



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS DE UTILIDAD EN UNA INDUSTRIA LÁCTEA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2017/18

**Alumno: Araceli Tordera Castro
Tutor: Elena Hidalgo**

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

INDICE:

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Origen	1
2.2. Criterios de selección	3
2.3. Seguridad	4
2.4. Aplicaciones	5
2.5. Identificación de cepas	6
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. MATERIALES	7
4.1.1. Reactivos químicos y equipos	7
4.1.2. Material biológico	8
4.1.3. Medios de cultivo	8
4.2. MÉTODOS	10
4.2.1. Degradación de mucinas	10
4.2.2. Determinación de resistencia a antibióticos: MICS	10
4.2.3. Producción de aminas biógenas	13
4.2.4. Ribotipado	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1. ENSAYOS DE SEGURIDAD	18
5.1.1. Determinación de resistencia a antibióticos: MICS	18
5.1.2. Degradación de mucinas	20
5.1.3. Producción de aminas biógenas	22
5.2. ENSAYO DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	23
5.2.1. Ribotipado	23
6. CONCLUSIONES	25
7. AGRADECIMIENTOS	26
8. BIBLIOGRAFÍA	26

1. RESUMEN

Hoy en día, el uso de probióticos supone un novedoso avance en la prevención y tratamiento de múltiples patologías gastrointestinales, constituyendo un elemento más en el arsenal terapéutico. La alta demanda de estos productos, hace que la industria alimentaria esté en constante evolución y desarrollo para así satisfacer las necesidades del consumidor. En este contexto la empresa Biosearch S.A. se encuentra en constante investigación de nuevas cepas de bacterias a las cuales se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. Para ello se debe primero identificar y caracterizar dichas cepas por diferentes metodologías y además asegurar la seguridad de estos ingredientes probióticos antes de ser comercializadas.

ABSTRACT

Nowadays, the use of probiotics is a novel advance in the prevention and treatment of multiple gastrointestinal pathologies, constituting another element in the therapeutic arsenal. The high demand for these products, makes the food industry being in constantly evolving and developing to satisfy the needs of the consumer. In this context, the company Biosearch S.A. is constantly researching new strains of bacteria to which they attribute beneficial health properties. For this, it is necessary to identify and characterize these strains by different methodologies and also to ensure the safety of these probiotic ingredients before being commercialized.

2. INTRODUCCIÓN

PROBIÓTICOS

2.1. Origen

El uso de alimentos fermentados ha sido utilizado a lo largo de la historia para el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Pero no fue hasta el siglo XX cuando se empezó a relacionar la presencia de estas bacterias en los alimentos fermentados con beneficios en la salud de aquellos que los consumían, especialmente en relación con las infecciones intestinales (Rodríguez Gómez, 2006). En 1907 se publicó "Prolongation of Life" escrito por Elle Metchnikoff, en el cual se postuló la relación entre los fermentos de la leche y la longevidad analizando la dependencia entre los microbios intestinales y los alimentos ingeridos. Esto ejerció una gran influencia en la comunidad científica, ya que a partir de ese momento fue posible adoptar medidas para modificar la microbiota

del organismo humano y sustituir los microbios nocivos por microbios beneficiosos (Metchnikoff, 1907). A partir de 1960 se acuñó la palabra probiótico para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Posteriormente, Fuller definió el término probiótico por primera vez, como “un complemento alimenticio a base de microorganismos vivos y vitales que produce efectos beneficiosos sobre el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal” (Fuller, 1989). Numerosas definiciones han surgido, hasta que un comité conjunto FAO/OMS (FAO/OMS, 2002) los ha definido como “microorganismos vivos que, ingeridos a dosis definidas, ejercen efectos beneficiosos para la salud”. Esta definición pone de manifiesto tres aspectos claves para que un producto pueda considerarse probiótico:

- *Debe contener un microorganismo vivo*: Aunque investigaciones recientes demuestran que ciertos microorganismos pueden ejercer efectos beneficiosos incluso cuando se ingieren muertos o inactivados, a día de hoy no hay evidencias suficientes como para clasificarlos como probióticos.

- *Número definido*: La preparación o producto deberá contener uno o varios microorganismos bien definidos y en número conocido y suficiente.

- *Deben ejercer un beneficio para la salud*: Esto implica que dichos beneficios deben ser demostrados mediante pruebas científicas generalmente aceptadas.

Entre los microorganismos empleados con fines probióticos, los lactobacilos y las bifidobacterias ocupan, con diferencia, el lugar más destacado pero también se utilizan bacterias que pertenecen a otros géneros, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, o levaduras, principalmente del género *Saccharomyces*. Sin embargo no todos los lactobacilos pueden ser considerados probióticos ni todos los probióticos van a ejercer las mismas funciones. Los efectos de cada cepa son únicos, y no deben de extrapolarse a otras. Por ello se requiere de un proceso de caracterización que permita definir con precisión el potencial probiótico de cada cepa.

Además del concepto de probióticos, existen dos términos íntimamente relacionados, los prebióticos y los simbióticos. Los prebióticos son aquellos carbohidratos no digeribles que favorecen de forma selectiva el crecimiento de ciertas bacterias consideradas como beneficiosas para el hospedador (Cummings et al., 2001). La combinación de al menos un probiótico y un prebiótico se denomina “simbiótico”

(Holzapfel y Schillinger, 2002). Es interesante señalar que la combinación de probiótico y prebiótico en un mismo producto puede tener un efecto sinérgico y conferir beneficios mayores que los que cada uno de los componentes por separado (Rowland et al., 1998).

2.2. Criterios de selección

El espectro de probióticos introducidos en el mercado está aumentando rápidamente, incluyendo productos no lácteos, como productos cárnicos fermentados, zumos u otros productos de origen vegetal. Por ello, la selección de cepas con fines probióticos supone un reto para investigadores e industrias, ya que cada producto tiene diferente matriz alimentaria y resulta complicado uniformizar los criterios de selección de este tipo de microorganismos. Sin embargo, según un grupo de expertos de FAO/OMS (FAO/OMS, 2002) la selección de un probiótico debería basarse en tres criterios fundamentales:

a. Criterios de seguridad:

Se deben descartar bacterias con resistencia a antibióticos y ciertas actividades metabólicas que conlleven efectos adversos en el consumidor, como la producción de toxinas o actividad hemolítica. La resistencia a antibióticos es de los campos más estudiados en cuanto a seguridad de los probióticos. También es importante comprobar actividades enzimáticas, como son la degradación de mucinas o actividades proteolíticas.

b. Criterios funcionales:

Existen diversos aspectos funcionales a tener en cuenta a la hora de seleccionar bacterias probióticas: la capacidad de sobrevivir al proceso de digestión gastrointestinal, marcada por la acidez del jugo gástrico y la concentración de sales biliares; la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, que depende de la cepa y del sustrato disponible (como por ejemplo las mucinas); la interacción con patógenos y otras bacterias comensales, debido a la competición por los nutrientes; y la habilidad de estimular el sistema inmune del hospedador; su capacidad fermentativa.

Algunas de estas características son intrínsecas a las distintas cepas bacterianas.

c. Criterios tecnológicos:

Entre los aspectos tecnológicos que hay que seleccionar cepas probióticas que destaquen por su capacidad de ser cultivadas fácilmente, resistir procesos industriales agresivos, mantener su viabilidad celular en diferentes matrices y durante periodos largos de tiempo y exhibir buenas propiedades organolépticas.

