con los demás es la combinación de estos dos factores. Los resultados muestran que existen variaciones entre cepas para la tolerancia a condiciones ácidas y de sales biliares.

También se analizó la resistencia a elevadas concentraciones de sal, se testaron las concentraciones 2, 3, 6, 8, 10% de NaCl. Las cepas toleraron bien las concentraciones de hasta 6% de NaCl mientras que concentraciones más elevadas redujeron su capacidad de crecimiento (Fig.10). Como se puede observar, la resistencia a un determinado factor puede conferir resistencia a otros factores.

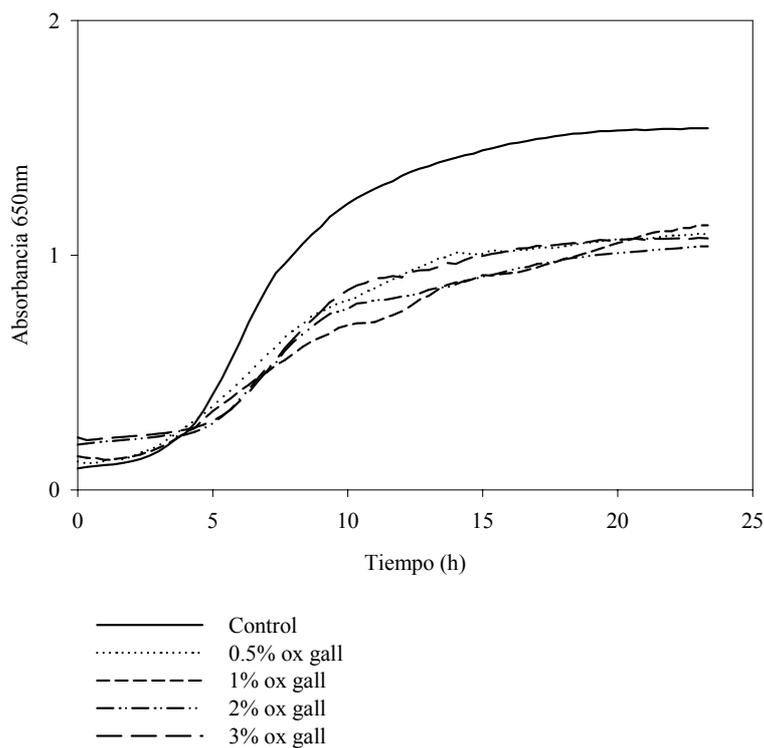


Figura 5. Efecto de las distintas concentraciones de Ox gall en el crecimiento de una cepa del género *Bifidobacterium* aislada tras incubación bajo condiciones ácidas durante 16h. Crecimiento durante 24h medido a A_{650} .

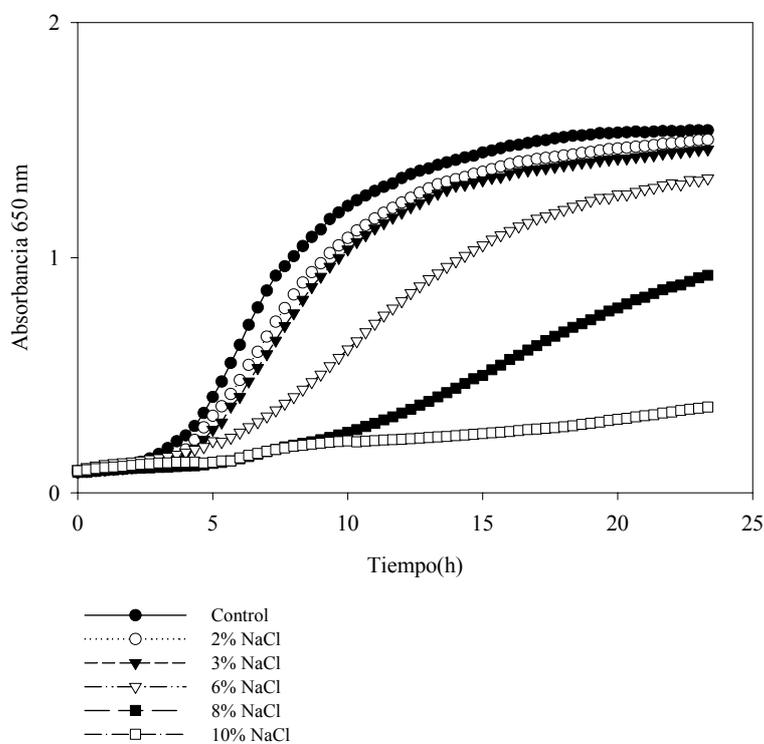


Figura 6. Efecto de las distintas concentraciones de NaCl en el crecimiento de una cepa del género *Bifidobacterium* aislada tras incubación con NaCl durante 16h. Crecimiento durante 24h medido a A_{650} .

3.4. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas del género *Bifidobacterium*

El espectro de inhibición de las cepas seleccionadas fue determinada mediante la técnica de overlay frente a las cepas indicadoras. La actividad antimicrobiana de las cepas es muy similar entre sí con esta técnica, debido posiblemente a la presencia de ácidos orgánicos, aunque las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 y IATA-350 presentaron los mayores espectros de actividad antimicrobiana frente a las cepas testadas, por ello se seleccionaron para seguir estudiando la actividad antimicrobiana, ya que este método es muy eficaz para detectar actividad antimicrobiana, pero ésta puede estar debida a los ácidos orgánicos producidos como metabolitos durante su crecimiento.

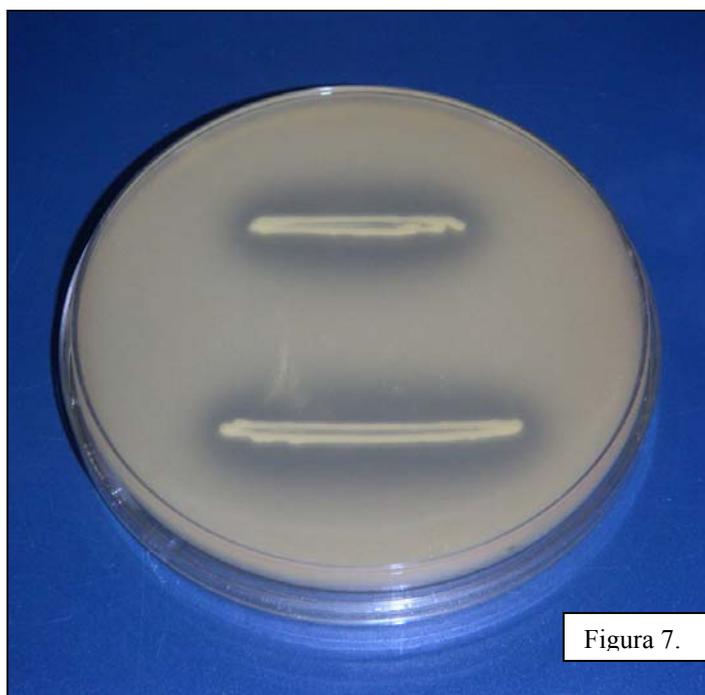


Figura 7. Actividad antimicrobiana detectada mediante el método de overlay frente a *Listeria innocua* ATCC3309.

3.5. Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de bifidobacterias aisladas

La susceptibilidad de las bifidobacterias seleccionadas en base a su mayor espectro de actividad antimicrobiana frente a la resistencia a antibióticos se muestra en la Tabla 3. Este es uno de los criterios de selección de nuevas cepas de

probióticos y asegurar la seguridad de su uso y de sus aplicaciones potenciales como adjuntos en el tratamiento de infecciones gastrointestinales (Tabla 3).

Tabla 3. Susceptibilidad frente a antibióticos de las cepas de bifidobacterias seleccionadas.

Antibiótico	[µg/ml]	Susceptibilidad de las cepas de <i>Bifidobacterium</i> (mm) ^a						
		IATA-304	IATA-307	IATA-312	IATA-324	IATA-326	IATA-349	IATA-350
Amoxicilin	30	24.3±0.2	25.4±0.1	20.4±0.1	25.2±0.3	25.5±0.0	25.3±0.2	25.2±0.5
Carbencilina	100	30.4±0.1	30.0±0.5	32.1±0.4	28.2±0.1	32.2±0.3	33.3±0.2	30.0±0.2
Oxacilina	1	- ^b	-	-	-	-	-	-
Penicilina G	10	22.1±0.4	15.0±0.0	22.5±0.0	20.3±0.2	21.3±0.1	22.1±0.2	15.5±0.2
Vancomicina	30	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	30	14.3±0.1	12.3±0.2	16.4±0.1	12.4±0.1	14.5±0.0	15.4±0.1	12.1±0.2
Eritromicina	15	25.0±0.0	22.2±0.1	20.3±0.2	21.2±0.2	23.6±0.2	22.1±0.3	22.5±0.2
Gentamicina	10	-	-	-	-	-	7.5±0.2	-
Kanamicina	30	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	30	24.3±0.1	23.3±0.3	21.4±0.1	25.2±0.3	25.4±0.1	25.3±0.2	23.4±0.2
Metronidazol	5	-	-	-	-	-	-	-
Ácido nalidíxico	30	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicina	5	22.3±0.2	25.4±0.2	26.3±0.3	25.3±0.1	23.4±0.1	22.5±0.0	25.5±0.1
Trimetoprim	5	-	-	-	10.5±0.1	-	-	-
Polimixina	300	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamida	200	-	-	-	-	-	-	-

^aValores de halos de inhibición (mm) expresados como la media y el error estándar (SEM) de la media de dos análisis.

^bNo se detecta inhibición

Todas las cepas presentaron resistencia frente a siete de los antibióticos testados incluyendo a oxacilina, vancomicina, kanamicina, metronidazol, ácido nalidíxico, polimixina y sulfamida. La cepa IATA-349 fue la única cepa sensible a la gentamicina y la cepa IATA-324 la única sensible a trimetoprim. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a la amoxicilina, carbencilina, penicilina G, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y rifampicina; estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Charteris *et al.*, (1998 y 2000), Biaviati *et al.*, (2000) y Temmerman *et al.*, (2002).

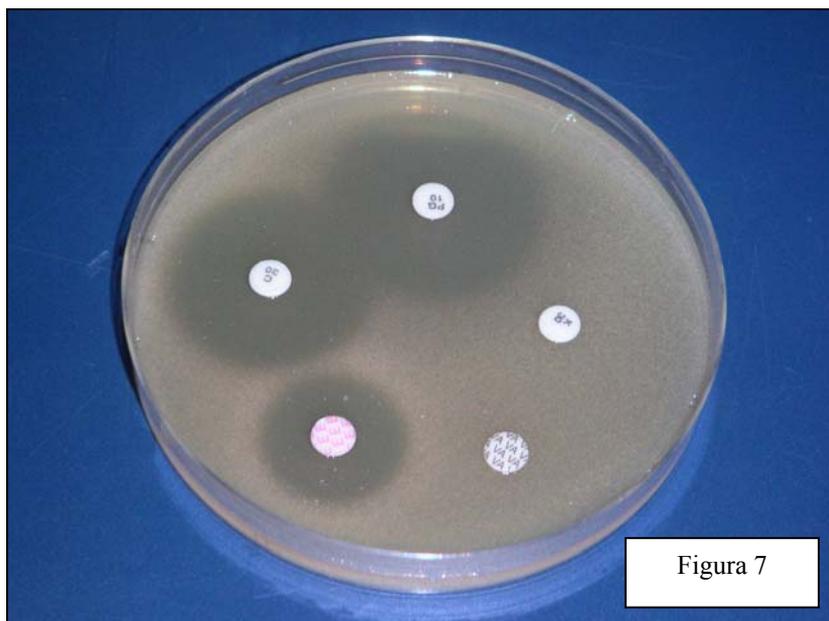


Figura 8. Antibiograma de una cepa del género *Bifidobacterium* aislada tras incubación bajo condiciones ácidas durante 16h.

3.6. Actividad enzimática de las cepas de *Bifidobacterium*

Los resultados de actividad enzimática obtenidos para las cepas de bifidobacterias seleccionadas se muestran en la tabla 4.

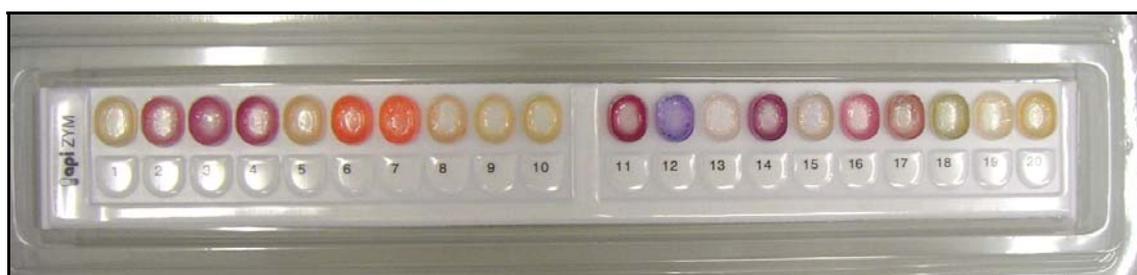


Figura 9. Actividades enzimáticas de las bifidobacterias seleccionadas estudiadas mediante el sistema comercial API ZYM.

Todas las cepas presentan actividad esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa. Ninguna de las cepas presenta actividad β -glucuronidasa relacionada con procesos carcinogénicos, tampoco presentan actividad α -fucosidasa, α -manosidasa, α -quimotripsina, tripsina, cistina arilamidasa, lipasa. La cepa IATA-324 es la única

cepa que no presenta actividad valina arilamidasa, tampoco presenta actividad β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. Además, una forma rápida y preliminar de identificación de las bifidobacterias puede ser realizada usando el enzima α -galactosidasa como marcador, este enzima no es detectado en cepas de *Lactobacillus* (Chevalier *et al.*, 1990) lo que puede ser de gran interés para identificar bifidobacterias.

Tabla 4. Actividades enzimáticas obtenidas mediante el sistema miniaturizado API ZYM de las cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas. +) reacción positiva; -) reacción negativa; ¿) dudosa.

Pruebas enzimáticas	Cepas del género <i>Bifidobacterium</i>						
	IATA 304	IATA 307	IATA 312	IATA 324	IATA 326	IATA 349	IATA 350
Fosfatasa alcalina	+	-	+	-	+	+	+
Esterasa	+	+	+	+	+	+	+
Esterasa lipasa (C8)	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	-	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	+	+	+	-	+	+	+
Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-	-
α -quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	+	+	+
Fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	+
α -galactosidasa	+	+	+	+	+	+	+
β -galactosidasa	+	+	+	+	+	+	+
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	+	+	-	+	+
β -glucosidasa	+	+	+	-	+	+	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	+	+	+	-	+	+	+
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-

4. DISCUSIÓN

Existe un interés creciente en el uso de probióticos pertenecientes al género *Bifidobacterium* por parte de la industria láctea. Las cepas de *Bifidobacterium* que presentan una elevada la resistencia a las condiciones ácidas del estómago o a las sales biliares pueden ser muy ventajosas para su empleo como probióticos, ya que podrían llegar vivas al intestino pudiendo adherirse, multiplicarse y colonizar el

intestino humano ejerciendo sus efectos beneficiosos sobre la salud humana descritos ampliamente en bibliografía. Sin embargo, no hay muchos estudios sobre la tolerancia de *Bifidobacterium* a sales biliares o a condiciones ácidas (Berrada *et al.*, 1991; Clark y Martin, 1994; Clark *et al.*, 1993; Ibrahim y Bezkorovainy, 1993; Margolles *et al.*, 2003; Noriega *et al.*, 2004). Ibrahim y Bezkorovainy (1993) detectaron que la especie *B. infantis* tenía los porcentajes de supervivencia más altos, seguido por las especies *B. bifidum*, *B. breve* y *B. longum*, cuando son expuestas a concentraciones entre 0 a 3 g/l de sales biliares. Por el contrario, Clark y Martin (1994) observaron que *B. longum* exhibía una tolerancia alta frente a concentraciones de 2.0 a 4.0% de bilis seguida por *B. bifidum* y *B. infantis*. En este estudio se ha empleado una metodología para la obtención de cepas resistentes a condiciones ácidas. El procedimiento descrito de aislamiento de bifidobacterias ácido resistentes de muestras fecales humanas fue efectivo y además, parece que las cepas resistentes a condiciones ácidas presentan también resistencia a elevadas concentraciones de sales biliares, por lo que parece que la resistencia al ácido puede inducir una resistencia cruzada a otras condiciones. Estas propiedades son testadas con el fin de seleccionar nuevas cepas probióticas con la finalidad de elegir aquellas que las presenten para garantizar su supervivencia durante el tránsito gastrointestinal (Chung *et al.*, 1999; Tuomola *et al.*, 2001). La tolerancia a diversas condiciones de las cepas seleccionadas podría reforzar su resistencia frente a las tecnologías de procesado de alimentos, ya que la acidez esta considerada como uno de los factores que más afectan a la viabilidad de las bifidobacterias en los productos fermentados (Lankaputhra *et al.*, 1996).

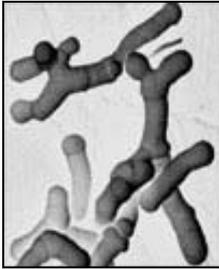
Las cepas aisladas también presentaron actividad antimicrobiana frente a *Listeria* y *Lactococcus*, esta actividad fue variable entre las cepas, seleccionando aquellas que mayor espectro de inhibición presentaban. La producción de sustancias de actividad antimicrobiana como bacteriocinas frente a microorganismos susceptibles de colonizar los mismos nichos ecológicos que las bifidobacterias permitiría a éstas competir de forma más eficaz por los sustratos y puntos de adhesión a mucus intestinal, por lo que son necesarias más investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de las cepas seleccionadas, así como estudiar su

capacidad de adhesión a mucus, y la exclusión competitiva frente a patógenos con el fin de seleccionar a las cepas con más capacidad de competir y desplazar patógenos.

La susceptibilidad a ciertos antibióticos es uno de los criterios esenciales de selección de microorganismos probióticos. De acuerdo con nuestros resultados, la resistencia a metronidazol, gentamicina, ácido nalidíxico, trimetoprim, kanamicina, vancomicina, y polimixina ha sido considerada una característica general de las bifidobacterias (Charteris *et al.*, 1998; Temmerman *et al.*, 2002). Lo mismo en cuanto a la sensibilidad a rifampicina, amoxicilina, penicilina G, cloranfenicol, eritromicina, y tetraciclinas (Charteris *et al.*, 1998; Temmerman *et al.*, 2002). Aunque debe prestarse la atención continua a la selección de cepas que no presenten elementos de resistencia antibióticos que puedan ser transferibles, los rasgos de resistencia antibióticos específicos entre cepas probióticas pueden ser deseables para los tratamientos en combinación con diversos antibióticos (Temmerman *et al.*, 2002). Por ejemplo, se ha obtenido un tratamiento mejor de la gastritis inducida por *H. pylori* mediante la combinación de bacterias probióticas con antibióticos (metronidazol); en este caso la resistencia de las bifidobacterias al metronidazol podría tener ciertas ventajas para su posible empleo en terapias combinadas. *Clostridium difficile* es la causa más importante de las diarreas asociadas a tratamientos antibióticos y se ha identificado en más del 95% de los casos de colitis pseudomembranosa (Lee *et al.*, 2003). Para el tratamiento de las infecciones por *C. difficile* se han empleado la administración conjunta de probióticos con antibióticos tales como vancomicina y metronidazol (McFarland *et al.*, 1994). Las cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas podrían también ser empleadas con una doble finalidad, por su efecto antimicrobiano frente a ese patógeno y por su resistencia al antibiótico que se empleo para el tratamiento de ese patógeno.

En conclusión, de entre las cepas estudiadas, seleccionadas por su tolerancia al ácido y bilis, su resistencia a antibióticos, su actividad enzimática y su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos se escogen las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 e IATA-350 como cepas potencialmente probióticas. Nuestros resultados sugieren que el procedimiento desarrollado en este estudio es eficaz y práctico para la selección de bifidobacterias, pero son necesarios un mayor número de estudios que profundicen en otras

características deseadas para las cepas probióticas como puede ser la inhibición de un amplio espectro de microorganismos (patógenos, alterantes o industriales) y su capacidad de adhesión a mucus intestinal.



CAPÍTULO 6

**Detección y estudio de actividad antimicrobiana de
cepas de origen humano pertenecientes al género
*Bifidobacterium***

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de bifidobacterias en el intestino humano es muy importante ya que representan más del 91% del total de la población del tracto gastrointestinal en recién nacidos aunque en adultos su porcentaje oscila entre un 3 y un 7 % (Harmsen *et al.*, 2000; Biavati y Mattarelli, 2001). Estas bacterias se han relacionado con una variedad de efectos que favorecen la buena salud incluyendo la inhibición o exclusión de microorganismos indeseables, inmunomodulación y la síntesis de vitaminas (Lee y Salminen, 1995).

