

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

“Aislamiento y selección de cepas del género
Lactobacillus con capacidad probiótica e
inmunomoduladora”

Tesis Doctoral dirigida por:

Dra. Maria dels Àngels Calvo i Torras

Dr. Carles Adelantado i Faura

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

MARÍA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

2009

AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil expresar en tan sólo unas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que han ayudado a la realización de esta Tesis doctoral.

Antes que nada, dar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Dra. M.Àngels Calvo y Dr. Carles Adelantado. M.Àngels y Carles gracias por haberme guiado en todo momento, por vuestros sabios consejos, por escuchar los problemas que surgieron a lo largo de la realización de la Tesis y haber sido un apoyo tanto a nivel profesional como personal.

Gracias a mis padres por siempre estar ahí y apoyarme en todos mis proyectos. A mi hermana por todo y ser una de las mejores personas que conozco. Y en general, a toda mi familia, entre ellos Marisa y Nacho por preocuparse siempre y darme su confianza en todo momento.

Agradecer a mis compañeros y amigos en el día a día de la UAB que, aún siendo mi Facultad “adoptiva”, me han hecho sentir como en casa Leo, Lucia, Lúdia y también Aroa.

Gracias a mis amigos Eli, Raxaa, Marta, Noe, Judith, Anna, Neus, Miguel, Marta M, Matías, Mari y Chris por tener paciencia y apoyarme siempre, aunque no nos veamos tanto como querríamos me alegra seguir teniendo momentos que compartir.

Gracias a mis compañeros de la UdG, por todo su ánimo y amistad sincera.

Mi agradecimiento también a Joan Puig por haberme dado la oportunidad de iniciar los estudios de doctorado.

También quiero dar las gracias al Servei de Genètica de la Facultat de Veterinària (UAB), al personal del Servei Integrat del Animal de Laboratori (SIAL, UAB), a Dra. Ester Fernández del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Inmunologia de la UAB, a la Dra. Paqui García del Instituto de Biotecnología y

Biomedicina (IBB, UAB), a los facultativos del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, UAB), al Servei d'Estadística de la UAB y al Laboratori de Bioseguretat de la UAB por toda la colaboración brindada y por haberme dado la oportunidad de recurrir a su experiencia científica.

Muy especialmente deseo agradecer a Sergi Audivert y a Miquel Àngel Bonachera que me hayan dado la oportunidad de conocer las diversas facetas del mundo de los probióticos y me hayan permitido utilizar los datos obtenidos a lo largo de nuestra experimentación con el fin de poder elaborar la Tesis doctoral. Quisiera transmitir mi agradecimiento a los Dres. Jordi Cuñé y Jordi Espadaler por sus valiosos consejos en el planteamiento de diversos ámbitos de la investigación, así como por su colaboración en la interpretación de los resultados, muy especialmente en los aspectos relacionados con los ensayos sobre inmunomodulación. Asimismo quisiera mencionar también al resto de mis compañeros de la empresa AB-Biotics con los que he compartido proyectos científicos y que me han aportado sus puntos de vista profesionales para el mejor desarrollo de nuestras investigaciones.

Por último, quisiera agradecer también a todas aquellas personas que no he nombrado y han puesto de su parte, ayudando en la realización de la Tesis de un modo u otro.

ABREVIATURAS EMPLEADAS MÁS FRECUENTEMENTE

APC: *Antigen-presenting cell*.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BAL: Bacterias del Ácido Láctico.

CD: *Cluster of differentiation*.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

dpm: Desintegraciones por minuto.

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*.

EFSA: *European Food Safety Authority*.

FAO: *Food and Agriculture Organization*.

GM-BAL: Bacterias del ácido láctico genéticamente modificadas.

GRAS: *Generally Recognized As Safe*.

HLA-DR+: *Major compatibility complex*.

IFN: Interferón.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

ILSI: *International Life Sciences Institute*.

MALT: *Mucosa associated lymphoid tissue*.

MEM: Medio Esencial Mínimo.

MRS: Medio de cultivo De Man Rogosa Sharpe.