2.3. Seguridad

Como se ha comentado anteriormente, demostrar la seguridad de cada probiótico antes de introducirlo en el mercado es un criterio fundamental para la selección de estas cepas probióticas. Además de conocer su origen y caracterizarlas correctamente a nivel de género, especie y cepa, se deben conocer aquellas propiedades intrínsecas relevantes desde el punto de vista de seguridad, como posibles factores de virulencia, potencial invasivo, resistencia a los antibióticos y facilidad para intercambiar material genético mediante procesos conjugativos (Rodríguez Gómez, 2006).

La normativa aplicable al empleo de cultivos microbianos en alimentos variará dependiendo del país que se trate. En EEUU, los microorganismos utilizados en alimentos pueden ser considerados aditivos, con lo que su uso tiene que ser aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), o como ingredientes, para lo que es imprescindible que este microorganismo esté clasificados como GRAS (Generally Recognized As Safety). En la Unión Europea, existe un sistema de preevaluación del microorganismo llamado QPS (Qualified Presumption of Safety). La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) es la que actúa como comité científico de la Unión Europea, evaluando los datos científicos que se tienen de cada cepa y elabora una lista de microorganismos con status QPS, los cuales no tienen por qué ser sometidos a posteriores estudios de seguridad, de lo contrario se debe recurrir a estudios clínicos y de toxicidad (Havelaar et al., 2010; Quigley, 2010). Para garantizar la seguridad de las cepas, se recomiendan las siguientes pruebas (FAO/OMS, 2001):

- Resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles (Danielsen y Wind, 2003). Para evaluar esta resistencia a antibióticos, se utiliza la técnica MIC (concentración mínima inhibitoria) en la que se determina la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de incubarlo. Con ello se obtienen valores correspondientes a la sensibilidad de una cepa a un determinado antibiótico, definiendo así los valores de resistencia a los que se deben ajustar distintas cepas bacterianas (EFSA, 2012) (Tabla 6). Si se superaran estos valores definidos por la EFSA, se deberían realizar investigaciones para probar la transferibilidad de esta resistencia a otras bacterias, o una búsqueda de genes relacionados con la resistencia en el genoma de la cepa (Bhardwaj et al., 2010)
- Actividades metabólicas perjudiciales: los probióticos tienen la capacidad de transformar componentes alimentarios o secreciones biológicas en otros compuestos que podrían ser perjudiciales para la salud del consumidor. Estas son: producción de aminas biogénicas que se generan por descarboxilación de los aminoácidos y en

concentraciones muy altas de algunas de ellas pueden dar lugar a graves problemas toxicológicos; desconjugación de ácidos biliares; producción de ácido D-láctico

-Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores

-Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica

-Evaluación de la ineffectividad en animales inmunodeprimidos

-Determinar la dosis y la duración de la terapia

-Realización de pruebas aleatorias

2.4. Aplicaciones

Son numerosas las aplicaciones que se atribuyen a la ingesta de probióticos apoyadas por estudios científicos y otras muchas que requieren todavía más estudios para corroborar los resultados que se tienen. A continuación se comentan las principales aplicaciones estudiadas:

-Intolerancia a la lactosa: las bacterias ácido lácticas producen beta-galactosidasas las cuales son capaces de hidrolizar la lactosa, dando lugar a sus dos monosacáridos galactosa y glucosa que son absorbidos en el intestino.

-Infecciones gastrointestinales: existe un gran número de estudios en los que se demuestra el efecto beneficioso del consumo de probióticos para el tratamiento y prevención de diarreas agudas (Allen et al., 2003; Guandalini et al., 2000); en cuanto a la diarrea asociada al consumo de antibióticos se ha demostrado un beneficio preventivo en poblaciones de niños (Johnston et al., 2011); otro tipo de diarrea en la que se ha visto un efecto beneficioso en el uso de probióticos es la llamada diarrea del viajero, una patología frecuente en viajeros que se desplazan a climas más húmedos, calurosos y a países subdesarrollados (Rolfe, 2000).

-Prevención y tratamiento de reacciones alérgicas: se han empleado los probióticos en otras patologías alérgicas como la rinitis alérgica y el asma en adultos, viéndose una mejora de la calidad de vida (Ishida et al., 2005; Xiao et al., 2006) al igual que una reducción en los episodios de rinitis en niños. Una revisión en año 2008 recogió datos de 12 estudios clínicos controlados aleatorizados que evaluaban el efecto de los probióticos sobre la rinitis alérgica y 4 sobre asma. La revisión concluye que si bien no se observan efectos beneficiosos sobre el asma sí que se observa cierta efectividad en el tratamiento de la rinitis alérgica (Vliagoftis et al., 2008).

-Infecciones respiratorias en adultos y en niños: De acuerdo a los estudios de Pregliasco et al., (2008), la ingesta a largo plazo de simbióticos (probiótico y prebiótico) logró

mejorar la salud mediante la reducción de la incidencia y gravedad de las enfermedades respiratorias durante la temporada de frío.

-Tratamiento y prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades intestinales: Uno de los campos en los que se está trabajando mucho en los últimos años es el uso de los probióticos en el tratamiento y prevención de enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y otras patologías intestinales como el síndrome del colon irritable y la enterocolitis necrotizante.

-Tratamiento en infecciones por *Helicobacter pylori*: Las infecciones debidas a *Helicobacter pylori* son una de las principales causas de gastritis crónicas y úlceras gástricas además de estar vinculadas a patologías como el cáncer de estómago. Existen varios trabajos en los que se evalúan los posibles efectos de los probióticos en la reducción de esta infección y mejoras en su sintomatología. Algunos probióticos han demostrado ser eficaces en la eliminación de la bacteria además de producir efectos beneficiosos en la tolerancia del tratamiento. Un ejemplo de ello sería el caso de *Lactobacillus acidophilus* que mejoró la eliminación de *H. pylori* (Canducci et al., 2000). Por otro lado, la toma de probióticos ejerce un beneficio en trastornos asociados al tratamiento, como pueden ser diarreas asociadas al consumo de antibióticos, como se ha comentado anteriormente.

-Efectos sobre el sistema inmunológico: El consumo de probióticos puede ayudar a disminuir y aliviar síntomas de alergias alimentarias por medio de la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la microbiota intestinal. Es una alternativa, especialmente en niños que tienen su microbiota en pleno desarrollo. Las cepas no son las que inducen o modifican la respuesta inmune, pero sí que están vinculadas a alteraciones transitorias que favorecen al consumidor (Mattila-Sandholm et al., 1999)

2.5. Identificación de cepas

La adecuada clasificación taxonómica de los probióticos es un aspecto fundamental con importantes connotaciones en la seguridad y en los aspectos legales de los mismos.

Para una correcta identificación y clasificación, la FAO y la OMS recomiendan que las cepas probióticas sean nombradas de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura además de ser depositadas en colecciones de cultivos internacionales, en España la colección de cultivos más reconocida es la Colección Española de Cultivos Tipo, que asigna un código a cada cepa depositada precedida de las siglas de la colección, CECT. La cepa deberá ser caracterizada fenotípicamente y genéticamente, incluyendo métodos de hibridación ADN/ARN o secuenciación de la región genómica

perteneciente al 16S, pudiéndose incluir dicha secuenciación en bases de datos específicas que pueden ser consultadas para la identificación de una cepa problema.