El amplio uso en la prescripción y consumo de antibióticos ha favorecido la aparición de cepas resistentes de microorganismos patógenos, y está asociado con trastornos en la flora protectora del intestino incrementando el riesgo de infección. Como consecuencia hay un creciente interés en el desarrollo de adjuntos o terapias alternativas basadas en el reemplazo bacteriano empleando probióticos aislados de la flora natural intestinal (Forestier *et al.*, 2001; Gill, 2003). Las bifidobacterias probióticas están comenzando a ser aceptadas para su uso en el manejo (profilaxis y terapia) de las infecciones gastrointestinales. Éstas parecen ejercer efectos protectores contra la diarrea del viajero, infección por rotavirus y diarreas asociadas a tratamientos antibióticos (McNaught y MacFie, 2001; Gill, 2003). También, han sido descritos efectos antagonistas contra patógenos pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella* y *Escherichia*, (Kambe, 1991; Gibson y Wang, 1994; Asahara *et al.*, 2001; 2004; Touré *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2004). Los posibles mecanismos responsables de estos efectos inhibitorios incluyen la competencia por nutrientes y por sitios de adhesión en la mucosa intestinal, inactivación de toxinas, secreción de sustancias antimicrobianas y la estimulación del sistema inmunológico, pero los mecanismos de actuación siguen sin estar claros (Fooks *et al.*, 1999).

Los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas pueden ser divididos en dos grandes grupos: (i) compuestos de bajo peso molecular (< 1,000 Da) como ácidos orgánicos que poseen un amplio espectro de acción, y (ii) péptidos antimicrobianos, denominados bacteriocinas (>1,000 Da), con una estrecha

especificidad relativa de acción contra organismos cercanos y otras bacterias Gram-positivas relativo (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Chen y Hoover, 2003). Las bacteriocinas producidas por las BAL ha sido subdividida en cuatro clases: clase I, lantibióticos que comprende péptidos muy pequeños (< 5 kDa) estables al calor que contienen aminoácidos; clase II, péptidos no-lantibióticos que incluyen proteínas pequeñas estables al calor (< 10 kDa); clase III, proteínas termolábiles de tamaño > 30 kDa; y clase IV, que consiste en una mezcla no definida de proteína(s), lípido(s) y carbohidrato(s) (Riley y Wertz, 2002; Chen y Hoover, 2003). Muchos estudios que detallan la caracterización y detección de bacteriocinas o compuestos semejantes a bacteriocinas producidas por BAL se basan fundamentalmente en especies que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, principalmente por la diversidad en especies y cepas y los habitats donde se encuentran, todo ello favorece su aplicación potenciales como conservantes naturales en alimentos (Klaenhammer, 1988; Chen y Hoover, 2003). En contraste, en bibliografía existe un limitado numero de estudios en los que se ha realizado en la caracterización de péptidos antimicrobianos sintetizados por *Bifidobacterium* spp., únicamente se ha caracterizado y purificado una bacteriocina denominada Bifidocina B producida por *B. bifidum* NCFB 1454 (Yildirim y Johnson, 1998; Yildirim *et al.*, 1999) aunque también se han descrito actividades antimicrobianas frente a *L. monocytogenes* y *E.coli* de bifidobacterias aisladas de niños (Touré *et al.*, 2003).

El objetivo de este estudio es detectar en cepas del género *Bifidobacterium* de origen humano la producción de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, que puedan interferir en el crecimiento de patógenos y otros microorganismos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo

Los microorganismos indicadores empleados para determinar el espectro de acción de las bifidobacterias seleccionadas se muestran en la Tabla 1. De las 24 cepas distintas de bifidobacterias aisladas de heces humanas y caracterizadas molecularmente (capítulo 5, pag. 139) se seleccionaron IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 y IATA-350, y fueron sembradas en

MRSC e incubados a 37°C, bajo condiciones anaerobias (AnaeroGen; Oxoid). Todas las cepas fueron almacenadas en congelación a -80 °C en medios apropiado con 15% glicerol y fueron sub-cultivadas tres veces antes de cada experimento.

Tabla 1. Microorganismos indicadores, origen y condiciones de crecimiento.

Microorganismo indicador	Origen/cepa	Cultivo		
		Medio	Incub. Temp. (°C)	Condiciones
<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363 ^a	MRS	30°C	aeróbicas
<i>Lactobacillus fermentum</i>	IATA	MRS	30°C	aeróbicas
<i>Leuconostoc</i> spp	IATA	MRS	30°C	aeróbicas
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	BH	37°C	aeróbicas
<i>Carnobacterium piscicola</i>	ATCC 35586	YPD	30°C	aeróbicas
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NCTC 10472	TPY	37°C	anaeróbicas
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	IATA	STAA	30°C	aeróbicas
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	BH	30°C	aeróbicas
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	BH	30°C	aeróbicas
<i>Clostridium difficile</i>	ATCC 9689	RCM	37°C	anaeróbicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600	BH	37°C	aeróbicas
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 8603	BH	37°C	aeróbicas
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	BH	37°C	aeróbicas
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 29631	BH	37°C	aeróbicas
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	BH	30°C	aeróbicas
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 49394	BH	20°C	aeróbicas
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	BH+NaCl	37°C	aeróbicas
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11637	ASC	37°C	microaeróbicas
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11638	ASC	37°C	microaeróbicas
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11366	ASO	37°C	microaeróbicas
<i>Arcobacter butzleri</i>	NCTC 12481	ASO	30°C	aeróbicas
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804	YPD	30°C	aeróbicas

^aGasson (1983)

Para determinar los efectos de la composición del medio en la producción de compuestos antimicrobianos por las bifidobacterias diversos medios de cultivo fueron testados: TPY agar, MRSC con distintas concentraciones de glucosa (2, 3, 4 y 5%), MRSC con 1% Tween 80 y MRS-C con 1% carbonato cálcico.

2.2. Tolerancia al ácido y a las sales biliares

La resistencia a condiciones ácidas de las bifidobacterias estudiadas fue confirmada testando su viabilidad tras su exposición al ácido. Las cepas fueron sembradas en MRSC a 37 °C durante 24 h. A continuación, las células fueron recogidas por centrifugación (6,000 rpm, 10 min, 4°C), lavadas y resuspendidas en tampón PBS alcanzando una densidad celular final de 10^9 células/ml, aproximadamente. Un mililitro de esta suspensión bacteriana se diluye en 9 ml de solución salina que contiene 3 g/l de pepsina extraída de la mucosa estomacal porcina (Sigma, St Louis, MO) y ajustada a pH 2.0 con HCl 0.1 M. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, 0, 90 y 120 min de incubación a 37 °C y la viabilidad fue determinada mediante recuentos en placas de MRSC agar.

La tolerancia a las sales biliares fue confirmada y determinada mediante el crecimiento en MRSC con un 1% y un 1.5% (peso/vol) de Ox gall (Sigma). Cada medio se inoculó al 1% (vol/vol) con cultivo de 24 h y se incubó 37 °C. El crecimiento bacteriano fue monitorizado mediante la medición de la densidad óptica a 650 nm en placas multipocillo con el lector Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA).

2.3. Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas del género *Bifidobacterium*

Para determinar la actividad de los compuestos antimicrobianos secretados por las bifidobacterias seleccionadas, se emplearon cultivos de 24 h de cada cepa que fueron previamente sub-cultivados tres veces, se inocularon al (1% vol/vol) en 10 ml de caldo de MRSC. Tras 16 h de incubación a 37 °C, el cultivo se centrifugó (12,000 rpm, 15 min, a 4°C). Los sobrenadantes obtenidos fueron esterilizados mediante el uso de filtros (0.22 μ m tamaño poro, Millipore, Bedford, MA) con el fin de eliminar la posible presencia de células viables, y a continuación los pH se neutralizaron ajustando el pH a 6.5 con 1 N NaOH para excluir los efectos de ácidos orgánicos. Los sobrenadantes neutralizados libres de células (SNCs) se concentraron liofilizándolos, y fueron resuspendidos en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6.5) concentrándolos diez veces, los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta el uso.

Los SNCs de las diferentes cepas de *Bifidobacterium* fueron testadas mediante difusión en agar (agar well diffusion) para evaluar su actividad antimicrobiana. 15 ml de medio apropiado para cada cepa indicadora con 0.7% (peso/vol) agar fueron inoculados con las cepas indicadores (Tabla 1) a una concentración final de 10^6 UFC/ml, se vertieron en placas Petri y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Se realizaron en el agar sólido celdas, de 5 mm de diámetro, con el empleo de un cilindro estéril de metal y los pocillos fueron llenados con 40 μ l de los SNCF y se incubaron durante 3 horas en condiciones de refrigeración con el fin de difundir el sobrenadante en el agar. A continuación, las placas se incubaron en condiciones adecuadas para cada indicador (Tabla 1) durante 16-24 h, tras las cuales las zonas de inhibición fueron evaluadas. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Alternativamente, el ensayo de actividad microbiana de los SNCs de las bifidobacterias aisladas se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos de forma que una alícuota de 175 μ l del medio de cultivo apropiado fue inoculada al 1% (vol/vol) con un cultivo de indicador de 24 h y se añadieron 25 μ l de sobrenadante neutralizado en cada pocillo. A continuación, se incubaron a las temperaturas apropiadas del indicador durante aproximadamente 20 h. El crecimiento de las cepas de indicador fue monitorizado mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 650 nm a distintos intervalos de tiempo usando el lector de placas multipocillo 550 Microplate Reader (Bio-Rad).

2.4. Caracterización de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana

Para la caracterización de los compuestos antimicrobianos, se empleó el método de difusión en agar (agar well diffusion) con las cepas *L. lactis* MG1363 y *L. innocua* ATCC 33090. Para determinar la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, los SNCs fueron tratados con enzimas proteolíticas como tripsina, proteinasa K, proteasa A, pepsina, catepsina B, papaína, enzimas glucolíticas como α -amilasa y enzimas lipolíticas como lipasa A (Sigma, el St., Louis, MO) que fueron añadidas a una concentración final de 2 mg/ml en 50 μ l de los sobrenadantes neutralizados. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a temperaturas y pHs óptimos para cada una de las enzimas, tras la incubación la

actividad antimicrobiana fue testada de nuevo mediante el método de difusión en agar.

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica del compuesto antimicrobiano, los sobrenadantes fueron incubados en un termobloque a 80°C durante 15, 30, y 60 min, y a 100 °C durante 15 y 20 min. De igual forma para evaluar la influencia del pH en la estabilidad de la actividad microbiana, los sobrenadantes se ajustaron con HCl o NaOH a distintos valores que oscilan entre pH 3.0 a 10.0 y se incubaron durante 1 h. La actividad antimicrobiana fue determinada antes y después de cada tratamiento siguiendo la técnica de difusión en agar descrita en el apartado anterior. Las muestras sin tratar se emplearon simultáneamente como controles positivos.

El tamaño aproximado de los compuestos antimicrobianos fue determinado por ultrafiltración a través de membranas de 10kDa y 30kDa (Millipore, Bedford, Mass). La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes filtrados se determinó como se ha descrito anteriormente, con la técnica de difusión en agar.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento e identificación de las cepas del género *Bifidobacterium*

La identidad de los aislados de las muestras fecales humanas se realizó mediante PCR específica de género (Ver capítulo 1 y 5). En cada caso, la presencia de un fragmento de 1.35 Kb correspondiente al gen 16S del rDNA confirmó la asignación al género *Bifidobacterium*. La efectividad de la pre-incubación de muestras del fecales a pH 2 durante 16 h para aislar cepas de *Bifidobacterium* ácido-tolerantes fue confirmada exponiendo a las cepas seleccionadas a condiciones ácidas (pH 2.0) durante 120 min. Las densidades celulares iniciales (10^8 células/ml) no se vieron significativamente afectadas por este tratamiento, permaneciendo los recuentos en niveles de alrededor 10^7 - 10^8 células/ml. Además, las cepas ácido resistentes fueron también tolerantes a altas concentraciones de sales biliares (más de un 1.5% bilis) (ver capítulo 5, pag. 152).

3.2. Efecto de la fase del crecimiento y del medio de cultivo en la producción de sustancias con carácter antimicrobiano

Las cepas de bifidobacterias denominadas con los nombres IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 e IATA-350 presentaron los mayores espectros de inhibición frente a las cepas indicadoras testadas *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Lactococcus lactis* MG1363 (ver capítulo 5) y, por consiguiente, se seleccionaron para realizar estudios más extensos en la caracterización de los compuestos antimicrobianos secretados.

Todas las cepas del género *Bifidobacterium* mostraron el máximo de inhibición al final de la fase logarítmica de su crecimiento (tras 16 h de incubación), pero disminuyó durante la transición a la fase estacionaria (Fig. 1). Las cepas indicadoras muestran una mayor inhibición a medida que se incrementan las cantidades de los sobrenadantes neutralizados (SNCs) (Fig. 2).

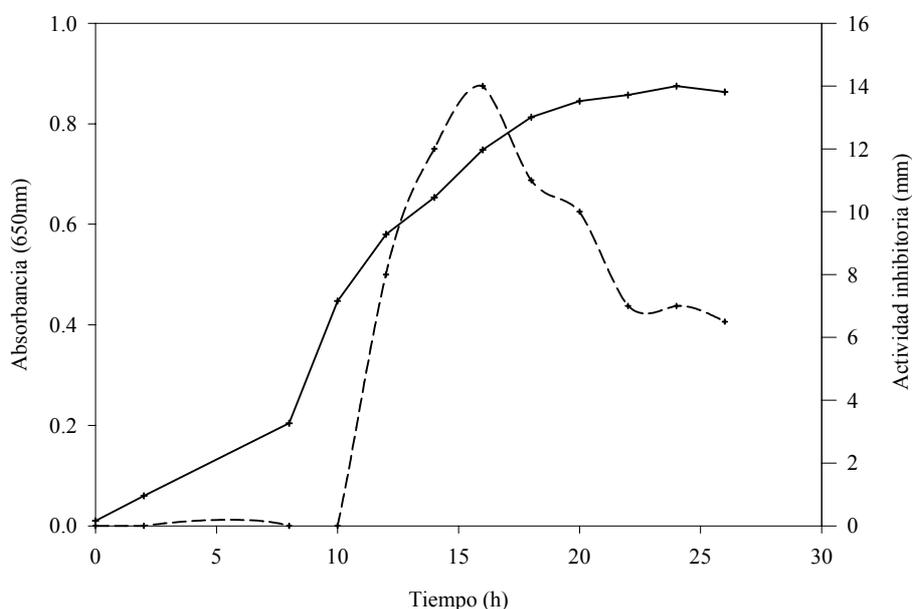


Figura 1. Efecto sobre la producción de compuestos antimicrobianos en función de la fase de crecimiento bacteriana. Monitorización del crecimiento de la cepa *Bifidobacterium* IATA-324 mediante absorbancias a 655 nm (línea continua) y actividad antimicrobiana del SNCs frente a *Listeria innocua* ATCC 33090 empleando la técnica de difusión en agar (línea discontinua).

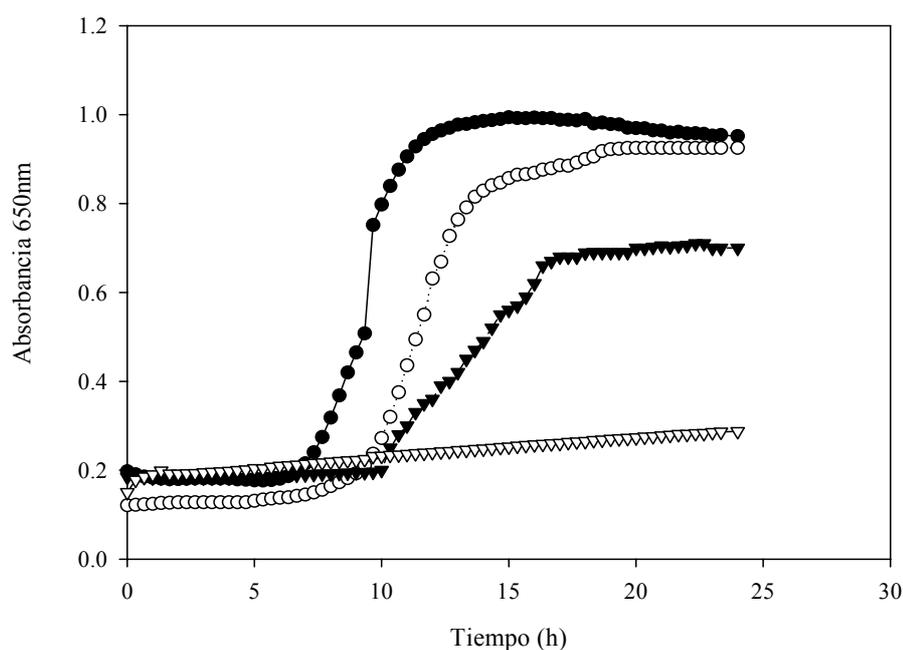


Figura 2. Efecto de los incrementos en la concentración de los SNCs de la cepa *Bifidobacterium* IATA-0324 frente a *Listeria innocua* ATCC 33090. El crecimiento del indicador fue monitorizado por absorbancia a 650 nm en presencia de: 0 µl (●), 30 µl (○); 50 µl (▼) y 70 µl (△) de SNCs.

Los medios de cultivo seleccionados para evaluar el crecimiento de las bifidobacterias y la producción de sus compuestos antimicrobianos fueron medios de composición compleja (MRSC y TPY). Dichos medios de cultivo presentan en su composición concentraciones variables de péptidos que podrían interferir en el proceso de purificación posterior del compuesto antimicrobiano pero su empleo para estudiar la actividad antimicrobiana está justificado ya que el crecimiento de los microorganismos productores en otros medios de composición semidefinida conduce, en la mayoría de los casos, a una disminución considerable de la producción de compuestos antimicrobianos en comparación con la obtenida con medios complejos (De Vuyst y Vandamme, 1994; Herranz *et al.*, 2001). Las actividades antimicrobianas de los SNCs se mantuvieron en presencia de un 1% CaCO_3 , sugiriendo que la inhibición detectada no es debida a la producción de ácidos orgánicos. La actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas crecidas en medio TPY fue mucho menor que la obtenida tras el crecimiento de las cepas en MRSC. Las zonas de inhibición para la cepa indicadora *L. lactis* MG1363 se redujeron entre 2-9 mm y no se detectó inhibición para *L. innocua* ATCC 33090. El

empleo de diferentes concentraciones en el medio de cultivo (2, 3, 4 y 5%) no afectó de manera significativa a la actividad antimicrobiana detectada para cada uno de los sobrenadantes neutralizados.

La adición de Tween 80 (polisorbato 80) a los medios de cultivo TPY y MRSC aumentó ligeramente la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes neutralizados. Las zonas de inhibición detectadas se incrementaron entre 3-5 mm en ambos casos y para cada una de las cepas indicadoras.

3.3. Espectro de inhibición de las cepas ácido resistentes seleccionadas

El espectro de inhibición de las cepas seleccionadas fue determinada mediante la exposición de los sobrenadantes neutralizados de cada cepa frente a un amplio número de microorganismos indicadores, entre los que se incluyen bacterias alterantes, patógenas y microorganismos empleados en alimentación, siendo todas muy importantes por su uso en la alimentación y la salud humana (Tabla 2). La cepa IATA-312 muestra el espectro de actividad antimicrobiana más amplio, es capaz de inhibir 16 de 21 cepas indicadoras. La actividad antimicrobiana de las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324 y IATA-326 son muy similares mientras que las cepas IATA-349 y IATA-350 son mucho más restringidas. *E. faecium* ATCC 19434 es la única cepa que no puede ser inhibida por ninguna bifidobacteria, mientras que *E. coli* NCTC 8603 fue inhibida por todas ellas. *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *E. aerogenes* ATCC 13048 y *Leuconostoc* spp. (aislados de carnes alteradas) fueron inhibidas únicamente por la cepa IATA-349. La cepa indicadora *B. bifidum* NCTC 10472 fue sensible al sobrenadante de la cepa *Bifidobacterium* IATA-0312. Muchos de los microorganismos patógenos Gram-positivos, como *C. difficile* ATCC 6989, *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *S. aureus* ATCC 12600, y algunos Gram negativos como *S. typhimurium* ATCC 2963, *H. pylori* NCTC 11637, *C. coli* NCTC 11366 y *A. butzleri* NCTC 12481 fueron inhibidos por algunas de las cepas testadas. Se detectó actividad antimicrobiana frente a *C. albicans* ATCC 18804 en las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-312 y IATA-324.

Tabla 2. Espectro de inhibición de las bifidobacterias seleccionadas por su resistencia a las condiciones ácidas frente a las cepas indicadoras. Los resultados se expresan como la media (mm) \pm error estándar de a media.

