

## INDICE

### INTRODUCCIÓN

1. Alimentos funcionales .....	1
1.1. Probióticos .....	3
1.1.1. Antecedentes de los probióticos .....	4
1.2. Propiedades de los probióticos .....	5
1.3. Efectos beneficiosos de los probióticos .....	9
2. Bacterias Acido lácticas .....	13
2.1. Derivados lácteos.....	16
2.2. Filogenia de las BAL.....	17
2.3. Genero <i>Lactobacillus</i> .....	17
2.4. Genero <i>Pediococcus</i> .....	20
2.5. Género <i>Lactococcus</i> .....	21
2.6. Género <i>Leuconostoc</i> .....	22
2.7. Especies presentes en leche de oveja Guirra.....	23
2.8. Identificación de las BAL.....	33
2.8.1. Características fenotípicas .....	33
2.8.2. Características genotípicas.....	34
3. Bacterias patógenas .....	38
3.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	38
3.2. <i>Salmonella spp.</i> .....	42

### CAPITULO I

IDENTIFICACIÓN FENOTIPICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE LECHE DE OVEJA GUIRRA .....	51
1. INTRODUCCIÓN .....	53
2. MATERIAL Y METODOS .....	55
2.1. Cepas bacterianas .....	55

2.2.	Identificación fenotípica .....	55
2.3.	Análisis estadístico .....	56
3.	RESULTADOS .....	56
4.	DISCUSIÓN .....	61

## CAPITULO II

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE LECHE DE OVEJA GUIRRA.....			63
1.	INTRODUCCIÓN .....		65
2.	MATERIAL Y METODOS .....		66
2.1.	Bacterias ácido lácticas.....		66
2.2.	Bacterias patógenas .....		66
2.3.	Evaluación de actividad antimicrobiana de las BAL .....		67
2.3.1.	Método de discos .....		67
	2.3.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....		68
	2.3.1.2. <i>Salmonella spp.</i> .....		69
2.3.2.	Método del sobrenadante en pocillos.....		70
	2.3.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....		71
	2.3.2.2. <i>Salmonella spp.</i> .....		72
2.4.	Análisis Estadístico.....		73
3.	RESULTADOS .....		74
3.1.	Actividad antimicrobiana frente a <i>H. pylori</i> .....		74
3.2.	Actividad antimicrobiana frente a <i>Salmonella spp.</i> .....		84
4.	DISCUSIÓN .....		91

## CAPITULO III

ESTUDIOS DE VIABILIDAD DE <i>H. pylori</i> .....			97
1.	INTRODUCCIÓN .....		99
2.	MATERIAL Y MÉTODOS .....		100

2.1.	Cepas .....	100
2.2.	Preparación del ensayo .....	100
3.	RESULTADOS .....	102
4.	DISCUSIÓN .....	111

## **CAPITULO IV**

CARACTERIZACION DE LAS CEPAS ACIDOLACTICAS CON POTENCIAL INHIBIDOR FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS .....		115
1.	INTRODUCCIÓN .....	117
2.	MATERIALES Y METODOS .....	118
2.1.	Caracterización molecular por RAPD .....	118
2.1.1.	Cepas bacterianas .....	118
2.1.2.	Aislamiento del ADN genómico.....	118
2.1.3.	RAPD (Amplificación del DNA mediante iniciadores aleatorios) .....	119
2.1.4.	Análisis de los datos .....	121
2.2.	Antibiogramas .....	122
2.2.1.	Cepas bacterianas .....	122
3.	RESULTADOS .....	123
3.1.	Caracterización molecular por RAPD .....	123
3.2.	Antibiogramas .....	129
3.2.1.	Cepas bacterianas .....	129
4.	DISCUSION .....	137

## **CAPITULO V**

ESTUDIO DE ADHESION A LA MUCINA.....		141
1.	INTRODUCCIÓN .....	143
2.	MATERIAL Y METODOS .....	145
2.1.	Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	145

2.2.	Tratamiento de la mucina .....	145
2.3.	Ensayo de adhesión .....	146
2.4.	Análisis Estadístico.....	147
3.	RESULTADOS .....	147
4.	DISCUSION .....	152