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Los principales propósitos de este trabajo son:

- La identificación y caracterización mediante métodos genéticos de determinadas cepas bacterianas a las cuales se les ha atribuido un papel beneficioso sobre la salud.
- La realización de ensayos de seguridad de dichas cepas que posteriormente serán utilizadas como ingredientes alimentarios mediante:
 - a) La comprobación de la resistencia de estas cepas a antibióticos
 - b) Degradación a mucinas
 - c) Producción de aminas biógenas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos químicos y equipos

Los reactivos químicos, siempre de grado de biología molecular, de uso general para la realización de los experimentos presentados en esta memoria han sido adquiridos a las siguientes casas comerciales: Agilent Technologies, Bio-Rad, GE Healthcare, Panreac Química S.L.U., Promega, Scharlab, Sigma-Aldrich y Thermo Fisher Scientific.

En los ensayos de secuenciación se utilizaron también los siguientes equipos y reactivos: enzima Taq DNA Polymerase (5 Prime GmbH) para realizar las PCR, las mezclas de reacción para PCR convencionales se incubaron en un equipo iCycler (Bio-Rad), los geles de agarosa fueron Agarose D-1 low EEO-GCT Pronadisa, como marcadores de peso molecular en la electroforesis utilizamos los siguientes marcadores: 1 kb, III, VIII y 100 pb (Thermo Fisher Scientific) según el ensayo, la electroforesis en equipos Mini Sub-Cell GT (Bio-Rad), para la visualización de los geles una vez teñidos con bromuro de etidio mediante luz UV se realizó en el equipo Gene Genius Gel Imaging System (Syngene) y para la purificación de los fragmentos de 1,4 kb con el Kit ENZO de Life Sciences.

Para el caso del ribotipado se utilizaron los siguientes equipos y reactivos: en la extracción del ADN genómico se utiliza el kit Wizard de Promega, el filtro de nylon de Hybond XL y el equipo TransBlott (Bio-Rad), la fijación del ADN al filtro por UV en el equipo Stratalinker 1800 (Stratagene).

4.1.2. Material biológico

Las cepas utilizadas para los diferentes ensayos fueron aisladas en el propio laboratorio de Biosearch S.A. y son las que se muestran en la siguiente Tabla 1 :

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Código	Cepa
DES 001	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 028	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 030	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 033	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 065	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 068	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 085	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 122	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BT 679	<i>Lactobacillus gasseri</i>
DES 460	<i>Bifidobacterium longum</i>
DES 405	<i>Bifidobacterium longum</i>
DES 454	<i>Bifidobacterium longum</i>
BT 1038	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BT 279	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
DES 005	<i>Bifidobacterium longum</i>
BT 851	<i>Bifidobacterium longum</i>
DES 384	<i>Bifidobacterium longum</i>
BT 849	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 805	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 804	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 803	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 719	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 718	<i>Lactobacillus fermentum</i>
BT 584	<i>Lactobacillus fermentum</i>

4.1.3. Medios de cultivo

En este trabajo se han utilizado diferentes medios para el cultivo de las distintas cepas, como se detalla a continuación:

-MRS:

En la mayor parte de los casos, para el medio MRS líquido (MRS Broth) y MRS sólido (MRS Agar) se utilizaron medios comerciales de la casa Oxoid siguiendo las instrucciones del fabricante para su preparación. En ocasiones para el caso del medio sólido MRS se utilizaron placas Petri ya preparadas (MRS Agar, Scharlab). A continuación se detallan los componentes de este medio:

Tabla 2. Composición del medio MRS para un volumen total de 1 L.

Componente	Cantidad (g)
Peptona	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
D(+)-Glucosa	20
Acetato de sodio	5
Citrato de triamonio	2
Sulfato de magnesio	0,05
Fosfato dipotásico	2
Polisorbato	1

-MDM, medio de degradación de mucinas:

En la Tabla 3 se recogen los componentes de este medio:

Tabla 3. Composición para el medio de degradación de mucinas para un volumen total de 1L.

Componente	Cantidad
Solución I	20 ml
Solución II	20 ml
Mucina tipo III	3 g
Bacto-Peptona	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	10 g
L-cisteína	0,5 g
Agua	1960 ml

Tabla 4. Composición de la Solución I para el medio MDM, para un volumen total de 100 ml.

Componente	Cantidad
K_2HPO_4	0,78 g
Agua	100 ml

Tabla 5. Composición de la Solución I para el medio MDM, para un volumen total de 100 ml.

Componente	Cantidad
KH_2PO_4	0,47 g
NaCl	1,18 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,2 g
$CaCl_2$	0,12 g
$MgSO_4$	0,25 g
Agua	100 ml

-RCA:

Se utilizaron placas Petri comerciales (Scharlab).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Degradación de mucinas

Este ensayo se realizó para comprobar el crecimiento de las cepas en estudio en medios con mucinas como medio de fuente de carbono.

Para ello se sembraron por agotamiento, para obtener colonias aisladas, en MRS agar las cepas bacterianas que se querían estudiar. Se incubó a 37°C, durante 48 horas y anoxia. Se prepararon tantos tubos Falcon de 15 ml como cepas problema había, a los que se les añadió 15 ml de medio MDM y otros tantos tubos con 15 ml de medio MDM+glu, en condiciones asépticas. Se inoculó 1 tubo de MDM y otro tubo de MDM+glu con 2 o 3 colonias de cada una de las cepas. Una pareja de tubos se inoculó con heces humanas siendo éste el control positivos, y otra pareja de tubos se dejó sin inocular siendo éste el control negativo. Se incubaron los tubos 24 horas a 37°C, midiendo a continuación el pH y la densidad óptica a 600 nm (DO600) para comprobar crecimientos bacterianos. Una vez se realizaron las medidas de pH y DO600 se volvieron a incubar a 37°C otras 24 horas más. A continuación, se repitieron las medidas de pH y DO600.

4.2.2. Determinación de resistencia a antibióticos: MICS

Todos los productos bacterianos destinados a ser utilizados como aditivos para alimentación humana o animal, deben ser examinados para establecer la susceptibilidad de la cepa a una amplia gama de antibióticos de importancia en salud humana y animal. Es esencial que tales pruebas se realicen de manera uniforme utilizando métodos reconocidos y estandarizados internacionalmente, como es el que se describe a continuación. Uno de los requisitos básicos, es que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos expresados se exprese en mg /L o µg /ml. Para distinguir cepas resistentes de las susceptibles, el panel FEEDAP perteneciente a la EFSA define unos valores de valor de corte (Tabla 6). Según esto, las cepas se pueden agrupar como susceptibles o resistentes:

Tabla 6. Valores de corte para diferentes cepas bacterianas.