Microorganismo indicador	Inhibición de los sobrenadantes de las cepas de <i>Bifidobacterium</i> (mm) ^a						
	IATA-304	IATA-307	IATA-312	IATA-324	IATA-326	IATA-349	IATA-350
<i>Lactococcus lactis</i>	10.1 \pm 0.2	9.2 \pm 0.1	14.3 \pm 0.2	10.1 \pm 0.1	10.5 \pm 0.2	19.2 \pm 0.4	9.0 \pm 0.5
<i>Lactobacillus fermentum</i>	9.2 \pm 0.2	- ^b	9.1 \pm 0.1	-	11.1 \pm 0.2	14.4 \pm 0.1	-
<i>Leuconostoc</i> spp.	-	-	-	-	-	10.3 \pm 0.2	16.2 \pm 0.3
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium piscicola</i>	10.1 \pm 0.1	-	9.0 \pm 0.2	9.2 \pm 0.0	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-	9.0 \pm 0.2	-	-	-	-
<i>Bochothrix thermospacta</i>	16.3 \pm 0.2	15.1 \pm 0.1	14.3 \pm 0.3	12.1 \pm 0.2	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	17.1 \pm 0.2	18.2 \pm 0.2	16.63 \pm 0.1	15.5 \pm 0.1	10.3 \pm 0.2	10.1 \pm 0.4	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	15.3 \pm 0.2	-	11.2 \pm 0.3	10.3 \pm 0.2	11.2 \pm 0.2	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	9.3 \pm 0.2	13.3 \pm 0.4	12.3 \pm 0.2	9.2 \pm 0.1	10.0 \pm 0.2	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.2 \pm 0.2	9.1 \pm 0.2	15.2 \pm 0.1	-	19.4 \pm 0.2	-	-
<i>Escherichia coli</i>	13.5 \pm 0.2	18.0 \pm 0.4	14.0 \pm 0.1	15.2 \pm 0.3	15.3 \pm 0.2	10.4 \pm 0.1	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	10.2 \pm 0.2	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	14.0 \pm 0.4	15.2 \pm 0.2	12.0 \pm 0.2	14.2 \pm 0.1	9.0 \pm 0.0	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	9.2 \pm 0.2	-
<i>Aeromonas salmocida</i>	-	-	9.0 \pm 0.2	-	9.0 \pm 0.0	10.0 \pm 0.2	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	9.3 \pm 0.2	9.0 \pm 0.0	11.3 \pm 0.2
<i>Helicobacter pylori</i>	-	11 \pm 0.1	13 \pm 0.1	9 \pm 0.1	12 \pm 0.1	10 \pm 0.1	N
<i>Helicobacter pylori</i>	10 \pm 0.1	10 \pm 0.1	9 \pm 0.1	11 \pm 0.1	9 \pm 0.1	9 \pm 0.1	N
<i>Campylobacter coli</i>	9.1 \pm 0.2	9.2 \pm 0.3	13.2 \pm 0.1	10.1 \pm 0.4	15.3 \pm 0.2	-	N
<i>Arcobacter butzleri</i>	13.3 \pm 0.2	9.0 \pm 0.3	10.2 \pm 0.2	11.5 \pm 0.3	12.4 \pm 0.2	-	N
<i>Candida albicans</i>	9.2 \pm 0.2	10.2 \pm 0.1	9.0 \pm 0.3	12.1 \pm 0.2	-	-	-

^aValores de inhibición (mm) se expresan como la media de los análisis realizados por duplicado y el error estándar de la media.

^bInhibición no detectada.

N no testado

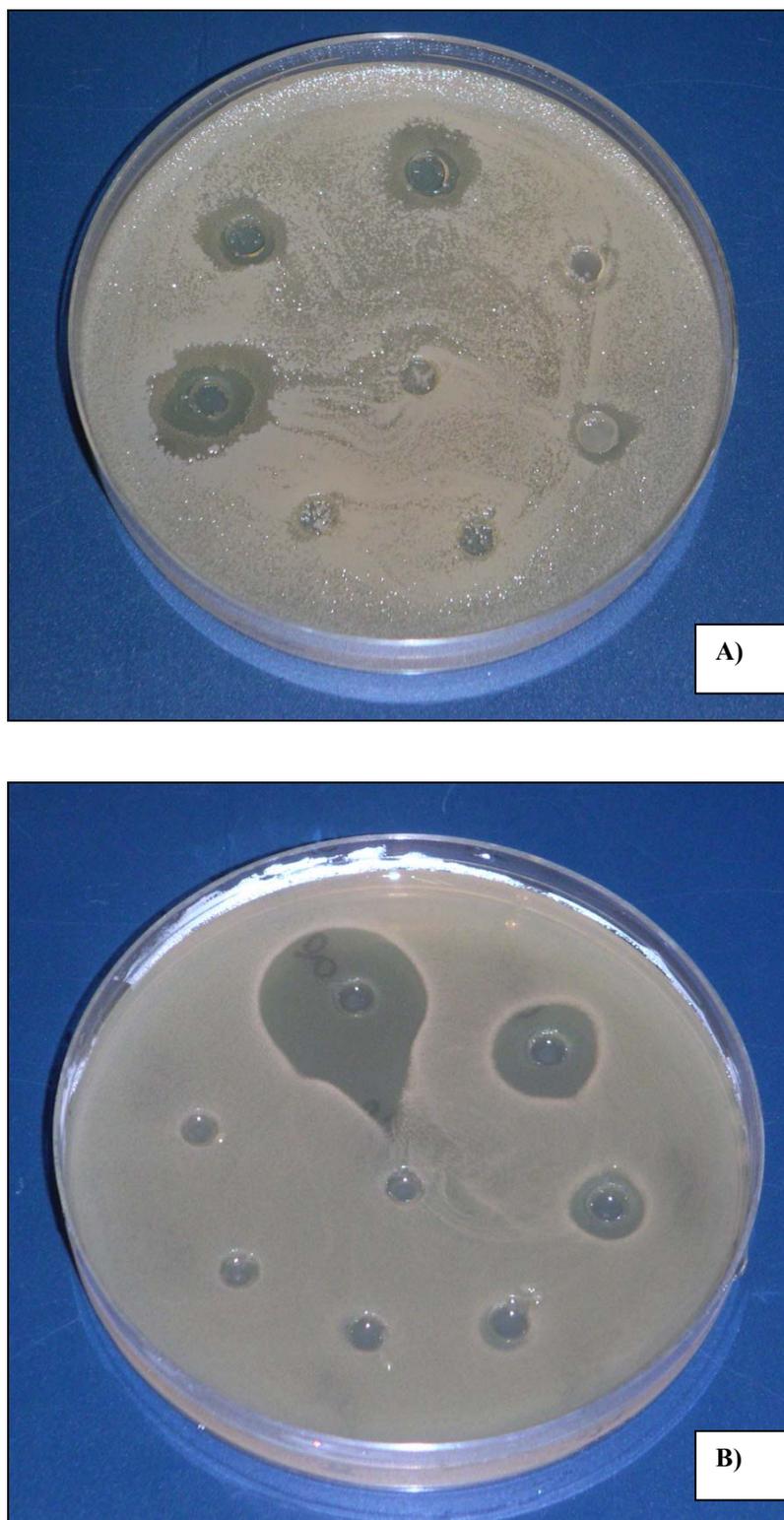


Figura 3. Efecto de los sobrenadantes neutralizados de las cepas del género *Bifidobacterium* frente a A) *Staphylococcus aureus* y B) *Lactococcus lactis*.

3.4. Caracterización de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana

Los sobrenadantes de las cepas seleccionadas IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 e IATA-350 fueron tratados con diferentes enzimas con el fin de determinar la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana. La exposición de los SNCs a las distintas enzimas proteolíticas hizo disminuir considerablemente la actividad antimicrobiana e incluso llegó a desaparecer en algunos la mayoría de los casos, mientras que los tratamientos con enzimas amilolíticos y proteolíticos no ejercieron ningún efecto en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes. Dichos resultados sugieren que la actividad microbiana de debe a un compuesto de naturaleza proteica (bacteriocina) cuya actividad biológica no depende de componentes de naturaleza lipídica ni glucídica.

Los compuestos antimicrobianos son estables a la temperatura ya que los actividad antimicrobiana permaneció tras incubación a 80°C durante 20 min y a 100°C durante 10 min, indicando que la actividad antimicrobiana esta mediada por moléculas termoresistentes. Todas las muestras presentaron una actividad inhibitoria en un amplio espectro de pH que oscilan entre 3.0 a 10.0 aunque a pH ácido las inhibiciones se incrementaron ligeramente (2-4 mm más en las inhibiciones obtenidas a pH neutro). De los resultados obtenidos se deduce que las sustancias antimicrobianas conservan su actividad en un amplio espectro y son estables al efecto del pH. Los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de las cepas IATA-312 y IATA-324 presentan un peso molecular entre 30 y 10 kDa, ya que se detectó inhibición en las fracciones de 10 kDa pero no en la no filtrada de 30 kDa. En contraste, la actividad antimicrobiana de los SNCs de las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-326 y IATA-349 tienen una masa molecular menor de 10 kDa ya que la actividad se detectó en la fracción filtrada de 10kDa.

4. DISCUSIÓN

En este estudio, se ha demostrado la producción de compuestos antimicrobianos con amplio espectro de acción por cepas de *Bifidobacterium* ácido resistentes como

un posible mecanismo para interferir en el crecimiento microbiano y para combatir y/o prevenir ciertas infecciones gastrointestinales.

El procedimiento descrito de aislamiento de bifidobacterias ácido resistentes de muestras fecales humanas fue efectivo y además, parece que las cepas resistentes a condiciones ácidas presentan también resistencia a elevadas concentraciones de sales biliares, por lo que parece que la resistencia al ácido puede inducir una resistencia cruzada a otras condiciones.

Los efectos antagonistas de las bifidobacterias contra microorganismos indeseables, patógenos y/ alterantes, ha sido inicialmente atribuida a la acidificación resultante de la producción de ácidos orgánicos (Ibrahim y Bezkorovainy, 1993; Asahara *et al.*, 2001; Bruno y Shah, 2002). La inhibición producida por los sobrenadantes neutralizados procedentes del crecimiento de bifidobacterias frente a *Clostridium perfringens*, *C. difficile* y *E. coli* O157:H7 ha encabezado la especulación sobre la implicación de péptidos antimicrobianos (Gibson y Wang, 1994; Lee *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2004). Sin embargo, ha sido descrito en bibliografía que ciertas cepas de bifidobacterias aisladas de niños producen una sustancia de naturaleza proteica estable al calor frente a *L. monocytogenes*. Una única bacteriocina (Bifidocina B) activa frente a bacterias Gram positivas ha sido purificada y caracterizada a partir de *B. bifidum* (Yildirim y Johnson, 1998; Touré *et al.*, 2003). En este trabajo, el estudio inicial de la producción de péptidos antimicrobianos por bifidobacterias se llevó a cabo empleando como indicadores dos microorganismos Gram positivos (*L. lactis* y *L. innocua*), que son fácilmente inhibidos por las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas descritas en bibliografía. La caracterización de los compuestos antimicrobianos sugiere que al menos dos tipos de sustancias de naturaleza protéica podrían ser producidas por las cepas de bifidobacterias estudiadas. Las cepas IATA-304, IATA-307, IATA-0326, IATA-349 y IATA-350 producen compuestos antimicrobianos estables a la temperatura con pesos moleculares menores de 10 kDa, como las bacteriocinas características de la clase I y II, y la bifidocina B, mientras que las producidas por IATA-312 y IATA-324 también son estables a tratamiento térmico pero presentan un peso molecular entre 10 y 30 kDa. Así, la relación de estos de péptidos antimicrobianos con la clase III, que son componentes lábiles a la temperatura, proteínas >30 kDa), es dudoso

(Yildirim y Johnson, 1998; Riley y Wertz, 2002; Chen y Hoover, 2003). Además, la presencia de diversas clases de péptidos antimicrobianos en el mismo sobrenadante neutralizado no puede ser descartada.

Uno de los factores que modula positivamente la actividad antimicrobiana detectada en los sobrenadantes neutralizados de bifidobacterias fue la adición de Tween 80 (polisorbato) al medio de cultivo de acuerdo con otros estudios (Huot *et al.*, 1996; Keren *et al.*, 2004). Este surfactante puede incrementar los niveles de bacteriocinas en los sobrenadantes mediante la estimulación de crecimiento o de la producción de bacteriocinas o mediante mecanismos que facilitan su secreción o deadsorción, aunque también podría actuar aumentando la sensibilidad del microorganismo empleado como indicador (Degnan *et al.*, 1993; Aymerich *et al.*, 2000; Keren *et al.*, 2004). La concentración de glucosa en el medio de cultivo no ejerce ningún efecto sobre la producción de compuestos antimicrobianos en las cepas de bifidobacterias testadas en este estudio. En contraste, existen estudios que demuestran que la producción de bacteriocinas esta promovida por pH ácido y, por lo tanto, mediante el empleo de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo podría favorecer la síntesis de ácidos (Nel *et al.*, 2001; Leal-Sánchez *et al.*, 2002; Mélancon y Grenier, 2003). En este estudio, las bifidobacterias seleccionadas presentan la máxima actividad antimicrobiana al final de la fase exponencial de crecimiento cuando se alcanza una elevada densidad celular en el medio de cultivo. De hecho, la producción de bacteriocina es dependiente de la densidad celular en muchas cepas de bacterias ácido lácticas (Eijsink *et al.*, 2002). El nivel de actividad, sin embargo, muestra una ligera disminución durante la fase estacionaria del crecimiento, posiblemente debida a la degradación proteolítica. La anulación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes por la acción de diversos enzimas proteolíticos y su resistencia al tratamiento con enzimas glucolíticos y lipolíticos sugiere que dicha actividad se debe a la producción y secreción al medio exocelular de sustancias de naturaleza proteica que no requiere para su actividad biológica componentes glucídicos ni lipídicos.

Los compuestos antimicrobianos producidos por las cepas de bifidobacterias seleccionadas en este estudio mostraron un amplio espectro de inhibición, siendo activos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y frente a levaduras.

Estas bifidobacterias presentaron actividad frente a cepas Gram-positivas como *B. thermosphacta*, *L. fermentum* y *Leuconostoc* spp. responsables de la alteración anaerobia de la carne refrigerada, este hecho podría sugerir su función como conservante en alimentos. Además, las bifidobacterias pudieron inhibir bacterias Gram negativas y levaduras, que no son frecuentemente inhibidas por las bacteriocinas descritas. Este trabajo es el primer estudio sobre la actividad antimicrobiana de cepas de *Bifidobacterium* frente a las especies *Helicobacter*, *Campylobacter* y *Arcobacter*. El antagonismo detectado frente a *A. butzleri* es particularmente relevante debido a que esta bacteria está considerada un patógeno emergente asociado a enteritis humana, diarreas, septicemia y bacteremia (Rivas *et al.*, 2004). En la actualidad, no hay información sobre el papel protector de otras bacterias ácido lácticas frente a este patógeno. En estos últimos años, se han descrito nuevas sustancias de naturaleza proteica con amplio espectro a partir de cepas de *Lactobacillus*. Los compuestos antimicrobianos detectados en *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei* cepa M3 y *Lactobacillus plantarum* han presentado actividad antimicrobiana frente a *Candida*, *H. pylori* y *E. coli* O157:H7 (Okkers *et al.*, 1999; Magnusson y Schnürer; 2001; Atanassova *et al.*, 2003; Elegado *et al.*, 2004). Según las características y el espectro de acción de los compuestos antimicrobianos producidos por las cepas de bifidobacterias seleccionadas debe ser considerada la posibilidad de la síntesis simultánea de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos.

En resumen, este estudio evidencia la habilidad de algunas cepas del género *Bifidobacterium*, integrantes de la flora intestinal endógena de niños y adultos, de producir compuestos con actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos. Esta propiedad podría constituir un mecanismo adicional de las bifidobacterias para participar en la defensa del huésped contra microorganismos patógenos y reforzar su competitividad en los diversos ecosistemas así como jugar un papel en la conservación de los alimentos.

Suplemento capítulo 6. Detección y estudio de actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* de cepas de origen humano pertenecientes al género *Bifidobacterium*

Dada la importancia de *Helicobacter pylori* en nuestra sociedad, esta especie esta considerada como el agente etiológico más importante de las gastritis crónicas y en las úlceras pépticas y están asociadas, también, al desarrollo de adenocarcinomas gástricos y de linfomas (Graham, 1997; Hamilton-Miller, 2003) y además se encuentra presente 70–90% de la poblaciones en desarrollo y en 25–50% en países desarrollados (Go, 2002). Para el tratamiento de infecciones de *H. pylori* se suele emplear una combinación de antibióticos (amoxicilina, claritromicina, o nitroimidazoles) junto a compuestos supresores de ácidos (fármacos inhibidores de la bomba de protones y antagonistas de H₂-receptores), en triples o cuádruples combinaciones (Hamilton-Miller, 2003). Estos tratamiento presentan elevado porcentajes de eliminación de la infección (>90%), pero poseen efectos secundarios entre los que destaca la aparición de resistencias a los antibióticos empleados en el tratamiento de *H. pylori* (Matsumoto *et al.*, 1997). La resistencia a metronidazol y en particular a la claritromicina son factores que, en la actualidad, están limitando la eficacia de los tratamientos contra esta infección (Graham, 2000). A consecuencia de estos hechos es necesario desarrollar nuevos tratamientos.

El géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* constituyen el origen principal de microorganismos probióticos; se han empleado con buenos resultados en la prevención y/o tratamiento de infecciones intestinales y recientes estudios han evidenciado su papel en el tratamiento contra *H. pylori* (Hamilton-Miller, 2003; Ouwehand *et al.*, 2000). Ciertas cepas de lactobacilos han demostrado presentar actividad, *in vivo* y *in vitro*, frente a *H. pylori* mediante la producción de ácidos orgánicos, inhibición competitiva por los lugares de adhesión a mucus e inmunomodulación (Bernet *et al.*, 1994; Sgouras *et al.*, 2004). Sin embargo, la síntesis de compuestos proteicos similares a bacteriocinas o bacteriocinas no se ha relacionado con efectos antagonistas contra *H. pylori* (Sgouras *et al.*, 2004). No existe en muchos estudios sobre el uso potencial de las bifidobacterias para combatir las infecciones por *H. pylori*, incluyendo los mecanismos responsables sin embargo

si existen algunas referencias para lactobacilos, aunque la caracterización de la síntesis de metabolitos antimicrobianos y otros ácidos orgánicos permanecen inexplorados.

El objetivo de este estudio es determinar la susceptibilidad de las cepas de *Bifidobacterium* y de cepas procedentes de aislados clínicos de *H. pylori* a los antibióticos empleados su tratamiento así como caracterizar los compuestos antimicrobianos secretados. La propuesta de este trabajo es buscar una alternativa a los antibióticos empleados para evitar las infecciones de *H. pylori* resistentes a esos antibióticos, bien mediante la administración de probióticos o bien como suplementos a las terapias con antibióticos.

S2. MATERIAL Y MÉTODOS

S2.1. Cepas, aislamiento y condiciones de crecimiento

Las cepas de referencia incluidas en este estudio fueron *Helicobacter pylori* NCTC 11638, *Helicobacter pylori* NCTC 11637, *Campylobacter coli* NCTC 11366, cepas de *Helicobacter pylori* aisladas a partir de biopsias gástricas, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 y H11 pertenecientes a la colección del Dept. Biotecnología (área microbiología) de la Universidad Politécnica de Valencia. Las cepas de *H. pylori* se cultivaron en superficie en el medio selectivo Pylori Agar (BioMerieux, Francia) y en Columbia agar Base (Difco, USA) con 7% (vol/vol) sangre de caballo desfibrinada y con suplemento selectivo para *Helicobacter* (SR147E, Oxoid, England). Las palcas se incubaron a 37°C bajo condiciones de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂). Las presuntas colonias se identificaron en base a su morfología de colonia, tinción Gram, reacción positiva de la ureasa (Urea agar, Microkit S.L., España), catalasa, y oxidasa (Bactident oxidase Kit, Merck, Darmstadt, Alemania).

Las bifidobacterias seleccionadas fueron IATA-304, IATA-307, IATA-312, IATA-324, IATA-326, IATA-349 e IATA-350 aisladas de muestras fecales humanas y caracterizadas molecularmente, tal y como se describe en otros capítulos.

S2.2. Identificación y caracterización molecular

El DNA genómico de las cepas de *Bifidobacterium* y *Helicobacter pylori* fue obtenido de acuerdo con el procedimiento de Wilson *et al.*, y fue ligeramente modificado para las bacterias Gram positivas. La confirmación de la cepas de *H. pylori* de las biopsias se realizó mediante PCR específica de especie, amplificando un fragmento específico de 2410 bp correspondiente al gen de la ureasa (Burucoa *et al.*, 1999). La confirmación de la identidad de las bifidobacterias se realizó mediante PCR específica de género amplificándose un fragmento específico de 1350 pb del gen del 16S rRNA (Kaufman *et al.*, 1997). (Ver capítulo 5 y 6).

S2.3. Detección de actividad antimicrobiana frente *Helicobacter pylori*

(Ver capítulo 6, pag. 164) Para determinar la actividad antimicrobiana secretados por las bifidobacterias seleccionadas, se emplearon cultivos de 24 h de cada cepa que fueron previamente sub-cultivados tres veces, se inocularon al (1% vol/vol) en 10 ml de caldo de MRSC. Tras 16 h de incubación a 37 °C, el cultivo se centrifugó (12,000 rpm, 15 min, a 4°C). Los sobrenadantes obtenidos fueron esterilizados mediante el uso de filtros y los pH se neutralizaron. Los sobrenadantes neutralizados libres de células (SNCs) se concentraron liofilizándolos, y fueron resuspendidos en 50 mM el fosfato de sodio (pH 6.5). Los SNCs de las diferentes cepas de *Bifidobacterium* fueron testadas mediante difusión en agar (agar well diffusion) para evaluar su actividad antimicrobiana. Para este ensayo, las células de *H. pylori* se resuspendieron en un diluyente Maximum Recovery Diluent (MRD; 0.1% (peso/vol) peptona y 0.85% (peso/vol) cloruro de sodio, pH 7) y se siembra en superficie sobre Columbia Agar Base suplementado con 10% (vol/vol) sangre de caballo. A continuación, se realizaron en el agar celdas de 5 mm de diámetro, con el empleo de un cilindro estéril de metal y los pocillos fueron llenados con 40 µl de los SNCF. Las placas se incubaron en condiciones adecuadas durante 16-24 h, tras las cuales las zonas de inhibición fueron evaluadas. Cada ensayo se realizó por duplicado.