## CAPITULO VI

ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR DE LAS BAL FRENTE A CONDICIONES GASTROINTESTINALES .....	157
1. INTRODUCCIÓN .....	159
2. MATERIAL Y METODOS .....	160
2.1. Estudio <i>in vitro</i> de la supervivencia frente a los jugos gástricos .....	160
2.1.1. Cepas .....	160
2.1.2. Preparación de los jugos gástricos y pancreáticos .....	160
2.1.3. Determinación de la supervivencia “ <i>in vitro</i> ” al tránsito gastrointestinal .....	161
3. RESULTADOS .....	161
3.1. Determinación de la tolerancia gastrointestinal .....	161
4. DISCUSION .....	175
<b>DISCUSION GLOBAL.....</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>193</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>227</b>
ANEXO I .....	229
MEDIOS DE CULTIVO .....	229

MEDIOS DE CULTIVO SEMISOLIDOS.....	231
MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS .....	232
ANEXO 2.....	233
REACTIVOS Y SOLUCIONES .....	233
ANEXO 3.....	235
Tablas ID API 50CHL.....	235
ANEXO 4.....	243
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BAL FRENTE A <i>Helicobacter pylori</i> y <i>Samonella spp.</i> .....	243
<b>CONGRESOS Y PUBLICACIONES.....</b>	<b>251</b>



## INDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Aislados y usos de especies de <i>Lactobacillus</i> .....	19
Tabla 2. Características del género <i>Lactobacillus</i> . .....	20

### CAPITULO I

Tabla 1. Identificación de Bacterias Acido Lácticas de la CECT y aisladas de leche de oveja Guirra mediante el sistema comercial API-50CHL.....	58
Tabla 2. Matriz de componentes rotados.....	60

### CAPITULO II

Tabla 1. Cepas de <i>H. pylori</i> .....	67
Tabla 2. Cepas de <i>Salmonella spp.</i> .....	67
Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de oveja y de cepas de la CECT frente a la cepa B6 de <i>H. pylori</i> en cada método.....	80
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de leche de oveja y la CECT frente a la cepa NCTC11637 de <i>H. pylori</i> en cada método.....	83
Tabla 5. Porcentaje de inhibición de las BAL frente a las cepas de <i>H. pylori</i> B6 y NCTC11637 .....	84

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de las BAL frente a la cepa S134 en cada método. ....	86
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de las BAL frente a la cepa S58 en cada método. ....	86
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de las BAL frente a la cepa S135 en cada método. ....	86
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de las BAL frente a la cepa CECT915 en cada método. ...	87
Tabla 10. Porcentaje inhibición de las BAL frente a las cepas S58, CECT915, S134, S135. .....	91

### CAPITULO III

Tabla 1. Viabilidad de <i>H. pylori</i> B6 en contacto con sobrenadantes de BAL aisladas de leche de oveja guirra mediante técnicas de cultivo en placa y recuento de epifluorescencia empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD. Media $\pm$ (SEM) Error estándar de la media. .....	104
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### CAPITULO IV

Tabla 1. BAL con actividad antimicrobiana frente a <i>H. pylori</i> y <i>Salmonella spp.</i> ....	119
Tabla 2. Iniciadores .....	120
Tabla 3. Condiciones PCR. Iniciador 1254 .....	120
Tabla 4. Condiciones PCR - iniciador 7254 .....	121
Tabla 5. Antibióticos .....	123
Tabla 6. Antibiograma de las cepas aisladas de leche de oveja Guirra y CECT con actividad antimicrobiana frente a <i>H. pylori</i> y <i>Salmonella</i> . Media en mm y (SEM) error estándar de la media de dos análisis. ....	132

## **CAPITULO V**

Tabla 1. Adhesión de las BAL a mucina y tratamiento sin mucina. Densidad bacteriana inicial de cada muestra en placa Log UFC/ml. (-) valor no observado. Media de tres observaciones y error estándar (SD).....	149
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## **CAPITULO VI**

Tabla 1. Tinción con los fluorocromos SYTO9 y PI de BAL antes y después del tratamiento con pepsina pH 2. ....	173
Tabla 2. Tinción con los fluorocromos SYTO9 y PI de BAL antes y después del tratamiento con pancreatina pH 8. ....	174