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^a	1	2 ^b	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^c	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei /paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus</i> spp	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
Other Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2

n.r. not required.
^a including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*
^b not required for *L. salivarius*
^c including *L. fermentum*

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tylosine	tetracycline	chloramphenicol
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	4	4	16

	ampicillin	gentamicin ^d	kanamycin ^d	streptomycin ^d	tetracycline	chloramphenicol	nalidixic acid	sulfonamide	trimethoprim ^d	apramycin
<i>Escherichia coli</i>	8	2	8	16	8	16	16	256	2	8

^d Possible interference of the growth medium

-Susceptible (S): una cepa bacteriana se define como susceptible cuando es inhibida a una concentración de antibiótico igual o menor que el valor establecido como valor de corte ($S \leq x$ mg/L).

-Resistente (R): una cepa bacteriana se define como resistente cuando no es inhibida a una concentración de antibiótico mayor que el valor establecido como valor de corte ($R > x$ mg/L).

Para calificar a nuestras cepas problema como resistentes o susceptibles, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Después de sembrar las cepas de bacterias que se quieren utilizar en el ensayo , se prepararon diluciones de los antibióticos que se van a utilizar y las placas necesarias para analizar por microdilución (placas de 96 pocillos, con 12 filas y 8 columnas). Se siguieron dos metodologías diferentes:

1. Para las cepas de *L. gasseri*, se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones iniciales que se indican:

- Ampicilina, 16 µg /ml
- Vancomicina, 128 µg /ml
- Gentamicina, 256 µg /ml
- Estreptomycin, 256 µg /ml
- Eritromicina, 8 µg /ml
- Clindamicina, 16 µg /ml
- Tetraciclina, 64 µg /ml
- Cloranfenicol, 64 µg /ml

Se prepararon 10 ml del medio 2XML para cada cepa, en un tubos Falcon de 15 ml en condiciones de esterilidad. A continuación, se resuspendieron varias colonias de cada cepa problema en 1,5 ml de NaCl 0,8 % hasta que se obtuvo un DO600 de entre 0,2-0,25. Una vez obtenida esta densidad óptica se inocularon los tubos Falcon que contienen medio 2XML con 20 µl de estas suspensiones. Cada placa se corresponde con una cepa bacteriana diferente y los pocillos se inocularon como se muestra a continuación:

Tabla 7. Concentración de cada antibiótico en cada pocillo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	P
B	N	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	P
C	N	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	P
D	N	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	P
E	N	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	P
F	N	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	P
G	N	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	P
H	N	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	P

N= Control negativo; P= Control positivo; A = Ampicilina; B = Vancomicina; C = Gentamicina; D = Estreptomycin; E = Eritromicina; F = Clindamicina; G = Tetraciclina; H = Cloranfenicol

En todas las columnas, excepto en la 2, se añadieron 50 µl de agua. A estos pocillos se les añadió:

En toda la columna 1, se añaden 50 µl del medio 2XML sin inocular (control negativo).

En la columna 2 en la cual se tiene la máxima concentración de cada antibiótico, se añadieron 50 µl del antibiótico correspondiente a cada posición + 50 µl de medio 2XML previamente inoculado.

En la columna 3 se añadieron 50 µl del antibiótico correspondiente + 50 µl del medio 2XML inoculado.

A partir de esta columna, se hacen diluciones seriadas: de esta mezcla de la columna 3, se cogen 50 µl y se trasvasan a la columna 4, se mezcla bien y se cogen otros 50 µl de la columna 4. Se repite este proceso hasta llegar a la columna 11, después de la cual se eliminaron los 50 µl sobrantes de esta columna.

En la columna 12 se añaden 50 µl del medio 2XML inoculado (control positivo).

Estas placas se incubaron a 37°C durante 48 horas y anoxia. Una vez transcurrido este tiempo, se comprobó el crecimiento y se determinaron los valores MIC para cada antibiótico y cepa.

2. Para *L. fermentum*, los antibióticos utilizados y la concentración inicial de estos fue: Cloranfenicol, 64 µg /ml y Kanamicina, 2048 µg /ml

El procedimiento fue igual que para *L. gasseri*, excepto la preparación de las placas: en este caso, cada placa se corresponde con un antibiótico diferente y en cada fila tenemos una cepa de *L. fermentum* diferente. Los pocillos se inoculan de la misma manera que para *L. gasseri*.

4.2.3. Producción de aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados no proteicos presentes en numerosos alimentos (carne, pescado, queso, vino, vegetales,...). Las más frecuentes en alimentos son: histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β-feniletilamina, espermina y espermidina. Estos compuestos se forman por descarboxilación enzimática de los aminoácidos precursores que se encuentran libres, por acción de las enzimas aminoácido descarboxilasas, principalmente de origen microbiano.

Un pH ácido se ha relacionado con un incremento en los niveles de aminas biógenas. De hecho, a pH reducido las bacterias producen enzimas aminoácido descarboxilasa como parte de su mecanismo de defensa contra la acidez del medio formando aminas biógenas (Bover-Cid et al., 2006). Por ejemplo, la actividad de la enzima histidina-descarboxilasa aumenta en medio ácido, con un rango de pH óptimo de 4 a 5,5 (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004).

Para la determinación de la presencia estas aminas biógenas se siguió el siguiente procedimiento:

Se sembraron por agotamiento en medio MRS agar las cepas problema y a continuación se incubaron en condiciones de anaerobiosis 48 horas a 37°C. Una vez transcurrió este tiempo, se inocularon 50 ml de MRS caldo con una colonia de cada una de las cepas problema y se incubaron toda la noche a 37°C en reposo.

Se prepararon 300 ml de una disolución de KH_2PO_4 30 mM, se midió el pH y se repartió esta disolución en 3 botellas: 100 ml de esta disolución en cada botella. A una de las botellas se le añadió la cantidad correspondiente de L-histidina para conseguir que la disolución estuviera a 10 mM, a otra de ellas se le añadió L-tirosina para conseguir que la disolución estuviera a 10 mM y se dejó la última botella como control. Se volvieron a medir los pH de cada disolución y se esterilizaron todas por filtración. En condiciones asépticas se añadieron a 12 tubos Falcon, 5 ml de cada disolución, obteniendo un total de 36 tubos.

Se midió la DO600 de los tubos inoculados previamente con nuestras cepas problema, utilizando como blanco el mismo medio MRS caldo empleado y se estandarizó a DO600 = 10. Si estaba más diluído se concentró mediante centrifugación, en cambio si estaba más concentrado, se diluyó con el medio MRS.

Se inocularon 3 tubos de cada solución previamente preparada de L-histidina, L-tirosina y el tampón, con 50 μl de los medios inoculados previamente con cada una de las cepas a estudiar. Se inocularon además 3 tubos de cada disolución con 50 μl de MRS caldo como control negativo. Se incubaron las suspensiones inoculadas durante 5-6 horas a 37°C y agitación suave. Por último, se midió el pH de cada disolución.

4.2.4. Ribotipado

Técnica que nos permite la diferenciación genética entre cepas.

El ADN problema, previamente extraído, es sometido a una digestión enzimática. Estas enzimas, producen cortes en lugares específicos. Los fragmentos se separan por electroforesis y se obtiene un patrón de restricción. A continuación comienza la hibridación de ADN, técnica que se basa en la homología de los ácidos nucleicos. Cada cadena de ácido puede unirse específicamente a su homóloga debido a la complementariedad de sus bases (adenina con timina y guanina con citosina). Para ello hay que disponer de una sonda, que es una secuencia de DNA homóloga a otra secuencia específica de la bacteria a detectar. La sonda se marca previamente para su posterior detección uniéndola a una molécula fluorescente, radioactiva o enzimática.