S2.4. Caracterización de los compuestos antimicrobianos

(Ver capítulo 6, pag. 165) Para determinar la naturaleza de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, los sobrenadantes fueron tratados con tripsina, proteinasa K, proteasa A, pepsina, catepsina B, α -amilasa y lipasa A (Sigma, el St., Louis, MO) que fueron añadidas a 50 μ l de SNCs a una concentración final de 2 mg/ml. En los tratamientos con proteinasa K se trataron los sobrenadantes con distintas concentraciones desde 100 a 500 μ g/ml para evaluar la sensibilidad de los compuestos antimicrobianos a la acción de esta enzima. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a temperaturas y pHs óptimo para cada una de las enzimas, tras la incubación la actividad antimicrobiana fue testada de nuevo. Con el fin de evaluar la estabilidad térmica del compuesto antimicrobiano, los sobrenadantes fueron expuestos a 80°C durante 15, 30, y 60 min, y a 100 °C durante 15 y 20 min. De igual forma para evaluar la influencia del pH, los sobrenadantes se ajustaron con HCl o NaOH a distintos valores que oscilan entre pH 3.0 a 10.0 y se incubaron durante 1 h. La actividad antimicrobiana fue determinada antes y después de cada tratamiento siguiendo la técnica de difusión en agar descrita en el apartado anterior.

La inhibición causada por los ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), que podrían estar presentes en los sobrenadantes como resultado del metabolismo fermentativo, fueron testadas para ello soluciones de 5 y 10 mM ácido láctico (pH entre 4.0 y 3.6, respectivamente) y mezclas de 5 mM ácido láctico y 10 mM de ácido acético (Sigma, St. Louis, Mo). Estas soluciones fueron concentradas 10 veces mediante liofilización, y la inhibición de cada solución fue estudiada con y sin ajustar el pH a 6.5.

S2.5. Susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad de las cepas de *Helicobacter* y *Bifidobacterium* a metronidazol (MET) y claritromicina (CLR) fue cuantificada mediante el E-test siguiendo las instrucciones del fabricante (E-test®, AB BIODISK, Solna, Sweden). La susceptibilidad de las cepas de *Helicobacter* fue testada en Columbia Agar Base suplementado con 10% (vol/vol) sangre de caballo tras incubación a 37°C durante

48 h en condiciones de microaerofilia. El punto de resistencia a la CLR se ha establecido en $CMI \geq 2\mu\text{g/ml}$ y para el metronidazol $\geq 8.0 \mu\text{g/ml}$ (Megraud *et al.*, 1999). La susceptibilidad a estos antibióticos se determine en MRSC semisólido tras incubación a 37°C durante 24 h en condiciones anaerobias.

S2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el empleo del programa informático SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los datos fueron analizado mediante el análisis de varianza ANOVA y, en los casos donde sea adecuado, se empleó el test de Student-Newman-Keuls (S-N-K) para comparar las medias. Los datos se expresaron como la media de dos determinaciones independientes y el error de la media (SEM, Standard Error Media).

S3. RESULTADOS

S3.1. Identificación y caracterización molecular

La identidad de las cepas de *H. pylori* aisladas de las biopsias fue confirmada mediante le uso de métodos convencionales y mediante PCR específica que dieron como resultado la amplificación de un fragmento de 2410 pb del gen de la ureasa. En todos lo casos, el amplificado esperado fue detectado confirmando la asignación correcta de los aislados a este especie.

S3.2. Actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por *Bifidobacterium* frente a las cepas de *H. pylori*

Las zonas de inhibición detectadas para las placas con *H. pylori* varían entre 8 y 18 mm (Tabla 3). El grado de inhibición de las cepas de *H. pylori* por las cepas de bifidobacterias seleccionadas fue distinto ($P < 0.05$). Los sobrenadantes de las cepas IATA-307, IATA-312 e IATA-324 fueron capaces de inhibir en mayor o menor grado a todas le cepas de *Helicobacter* testadas (Fig. 4). La cepa IATA-304 fue la bifidobacteria menos eficiente, ya que no detectó actividad frente a *H. pylori* 11637 y a dos aislados clínicos (H6 y H10), la actividad anti-*H. pylori* de esta cepa fue menor ($P < 0.05$) que el resto de cepas IATA-307, IATA-312, IATA-324 y

IATA-326. La cepa IATA-349 no mostró diferencias significativas ($P<0.05$) con ninguna de las cepas de bifidobacterias en su habilidad para inhibir *H. pylori*. Cuando el pH de los sobrenadantes no fue neutralizado, las zona de inhibición se incrementaron entre 2 y 5 mm.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los SNCs frente a los diferentes aislados de *H. pylori*.

Cepas <i>H. pylori</i>	Diámetros de inhibición (mm) ¹					
	Cepas de <i>Bifidobacterium</i>					
	IATA-304	IATA-307	IATA-312	IATA-324	IATA-326	IATA-349
H1	9±0.2	10±0.4	15±0.2	12±0.1	- ²	10±0.3
H2	14±0.1	13±0.2	12±0.1	13±0.3	16±0.1	15±0.1
H3	12±0.2	14±0.4	12±0.1	12±0.3	18±0.2	10±0.1
H4	13±0.1	13±0.1	13±0.1	11±0.1	15±0.1	14±0.2
H5	10±0.2	9±0.2	10±0.1	12±0.1	-	-
H6	-	9±0.1	11±0.3	11±0.2	9±0.2	10±0.1
H7	12±0.4	10±0.2	12±0.2	12±0.1	13±0.0	9±0.1
H8	11±0.2	15±0.2	14±0.1	12±0.1	10±0.2	11±0.1
H9	11±0.2	13±0.1	11±0.3	14±0.2	13±0.1	11±0.1
H10	-	15±0.1	9±0.1	10±0.1	14±0.1	13±0.2
H11	9±0.1	11±0.1	9±0.2	12±0.1	13±0.0	8±0.2
<i>H. pylori</i> NCTC 11637	-	11±0.1	13±0.1	9±0.1	12±0.1	10±0.1
<i>H. pylori</i> NCTC 11638	10±0.1	10±0.1	9±0.1	11±0.1	9±0.1	9±0.1

¹Media de dos determinaciones independientes y error estándar de la media (SEM)

²Inhibición no detectada

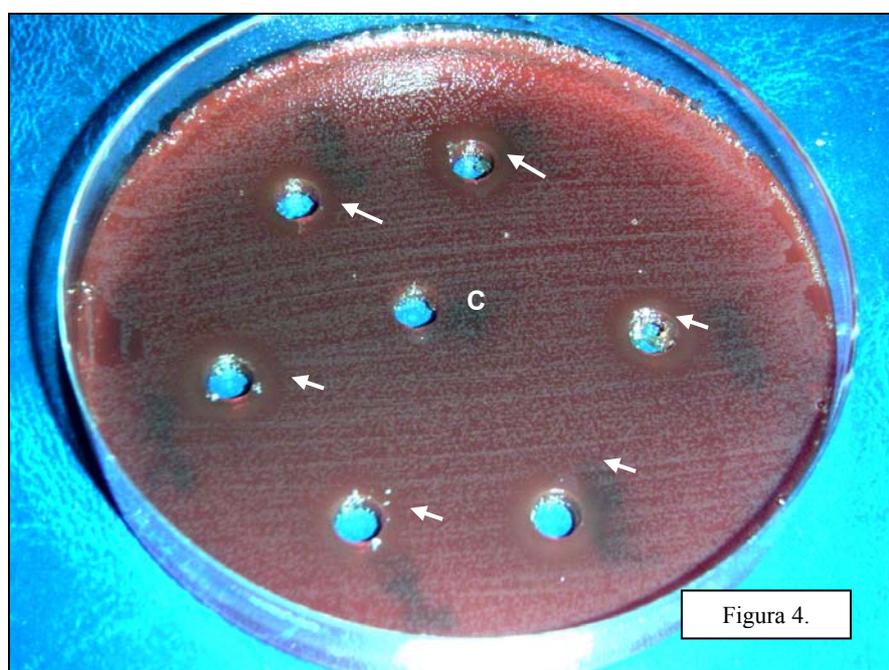


Figura 4. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes neutralizados de *Bifidobacterium* frente a *H. pylori*. C: control, MRSC concentrado y neutralizado.

Alguno de los compuestos responsables de la inhibición de *H. pylori* podrían ser los ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), para evaluar esta posibilidad, se testaron los efectos independientes de soluciones de ácido láctico a concentraciones 5 mM (pH 4.0) y 10 mM (pH 3.6), solas o en combinación con 10 mM de ácido acético. Las soluciones fueron evaluadas sin neutralizar y neutralizadas. Cuando no se neutralizaban las soluciones ácidas los efectos inhibitorios fueron entre 12-18 mm de diámetro, por lo contrario, cuando el pH de las soluciones ácidas se ajustaba a pH 6.5 no se detectaban halos de inhibición, estos resultados sugieren que en los sobrenadantes neutralizados los compuestos con actividad antimicrobiana son de diferentes a los ácidos orgánicos.

S3.3. Caracterización del compuesto antimicrobiano

La naturaleza de los compuestos antimicrobianos fue determinada mediante la exposición de los sobrenadantes frente a enzimas proteolíticas y lipolíticas. La actividad antimicrobiana se redujo considerablemente tras incubación de los sobrenadantes con todas las proteasas ensayadas a excepción de la proteinasa K, indicándonos que los compuestos son de naturaleza proteica. En todos los caso, la adición de distintas cantidades crecientes de proteinasa K hasta 500 µg/ml amplió considerablemente ($P < 0.05$) las zonas de inhibición (desde 8-10 a 18- 21 mm). Un ejemplo del efecto de la proteinasa K en la actividad antimicrobiana del sobrenadante neutralizado de la cepa IATA-304 se muestra en la Fig. 5. La acción de la proteinasa sobre *H. pylori* provoca inhibición (9-14 mm; $P < 0.05$) a altas concentraciones de proteinasa K (300-500 µg/ml) pero este efecto es menos pronunciado (6-8 mm; $P < 0.05$) cuando la proteinasa K se añade a los sobrenadantes neutralizados (Fig. 5). Estos resultados podrían sugerir que la proteinasa K añadida a los sobrenadantes neutralizados podría inhibir a *H. pylori* mediante dos posibles mecanismos: (i) por el propio efecto inhibitorio de la proteinasa K a altas concentraciones, y (ii) por la generación de péptidos pequeños por la acción de la proteinasa K, que podrían tener una actividad frente a *H. pylori*. El tratamiento de los sobrenadantes con lipasa no modificó la actividad anti-*H. pylori* de los sobrenadantes.

En todos los casos, la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes permaneció estable a tratamientos de 80 °C durante 20 min y a 100°C durante 10 min. La exposición de los sobrenadantes a distintos pH dio como resultado que la actividad de los compuestos antimicrobianos permanece estable a los pH comprendidos entre pH 3.0 a 10.0.

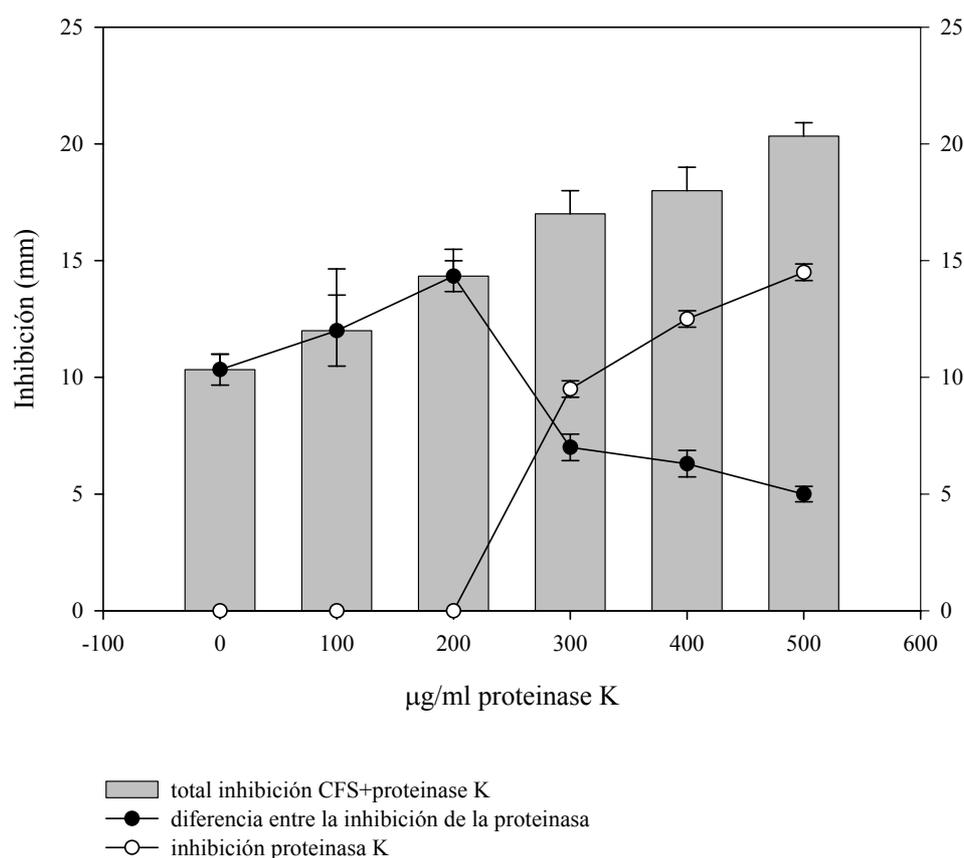


Figura 5. Actividad antimicrobiana del sobrenadante de cepas de *Bifidobacterium* aisladas de muestras fecales y la acción de la proteínasa K en dicha actividad.

S3.4. Susceptibilidad a antibióticos

Los resultados obtenidos mediante E-test para metronidazol y claritromicina se muestran en la Tabla 4. Todas las bifidobacterias fueron resistentes al metronidazol y mostraron sensibilidad a la claritromicina. Las cepas IATA-307 y IATA-324 presentaron una elevada resistencia a la claritromicina con valores CIM cercanos a 0.1 µg/ml. Todas las cepas de *H. pylori* presentaron sensibilidad a la claritromicina (≤ 2.0 µg/ml) a excepción de la cepa H1, que fue resistente. Las cepas

H1 y *H. pylori* NTCT 11637 mostraron una alta resistencia al metronidazol (256.0 µg/ml) mientras que las cepas H6, H7, H10 y *H. pylori* NCTC 11638 mostraron sensibilidad (≤ 0.0016 µg/ml). Únicamente la cepa H1 fue resistente a los antibióticos, metronidazol y claritromicina testados.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias frente a metronidazol y claritromicina de las cepas de *H. pylori* y *Bifidobacterium*.

Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/ml)	
	Metronidazol	Claritromicina
H1	-	*
H2	0.094	<0.016
H3	12	<0.016
H4	0.064	<0.016
H5	0.038	<0.016
H6	<0.016	<0.016
H7	<0.016	<0.016
H8	0.023	<0.016
H9	0.032	<0.016
H10	<0.016	<0.016
H11	0.064	<0.016
<i>H. pylori</i> NCTC 11637	-	<0.016
<i>H. pylori</i> NCTC 11638	<0.016	<0.016
IATA-304	-	<0.016
IATA-307	-	0.1
IATA-312	-	0.064
IATA-324	-	0.094
IATA-326	-	0.047
IATA-349	-	<0.016

*(-), no detección de halos de inhibición

S4. DISCUSIÓN

En los últimos años, el número de casos por infección por *H. pylori* han aumentado a nivel mundial y además, se esta incrementando el número de cepas resistentes a los antibióticos normalmente empleados para el tratamiento de estas infecciones (Blaser y Atherton, 2004). Este patógeno se está transformando en un problema clínico y terapéutico ya que las infecciones no pueden ser controladas adecuadamente por antibióticos que ya no constituyen una terapia satisfactoria. En este sentido, el uso de probióticos que podrían actuar impidiendo la colonización de patógenos bacterianos podría ser una alternativa prometedora (Ouwehand *et al.*, 200; Sakamoto *et al.*, 2001).

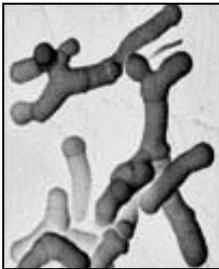
Los criterios principales para la selección de estas cepas probióticas son la resistencia frente a condiciones ácidas, antagonismo frente a microorganismos patógenos, y su susceptibilidad antibiótica. En el capítulo 5, el método de selección de cepas tolerantes a las condiciones ácidas es una manera de garantizar la resistencia a las condiciones ácidas, ya que permitiría que estos probióticos lleguen a la mucosa estomacal donde *H.pylori* habita.

Este estudio es el primero en demostrar que compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica secretados por cepas de *Bifidobacterium* de origen humano, pueden inhibir el crecimiento de cepas aisladas de muestras clínicas de *H. pylori* y que sus efectos no son debidos a la acción de los ácidos orgánicos. Recientes estudios sobre los mecanismos de inhibición de cepas probióticas de lactobacilos frente *H. pylori* señalan la implicación de la viabilidad celular y de la producción de ácido láctico en la inhibición del sistema de la ureasa del patógeno (Aiba *et al.*, 1998; Sakamoto *et al.*, 2001; Sgouras *et al.*, 2004). El estímulo de la inmunidad específica y no-específica así como la interferencia con los sitios de adhesión también han sido propuestos como los posibles mecanismos de acción (Sakamoto *et al.*, 2001; Sgouras *et al.*, 2004). No obstante, los efectos de péptidos o compuestos similares a las bacteriocinas contra *H. pylori* han sido poco documentados y, la inhibición se ha atribuido sólo a bacteriocinas de *Lactococcus* y *Pediococcus* y/o a componentes intracelulares proteicos de *L.acidophilus* CRL 639 (Kim *et al.*, 2003; Felley y Michetti, 2004). Las sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica posiblemente producidas por cepas del género *Bifidobacterium* son desconocidas y únicamente se ha descrito y caracterizado la bacteriocina denominada bifidocina B de *B. bifidum* NCFB 1454, pero sus efectos sobre *H.pylori* fueron estudiados (Yildirim y Jonson, 1998). No obstante, son necesarias investigaciones más extensas enfocadas al aislamiento y caracterización de compuestos antimicrobianos a partir de cepas de bifidobacterias deben llevarse a cabo para evaluar su posible uso profiláctico y/o terapéutico.

La evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *Bifidobacterium* aisladas frente a los antibióticos normalmente empleados en la lucha contra *H.pylori* es importante, ya que es necesario evaluar la seguridad de su empleo y estudiar su posible compatibilidad con las terapias antibióticas empleadas en la actualidad.

Todos las cepas de *Bifidobacterium* estudiadas mostraron resistencia al metronidazol, estos resultados concuerdan con los datos proporcionados por otros autores aunque el nivel de resistencia (256 µg/ml) fue más alto del esperado (Charteris *et al.*, 2000). Este hecho podría favorecer el empleo de las bifidobacterias como una terapia adjunta, combinada con este antibiótico. También se ha demostrado que la administración de probióticos previene los efectos gastrointestinales no deseados de asociados a los tratamientos con antibióticos (Felley y Michetti, 2004). Sin embargo, la susceptibilidad de las cepas de *Bifidobacterium* al claritromicina parecía ser variable y dependiente de cada cepa. Esto podría limitar su administración en combinación con este antibiótico. Hasta ahora, el uso terapéutico de cepas de lactobacilos probióticos contra *H. pylori* también había fallado en combinación simultánea con la administración de claritromicina. Todas las cepas *H. pylori* fueron inhibidas por los sobrenadantes neutralizados de las bifidobacterias seleccionadas, incluso la cepa H1 que mostró resistencia a ambos antibióticos. Así, combinaciones de distintas cepas de bifidobacterias podrían constituir una alternativa a los tratamientos empleados para combatir las infecciones por *H. pylori* multi-resistentes. La resistencia de *Helicobacter* a la claritromicina y al metronidazol está aumentando y este hecho se ha sido demostrado con numerosos estudios descritos en bibliografía (Graham, 2000; Falsafis *et al.*, 2004), este hecho podría revelar la necesidad de desarrollar nuevas terapias o buscar nuevos agentes antimicrobianos para la lucha contra *H. pylori*.

En conjunto, este estudio aumenta el conocimiento de los mecanismos desarrollados por las bifidobacterias frente a microorganismos patógenos mostrando evidencias de la implicación de péptidos antimicrobianos estables a pH ácidos. Las propiedades inhibitorias de las bifidobacterias seleccionadas frente a aislados clínicos de *H. pylori*, su habilidad de sobrevivir a las condiciones ácidas y su resistencia antibiótica convierte a estas cepas probióticas de bifidobacterias en candidatos potenciales para su empleo en el tratamiento y/o prevención de infecciones por *Helicobacter*.



CAPÍTULO 7

Estudio de adhesión a mucus intestinal humano de cepas de *Bifidobacterium* de origen humano. Papel en la exclusión y desplazamiento de patógenos.