## INDICE DE FIGURAS

### CAPITULO I

Figura 1. Identificación API 50 CHL.....	56
Figura 2. Distribución por especie de las cepas aisladas de leche de oveja Guirra. ....	57
Figura 3. Agrupación de las cepas estudiadas de acuerdo al análisis de componentes principales. ....	61

### CAPITULO II

Figura 1. Diseño del ensayo de actividad antimicrobiana contra <i>H. pylori</i> en presencia de células viables de BAL.....	69
Figura 2. Diseño del ensayo de actividad antimicrobiana contra <i>Salmonella</i> en presencia de células viables de BAL.....	70
Figura 3. Diseño del ensayo de actividad antimicrobiana en ausencia de células. <i>H. pylori</i> frente a las sustancias producidas por BAL.....	72
Figura 4. Diseño del ensayo de actividad antimicrobiana en ausencia de células. <i>Salmonella</i> frente a las sustancias producidas por BAL. ....	73
Figura 5. Ensayo de inhibición <i>H. pylori</i> B6 en presencia células de las BAL.....	75
Figura 6. Inhibición de <i>H. pylori</i> B6 por presencia de células de las BAL aisladas de leche de oveja. ....	75
Figura 7. Inhibición de <i>H. pylori</i> NCTC11637 en presencia de células por las BAL aisladas de leche de oveja. ....	76
Figura 8. Ensayo de inhibición <i>H. pylori</i> B6 ausencia células de las BAL.....	77
Figura 9. Inhibición de <i>H. pylori</i> B6 en ausencia de células de las BAL aisladas de leche de oveja. ....	77
Figura 10. Actividad antimicrobiana de las BAL en presencia, ausencia de células sobre <i>H. pylori</i> B6 a pH 4.5 y 7. ....	78
Figura 11. Comparación entre métodos aplicados a la inhibición de las BAL frente a <i>H. pylori</i> B6. No Método: 1: Presencia de células. 2: Ausencia de células pH 4.5. 3: Ausencia de células pH 7. ....	79

Figura 12. Inhibición de <i>H. pylori</i> NCTC11637 en ausencia de células de las BAL aisladas de leche de oveja. ....	81
Figura 13. Actividad antimicrobiana de las BAL aisladas de leche de oveja en presencia y ausencia de células a pH 4.5 y 7 sobre <i>H. pylori</i> NCTC11637. ....	82
Figura 14. Inhibición <i>H. pylori</i> B6 y NCTC11637 por las BAL aisladas de leche de oveja. ....	83
Figura 15. Ensayo de inhibición <i>Salmonella spp.</i> en ausencia células de las BAL. ....	85
Figura 16. Inhibición de las BAL sobre <i>Salmonella spp.</i> Los resultados son la media de tres experimentos independientes. ....	89

### CAPITULO III

Figura 1. Variación de la cultivabilidad para cada muestra respecto del tiempo 0. No: Tiempo 0. N: Tiempo 0, 5, 19, 24 horas. ....	105
Figura 2. Variación del número de células viables para cada muestra respecto del tiempo 0. No: Tiempo 0. N: Tiempo 0, 5, 19, 24 h. ....	106
Figura 3. Variación del número de células viables, no viables (cel/ml) y cultivables (UFC/ml) de <i>H. pylori</i> B6 respecto del tiempo 0. No: Tiempo 0. N: Tiempo 0, 5, 19, 24 h. A) Control, B) <i>H. pylori</i> + Sobrenadante 12O3. C) <i>H. pylori</i> + Sobrenadante 20O4. ....	107
Figura 4. Células <i>H. pylori</i> B6 a tiempo 0 h (izquierda) y 5h (derecha) de contacto con el sobrenadante 12O3. ....	108
Figura 5. Células <i>H. pylori</i> B6 a tiempo 19 h (izquierda) y 24 h (derecha) con el sobrenadante 12O3. ....	108
Figura 6. Porcentaje de viables (SYTO9) y no viables (PI) en la muestra control con <i>H. pylori</i> B6. ....	109
Figura 7. Porcentaje de viables (SYTO9) y no viables (PI) en la muestra <i>H. pylori</i> B6+ Sobrenadante 12O3. ....	110
Figura 8. Porcentaje de viables (SYTO9) y no viables (PI) en la muestra <i>H. pylori</i> B6+ Sobrenadante 20O4. ....	110