Primero se desnaturaliza el DNA problema (diana) para separar sus dos hebras y se fija a un soporte sólido de nitrocelulosa, aplicando luego la sonda marcada. Si la muestra contiene la bacteria en cuestión, la sonda se unirá a su diana. Tras eliminar la sonda no unida mediante lavados, se procede a la detección de la sonda marcada en el tejido. El método para esto depende del tipo de marcaje que ha sido incorporada en la sonda. En nuestro caso, se siguió el procedimiento de localización de sondas marcadas con haptenos, que pueden ser visualizadas indirectamente con un anticuerpo conjugado. Antes de la incubación con diluciones de anticuerpos conjugados anti- haptenos, los tejidos a hibridar son preincubados con una solución que contiene detergentes y otros agentes que bloquean la unión inespecífica del anticuerpo. Para amplificar la señal, se utilizó una enzima acoplada a un anticuerpo + por la cual el sustrato cromogénico esté disponible para generar un producto insoluble colorido. El anticuerpo que se usa en este caso es anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (AP), usando NTB-BCIP (NTB: nitro-blue tetrazolium chloride; BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) como sustrato. La alta estabilidad de esta enzima permite amplificar la señal. Finalmente la reacción cromogénica es llevada a cabo equilibrando el tejido con el sustrato cromogénico que es convertido por la enzima en un producto colorido insoluble.

El procedimiento que se llevó a cabo fue:

Primero se procedió a la extracción del ADN bacteriano de nuestras cepas. Para ello se sembraron por agotamiento en MRS agar las cepas problema. Se incubaron a 37°C y anoxia durante 48 horas. Se inocularon 15 ml de MRS caldo con una colonia de las cepas problema y se incubaron a 37°C y reposo durante 24 horas. Transcurrido ese

tiempo, se inocularon 15 ml de MRS caldo con 0,5 ml de los cultivos bacterianos del paso anterior y se incubaron a 37°C y reposo durante 5 horas, para que las bacterias se encuentren en fase de crecimiento exponencial. A continuación se cosechó la biomasa de los dos lotes de cultivo por centrifugación a 5.000 g y temperatura ambiente durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 3 ml de EDTA 50 mM, pH 8.

Para la extracción del ADN genómico de ambos cultivos, se utilizó el kit Wizard de Promega. El ADN extraído se resuspendió en 100 µl de tampón Tris 10 mM, pH 8. Se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa al 0,8 %. Una vez resuelto, se reveló el gel en bromuro de etidio durante 20 min y a continuación se visualizaron las bandas electroforéticas bajo luz UV. Se obtuvieron unas bandas nítidas en las que se aprecia gran cantidad de ADN.

Se procedió a digerir las muestras de ADN con dos enzimas de restricción diferentes: *EcoRI* y *HindIII*. Se seleccionó una sola muestra de cada cepa de las dos que se habían incubado. Se hicieron tres digestiones por cada cepa.

A la muestra de ADN extraído se le añadió 1 µl de la enzima, 5 µl del tampón correspondiente y se completa con agua hasta un volumen total de 50 µl. Se incubó durante 12 horas a 37°C. Se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa del 0,8 % y se reveló el gel como se hizo anteriormente. Se vieron las bandas esperadas, va desapareciendo el ADN inicial ya que éste se va degradando.

Se procedió a una segunda digestión, se añadió a la muestra de ADN 1 µl de la enzima, 5 µl del tampón correspondiente y se completó con agua hasta un volumen total de 50 µl. Se incubó durante 5 horas a 37°C. Una vez terminada, se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa del 0,8 % y se reveló el gel como se hizo anteriormente. Se vio el ADN totalmente degradado, por lo que se confirmó la digestión del ADN.

Para estar completamente seguros de que todo el ADN estaba degradado, se hizo una tercera digestión, se ajustó el volumen de cada reacción necesaria para normalizar el ADN de cada muestra. A esta muestra de ADN digerido se le añadió la misma cantidad de enzima y de tampón a las muestras. La incubación se hizo durante 2 horas. Cuando esta terminó, se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa del 0,6%, el marcador de pesos moleculares fue marcado con DIG. Se reveló el gel y se procede a

transferir el DNA resuelto a un filtro de nylon mediante succión, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se sumergió el gel de agarosa en HCl 0,25 N durante 15 min en agitación suave para despurinizarlo.
- Se eliminó la solución de HCl y se lavó el gel varias veces con agua destilada.
- Se desnaturizó el gel en una solución de NaOH 0,5 N durante 30 minutos en agitación suave.
- Se transfirió a una solución SSC 10X (tampón citrato sódico salino) hasta el momento en el que se transfiera al sistema de vacío.
- Se montó la transferencia en el equipo y se selló el gel con agarosa al 3%.
- El proceso se llevó a cabo durante 90 minutos a 5 pulgadas de mercurio de vacío.
- Se marcó en el filtro las posiciones de los pocillos con un bolígrafo de tinta azul. También se marcaron los bordes y la ventana de transferencia.
- Se puede confirmar la transferencia de ADN mediante tinción del gel con bromuro de etidio.
- Se sumergió la membrana de nylon en una solución SSC 2x durante 5 minutos y se secó entre dos láminas de papel de filtro.

Por último, se sometió la membrana a un proceso de fijación del ADN por UV en el equipo Stratalinker 1800 (Stratagene).

El siguiente paso fue la hibridación de los ácidos nucleicos: el proceso de hibridación comenzó con una prehibridación del filtro con 15 ml del tampón de hibridación (EasyHyb; Roche) durante 30 minutos a 42°C en el horno con agitación constante. Se eliminó el tampón de hibridación y se añadieron 15 ml del tampón de hibridación con la sonda marcada, la cual para asegurarnos de que se encuentra completamente desnaturizada, se incubó 15 minutos a 68°C antes de añadirla al tubo de hibridación. Esta mezcla se incubó 12 horas a 45°C en el horno y agitación constante. Se recogió el tampón de hibridación y se lavó el filtro dentro del tubo de hibridación de la siguiente manera:

- Se lavó dos veces durante 5 minutos a 25°C con 100 ml de SSC 2X 0,1 % SDS (detergente) y se eliminó por el fregadero.
- A continuación se hicieron 2 lavados de 15 minutos a 42°C con 100 ml de 0,5X SSC 0,1 % SDS.

Por último se llevó a cabo el revelado mediante el siguiente protocolo:

- Se transfirió el filtro hibridado a un recipiente de plástico y se incubó durante 30 minutos con 100 mL de solución de bloqueo y con agitación. Una vez terminada la incubación se eliminó la solución de bloqueo.
- Se incubó durante 30 minutos con 20 mL de la solución de anticuerpo con agitación. Se eliminó la solución de anticuerpo.
- Se realizaron 2 lavados de 15 minutos con 100 ml de tampón de lavado.
- Se equilibró durante 3 minutos con 20 ml de tampón de detección.
- Por último, para su visualización se incubó con sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina (40 µL de NBT/BCIP por cada 2 mL de tampón de detección) en oscuridad y se paró la reacción mediante lavados con agua.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ENSAYOS DE SEGURIDAD

5.1.1. Determinación de resistencia a antibióticos: MICS

Después de que se incubaran las placas de antibióticos con nuestras cepas problema, se procedió a determinar el valor MIC de un antibiótico para una cepa bacteriana en particular. Este valor se define como la mínima concentración de antibiótico a la cual no hay crecimiento bacteriano. Y según el cual se puede decir si son resistentes o susceptibles las cepas problema:

Tabla 10. Valores MICS para las cepas problema.