1. INTRODUCCIÓN

Cepas seleccionadas de lactobacilos y bifidobacterias están siendo introducidas en la alimentación a partir de su inclusión en diversos alimentos como probióticos por sus efectos beneficiosos sobre la salud y nutrición del huésped (Huis *et al.*, 1998; Lee y Salminen, 1995; Salminen *et al.*, 1999). Algunas de estas cepas reducen el riesgo de infecciones gastrointestinales o se emplean para el tratamiento de tales desordenes (Salminen *et al.*, 1998; 1999).

La contribución de las bifidobacterias sobre la salud ha sido durante mucho tiempo reconocida y por ello esta aumentando la explotación industrial y tecnológica de este género como probióticos para mantener y/o mejorar la salud humana y animal (Gomes *et al.*, 1997; Muirhead, 2000, Stanton *et al.*, 2001). Algunos criterios para la selección de cepas probióticas han sido sugeridos entre los cuales destacamos la carencia de patogeneicidad, la tolerancia a las condiciones gastrointestinales (jugo gástrico e intestinal), habilidad para adherirse a la mucosa gastrointestinal y la exclusión competitiva de patógenos (Collins *et al.*, 1998; Ouwehand *et al.*, 2002). La adhesión a la mucosa intestinal es considerada como un pre-requisito para la colonización bacteriana (Beachey, 1981) y es una característica importante relacionada con la habilidad para modular el sistema inmune (Schiffrin *et al.*, 1997). Así, la adhesión es uno de los principales criterios de selección de nuevas cepas probióticas (Havenaar *et al.*, 1992, Salminen *et al.*, 1998). A pesar de la falta de evidencias definitivas, algunos estudios parecen sugerir que existe una relación entre la adhesión *in vitro* y la colonización *in vivo* (Crociani *et al.*, 1995; Cesena *et al.*, 2001). Además, la adherencia y la colonización de superficies mucosas son posibles mecanismos de protección frente a la invasión de patógenos a través de la competencia por los sitios intestinales y por nutrientes (Westerdahl *et al.*, 1991) o modulación del sistema inmune (Salminen *et al.*, 1998).

Las cepas humanas pertenecientes al género *Bifidobacterium* empleadas en este estudio han sido aisladas de muestras fecales procedentes de individuos sanos, adultos y niños. Siete cepas de sesenta cepas de *Bifidobacterium* aisladas se seleccionaron basándose en su tolerancia frente a las condiciones gastrointestinales

simuladas, en su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas incluyendo *Listeria*, *Salmonella*, *C. difficile*, *H. pylori* y *E. coli* (Collado *et al.*, 2005).

Estas consideraciones son la base de este estudio, diseñado para evaluar la capacidad de adhesión de estas cepas del género *Bifidobacterium* pre-seleccionadas y el estudio de su habilidad para inhibir la adhesión y desplazar a bacterias patógenas humanas. Para esta propuesta, se ha seleccionado el modelo de mucus intestinal humano inmovilizado. Existe una buena correlación entre este modelo y el modelo con enterocitos como las líneas celulares de Caco-2 (Aissi *et al.*, 2001; Ouwehand y Salminen, 2003). Además, la naturaleza de las macromoléculas implicadas en la adhesión a mucus intestinal fue caracterizada preliminarmente sometiendo a las bifidobacterias a diversos tratamientos físico-químicos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas patógenas empleadas en este estudio fueron *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29544, *Salmonella thyphimurium* ATCC 29631, *Escherichia coli* NCTC 8603 y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Siete cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de heces humanas fueron empeladas para los estudios de adhesión a mucus (Tabla 1). Estas cepas fueron identificadas por PCR específica de género (Kaufmann *et al.*, 1997) y de especie (Matsuki *et al.*, 2003).

Las bacterias patógenas se cultivaron en medio Gifu Anaerobic medio (GAM; Nissui Pharmaceutical, Japan) y las bifidobacterias crecieron bajo condiciones anaerobias (Concept 400 anaerobic chamber, Ruskinn Technology, Leeds, United Kingdom) en el medio MRS caldo (Merck, Darmstadt, Germany) suplementado con 0.05% cisteína (vol/vol). Las bacterias fueron marcadas radioactivamente añadiendo al medio de cultivo 10 µl/ml de timidina tritiada ($5\text{-}^3\text{H}$ -thymidine 120 Ci/ mmol; Amersham Biosciences, UK). Todas las bacterias fueron cultivadas a 37 °C.

2.2. Ensayo de adhesión a mucus intestinal

El mucus intestinal humano fue aislado de la parte sana de tejido colónico resecionado según la metodología descrita por Ouwehand *et al.* (1999). El tejido colónico se lava generosamente con tampón PBS que contiene 0.01% (peso/vol) de gelatina y a continuación, el mucus intestinal es recogido mediante raspado directo de la mucosa con una espátula de goma. El mucus obtenido se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min para eliminar las células destruidas y las bacterias, el mucus se almacena a -80°C hasta su empleo. Antes de su uso, la concentración proteica se determina con una modificación del método descrito por Lowry y colaboradores (1951) como el descrito por Miller y Hoskins (1981), empleando albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, Mo.) como estándar.

El mucus humano se disuelve (0.5 mg/ml proteína) en tampón HEPES (*N*-2-hidroxietilpiperazine-*N*-2-ácido etanosulfónico)-Hanks (HH; 10 mM HEPES, pH 7.4) y 100 μl de esta solución se inmovilizan en placas multipocillo de poliestireno (Maxisorp, Nunc, Denmark) mediante incubación a 4°C durante toda la noche, siguiendo la metodología descrita por Kirjavainen *et al.* (1998). Las bacterias marcadas radioactivamente fueron centrifugadas (6000 rpm, 7 min) y lavadas dos veces con tampón HH para eliminar los restos de timidina no incluida por las bacterias, a continuación, se determinó la concentración de microorganismos mediante absorbancia ($A_{600\text{nm}}$) que se ajustó a 0.25 ± 0.05 con el fin de estandarizar el número de microorganismos a 10^7 - 10^8 UFC/ ml. 100 μl de la solución con microorganismos marcados se añadieron a las celdas de la placa multipocillo y se incubó durante 1 h a 37°C . Las celdas se lavaron dos veces con 200 μl HH para eliminar las bacterias no adheridas. Las bacterias adheridas fueron liberadas mediante raspado del mucus inmovilizado en los pocillos y fueron lisadas con 1% (peso/vol) de SDS en 0.1 M NaOH (200 μl por pocillo) tras incubación a 60°C durante 1 h. Los contenidos de las celdas fueron transferidos a tubos eppendorf que contenían líquido de centelleo (OptiPhase 'HiSafe 3'; Wallac, UK) y la radioactividad fue medida gracias al líquido de centelleo. La adhesión fue expresada como el porcentaje de radioactividad recuperado después de la adhesión en relación a la radioactividad de la suspensión bacteriana añadida al mucus inmovilizado. La

adhesión bacteriana fue determinada en tres experimentos independientes y cada ensayo se realizó por cuadruplicado con el fin de calcular la variación intra-ensayos.

2.3. Inhibición de la adhesión de patógenos

Para testar la habilidad de las bifidobacterias seleccionadas en la inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos al mucus intestinal, las cepas probióticas sin marcar radioactivamente (100 μ l) fueron añadidas a las celdas de las placas multipocillo e incubadas durante 1h a 37°C. Las bifidobacterias no adheridas se eliminaron con dos lavados con tampón HH y los microorganismos patógenos marcados (100 μ l) se añadieron a los pocillos y se incubaron a 37°C durante 1 h. Los patógenos no adheridos se eliminaron mediante lavado y las células adheridas se liberaron mediante raspado del mucus y se lisaron con 1% (peso/vol) SDS en 0.1 M NaOH a 60 °C durante 1 h para liberar la radioactividad. La radioactividad fue evaluada con el líquido de centelleo. Los resultados se expresan como el porcentaje de radioactividad recuperada después de la adhesión, en relación a la radioactividad de la suspensión bacteriana añadida a los pocillos. El porcentaje de inhibición de la adhesión se calculó como la diferencia entre la adhesión del patógeno en ausencia y en presencia de las bifidobacterias. La adhesión se determinó en tres experimentos independientes, y cada uno de ellos se realizó por cuadruplicado para calcular la variación intra-ensayo.

2.4. Desplazamiento de patógenos

La habilidad de las bifidobacterias para desplazar a las bacterias patógenas previamente adheridas a mucus fue evaluada como se detalla a continuación. Las bacterias patógenas marcadas radioactivamente fueron añadidas a los pocillos e incubadas a 37°C durante 1 h. Después de los lavados y de la eliminación de los patógenos no adheridos, se añadieron bifidobacterias no marcadas radioactivamente (100 μ l) y se incubó 1 h a 37°C, a continuación, los pocillos fueron lavados para eliminar las bacterias no adheridas y/o desplazadas. Las bacterias adheridas a mucus se liberaron del mucus y se lisaron como se ha descrito anteriormente. El desplazamiento de patógenos fue calculado como la diferencia entre la adhesión de

patógenos antes y después de la adición de las bifidobacterias. Los experimentos también se realizaron por triplicado y en cada ensayo por cuadruplicado.

2.5. Caracterización preliminar de los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana

Las bacterias marcadas radioactivamente fueron centrifugadas, lavadas dos veces con tampón HH y se ajustó la concentración de microorganismos por absorbancia a 0.25 ± 0.05 . Las suspensiones bacterianas fueron divididas en alícuotas de 1 ml y sometidas a los siguientes tratamientos: i) tampón PBS con 1mg/ml de proteinasa K (Sigma), ii) tampón PBS con 1mg/ml de lipasa (ICN Biomedicals Inc.) y iii) tampón acetato (pH 4.5) con 5 mg/ml metaperiodato sódico (Merck). Además, las células también fueron sometidas a tratamiento térmico mediante exposición a 100°C durante 10 min en tampón PBS. Como controles, se usaron las suspensiones bacterianas incubadas únicamente en tampón PBS y tampón acetato. Tras la incubación durante 1h a 37°C bajo las condiciones apropiadas a cada tratamiento, las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en tampón HH para realizar los ensayos de adhesión como previamente se ha descrito.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el empleo del programa informático SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los datos fueron analizado mediante el análisis de varianza ANOVA y, en los casos donde sea adecuado, se empleó el test de Student-Newman-Keuls (S-N-K) para comparar las medias.

3. RESULTADOS

3.1. Adhesión de las cepas estudiadas

Los resultados de adhesión a mucus intestinal humano obtenidos en este trabajo se muestran en la figura 1.

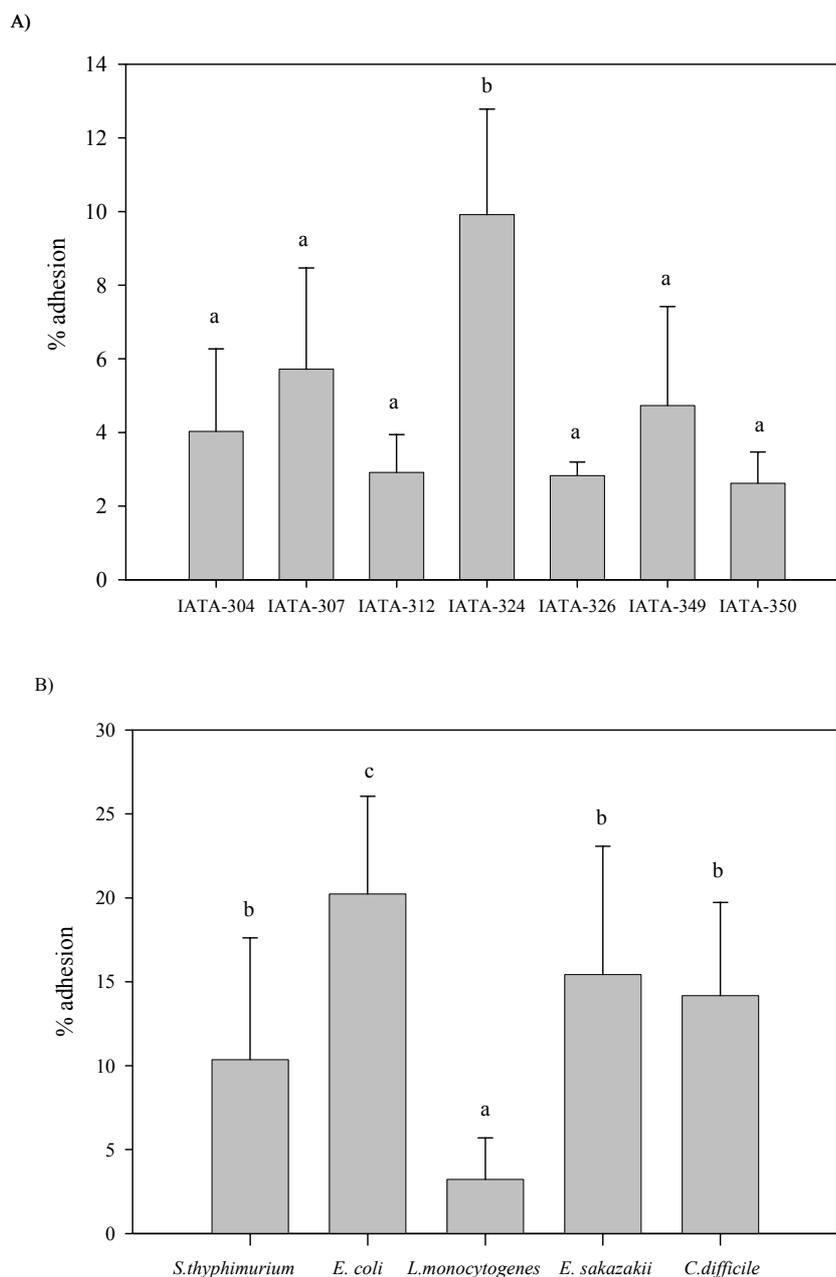


Figura 1. Adhesión de las cepas probióticas (A) y de las cepas patógenas (B) a las glicoproteínas del mucus intestinal humano. Los resultados se expresan como el % medio de adhesión \pm desviación estándar. ^{a, b, c} Columnas con diferencias significativas ($P < 0.05$).

La adhesión de las bifidobacterias varía entre 3 y 6% con la excepción de la cepa IATA-324, que muestra una capacidad de adhesión del 9.92%. En cuanto a las bacterias patógenas, *E. coli* NCTC 8603 presenta un porcentaje de adhesión del 20%), mientras que *S. thyphimurium* ATCC 29631, *Ent. sakazaki* ATCC 29544 y *C. difficile* ATCC 9689 muestran una capacidad de adhesión que se encuentra entre el 10 y 15%. El patógeno con menor capacidad de adhesión fue *L. monocytogenes* ATCC 15313, con un 3% de adhesión a mucus intestinal humano.

3.2. Inhibición de la adhesión de patógenos a mucus intestinal

La inhibición en la adhesión de los microorganismos patógenos por cepas de *Bifidobacterium* es dependiente de cada cepa de bifidobacteria y de cada patógeno ensayado (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibición de la adhesión de patógenos por cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

Cepas	% inhibición en la adhesión				
	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Clostridium</i>
	<i>thyphimurium</i> ATCC 29631	<i>monocytogenes</i> ATCC 15313	NCTC 8603	<i>sakazakii</i> ATCC 29544	<i>difficile</i> ATCC 9689
IATA-304	-24.45 \pm 4.81*	-20.99 \pm 13.44	20.54 \pm 14.84	-25.05 \pm 9.13*	6.75 \pm 5.84
IATA-307	12.72 \pm 7.02	13.78 \pm 8.46	6.07 \pm 4.66	22.51 \pm 10.79	22.37 \pm 9.15*
IATA-312	14.85 \pm 8.10	-4.08 \pm 2.64	3.76 \pm 2.07	8.39 \pm 4.08	17.27 \pm 7.29*
IATA-324	22.12 \pm 3.51*	15.06 \pm 5.57*	6.86 \pm 0.43*	18.04 \pm 5.54*	35.88 \pm 4.80*
IATA-326	12.72 \pm 1.43*	21.07 \pm 4.60*	16.51 \pm 5.05*	19.27 \pm 8.60*	23.30 \pm 7.36*
IATA-349	28.81 \pm 14.30	11.73 \pm 6.18*	12.63 \pm 8.22	17.29 \pm 6.70	19.95 \pm 7.27*
IATA-350	29.74 \pm 5.51*	43.42 \pm 5.99*	27.09 \pm 2.41*	28.10 \pm 4.11*	40.64 \pm 9.30*

* Diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control (0% de inhibición)

Los datos muestran que la cepa IATA-350 presenta una elevada capacidad de inhibición de la adhesión para todos los patógenos estudiados. Esta cepa reduce de manera significativa ($P < 0.05$) los niveles de adhesión de todos los patógenos testados, los niveles de reducción obtenidos fueron los más altos para los cinco patógenos incluidos en este estudio. Las cepas IATA-324 y IATA-326 también, han demostrado que son capaces de excluir significativamente ($P < 0.05$) a todos los patógenos estudiados. La cepa IATA-304 no inhibe, de forma significativa ($P < 0.05$), la adhesión de ningún patógeno pero aumenta la adhesión de *S. thyphimurium* ATCC 29631 (24.45%, $P < 0.05$), *Ent. sakazaki* ATCC 29544 (20.05%, $P < 0.05$) y *L. monocytogenes* ATCC 15313 (20.99%, $P > 0.05$). Todas las otras cepas del género *Bifidobacterium* fueron capaces de inhibir la adhesión de al menos un patógeno.

3.3. Desplazamiento de patógenos

Los resultados en el desplazamiento de patógenos por las bifidobacterias seleccionadas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Desplazamiento de patógenos del mucus intestinal por cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

Cepas	% desplazamiento de patógenos				
	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Clostridium</i>
	<i>thyphimurium</i> ATCC 29631	<i>monocytogenes</i> ATCC 15313	NCTC 8603	<i>sakazakii</i> ATCC 29544	<i>difficile</i> ATCC 9689
IATA-304	8.26 \pm 3.78	8.21 \pm 1.49*	12.66 \pm 3.28*	7.70 \pm 1.98*	10.13 \pm 0.84*
IATA-307	13.67 \pm 3.22*	12.88 \pm 9.31	9.45 \pm 3.58*	7.92 \pm 0.85*	1.74 \pm 0.64*
IATA-312	17.64 \pm 5.68*	16.77 \pm 4.97*	9.07 \pm 2.41*	14.35 \pm 5.15*	9.87 \pm 4.27*
IATA-324	8.00 \pm 3.91	34.15 \pm 11.78*	17.11 \pm 3.53*	56.83 \pm 10.55*	40.70 \pm 16.34*
IATA-326	11.36 \pm 2.15*	16.97 \pm 3.05*	4.53 \pm 1.33*	16.73 \pm 3.79*	15.52 \pm 6.81*
IATA-349	12.02 \pm 4.20*	16.69 \pm 7.56	15.97 \pm 7.03*	15.68 \pm 3.93*	15.12 \pm 4.89*
IATA-350	4.98 \pm 3.11	16.54 \pm 5.92*	7.98 \pm 2.32*	9.98 \pm 3.30*	10.54 \pm 1.10*

*Diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control (0% desplazamiento).

Los resultados demuestran que todos los patógenos pueden ser desplazados por las bifidobacterias testadas en este estudio, con algunas diferencias entre cepas. Todas las bifidobacterias son capaces de desplazar significativamente ($P < 0.05$) a *E. coli* NCTC 8603, *Ent. Sakazakii* ATCC 29544 y *C. difficile* ATCC 9689. Además, cinco y cuatro de las cepas testadas desplazan significativamente ($P < 0.05$) a *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *S. thyphimurium* ATCC 29631, respectivamente. Entre todas las cepas, la cepa IATA-324 alcanza los valores más altos de desplazamiento para los patógenos *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Ent. Sakazakii* y *C. difficile* (34.15, 17.11, 56.83 y 40.70% respectivamente), pero no desplaza significativamente a *S. thyphimurium*. Únicamente, las cepas IATA-312 y IATA-326 desplazan significativamente ($P < 0.05$) a todas las cepas de patógenos pre-adheridas, IATA-312 fue la cepa humana más efectiva en el desplazamiento de *S. thyphimurium*.

3.4. Caracterización preliminar de los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana

Se realizó la caracterización preliminar de los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana para dos de las cepas del género *Bifidobacterium*, IATA-326 e IATA-350, que fueron sometidas a diferentes tratamientos para caracterizar los componentes de la superficie celular implicados en su adhesión a mucus intestinal.

Como muestra la Tabla 3, todos los tratamientos reducen de forma significativa ($P<0.05$) la adhesión de las cepas testadas comparándolas con los controles tratados con los tampones adecuados, sugiriendo la participación de diferentes moléculas en la adhesión.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos en la adhesión de las bifidobacterias. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar.