## CAPITULO IV

Figura 1. Perfiles generados con la técnica RAPD de las cepas BAL aisladas de leche de oveja Guirra y las pertenecientes a la CECT empleando el iniciador 1254. <i>L. plantarum</i> (3O9, CECT4645, 7O1, Q3), <i>L. paracasei</i> (4O4, 3O10), <i>L. brevis</i> (20O4, CECT4121), <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> (CECT4005), <i>L. delbrueckii delbrueckii</i> (CECT286), <i>L. casei</i> (CECT475), <i>L. acidophilus</i> (9O3), <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> (1O3, 2O4, 1O8) (C-). M Marcador DNA 100 pb.....	124
Figura 2. Dendrograma obtenido de los perfiles RAPD usando iniciador 1254 de las cepas ácido lácticas con actividad antimicrobiana frente a <i>H. pylori</i> y <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	125
Figura 3. Perfiles generados con la técnica RAPD de las cepas BAL aisladas de leche de oveja Guirra y de la CECT empleando el iniciador 7254. <i>L. plantarum</i> (3O9, CECT4645, 7O1, Q3), <i>L. paracasei</i> (4O4, 3O10), <i>L. brevis</i> (20O4, CECT4121), <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> (CECT4005), <i>L. delbrueckii delbrueckii</i> (CECT286), <i>L. casei</i> (CECT475), <i>L. acidophilus</i> (9O3), <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> (1O3, 2O4, 1O8) (C-). M Marcador DNA 100 pb. ....	126
Figura 4. Dendrograma obtenido de los perfiles RAPD usando iniciador 7254 de las cepas ácido lácticas con actividad antimicrobiana frente a <i>H. pylori</i> y <i>Salmonella spp.</i> .....	128
Figura 5. Antibiograma de la cepa láctica 13O5B aislada de leche de oveja Guirra. ....	131
Figura 6. Porcentaje de susceptibilidad cepas BAL aisladas de oveja Guirra y CECT.....	131
Figura 7. Susceptibilidad de BAL frente a gentamicina 10 µg/ml.....	134
Figura 8. Susceptibilidad de BAL frente a amoxicilina 30 µg/ml.....	134
Figura 9. Susceptibilidad de BAL frente a trimetoprim 25 µg/ml .....	134
Figura 10. Susceptibilidad de BAL frente a ciprofloxacino 5 µg/ml .....	135
Figura 11. Susceptibilidad de BAL frente a ceftriaxona 30 µg/ml .....	135
Figura 12. Susceptibilidad de BAL frente a cloranfenicol 30 µg/ml .....	135
Figura 13. Susceptibilidad de BAL frente a cefalotin 30 µg/ml .....	136
Figura 14. Susceptibilidad de BAL frente a tetraciclina 30 µg/ml.....	136

Figura 15. Susceptibilidad de BAL frente a amikacina 30 µg/ml .....	136
Figura 16. Susceptibilidad de BAL frente a ampicilina 10 µg/ml.....	137
Figura 17. Susceptibilidad de BAL frente a carbencilina 30 µg/ml .....	137

## **CAPITULO V**

Figura 1. Interacción del CFDA con la célula Gram positiva. ....	145
Figura 2. Comparación tratamiento con mucina y sin mucina (poliestireno).....	148
Figura 3. Porcentaje de adhesión de las BAL aisladas de leche de oveja Guirra y CECT. Con mucina y sin mucina.....	151

## **CAPITULO VI**

Figura 1. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 9O3 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	164
Figura 2. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 2O7 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	165
Figura 3. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa Q2 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	166
Figura 4. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa Q3 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	167
Figura 5. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 1O10 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	168
Figura 6. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 1O3 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	169
Figura 7. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 12O3 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	170
Figura 8. Supervivencia al tránsito gastrointestinal de la cepa 2O04 por recuento en placa y fluorocromo SYTO9.....	171
Figura 9. Porcentajes de viabilidad celular al tránsito gastrointestinal frente a pepsina pH 2 .....	172
Figura 10. Porcentajes de viabilidad celular con SYTO al tránsito gastrointestinal frente a pancreatina pH 8. ....	172