Antibiótico	Cepa Bacteriana	MIC (mg/ml)	Interpretación
Ampicilina	DES 001	0,063	S
	DES 028	0,125	S
	DES 030	0,25	S
	DES 033	0,125	S
	DES 065	0,125	S
	DES 068	0,125	S
	DES 085	0,25	S
	DES 122	0,063	S
	BT 679	0,25	S
	DES 005	0,25	S
	BT 851	0,5	S
	DES 384	0,25	S
Vancomicina	DES 001	2	S
	DES 028	8	R
	DES 030	8	R
	DES 033	8	R
	DES 065	8	R
	DES 068	8	R

	DES 085	16	R
	DES 122	2	S
	BT 679	32	R
	DES 005	2	S
	BT 851	2	S
	DES 384	2	S
Gentamicina	DES 001	0,5	S
	DES 028	1	S
	DES 030	0,5	S
	DES 033	1	S
	DES 065	1	S
	DES 068	1	S
	DES 085	0,5	S
	DES 122	0,5	S
	BT 679	2	S
	DES 005	8	S
	BT 851	4	S
	DES 384	1	S
Estreptomicina	DES 001	1	S
	DES 028	1	S
	DES 030	0,5	S
	DES 033	2	S
	DES 065	0,5	S
	DES 068	1	S
	DES 085	2	S
	DES 122	0,5	S
	BT 679	8	S
	DES 005	4	S
	BT 851	8	S
	DES 384	4	S
Eritromicina	DES 001	0,016	S
	DES 028	0,031	S
	DES 030	0,25	S
	DES 033	0,016	S
	DES 065	0,031	S
	DES 068	0,016	S
	DES 085	0,016	S
	DES 122	0,063	S
	BT 679	0,063	S
	DES 005	-	R
	BT 851	0,125	S
	DES 384	0,25	S
Clindamicina	DES 001	0,063	S
	DES 028	0,125	S
	DES 030	8	R
	DES 033	4	R
	DES 065	4	R
	DES 068	1	S
	DES 085	4	R
	DES 122	0,25	S
	BT 679	8	R
	DES 005	2	S
	BT 851	0,063	S
	DES 384	0,063	S
Tetraciclina	DES 001	0,5	S

	DES 028	2	S
	DES 030	2	S
	DES 033	4	S
	DES 065	1	S
	DES 068	4	S
	DES 085	8	S
	DES 122	0,125	S
	BT 679	8	S
	DES 005	0,25	S
	BT 851	1	S
	DES 384	2	S
Cloranfenicol	DES 001	4	S
	DES 028	8	S
	DES 030	8	S
	DES 033	16	R
	DES 065	4	S
	DES 068	8	S
	DES 085	8	S
	DES 122	0,5	S
	BT 679	8	S
	DES 005	2	S
	BT 851	2	S
	DES 384	2	S

Se analizaron los resultados obtenidos (Tabla 10), considerándose resistentes aquellas cepas cuyo valor MIC es mayor que el valor de corte. En el caso de los *L. gasseri* predomina una resistencia a la Vancomicina y a la Clindamicina. En cambio para los *B. longum* apenas muestran resistencia a ningún antibiótico.

5.1.2. Degradación de mucinas

Una vez realizadas las medidas, se comparan los crecimientos en un medio con glucosa (fuente de carbono) y en el otro con el medio con mucinas como única fuente de carbono. Se obtuvieron los siguientes datos para las cepas de *L. gasseri*:

DO600 a las 24 horas:

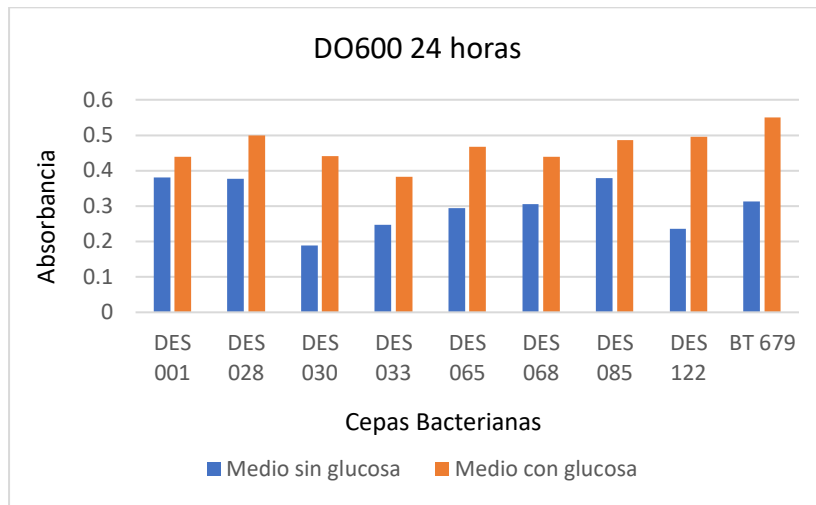


Figura 1. Valores de densidad óptica a 600 nm de las cepas de *L.gasseri*.

pH a las 24 horas:

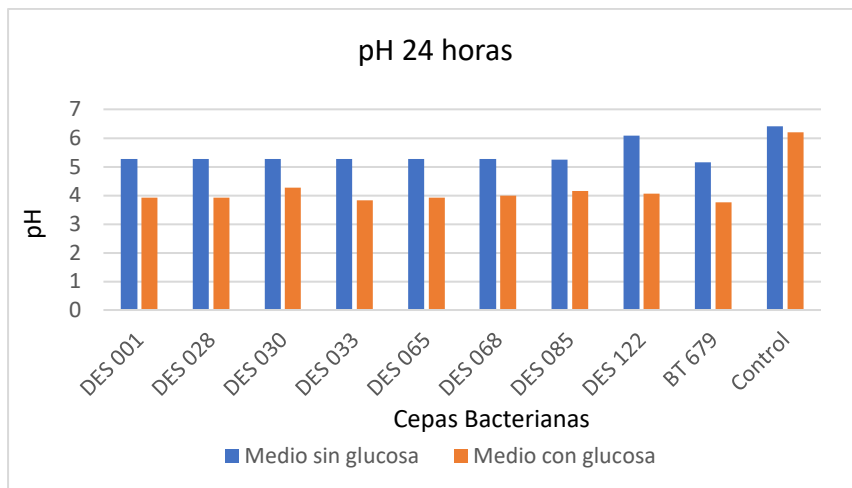


Figura 2. Valores de pH de las cepas de *L. gasseri*.