Cepas	% reducción en la adhesión			
	Tratamientos			
	Metaperiodato (5 mg/ml)	Lipasa (1mg/ ml)	Proteínasa K (1mg/ ml)	Temperatura
IATA-326	20.35 \pm 6.82 *	47.95 \pm 15.32 *	37.19 \pm 16.41 *	41.27 \pm 14.61 *
IATA-350	33.61 \pm 11.41 *	57.76 \pm 12.34 *	62.39 \pm 12.57 *	71.24 \pm 20.54 *

* Diferencias significativas con el control ($P<0.05$)

El tratamiento con proteínasa K es el que más influencia posee sobre la adhesión al mucus intestinal. Este tratamiento reduce la adhesión de la cepa IATA-350 en un 62.39% y de la cepa IATA-326 en un 37.19%, indicando el importante papel que desempeñan las proteínas en la adhesión de las bifidobacterias al mucus intestinal. El tratamiento con lipasa exhibe, también, un marcado efecto en la adhesión, con reducciones en torno al 47.95-57.76%, y este hecho también sugiere la participación de componentes lipídicos en la adhesión de las cepas seleccionadas al mucus humano. La adhesión también se ve reducida con los tratamientos con metaperiodato sódico, pero menos que los anteriores tratamientos, sugiriendo que en el proceso de adhesión también están implicados los carbohidratos. Además de todo esto, la adhesión de las cepas de bifidobacterias disminuye tras someterlas a 100°C durante 10 min, lo cual implicaría la naturaleza termolábil de algunos factores implicados en la adhesión.

4. DISCUSIÓN

Estudios previos que demuestran la tolerancia a las condiciones gastrointestinales y propiedades antimicrobianas frente a importantes patógenos justifican la selección de estas siete cepas humanas que pertenecen al género *Bifidobacterium* (Collado *et al.*, 2005) (ver capítulo 6). En el presente estudio se

evaluó la capacidad de adhesión de estas cepas al mucus intestinal humano y su habilidad para inhibir la adhesión y/o el desplazamiento de microorganismos previamente adheridos. La adhesión a la mucosa intestinal humana es considerada como un prerrequisito para los microorganismos probióticos, permitiendo la colonización del tracto gastrointestinal humano (Alander *et al.*, 1999). Se ha demostrado que algunas bifidobacterias comparten uniones de carbohidratos específicas con algunos enteropatógenos (Fujiwara *et al.*, 2001), de esta forma, el uso de estos microorganismos en la prevención de las infecciones en estados tempranos por inhibición de la adhesión de patógenos por exclusión competitiva podría ser empleada. En este contexto, la habilidad de adhesión de las cepas del género *Bifidobacterium* para excluir competitivamente a enteropatógenos de líneas celulares Caco-2 había sido descrita por Bernet *et al.* (1993). Las dificultades que envuelven el estudio de la adhesión bacteriana *in vivo*, especialmente en humanos, ha encabezado el desarrollo de sistemas y modelos *in vitro* para la selección preliminar de cepas potencialmente adherentes. Diferentes modelos de mucosa intestinal han sido empleados para evaluar la capacidad de adhesión de probióticos, particularmente la adhesión a mucus intestinal humano (Kirjavainen *et al.*, 1998; Tuomola *et al.*, 2000; Rinkinen *et al.*, 2003; Ouwerhand *et al.*, 2000).

Los niveles de adhesión obtenidos de las bifidobacterias testadas en este estudio son similares a los descritos en bibliografía (Ouwerhand *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001). Es destacable que todos los patógenos muestran una elevada capacidad de adhesión a mucus intestinal, con la excepción *L. monocytogenes*, que únicamente adhiere un 3%. Este hecho podría sugerir que las bacterias patógenas tienen la capacidad de unirse al mucus intestinal con lo que podría facilitarse su invasión por toda la mucosa. La identificación de apropiados microorganismos que posean la habilidad de prevenir la adhesión de esas bacterias patógenas sería de gran interés. Para evaluar la habilidad de nuestras cepas de bifidobacterias en la inhibición de la adhesión de enteropatógenos y a la vez desplazarlos del mucus intestinal, cinco enteropatógenos que afectan a humanos, incluyendo: *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Ent. Sakazakii* y *C. difficile* fueron seleccionados en base a su importante papel en desordenes gastrointestinales. Al respecto, la habilidad de ciertos lactobacilos para excluir competitivamente a enteropatógenos ha sido

ampliamente descrita empleando diferentes modelos de adhesión *in vitro* (Tuomola *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Sin embargo, la actividad de las bifidobacterias no ha sido caracterizada.

La inhibición en la adhesión de patógenos por las bifidobacterias usadas en este estudio evidencian una variabilidad considerable y fue, claramente, una propiedad dependiente de cada cepa evaluada. Las cepas IATA-324, IATA-326 y IATA-350 muestran una elevada capacidad de inhibición con valores por encima del 40% de inhibición para alguno de los patógenos testados. De acuerdo con los resultados de este estudio, otros autores han descrito que ciertas bifidobacterias con capaces de inhibir la adhesión a la mucosa intestinal de *E. coli* y *Salmonella* por exclusión competitiva (Bernet *et al.*, 1993). Contrario a este hecho, la cepa IATA-349 incrementa la adhesión de *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* y *Ent. sakazakii* entre un 20 y 30%. El incremento en la adhesión de *S. typhimurium* al mucus intestinal tratado previamente con algunas cepas probióticas de lactobacilos había sido descrita anteriormente (Tuomola *et al.*, 1999). Aunque el significado biológico del incremento en la adhesión de patógenos es todavía desconocido debería ser considerado como un factor de riesgo asociado a estas cepas.

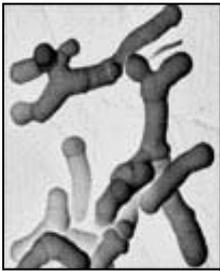
De acuerdo con los resultados descritos por otros autores (Bibiloni *et al.*, 1999a), no existe correlación entre la capacidad de adhesión y la inhibición en la adhesión de patógenos en las cepas de bifidobacterias empleadas en este estudio, indicándonos que además de la adhesión a mucus existen otros factores que podrían estar implicados como la co-agregación con patógenos.

El desplazamiento de patógenos pre-adheridos parece ser dependiente de cada cepa y de cada patógeno, y en cuanto a la inhibición en la adhesión, no se han encontrado relaciones directas entre la adhesión de las bifidobacterias y el desplazamiento de patógenos. No obstante, la adhesión podría ser uno de los factores implicados. En este sentido, la cepa IATA-324 que presenta una elevada capacidad de adhesión, también es muy efectiva en la inhibición de cuatro de los cinco patógenos testados, desplazando un 56.83% de *Ent. Sakazakii* previamente adherido, 40.70% de *C. difficile*, 17.11 y 34.15% para *E. coli* y *L. monocytogenes*, respectivamente. No se ha encontrado relación entre los resultados obtenidos para la

inhibición de la adhesión y el desplazamiento de patógenos, indicando que podrían estar implicados diferentes mecanismos en estos procesos.

Las moléculas implicadas en la adhesión de algunas bifidobacterias estudiadas fueron caracterizadas preliminarmente sometiendo a las cepas a diferentes tratamientos antes de la adhesión. Estudios previos han demostrado que compuestos proteicos y carbohidratos parecen estar involucrados en la adhesión a mucus intestinal y a líneas celulares como las Caco-2 en lactobacilos (Greene y Klaenhammer, 1994; Tuomola *et al.*, 2000) y en bifidobacterias (Bibiloni *et al.*, 1999b). De acuerdo con estos resultados, hemos encontrado en nuestro estudio que los tratamientos con proteinasa K y metaperiodato reducen la adhesión de nuestras cepas, señalando la participación en la adhesión de compuestos proteicos y carbohidratos de la superficie celular. El tratamiento con lipasa también reduce la adhesión, señalando que factores lipídicos también se podrían estar implicados. Estos resultados indican que compuestos de distinta naturaleza están implicados en la adhesión de las bifidobacterias al mucus intestinal, constituyendo un proceso multi-factorial.

Las cepas de bifidobacterias que inhiben y desplazan patógenos podrían ser unos excelentes candidatas para su uso como probióticos, pero teniendo en cuenta la alta especificidad de esos procesos es de vital importancia la caracterización de las propiedades de las cepas con el fin de seleccionar la mayor cepa o mejores combinaciones de cepas para prevenir o tratar infecciones por patógenos específicos. En conjunto, nuestros resultados junto con otros estudios sugieren que el estudio de la capacidad de adhesión al mucus intestinal es aplicable para la selección de nuevas cepas de bifidobacterias para uso humano. Esto podría permitir el desarrollo de probióticos para la prevención y/o tratamiento de desordenes gastrointestinales específicos u otras enfermedades. Entre las cepas testadas, la cepa IATA-324 parece ser la mejor para inhibir la adhesión de patógenos. No obstante, en vista de la marcada variabilidad observada en este estudio queda claro que esta propiedad es dependiente de cada cepa y de cada patógeno. Son necesarias más investigaciones con el fin de profundizar y garantizar el carácter probiótico de las cepas del género *Bifidobacterium* empleadas en este estudio.



DISCUSIÓN GLOBAL

DISCUSIÓN GLOBAL

El trabajo presenta dos partes diferenciadas, la primera parte abarca una investigación (aislamiento, identificación, caracterización y estudio de viabilidad) sobre las leches fermentadas con bifidobacterias comercializadas en el mercado español donde se observan la composición de la microbiota de los productos fermentados y se realiza una caracterización molecular de las bacterias. Esta primera parte se encuentran englobados los 4 primeros capítulos. En el primero (capítulo 1) se realiza un aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos comerciales, se observa que todas las muestras lácteas analizadas contienen alrededor de 10^8 - 10^9 microorganismos por mililitro, cumpliendo la normativa legal vigente (B.O.E. nº 135, 2002), que señala que un producto lácteo para denominarse yogur, debe contener al menos 10^7 microorganismos vivos por gramo, capaces de mantener todas sus características durante la vigencia legal del producto (24 días). En general, se observa que los estreptococos predominan en la matriz del producto y los lactobacilos y bifidobacterias se encuentran en menor medida. La cantidad de microorganismos del género *Bifidobacterium* es muy variada en los diversos productos lácteos analizados, detectando que algunos productos contienen $\leq 10^4$ bifidobacterias/ml pudiendo quedar comprometido el efecto probiótico en cuanto al contenido en bifidobacterias se refiere, ya que se recomienda las BAL se encuentren en una cantidad suficiente (10^6 - 10^7 microorganismos por ml) para que puedan ejercer su acción beneficiosa sobre la salud. Las leches fermentadas con bifidobacterias no poseen una normativa a nivel nacional que regule la cantidad de bacterias del género *Bifidobacterium* que debe contener este tipo de productos, pero la FAO/OMS y el Codex Alimentarius señalan que la cantidad presente en estos productos ha de ser $\geq 10^6$ - 10^7 células/ml y muchos de los productos analizados no siguen estas recomendaciones.

Para la caracterización molecular de bifidobacterias y de las otras bacterias lácticas se emplearon diversas técnicas RAPDs, AFLPs, PCR específica, múltiplex PCR y digestión con enzimas de restricción (ARDRA) del gen 16S del rRNA. Mediante RAPDs las bifidobacterias fueron caracterizadas intraespecíficamente. El análisis numérico de los distintos perfiles obtenidos con esta técnica dieron lugar a

un dendrograma, que permite diferenciar claramente los lactobacilos, las bifidobacterias y los estreptococos en grupos diferenciados, existiendo una mayor homología entre bifidobacterias y lactobacilos que con los estreptococos. Esto es una gran ventaja ya que permite la diferenciación entre géneros y además no proporciona información a nivel de cepa, que es muy importante a nivel industrial y científico porque nos ayuda a monitorizar determinadas bacterias y nos señala la presencia de la misma en diversos ambientes. La técnica AFLPs resulta ser mucho más tediosa de realizar para obtener los mismos resultados que empleando una técnica mucho más rápida y sencilla como es la técnica RAPDs. La amplificación del 16S del rRNA permitió la identificación molecular de las bifidobacterias a nivel de género tal y como describen otros autores (Kaufmann *et al.*, 1997) y la digestión de este fragmento con enzimas de restricción permite la discriminación interespecíficamente. Las mejores técnicas para la identificación de BAL y bifidobacterias son RAPDs, con la que conseguimos una identificación a nivel de cepa, múltiplex PCR y ARDRA con las que identificamos a nivel de especie y género. La combinación de las técnicas de múltiplex PCR, RAPDs y ARDRA es la herramienta más adecuada para la identificación de las bifidobacterias contenidas en productos lácteos comerciales. Todas las bifidobacterias analizadas pertenecen a la especie *Bifidobacterium animalis/lactis* y 20% de las cepas son diferentes, nuestro estudio demuestra que en el mercado español se emplea la misma cepa o clones de esa cepa para la elaboración de productos lácteos; éstos resultados concuerdan con los descritos por otros autores detectaron que en los productos comerciales la especie más empleada es *B. animalis* (Gueimonde *et al.*, 2004; Biavati *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que para que los probióticos ejerzan su acción deben llegar al intestino en una cantidad suficiente (10^6 - 10^7 bacterias/ml) para que se puedan apreciar sus efectos (Kurmann y Rasic 1991; Bouhnik, 1993). Por ello, es de especial interés estudiar la viabilidad de las bacterias lácticas y en este estudio se realizó el análisis de la supervivencia de las BAL presentes en productos lácteos (yogures, leches fermentadas, yogures pasterizados) durante su almacenamiento en refrigeración a 4°C (capítulo 2). El recuento total, realizado con medios selectivos y con tinción con fluorocromos, al inicio del ensayo para todos los productos fue 10^8 -

10⁹ bacterias/ml, pero solo 97-80% eran viables. El recuento en placa fue inferior al obtenido con fluorocromos debido a las bacterias no viables. Los recuentos de las BAL antes de la fecha de caducidad disminuyeron paulatinamente, a partir de la fecha de caducidad disminuyó considerablemente la viabilidad. Los productos de pH más ácido presentaron una disminución más acusada. La viabilidad de las bifidobacterias fue la más afectada durante el período de almacenamiento.

Los ensayos de supervivencia *in vitro* de las bifidobacterias comerciales al tránsito gastrointestinal también se realizó con LIVE/DEAD BacLight y recuentos en placa. Según nuestros resultados las bifidobacterias pueden atravesar el tracto gastrointestinal pero en función del inóculo en el producto y de la sensibilidad a la acidez de la cepa, podrían sobrevivir al tránsito gastrointestinal cantidades variables. Los resultados demuestran que las bifidobacterias son más sensibles al jugo gástrico que al intestinal, observándose pérdidas de viabilidad variables dependiendo de la cepa. La viabilidad se mantiene entre un 50-60% hasta la fecha de caducidad, cumpliendo normativa legal. La diferencia en la disminución de BAL viables entre los distintos productos estudiados, indica el uso de cepas con distinta resistencia dentro de la misma especie.

Tras el análisis de la viabilidad *in vitro* se escogió la leche fermentada con mayor número de bifidobacterias para estudiar su viabilidad *in vivo*; para ello, diez individuos sanos fueron sometidos a ingesta continuada de la leche comercial. Se monitorizó la población de bifidobacterias de los individuos durante todo el estudio empleando técnicas tradicionales de cultivo en medios selectivos y técnicas moleculares, entre las que seleccionamos la hibridación *in situ* con sondas específicas de género y de especie y la técnica ARDRA (restricción de los fragmentos de DNA amplificados); estas técnicas permitieron diferenciar las bifidobacterias endógenas de cada individuo de las exógenas pertenecientes a la especie *B.animalis/lactis*, contenidas en la leche fermentada ingerida, ya que presentan perfiles de digestión ARDRA diferentes y *B.animalis/lactis* no se encuentra de forma incluida dentro de la población bifidobacteriana habitual humana. Además, esta especie *B.animalis/lactis* no se encontró en la población microbiana intestinal de ninguno de los individuos sometidos a estudio. Con todas

estas técnicas se observa un incremento en la población bifidobacteriana total tras el consumo continuado en todos los individuos, esto incremento podría ser debido al aumento de la cepa comercial, por lo que esta cepa estudiada sobrevive al tránsito intestinal y se detecta viva en las heces de todos los individuos. Sin embargo, cuando cesó el consumo de *B.animalis/lactis*, la proporción de esta especie disminuyó tras 3 semanas de no ingestión la leche fermentada comercial.

Tras observar que la especie de bifidobacteria empleada en los productos lácteos es la misma, en la segunda parte en este estudio que realiza una selección y estudio de cepas de bifidobacterias de origen humano en función de algunos de los criterios descritos, tales como tolerancia a condiciones ácidas y a otras condiciones (sales biliares, antibióticos, etc.), actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y/o alterantes de alimentos, capacidad de adhesión a mucus intestinal, etc., con el fin de obtener cepas de origen humano con posible utilización como cepas probióticas como alternativa a las empleadas en la actualidad para el desarrollo de nuevos probióticos y bioprotectores en clínica y tecnología de los alimentos.

El aislamiento de cepas ácido resistentes se realizó a partir de muestras fecales de niños y adultos que se sometieron a un tratamiento en condiciones ácidas pH 2,0 durante 16 horas, tras las cuales se recuperaron en medios de cultivo selectivos bifidobacterias ácido resistentes. El procedimiento descrito de aislamiento de bifidobacterias ácido resistentes fue muy efectivo debido a que las cepas obtenidas presentaban un excelente mantenimiento de su viabilidad frente a condiciones ácidas. Además, estas cepas resistentes presentan resistencia a elevadas concentraciones de sales biliares y a NaCl, por lo que parece que la resistencia al ácido puede inducir una resistencia cruzada a otras condiciones. La tolerancia a condiciones ácidas de las cepas seleccionadas podría también reforzar su resistencia a las tecnologías de procesado de alimentos, ya que la acidez esta considerada como uno de los factores que más afectan a la viabilidad de las bifidobacterias en los productos fermentados.

Dado el interés originado por las bacterias lácticas de origen natural productoras de bacteriocinas, se seleccionaron seis cepas de bifidobacterias resistentes a condiciones extremas (pH, acidez, salinidad, exposición jugos gastrointestinales...) para su empleo como futuros probióticos, y se estudiaron las actividades antimicrobianas frente a bacterias de interés industrial y clínico tan importantes como *Helicobacter pylori*.

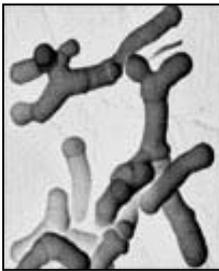
Los efectos antagonistas de las bifidobacterias contra microorganismos indeseables, patógenos y/ alterantes, inicialmente ha sido atribuida a la acidificación resultante de la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, se han descrito algunas cepas de bifidobacterias aisladas de niños que producen una sustancia de naturaleza proteica estable al calor frente a *L. monocytogenes* (Touré *et al.*, 2003) y, únicamente se ha estudiado una bacteriocina (Bifidocina B) activa frente a bacterias Gram positivas de *B. bifidum* (Yildirim y Johnson, 1998; Yildirim *et al.*, 1999). En este trabajo, el screening inicial de la producción de péptidos antimicrobianos por bifidobacterias se llevó a cabo empleando como indicadores dos microorganismos Gram positivos (*L. lactis* y *L. innocua*), que son fácilmente inhibidos por las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas. La caracterización de los compuestos antimicrobianos sugiere que al menos dos tipos de sustancias de naturaleza proteica podrían ser producidas por las cepas de bifidobacterias estudiadas. Este trabajo es el primer estudio sobre la actividad antimicrobiana de cepas de *Bifidobacterium* aisladas de muestras fecales humanas frente a las especies *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Candida*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium* spp., *Salmonella*, *Listeria* spp., etc. Los compuestos secretados son estables a la temperatura con pesos moleculares menores de 10 kDa, como las bacteriocinas características de la clase I y II, y la bifidocina B, mientras que las producidas por IATA-312 y IATA-324 también son estables a tratamiento térmico pero presentan un peso molecular entre 10 y 30 kDa. Uno de los factores que modula positivamente la actividad antimicrobiana detectada en los sobrenadantes neutralizados de bifidobacterias fue la adición de Tween 80 (polisorbato), este surfactante puede incrementar los niveles de bacteriocinas en los sobrenadantes mediante la estimulación de crecimiento o de la producción de bacteriocinas. La concentración de glucosa en el medio de cultivo no ejerce ningún efecto sobre la producción de

compuestos antimicrobianos. Las bifidobacterias seleccionadas presentan la máxima actividad antimicrobiana al final de la fase exponencial de crecimiento cuando se alcanza una elevada densidad celular en el medio de cultivo. El nivel de actividad, sin embargo, muestra una ligera disminución durante la fase estacionaria del crecimiento, posiblemente debida a la degradación proteolítica. La anulación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes por la acción de diversos enzimas proteolíticos y su resistencia al tratamiento con enzimas glucolíticos y lipolíticos sugiere que dicha actividad se debe a la producción y secreción al medio exocelular de sustancias de naturaleza proteica que no requiere para su actividad biológica componentes glucídicos ni lipídicos. En resumen, este estudio evidencia la habilidad de algunas cepas del género *Bifidobacterium*, integrantes de la flora intestinal endógena de niños y adultos, de producir compuestos con actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos. Esta propiedad podría constituir un mecanismo adicional de las bifidobacterias para participar en la defensa del huésped contra microorganismos patógenos y reforzar su competitividad en los diversos ecosistemas así como jugar un papel en la conservación de los alimentos.