Para el ensayo con *L. gasseri* y *L. coryniformis* se hicieron por duplicado los cultivos y se obtuvieron los siguientes datos:

DO600 a las 24 horas:

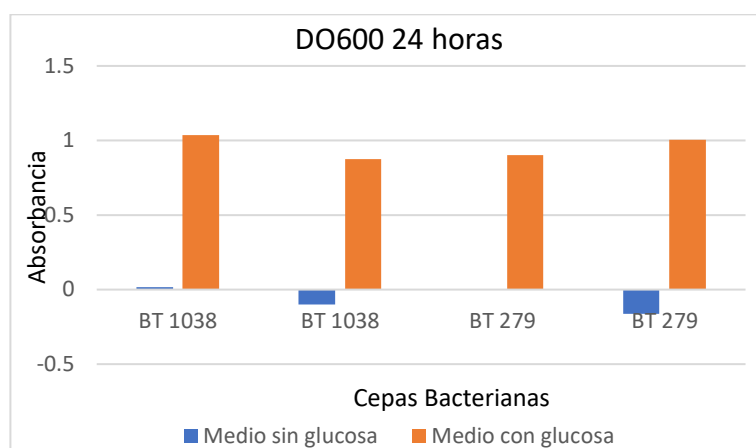


Figura 3. Valores de densidad óptica a 600 nm de las cepas de *L. gasseri* (BT 1038) y *L. coryniformis* (BT 279).

pH a las 24 horas:

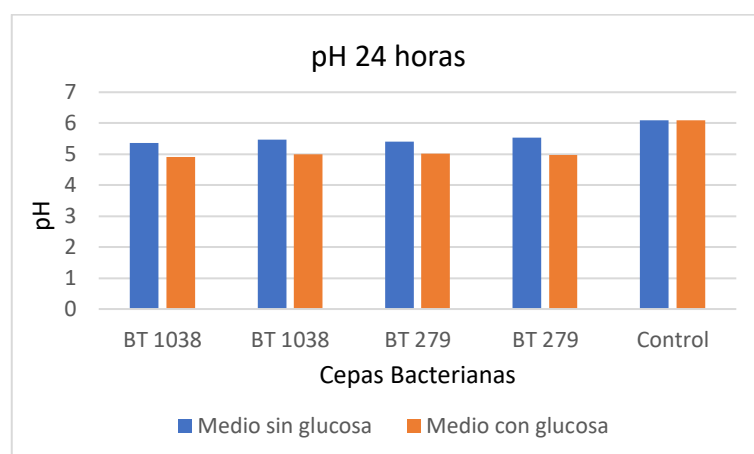


Figura 4. Valores de pH de las cepas de *L. gasseri* (BT 1038) y *L. coryniformis* (BT 279).

Los resultados que se esperan si ha habido crecimiento, es un pH más bajo que el del control ya que con el crecimiento bacteriano se acidifica el medio. Respecto a la densidad óptica, esta deberá ser mayor con el crecimiento bacteriano ya que estas absorben a 600 nm. A la vista de los resultados obtenidos recogidos en las Figuras 1-4, en ambos ensayos ha habido un crecimiento bacteriano. Pero si se comparan los valores obtenidos del medio sin glucosa y con glucosa de las mismas cepas, se ve un mayor crecimiento en los que pueden utilizar glucosa como fuente de carbono.

5.1.3. Producción de aminas biógenas

La formación de aminas biógenas se determinó indirectamente in vitro mediante el análisis del pH de una solución que contiene sustratos de aminoácidos antes y después de la adición de las cepas bacterianas problema. Los datos de pH que se obtuvieron

para cada disolución son los que se muestran a continuación. Cada cepa se cultivó por triplicado:

Tabla 11. Valores de pH para las disoluciones que contienen tirosina.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Control
BT 279	6,70	6,69	6,68	6,9
BT 1038	6,75	6,81	6,78	6,9

pH disolución tirosina = 6,93

Tabla 12. Valores de pH para las disoluciones que contienen histidina.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Control
BT 279	3,95	3,95	3,96	4,87
BT 1038	4,05	4,03	4,02	4,77

pH disolución histidina = 4,5

Tabla 13. Valores de pH para las disoluciones de tampón fosfato potásico (TPK).

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Control
BT 279	4,07	4,03	4,03	5,36
BT 1038	4,06	4,07	4,05	5,31

pH disolución TPK = 5

Los datos de pH obtenidos, indican que no ha habido formación de aminas biógenas, ya que si se compara el pH de las disoluciones antes y después de añadir las cepas bacterianas, se observa un descenso de éste.

5.2. ENSAYO DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

5.2.1. Ribotipado

Como se explicó anteriormente, primeramente se hizo una extracción de ADN de nuestras cepas problema mediante el kit Wizard de Promega. Posteriormente se resolvió en un gel de agarosa y se reveló. Como se puede comprobar en la Figura 5, el ADN se extrajo adecuadamente y una gran cantidad de este.

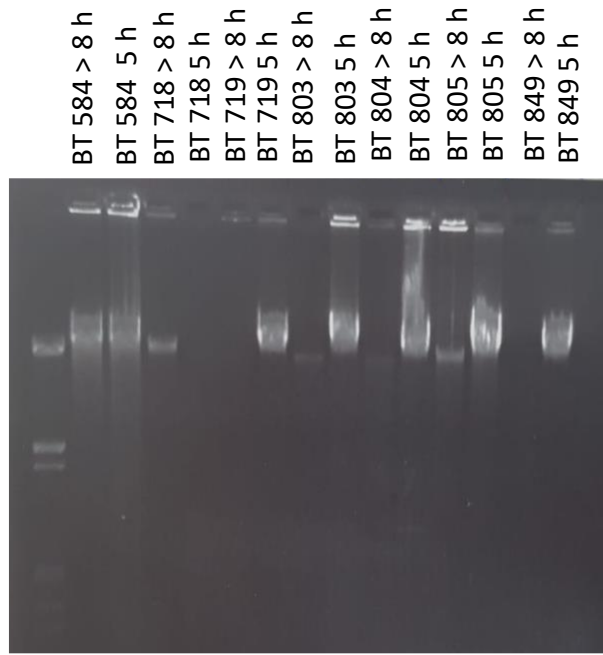


Figura 5. ADN extraído de las cepas indicadas. A cada cepa se le extrajo en dos momentos diferentes del crecimiento bacteriano: saturado: > 8h y exponencial : 5 h.

Como tenemos cada cepa por duplicado, se eligió la que mejor rendimiento mostró en el gel. Estas son: BT 584 > 8h; BT 718 > 8h; BT 719 5h; BT 803 5h; BT 804 5h; BT 805 5h; BT 849 5h.

A continuación se llevaron a cabo digestiones enzimáticas con dos enzimas de restricción sobre las 7 muestras de ADN seleccionadas. Se verificó el efecto de los enzimas de restricción en tres momentos sucesivos mediante un gel de agarosa añadiendo en caso necesario mayor cantidad de enzima. En la Figura 6 se recogen los resultados de la digestión en los tres momentos indicados, siendo las 7 primeras muestras se digirieron con la enzima *HindIII* y las 7 siguientes con *EcoRI*.

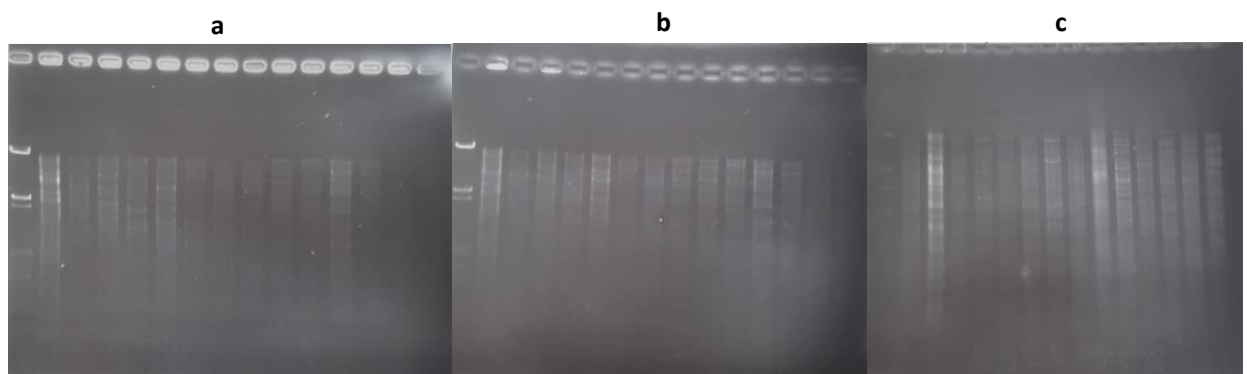


Figura 6. Digestión enzimática del ADN total de las muestras en tres momentos: a. primera digestión, b. segunda digestión, c. tercera digestión.

A continuación se siguió con el procedimiento descrito previamente: se llevó a cabo la hibridación del ADN con las sondas estándar y el posterior revelado del soporte. Se obtuvo el patrón de bandas que se muestra en la Figura 7 para *EcoRI* y *HindIII*.

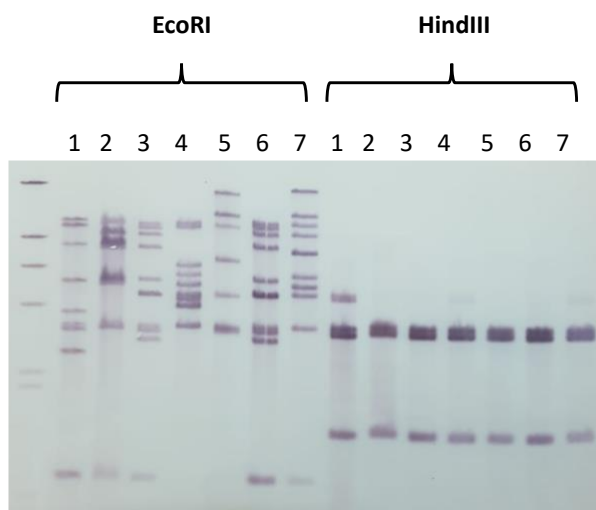


Figura 7. Patrón de bandas obtenido tras el revelado del soporte.

Como se aprecia, *HindIII* no genera diferencias en el patrón de bandas para cada cepa. En cambio para *EcoRI* se ven 6 patrones diferentes, que no coinciden con el patrón con el que se quiere comparar que se encuentra en la primera posición para ambas enzimas. Se puede apreciar que hay dos muestras que tienen el mismo patrón de bandas, 3 y 6, por lo que podrían ser la misma cepa bacteriana.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio de nuevas cepas bacterianas para su posterior uso como ingredientes probióticos, se extraen las siguientes conclusiones:

- a) En cuanto a la resistencia a antibióticos, según los resultados obtenidos depende principalmente de la especie bacteriana estudiada. En el caso de los *L. gasseri* se encontró resistencia a la Vancomicina y a la Clindamicina. En cambio, para los *B. longum* apenas muestran resistencia a ningún antibiótico. Por lo que se deberían hacer más estudios para determinar el motivo de esta resistencia.
- b) Respecto a la degradación de mucinas, en ambos ensayos se han obtenido resultados similares, y es que las cepas bacterianas estudiadas crecen mejor si en el medio tienen un fuente de carbono disponible.

- c) De acuerdo con los valores de pH obtenidos en el ensayo de producción de aminas biógenas, podemos afirmar que las cepas probióticas estudiadas no producirán estos compuestos que en una alta concentración resultan tóxicos para nuestra salud.
- d) A la hora de identificación y caracterización de las bacterias ácido lácticas que nos interesaban estudiar, se han obtenido diferentes resultados para cada enzima de restricción. En el caso *HindIII* no sirve para la diferenciación entre cepas.
- e) Para el caso de la enzima *EcoRI*, los resultados muestran que esta si que es capaz de diferenciar entre diferentes cepas pertenecientes a la misma especie. Con lo que nos sirve para identificar y caracterizar las bacterias estudiadas.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la empresa Biosearch Life, en particular al departamento de Descubrimientos del cuál tuve la suerte de formar parte. Este departamento formado por Óskar Bañuelos Hortigüela, Ana Isabel Sañudo y Roberto Luque Buitrago me acogió desde el primer día, ayudándome con cada duda e imprevisto que surgió durante el desarrollo del proyecto. Haciendo que mi estancia en Granada fuera del todo positiva.

Quiero también agradecer a Elena Hidalgo toda la paciencia y ayuda prestada en la presentación de este proyecto.

8. BIBLIOGRAFÍA

AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.

Allen, S. J., Okoko, B., Martinez, E. G., Gregorio, G. V., & Dans, L. F. (2003). Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).

Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., & Malik, R.K. (2010). Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Food Microbiol.*, 141(3), 156-64.

Bover-Cid, S., Miguelez-Arrizado, M. J., Moratalla, L. L. L., & Carou, M. C. V. (2006). Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science*, 72(1), 62-68.

Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Bartolozzi, F., Pola, P., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2000). A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther.* 14(12), 1625-9.

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 415s-420s.

Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82(1), 1-11.

FAO/OMS, 2001. Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas de ácido láctico.

FAO/WHO Expertconsulta on 2001. www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

Gómez, J. M. R. (2008). Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. *Editorial Complutense*.

Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J. S., Sandhu, B., Szajewska, H., & Weizman Z. (2000). *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.* 30(1):54-60.

Havelaar, A. H., Brul, S., De Jong, A., De Jonge, R., Zwietering, M.H., & Ter Kuile, B.H. (2010). Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 79–94.

Holzappel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35(2-3), 109-116.

Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Hirata, H., Nishimura, A., Kajimoto, O., & Fujiwara, S. (2005). Clinical effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on

perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Dairy Sci.* 88(2), 527-33.

Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., Vandvik, P. O., Sun, X., & Guyatt, G. H. (2011). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*, 11(11).

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.

Mattila-Sandholm, T., Matto, J., & Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9, 25-37.

Metchnikoff, E., & Chalmers-Mitchell, P. (1908). The Prolongation of Life. Optimistic studies. *New York: GP Putnam's Sons*.

Pregliasco, F., Anselmi, G., Fonte, L., Giussani, F., Schieppati, S., & Soletti, L. (2008). A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations. *Journal of clinical gastroenterology*. 42(3), S224-S233.

Quigley, E. M. M., (2010). Prebiotics and probiotics; Modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61, 213–218.

Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130 (2S), 396S-402S.

Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T., & Lievens, L. C. (1998). Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19(2), 281-285.

Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, 218(3), 237-241.

Vliagoftis, H., Kouranos, V. D., Betsi, G. I., & Falagas, M. E. (2008). Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 101(6), 570-9.

Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, K., & Enomoto, T. (2006). Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin. Exp. Allergy*. 36(11),1425-35.