En la última parte del trabajo, se realizó un estudio diseñado para evaluar la capacidad de adhesión de estas cepas del género *Bifidobacterium* pre-seleccionadas y se estudió su habilidad para inhibir la adhesión y desplazar a bacterias patógenas humanas, ya que son características importantes de selección de cepas probióticas. Todas las cepas del género *Bifidobacterium* fueron capaces de inhibir la adhesión de patógenos y de desplazar en mayor o menor grado a las bacterias patógenas pre-adheridas, el desplazamiento de patógenos pre-adheridos parece ser dependiente de cada cepa y de cada patógeno. No se ha encontrado relación entre los resultados obtenidos para la inhibición de la adhesión y el desplazamiento de patógenos, indicando que podrían estar implicados diferentes mecanismos en estos procesos. Los tratamientos con proteinasa K y metaperiodato reducen la adhesión de nuestras cepas, señalando la participación en la adhesión de compuestos proteicos y carbohidratos de la superficie celular. El tratamiento con lipasa también reduce la adhesión, señalando que factores lipídicos también se podrían estar implicados. Estos resultados indican que compuestos de distinta naturaleza están implicados en

la adhesión de las bifidobacterias al mucus intestinal, constituyendo un proceso multi-factorial.

En conclusión, las intensas investigaciones llevadas a cabo en el campo de los probióticos muestran evidencias cada vez más sólidas sobre sus efectos beneficiosos sobre el estado nutritivo y de salud y su función en la prevención y tratamiento de algunos desordenes fisiológicos. Estos estudios están demostrando además, que los probióticos poseen un número de propiedades funcionales superior a lo inicialmente esperado, lo que abre un amplio abanico de nuevas aplicaciones médicas e industriales. No obstante, existe una gran diversidad en las propiedades biológicas de distintas cepas por lo que se requiere mejorar los procesos de selección y realizar una caracterización individualizada de las mismas. Además, existe todavía un conocimiento limitado de los mecanismos de acción de éstas, de los compuestos bioactivos que pueden sintetizar y de su posible función fisiológica y aplicación tecnológica. Por todo ello, son necesarias un mayor número de investigaciones con el fin de asociar determinadas propiedades a cepas concretas y profundizar más en el conocimiento de estas bacterias y analizar su potencial uso para desarrollo de nuevos probióticos y bioprotectores en clínica y en tecnología de los alimentos.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

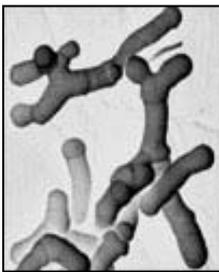
- ✓ Todos los productos lácteos analizados cumplen la normativa legal vigente. La cantidad de bifidobacterias es muy variable y algunos de los productos podrían ver limitado el efecto probiótico en cuanto a bifidobacterias, ya que poseen números menores que los recomendados por Codex Alimentarius y por la FAO-OMS. Los estreptococos predominan en todos los productos.
- ✓ El uso de sondas específicas de género mediante la técnica FISH permitió identificar todos microorganismos (lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos) presentes en los productos lácteos.
- ✓ Todas las bacterias aisladas de productos lácteos fueron identificadas a nivel de género, especie y cepas mediante las técnicas PCR específica, múltiplex PCR, digestión con enzimas de restricción del gen 16S del rRNA y RAPDs. Se observó que a pesar de pertenecer a la misma especie, las bacterias originarias de cada casa comercial presentan diferencias a nivel de cepa.
- ✓ La técnica molecular de RAPDs resulta adecuada para la identificación y diferenciación de las distintas bacterias acidolácticas, esta técnica permite diferenciar claramente éstos géneros. Las cepas de bifidobacterias y lactobacilos son las que presentan mayor homogeneidad.
- ✓ Mediante la restricción del gen del 16S con la enzima *MwoI* se diferencian los tres géneros (lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos) sin necesidad de identificación cultural, morfológica y bioquímica.
- ✓ Todas las bifidobacterias analizadas pertenecen a la especie *B.animalis/B.lactis*, aunque el 20% de las cepas son diferentes. La combinación de las técnicas de múltiplex PCR, RAPDs y ARDRA es la herramienta más adecuada para la identificación de las bifidobacterias.

- ✓ La viabilidad (lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos) durante el almacenamiento en refrigeración disminuyeron paulatinamente se mantiene entre un 50-60% y a partir de la fecha de caducidad se reduce drásticamente evaluada con tinción con fluorocromos y técnicas culturales. Los productos de pH más ácido presentaron una disminución más acusada.
- ✓ La supervivencia *in vitro* de las bifidobacterias comerciales a través del tránsito gastrointestinal evaluada con las técnicas de LIVE/DEAD BacLight y recuentos en placa, han demostrado que las bifidobacterias son más sensibles al jugo gástrico que al intestinal, observándose pérdidas de viabilidad entre el 90-40% dependiendo de la cepa. La supervivencia a los jugos gastrointestinales es dependiente de cada cepa.
- ✓ En el estudio *in vivo*, la técnica FISH y la técnica ARDRA permite diferenciar y monitorizar las bifidobacterias endógenas de cada individuo y las exógenas contenidas en la leche fermentada ingerida. Se observa un incremento en la población bifidobacteriana total tras el consumo de *B.animalis/lactis* para todos los individuos, esto indica que esta cepa sobrevive al tránsito gastrointestinal. Se detecta un descenso en los niveles de bifidobacterias tras cesar el consumo, llegando a no detectar la cepa ingerida tras 4 semanas de no ingesta.
- ✓ El procedimiento de aislamiento de bifidobacterias ácido resistentes de muestras fecales humanas es efectivo y además, las cepas presentan resistencias a otras condiciones tales como elevadas concentraciones de sales biliares y NaCl. Parece que la resistencia al ácido puede inducir una resistencia cruzada a otras condiciones.
- ✓ Las cepas de bifidobacterias ácido resistentes aisladas producen compuestos antimicrobianos frente a un amplio espectro de inhibición, siendo activos frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y frente a levaduras.

- ✓ Los compuestos antimicrobianos secretados son termoestables y de naturaleza protéica que no requiere para su actividad biológica componentes glucídicos ni lipídicos.

- ✓ Todas las cepas del género *Bifidobacterium* inhiben la adhesión de patógenos y desplazan a bacterias patógenas pre-adheridas, este desplazamiento es dependiente de cada cepa y de cada patógeno. No se han encontrado relaciones directas entre la adhesión y el desplazamiento de patógenos.

- ✓ En la adhesión participan compuestos proteicos, carbohidratos de la superficie celular y algunos factores lipídicos, constituyendo un proceso multi-factorial.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A., Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 2097-2101.
- Aissi, E.A., Lecocq, M., Brassart, C., Buoquelet, S. 2001. Adhesion of some Bifidobacteria strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins. *Microb. Ecol. Health Dis.* **13**, 32-39.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., Von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1), 351-4.
- Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1567-1576.
- Amann R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinate, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762-770.
- Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M., Tanaka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection by symbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 985-96.
- Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteínaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 63-73.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1991. *Current Protocols in Molecular Biology*. vol. 1, p. 241. In John Wiley (Eds.), New York.
- Auty, M.A.E., Gardiner, G.E., McBrearty, S.J., O'Sullivan, E.O., Mulvihill, D.M., Collins, J.K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. 2001. Direct In situ viability assessment of Bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 420-425.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional aspects. (Salminen, S. and Von Wright, A., eds). Marcel Dekker, Inc. New York.

- Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., Hugas, M. 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry-fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 686-694.
- Beachey, E.H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**, 325-345.
- Beerens, H. 1991. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2418-2419.
- Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 155-157.
- Beijerinck M.W. 1901. Sur les ferments lactiques de l'industrie. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles (Section 2). **6**, 212-243.
- Beimfohr, C., Krause, A., Amman, R., Ludwig, W., Schleifer, K-H. 1993. *In situ* identification of *Lactococci*, *Enterococci* and *Streptococci*. *Sys. Appl. Microbiol.* **16**, 450-456.
- Bell, C., Kyriakides, A. 2002. *Salmonella*. A practical approach to the organism and its control in foods. Practical Food Microbiology Series. Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Benjamin, M.M., Datta, A.R. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1669-1672.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., Hudault, S. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* **35**, 483-489.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Nesser, J.R., Servin, A.L. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4121-4128.
- Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M. 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74**, 409-413.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2001. The family *Bifidobacteriaceae*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer K-H, Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York., USA, pp. 1-70.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* **50**, 117-131.
- Bibiloni, R., Pérez, P.F., De Antoni, G.L. 1999. Factors involved in adhesion of bifidobacterial strains to epithelial cells in culture. *Anaerobe.* **5**, 483-485.
- Bibiloni, R., Perez, P.F., De Antoni, G.L. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? *Anaerobe.* **5**, 519-524.

- Blaser, M. J., Atherton, C. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* **113**, 321-333.
- Bonjoch, X., Balleste, E., Blanch, A.R. 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3171-3175.
- Boris, S., Barbès, C. 2000. Role played by Lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Rev. Microb. Infect.* **2**, 543-546.
- Bouhnik, Y. 1993. Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. *Lait.* **73**, 241-247.
- Bouhnik, Y., Pouchart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., Rambaud, J.C. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* spp ingested in fermented milk. *Gastroenterology.* **102**, 875-878.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.). 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins Baltimore, MD.
- Burucoa, C., Lhomme, V., Fauchere, J.L. 1999. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 4071-4080.
- Cai, Y., Matsumoto, M., Benno, Y. 2000. *Bifidobacterium lactis* Meile *et al.* 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka 1969) Scardovi and Trovatelli, 1974. *Microbiol.Immunol.* **44**, 815-820.
- CeNAN. 1982. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos y Bebidas. Madrid
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., Von Wright, A. 2001. *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J. Dairy Sci.* **84**, 1001-1010.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 1-27.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters Appl. Microbiol.* **26**, 333-337.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl Microbiol.* **84**, 759-68.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 2000. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *J. Food Prot.* **63**, 1369-1376.

- Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**, 82-100.
- Chevalier, P., Roy, D., Savoie, L. 1991. X- α -gal-based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *J. Microbiol. Methods*. **13**, 75-83.
- Chevalier, P., Roy, D., Ward, P. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 619-624
- Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E. 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Int.J. Food Microbiol.* **47**, 25-32.
- Clark, P.A., Cotton, L.N., Martin, J.H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II – Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* **28**, 11-14.
- Clark, P.A., Martin, J.H. 1994. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III – Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* **29**, 18-21
- Collado, M.C., Hernández, M., Sanz, Y. 2005. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human faecal *Bifidobacterium* strains. *J. Food Prot.* Aceptado.
- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O. 1998. Selection of probiotic strains for human application. *Int. Dairy J.* **8**, 487-490.
- Collins, M.D., Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1052-1057.
- Collins, M.D., Phillips, B.A., Zannoni, P. 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov. subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans* and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov. comb. *Int. Syst. Bact.* **39**, 105-108.
- Collins, M.D., Rodriguez, U., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**, 1-12
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microb. Biotechnol.* **50**, 253-256.
- Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V. 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp.nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 564-571.

- Crociani, J., Grill, J.P., Huppert, M., Ballonge, J. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 146-148.
- Cusick, S.M., O'Sullivan, D.J. 2000. Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2227-2231.
- Danielsen, M., Wind, A. 1997. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 1-11.
- Dave, R.I., Shah, N.P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **7**, 31-41.
- De Vries, W., Stouthamer, A.H. 1969. Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Microbiol.* **65**, 275-287.
- Defives, C., Guyard, S., Oularé, M.M., Mary, P., Hornez, J.P., 1999. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 1033-1038.
- Degnan, A.J., Buyong, N., Luchansky, J.B. 1993. Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 127-138.
- Deguchi, Y., Morishita, T., Mutai, M. 1985. Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 13-19.
- Dodd, H.M., Gasson, M.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria, p. 211-251. In M. J. Gasson, and W. M. De Vos (ed.), Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, London, England.
- Du Plessis, D.F., Dicks, L.M.T. 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*. *Curr. Microbiol.* **31**, 114-118.
- De Vuyst, L., y Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, London, England.
- Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **81**, 639-654.
- Elegado, F.B., Guerra, M.A.R.V., Macayan, R.A., Mendoza, H.A., Lizaran, M.B. 2004. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **95**, 11-18.
- El-Gendy, S.M., Marth, E. H. 1981. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J. Food Prot.* **44**, 211-212.

- Eriksen, G.S., Alexander, J. 1998. *Fusarium* toxins in cereals. In A risk Assessment. Tema Nord 1998:502. Copenhagen: Nordic Council of Ministers.
- European Commission in Concerted Action on Functional Foods Science in Europe. 1999. International Life Sciences Institute. Consensus Document. *Br. J. Med.* 81, S1-S2.
- Falsafi, T., Mobasheri, F., Nariman, F., Najafi, M. 2004. Susceptibilities to different antibiotics of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients at the pediatric medical center of Tehran, Iran. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 387-389.
- FAO/WHO. 2002. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellagio, F., Torriani, S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 59-70.
- Felley, C., Michetti, P. 2003. Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **17**, 785-791. Review.
- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* **9**, 53-61.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* **152**, 167-173.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Scut, F., Welling, G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3336-3345.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., Forstner, J.F. 2001. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliosylceramide on the cell surface. *Int. J. Food Microbiol.* **67**, 97-106.
- Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. In Probiotics: A Critical Review, G.W. Tannock, ed. Wyomndham, UK: Horizon Scientific Press. pp. 15-22.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut.* **32**, 439-442.
- Fuller, R. 1993. Probiotics foods. Current use and future developments. *Int. Food Ingrid.* **3**, 23-26.
- Fuller, R. 1999. Modulation of the intestinal microflora by probiotics. *Wordh. Series.* **42**, 33-45.

- Gagnon, M., Kheadr, E.E., Le Blay G., Fliss, I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* 0157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* **92**, 69-78.
- Gasson, M.J. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic streptococci after protoplast induced curing. *J. Bacteriol.* **154**, 1-9.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Gibson, G.R., Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **77**, 412-420.
- Gibson, J.R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S., Owen, R.J. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2580-2585.
- Giensendof, B.A.J., Quint, W.G.V., Henkens, M.H.C. 1992. Rapid and sensitive detection of *campylobacter* ssp. in chicken products using the polimerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**, 368-373.
- Gill, H.S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract.Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 755-773.
- Gilliland, S.E., Staley, T.E., Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* **67**, 3045-3051.
- Go, M.F. 2002. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharm. Therap.* **16**, 1-15.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Scie. Tech.* **10**, 139-157.
- Gorbach, S.L., Chang, T.W., Goldin, B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet.* **2**, 1519.
- Graham, D.Y. 1997. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology.* **113**, 1983-1991.
- Graham, D.Y. 2000. Community acquired acute *Helicobacter pylori* gastritis. *J. Gastroen. Hepatol.* **15**, 1353-1355.
- Greene, J.D., Klaenhammer, T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4487-4494.
- Greenwood, J.R., Pickett, M.J. 1980. Transfer of *Haemophilus vaginalis*, Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 170-178
- Guarner, F., Malagelada, J.R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet.* **361**, 512-519. Review.

- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., De los Reyes-Gavilán, C.G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Res. Int.* **37**, 839-850.
- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Canada. FAO/WHO.
- Hamilton-Miller, J.M. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **22**, 360-366. Review.
- Hamilton-Miller, J.M., Shah, S., Winkler, J.T. 1999. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutrition.* **2**, 223-229.
- Harmsen, H.J.M., Gibson, G.R., Elfferich, P., Raangs, G.C., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Argaiz, A., Roberfroid, M.B., Welling, G.W. 1999. Comparison of viable cell counts and fluorescence *in situ* hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 125-129.
- Harmsen, H.J.M., Wildeboer-Veloo, G.C., Raangs, A., Wagendorp, A., Klijn, N., Bindels, J.B., Welling, G.W. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification methods. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* **30**, 61-67.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use, p. 209-224. In R. Fuller (ed.), *Probiotics, the scientific basis*, 1st ed. Chapman and Hall, London, England.
- He, F., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Isolauri, E., Benno, Y., Salminen, S. 2001. Adhesion of *Bifidobacterium* spp. to human intestinal mucus. *Microbiol Immunol.* **45**, 259-62.
- He, F., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hashimoto, H., Benno, Y., Salminen, S. 2001. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30**, 43-47.
- Hernandez, J., Fayos, A., Ferrús, M.A., Owen, R.J. 1995. Random amplified polymorphism DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Res. Microbiol.* **146**, 685-696.
- Herranz, C., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Hernandez, P.E., Cintas, L.M. 2001. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 378-83.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P., Moore, W.E.C. (Eds.). 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, VI.
- Holland, D.F. 1920. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.* **5**, 215-229.

- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I., Mortensen, P.B. 1994. Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. Clinical Nutrition*. **59**, 74-79.
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCarney, A.L., Collins, M. D. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 995-999.
- Huang, Y., Adams, M.C. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 253-260.
- Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Servin, A.L. 1997. Antagonistic activity exerted in vivo and in vitro by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 513-518.
- Huis in't veld, J.H.J., Bosschaert and Shortt, C. 1998. Health aspects of probiotics. *Food Sci. Technol. Today*. **12**, 46-49.
- Huot, E., Barrena-Gonzalez, C., Petitdemange, H. 1996. Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 307-310.
- Ibrahim, S.A. Bezkorovainy, A. 1993. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* **62**, 351-354.
- Ingrassia, I., Roques, C., Prévots, F. 2001. Preliminary experiments for ARDRA validation on flora associated with intestinal mucosa. *Lait*. **81**, 263-280.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*. **88**, 90-91.
- Ji, G.E., Lee, S.K., Kim, I.H. 1994. Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp. Korean. *J. Food Sci.* **25**, 526-531.
- Jian, W., Dong, X. 2002. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 809-12.
- Jiang, T., Mustapha, A., Savaiano, D. A. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* **79**, 750-757.
- Johansson, M.L., Quednau, M., Ahrné, S., Molin, G. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 155-159.
- Kambe, M. 1991. Use of intestinal lactic acid bacteria and health, pp. 103-126. In Y. Nakazawa, and A. Hosono (eds), *Function of Fermented Milk*, Elsevier, London, United Kingdom.

- Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., Meguro, S. 1994. Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichi* and several intestinal bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**, 393–404.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1268-1273.
- Keren, T., Yarmus, M., Halevy, G., Shapira, R. 2004. Immunodetection of the bacteriocin lactacin RM: analysis of the influence of temperature and tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2098-2104.
- Kheadr, E., Bernoussi, N., Lacroix, C., Fliss, I. Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins. *Int. Dairy J.* **12**, 1041-1053.
- Kim, T.S., Hur, J.W., Yu, M.A., Cheigh, C.I., Kim, K.N., Hwang, J.K., Pyun, Y.R. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **66**, 3-12.
- Kirjavainen, P.E., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:185-189
- Klaenhammer, T.R. 1984. A general method for plasmid isolation in Lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **10**, 23-28.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 337-349.
- Kok, R.G., de Waal, A., Schut, F., Welling, G.W., Weenk, G., Hellingwerf, K.J. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3668–3672.
- Kokotovic, B., On, S.L. 1999. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified-fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Letters*, **173**, 77-84.
- Kullen, M.J., Amann, M.M., O'Shaughnessy, M.J., O'Sullivan, D.J., Busta, F.F., Brady, L.J. 1997. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J.Nutr.* **127**, 89-94.
- Kurmann, J.A., Rasic, J.L., 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Therapeutic properties of fermented milks. R.K. Robinson (Eds.), Elsevier Applied Food Sciences, London, pp. 117-158.
- Lane, D.L., Field, K.G., Olsen, G.J., and Pace, N.R. 1998. Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. *Meth. Enzymol.* **167**, 138-144.
- Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H.F., Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium*

- spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3069-3075.
- Lankaputhra, W.E., Shah, N.P. 1996. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft.* **51**, 65-69.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4048-4090.
- Leal-Sánchez, M.V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Frenández, A., Ruiz-Barba, J.L. 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPC0110. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4465-4471.
- Lee, I.S., Slonczewski, J.L. Foster, J.W. 1994. A low-pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *S. typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 1422-1426.
- Lee, Y., Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Scie. Tech.* **6**, 241-246.
- Lee, Y.J., Yu, W.K., Heo, T.R. 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**, 340-346.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. Salminen, S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* **52**, 925-930.
- Legan, J.D. 1993. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *Int. Biodeter. Biodegr.* **32**, 33-53.
- Leichmann, G. 1996. Über die im Brennereiprozess bei der Bereitung der Kunsthefe auftretende spontane Milchsäuregärung. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* **2**, 281-285.
- Li, L., Buhman, K.K., Hartman, P.A., Beitz, D.C. 1995. Hypocholesterolemic effect of *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 in rabbits. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 137-140.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H. 1965. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* **147**, 747-748.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 149-164.
- Linevsky, J.K., Kelly, C.P. 1997. *Clostridium difficile* colitis in gastrointestinal infections. In: LaMont, JT (ed) *Gastrointestinal Infections: Diagnosis and Management*. Marcel Dekker, New York, 293-325.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **19**, 265-275.
- Lynch, P.A., Gilpin, B.J., Sinton, L.W., Savill, M.G. 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human fecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 526-533.
- Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1-5.
- Man, Rogosa, Sharpe. 1960. *J. Appl. Bact.* **23**, 130
- Mangin, I., Bourget, N., Decaris, B. 1996. Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Res. Microbio.* **147**, 183-192.
- Margolles, A., Garcia, L., Sanchez, B., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C.G. 2003. Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate--a preliminary study. *Int J Food Microbiol.* **82**, 191-198.
- Marshall, S.M., Melito, P.L., Woodward, D.L., Johnson, W.M., Rodgers, F.G., Mulvey, M.R. 1999. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 4158-4160.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis In't veld, J.H.J. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine. Validation and the effect of bile. *J. Dairy Sci.* **80**, 1031-1037.
- Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Béra-Maillet, C., Bernalier, A., Corthier, G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4939-4942.
- Martinez-Murcia, A.J., and Collins, M.D. 1990. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 73-84.
- Martinez-Murcia, A.J., Harland, N.M., Collins, M.D. 1993. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assesment of congruence of small and large-subunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 532-541.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., Swings, J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1137-1143.

- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. 2004. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **85**, 191-198.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 167-73.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA: gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4506–4512.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Oyaizu, H. 1998. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species and group-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 113–121.
- Matsumoto, S., Washizuka, Y., Matsumoto, Y., Tawara, S., Ikeda, F., Yokota, Y., Karita, M. 1997. Appearance of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* strain in an Infected-ICR-mouse model and difference in eradication of metronidazole-resistant and -sensitive strains. *Antimicrob. Agents Ch.* **41**, 2602-2605.
- Matteuzzi, D., Crociani, F., Brigidi, P. 1983. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* **134**, 339-349.
- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., Fonden, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reiniero, R., Saarela, M., Salminen S., Saxelin, M., Schiffrin, E. Shanahan, F., Vaughan, E., Wright, A. 2000. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Tech.* **10**, 393-399.
- McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Greenberg, R.N., Fekety, R., Elmer, G.W., Moyer, K.A. 1994. A randomised placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *J. Am. Medical Ass.* **271**, 1913-1918.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H., Steward, P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods.* **21**, 1-13.
- McNaught, C.E., MacFie, J. 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutr. Res.* **21**. 343–353.
- McPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J., Gajaonar, A.A. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell. Probes.* **7**, 293-299.
- Megraud, F., Lehn, N., Lind, T., Bayerdorffer, E., O'Morain, C., Spiller, R., Unge, P., Van Zanten, S.V., Wrangstadh, M., Burman, C.F. 1999. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob. Agents Ch.* **43**, 2747-2752.

- Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S., Teuber M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 57–64.
- Melançon, D., Grenier, D. 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4482-4488.
- Metchnikoff, E. 1908. The Prolongation of Life. *G.P. Putnam*, 4.
- Miller, J.D. 2002. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **504**, 19-27.
- Miller, R.S., Hoskins, L.C. 1981. Mucus degradation in human colon ecosystems. Faecal population densities of mucus degrading bacteria estimated by a 'most probable number' method. *Gastroenterology.* **81**, 759-765.
- Mitsuoka, T. 1989. A Profile of Intestinal Bacteria. *Yakult Honsha Co.* Tokyo.
- Moreno, Y., Collado, M.C., Hernández, E., Hernández, M. 2004. Impact of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 on Human Intestinal Microbiota by Fluorescent *in situ* Hybridization. *Res. Microbiol.* Submitted.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 25-36.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauriello, G., Villani, F., Coppola, S. 1997. Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and determination of the number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies. *Res. Microbiol.* **148**, 501-510.
- Muirhead S., in 2000-2001 direct-fed microbial, enzyme and forage additive compendium. S. Muirhead (Ed.), Direct-fed products, Miller Publishing Co., Minnesota, 2000, Vol 5, Pages 57-294.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Ohori, H. 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int. J. Food Microbiol.* **90**, 357-62.
- Munoz, F.J., R. Pares. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1715-1718.
- Nagendra, G. 2001. Functional Foods from probiotics and prebiotics. *Food Tech.* **11**, 46-53.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142-201.
- Nazarowec-White, M., Farber, J.M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J. Med. Microbiol.* **48**, 559–567.

- Nebra, Y., Blanch, A.R. 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5173-5176.
- Nebra, Y., Bonjoch, X., Blanch, A.R. 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2651-2656.
- Neeser, J.R., Grant, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., Karlsson, K.A. 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology.* **10**, 1193-1199.
- Nel, H.A., Baner, R., Vandamme, E.J., Dicks, L.M. 2001. Growth optimisation of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PFD-1. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 1131-1138.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M.M., Gillilan, S.E. 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* **79**, 212-219.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, Y., Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 29-35.
- Nissen-Meyer, J., Nes., I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**, 67-77.
- Nokuthula, F.K., Geornaras, I., Von Holy, A., Hastings, J.W. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1084-1092.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A., de los Reyes-Gavilan, C.G. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low PH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 79-86.
- Okkers, D.J., Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.L. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 726-734.
- Oksanen, P.J., Salminen, S., Saxelin, M., Hämäläinen, P. 1990. Prevention of travellers diarrhoea by *Lactobacillus GG*. *Annual Medicine.* **22**, 58-63.
- O'Riordan, K., Fitzgerald, G.F. 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 259-264.
- Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le Lait.* **4**, 468-480.
- Orla-Jensen, S., Olsen, E., Geill, T. 1945. Senility and intestinal flora. A reexamination of Metchnikoff's hypothesis.

- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. **84**, 593-604.
- O'Sullivan, M.G., Thorton, G., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. 1992. Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 309-314.
- Ouwehand, A.C., and Salminen, S. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* **8**, 749-756.
- Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Salminen, S. 1999. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**, 61-64.
- Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Tolkkio, S., Salminen, S. 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 10-13.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. 2003. *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: A review. *Microb. Ecol. Health Dis.* **15**, 175-184.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **82**, 279-289.
- Ouwehand, A.C., Tolkkio, S., Kulmala, J., Salminen, S., Salminen, E. 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 82-86.
- Park, H.K., Seong, J.S., Heo, T.R. 1995. Acid adaptation promotes survival of *Bifidobacterium breve* against environmental stresses. *Food. Biotechnol.* **4**, 226-230.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* **29**, 4-8.
- Prevot, A.R. 1945. Concerning the distinction between *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Ann. Inst. Pasteur.* **88**, 229-231.
- Puhan, Z. 1990. Developments in the technology of fermented milk products. *Cult. Dairy Prod. J.* **25**, 4-9.
- Rafter, J.J. 1995. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scan. J. Gastroentero.* **30**, 497-502.
- Rasic, J.L., Kurmann, J.A. 1983. Bifidobacteria and their role. *Ann. Péd.* **241**, 8-23.
- Riley, M.A., Wertz, E. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 117-137.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2003. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet. Microbiol.* **97**, 55-61.
- Rivas, L., Fegan, N., Vanderlinde, P. 2004. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 31-41.

- 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 Microbiol. Lett.* **191**, 17–24.
- Roy, D., Ward, P., Champagne, G. 1996. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 11-29.
- Roy, D., Ward, P., Vincent, D., Mondou, F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **40**, 40-46.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* **344**, 1046-1049.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science.* **230**, 1350-1354.
- Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T., Koga, Y. 2001. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 709–710.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**, 147-171.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Sci. Technol.* **10**, 1-4.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 107-110.
- Samona, A., Robinson, R.K. 1991. Enumeration of Bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.* **44**, 3.
- Samona, A., Robinson, R.K. 1994. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *J. Soc. Dairy Technol.* **47**, 58-60.
- Sanders, M.E. 1993. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.* **76**, 1819-1828.
- Sanders, M.E., and Huis in't Veld. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **76**, 293-315.
- Sanders, M.E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: J. Kinsella (Eds.). *Advances in food and nutrition research. Academic Press.* San Diego, California. 67-130.

- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Smidt, H., Saarela, M., Matto, J., De Vos, W.M. 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Sys.Appl. Microbiol.* **26**, 572-584.
- Scardovi, V. 1981. The genus *Bifidobacterium*, in The Prokaryotes (Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. eds). 1951-1961.
- Scardovi, V. 1986. *Bifidobacterium*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Scardovi, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*, p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Scardovi, V. Trovatelli, L.D. 1969. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* **15**, 19-29.
- Scardovi, V., Crociani, F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 6-20.
- Schaafsma, G. 1996. Significance of probiotics in human diets. Page 38 in SOMED 21st *International Congress on Microbial Ecology and Disease*. Paris, October 28-30.
- Schiffirin, E.J., Brassard, D., Servin, A.L., Rochat, F., Donnet-Hughes, A. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 515-520.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., Neve, H. 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 386-388.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martínez-González, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 518-526.
- Shah, N.P. 1997. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: A review. *Milchwiss.* **52**, 72-75.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: Enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **83**, 894-907.
- Shankar, P.A., Davies, F.L. 1977. Selective technique for iogurt bacteria enumeration. *J. Soc. Dairy Technol.* **30**, 28.
- Shing, H., Lee, J., Pestka, J.J., Ustunol, Z. 2000. Viability of Bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerate storage. *J. Food Prot.* **63**, 327-331.
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S. 1990. Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea . *Annual Medicine.* **22**, 57 58.

- Simon, G.L., Gorbach, S.L. 1986. The human intestinal microflora. *Digest. Dis. Sci.* **31**, 147-162.
- Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. 2004a. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Methods.* **57**, 9-16.
- Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. 2004b. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 401-406.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L. 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7554-7557.
- Song, J.H., Cho, H., Park, M.Y., Na, D.S., Moon, H.B., Pai, C.H. 1993. Detection of *Salmonella tify* in the blood of patients with typhoid fever by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiology.* **31**, 1439-1443.
- Sonoike, K., Mada, M., Mutai, M. 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J. Food Hygienic Soc. Japan* **27**, 238-244.
- Sperti, G.S. 1971. Probiotics. Westport, Conn., AVI Pub.Co.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., and Witt, D. 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene.* **15**, 115, 255-260. Review.
- Stackebrandt, E., and Teuber, M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 317-324. Review.
- Stackebrandt, E., Fowler, V.J., Woose, C.R. 1983. A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 326-337.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.
- Stackebrandt, E., Teuber, M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 317-324.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., Ross, R.P. 2001. Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 476-483.
- Stiles, E. M. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **70**, 331-345.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Lemons, J.A. 2004. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* **144**, 821-823.
- Sullivan, A., Nord, C.E. 2002. Probiotics in human infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 625-627.
- Suzuki, I., Nomura, M., Morachi, T. 1991. Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft.* **46**, 635-639.

- Swaminathan, B., Matar, G.M. 1993. Molecular typing methods. In: "Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications". pp. 26-50. De: D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S. Ng J., Munro, K., Alotossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4264-4267.
- Tannock, J. 1999. Probiotics: a critical review. *Horizon Scientific Press, Norfolk, England.*
- Temmerman, R., Masco, L., Vanhoutte, T., Huys, G., Swings, J. 2003. Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6380-6385.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2002. Identification of antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 1-10.
- Teragazhi, B.E., Sandine, W.E. 1975. Improved medium for lactic Streptococcaceae phages from cheese factories. *Appl. Environm. Microbiol.* **29**, 807.
- Tham, W., Ericsson, H., Loncarevic, S., Unnerstad, H., Danielsson-Tham, M.L. 2000. Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold smoked fish. *Int. J. Food Microbiol.* **62**, 173-175.
- The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edition, release 3.7, 2001, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Tissier, H. 1900. La putréfaction intestinale. *Bull. Inst. Pasteur.* Paris.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M. 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.* **44**, 305-336.
- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4351-4356.
- Touré, R., Kheardr, E., Lacroix, C., Moroni, O., Fliss, I. 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1058-1069.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 393-398.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* **26**, 37-142.

- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int. J. Food Microbiol.* **60**, 75-81.
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Sarela, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3908-3914.
- Van Eldere, J., Janssen, P., HoefnagelS-Schuermans, A., Van Lierde, S., Peeter. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis versus fragment analysis for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2053-2057.
- Vandenbergh, P.A. 1993. Process for producing novel yeast and mould inhibiting products. *European patent 0 302 300 B1*.
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., Zink, R. 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 113-121.
- Ventura, M., Van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F., Zink, R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **86**, 205-223.
- Ventura, M., Zink, R. 2002. Rapid identification and differentiation of, and proposed new taxonomic classification for, *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6429-6434.
- Vincent, D., Roy, D., Mondou, F., Dery, C. 1998 Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 185-193.
- Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H., Wang, T.N., Wang, W.M. 2004. Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 737-41.
- Ward, L.J.H., Timmins, M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by Polymerase Chain Reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 90-92.
- Welsch, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- Wendakoon, C.N., Thomson, A.B., Ozimek, L. 2002. Lack of therapeutic effect of a specially designed yoghurt for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion.* **65**, 16-20.
- Westerdahl, A., Olsson, J.C., Kjelleberg, S., Conway, P.L. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2223-2228.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Refalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 2.4.1. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Yazid, A.M., Shuhaimi, M., Kalaivaani, V., Rokiah, M.Y., Reezal, A. 2000. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 57-62.
- Yildirim, Z., Johnson, M.G. 1998. Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.* **61**, 47-51
- Yildirim, Z., Winters, D.K., Johnson, M.G. 1999. Purification, amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 45-54.
- Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H., Reid, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2418-2423.
- Zhu, L., Li, W., Dong, X. 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1619-1623.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859.

Libros consultados

- Lactic acid bacteria, Microbiology and Functional aspects. 1998. Salminen S. y Von Wright, A.(eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Alimentos Funcionales. Probióticos. 2002. Ortega et al. (Eds.) Médica Panamericana, Madrid.
- Probiotics, a critical review.1999. Tannock G. (eds.). Horizon Scientific press.

Páginas web consultadas

www.bacterio.cict.fr/.

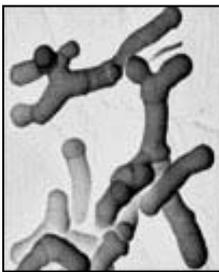
List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Noviembre 2004.

www.cme.msu.edu/bergeys/.

Manual de Bergey's on line. Fecha actualización Abril 2001

<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edition, Springer-Verlag, New York. Fecha actualización Agosto 2004.



ANEXOS

ANEXO I**MEDIOS DE CULTIVO**

Composición de los medios de cultivo referida a un litro de agua destilada.

MRS

Peptona	10 g
Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	4 g
Glucosa	20 g
Acetato sódico	5 g
Citrato triamónico	2 g
Sulfato magnésico	0.2 g
Sulfato manganoso	0.05 g
Polisorbato 80	1 ml
Agar	18 g
pH	6.3

M-17

Glicerofosfato sódico	19 g
Peptona de soja	5 g
Extracto de carne	5 g
Lactosa	5 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 g
pH	7.0

BFM

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
Cisteína	0.5 g
Tiamina	1 mg
Riboflavina	1 mg
Azul de metileno	16 mg
Agar	18 g
pH	5.5

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.

TPY

Triptona	10 g
Peptona de soja	5 g
Dextrosa	15 g
Extracto levadura	2.5 g
Cisteína	0.5 g
Fosfato dipotásico	2 g
Cloruro de magnesio	0.5 g
Cloruro cálcico	0.15 g
Cloruro férrico	0.01 g
Sulfato de zinc	0.25 g
Polisorbato 80	1 ml
Agar	18 g
pH	6.5

Para conseguir que el medio sea más selectivo y emplearlo como medio de aislamiento, Samona y Robinson (1991) propusieron la adición de mezclas inhibitoras como:

Cloruro de litio	3 g
Sulfato de neomicina	0.1 g
Ácido nalidíxico	15 mg

Añadidas al medio en forma de solución (esterilizada por filtración) después de esterilizar en el autoclave el medio a 121°C durante 15 minutos.

LS Differential

Tritona	10 g
Peptona de soja	5 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	5 g
Dextrosa	20 g
Cloruro sódico	5 g
Cisteína	0.3 g
Agar	18 g
pH	6.7

En frasco a parte, y se añade una vez atemperado el medio:

Leche descremada	10 g
Solución estéril de TTC al 1%	10 ml

Caldo glicerinado 20%

Polvo “Lab-Lemco”	10 g
Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Glicerol	2 g

BSM

Triptona	10 g
Peptona de soja	5 g
Dextrosa	15 g
Extracto levadura	2.5 g
Cisteína	0.5 g
Fosfato dipotásico	2 g
Cloruro de magnesio	0.5 g
Cloruro cálcico	0.15 g
Cloruro férrico	0.01 g
Sulfato de zinc	0.25 g
Polisorbato 80	1 ml
Agar	18 g
pH	6.5

ANEXO II**1. Soluciones, reactivos y material de identificación para PCR**

- **Solución CTAB / NaCl**

CTAB (Bromuro de hexadecil-amonio).10% en NaCl 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 50 mg/ml, introducir en un baño a 37°C durante 10 min antes de su uso.

- **Espermidina**

Solución de espermidina (SIGMA) 0.1M en TRIS-HCl 0.1M, pH 7.

- **Tampón TE**

Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM

- **Solución RNAsa**

RNAsa A (Boehringer)	5 mg
NaCl 1M	15 ml
Tris 1M (pH 8.3)	6 ml
EDTA 0.5M	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**

Tris-CHI	0.04M
EDTA	2 mM
Ácido acético glacial	0.02M

- **Tampón de carga**

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 una o dos gotas de solución de bromuro de etidio y verter en el molde.

- **Marcadores de pesos moleculares**

100pb DNA Ladder (IBERLABO)

Marcador L-101	50µl
Tampón TE	750µl
Tampón de carga	200µl

2. Soluciones y reactivos para la detección por FISH

- **PBS 3X**

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. Autoclavar a 115°C, 20min.

- **Paraformaldehido (Panreac)**

- ✓ Calentar 30 ml de agua destilada a 60°C.
- ✓ Añadir 2 g de PFA al agua precalentada y agitar. Se adicionan 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**

Gelatina bacteriológica (Cultimed 170-180)	0.1%
CrK(SO ₄) ₂ (Sigma C-5925)	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.

- **Solución de hibridación**

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
	µl						
NaCl 5M	360	360	360	360	360	360	360
HCl-Tris 1M	40	40	40	40	40	40	40
Formamida	200	400	500	600	700	800	900
H ₂ O MiliQ	1398	1198	1098	998	898	798	698
SDS 10%	2	2	2	2	2	2	2
Volumen final	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml y agitar.

- **Solución de lavado**

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
	µl						
NaCl 5M	4500	2150	1490	1020	700	460	300
EDTA 0,5M*	-	500	500	500	500	500	500
HCl-Tris 1M	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
SDS 10%	50	50	50	50	50	50	50
	ml						
H ₂ O MiliQ	44,45	46,3	47,94	47,43	47,75	47,06	48,15
Volumen final	50	50	50	50	50	50	50

* Sólo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

ANEXO III***Abreviaturas empleadas***

µl	Microlitro
µM	Micromolar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragments Length Polymorphisms</i>)
ARDRA	Digestión con enzimas de restricción (<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASC	Horse Blood Agar
ASO	Sheep Blood Agar
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
BFM	<i>Bifidobacterium</i> medio de cultivo
BH	Brain Heart agar (Oxoid, Basingstoke, UK)
BSM	<i>Bifidobacterium</i> specific media
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FA	Formamida
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (<i>Fluorescent in situ hybridization</i>)
FLUOS	5(6)-carboxy-fluorescein-N-hidroxisuccinimida éster
HH	Tampón HEPES-Hanks
HEPES	<i>N</i> -2-hidroxiethylpiperazine- <i>N</i> -2-ácido etanosulfónico
IATA	Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, Spain.
Kb	Kilobases (1000 pb)
kDa	Kilodaltons
M	Molar
ME	Agar Extracto de Malta
mM	Milimolar
M	Molar
MRS	Man Rogosa y Sharp medio de cultivo
MRSC	MRS con 0.05 g/l cisteína
NCTC	National Collection of Type Cultures, England
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PI	Ioduro de propidio
RAPDs	Amplificación aleatoria con iniciadores inespecíficos (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)
RCM	Reinforced Clostridial media (Oxoid, Basingstoke, UK)
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico

rpm	Revoluciones por minuto
SCNs	Sobrenadantes Neutralizados libres de células
SDS	Dodecil sulfato sódico
STAA	Streptomycin sulphate thallium acetate cycloheximide (actidione) agar
SYTO9	Syto 9
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPY	Triptona, peptona y extracto de levadura
TPY	Tryptone Peptone Yeast Extract agar (Oxoid, Basingstoke, UK)
TRICT	tetrametilrodamina-5-isotiocianato
UFC	Unidades formadoras de colonia
UPGMA	Underweighted-pair group method with average linkage
UPV	Universidad Politecnica de Valencia
U	Unidad
UV	Ultravioleta
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose agar

ANEXO IV**DIRECCIONES DE INTERÉS EN INTERNET****1.1 Centros de Biología Molecular**

<i>Portal</i>	<i>Dirección</i>
1. National Center for Biotechnology Information (USA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/
2. European Molecular Biology Laboratory (Europe)	www.embl.org/

1.2 Bancos de secuencias de nucleótidos

<i>Portal</i>	<i>Dirección</i>
1. GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/
2. EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	www.embl-heidelberg.de/

1.3. Herramientas de análisis

<i>Portal</i>	<i>Dirección</i>
1. BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
2. WEB CUTTER	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/

1.4. Buscadores de publicaciones periódicas

<i>Portal</i>	<i>Dirección</i>
1. Science Direct	www.sciencedirect.com/
2. Buscador investigación genómica	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
3. BioMedNet Journal Collection	http://journals.bmn.com/journals
4. Journal search	www.blackwell-science.com/
5. Biblioteca UPV	www.upv.es/revistas/
6. Ingenta	www.ingenta.com