NCTC: *National Collection of Type Cultures (UK)*.

NK: *Natural killer*.

o/n: Overnight.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

RDP: *Ribosomal Database Project*.

TGF- β : *Transforming growth factor β* .

TSA: Medio de cultivo *Tryptic Soy Agar*.

TSB: Medio de cultivo *Tryptic Soy Broth*.

TTC: *2,3,5-Trifenil Tetrazolium Chloride*.

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

WHO: *World Health Organization*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	Página 3
1.1. MICROORGANISMOS EN EL HOMBRE.....	Página 4
1.2. PROBIÓTICOS Y SALUD.....	Página 6
1.2.1. <u>Evolución de la definición de probiótico</u>	Página 7
1.2.2. <u>Actividad de los probióticos en el hombre</u>	Página 8
1.2.3. <u>Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos</u>	Página 9
1.2.4. <u>Mecanismos de acción de los probióticos</u>	Página 10
1.2.5. <u>El grupo de bacterias potencialmente probióticas</u>	Página 10
1.2.6. <u>Características del probiótico ideal</u>	Página 12
1.2.7. <u>Aplicaciones clínicas</u>	Página 14
1.2.7.1. Actividad frente a enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal	Página 14
1.2.7.2. Prevención y tratamiento de diarreas	Página 15
1.2.7.3. Actividad frente a <i>Helicobacter pylori</i>	Página 15
1.2.7.4. Reducción del riesgo de padecer cáncer de colon	Página 16
1.2.7.5. Actuación frente infección del tracto genitourinario	Página 16
1.2.7.6. Efecto protector frente a infecciones y capacidad de estimulación del sistema inmune	Página 17
1.2.7.7. Reducción de los niveles de colesterol	Página 17
1.2.7.8. Reducción de la intolerancia a la lactosa	Página 18
1.2.7.9. Actuación frente a la hipertensión	Página 18
1.2.7.10. Aplicación frente a las alergias	Página 18
1.2.8. <u>El sistema inmunitario gastrointestinal</u>	Página 19
1.2.8.1. La microbiota intestinal	Página 19
1.2.8.2. El epitelio y la mucosa intestinal	Página 20
1.2.8.3. El sistema inmunitario	Página 20
<u>Inmunidad innata</u>	Página 20
<u>Inmunidad adaptativa</u>	Página 20
1.2.9. <u>Guía para la evaluación de los probióticos</u>	Página 24
1.2.9.1. Pruebas <i>in vitro</i> para la selección de probióticos útiles para el hombre	Página 25
1.2.9.2. Seguridad de los probióticos	Página 26
1.2.9.3. Estudios <i>in vivo</i> en el hombre y en los animales	Página 26
1.2.9.4. Etiquetado	Página 26
1.2.10. <u>Probióticos comercialmente disponibles</u>	Página 27

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	Página 31
2.1. OBJETIVOS.....	Página 31
2.2. PLAN DE TRABAJO.....	Página 32
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Página 35
3.1. ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	Página 35
3.1.1. <u>Elección de las zonas de muestreo</u>	Página 35
3.1.2. <u>Obtención de muestras</u>	Página 36
3.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS.....	Página 39
3.2.1. <u>Procesado de las muestras</u>	Página 40
3.2.2. <u>Aislamiento y selección de las posibles cepas de <i>Lactobacillus spp.</i></u>	Página 42
3.2.2.1. Características morfológicas de las cepas	Página 43
<u>Observación macroscópica de las colonias</u>	Página 43
<u>Tinción de Gram</u>	Página 45
<u>Tinción de esporas</u>	Página 47
3.2.2.2. Prueba de la catalasa	Página 49
3.2.2.3. Actividad hemolítica	Página 50
3.2.2.4. Identificación de las cepas seleccionadas	Página 52
3.2.2.5. Evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales	Página 55
3.2.2.6. Propiedades antibacterianas	Página 60
3.2.2.7. Resistencia a antibióticos	Página 63
3.2.2.8. Proceso de liofilización y ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas	Página 66
3.2.2.9. Identificación de las cepas por la técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	Página 68
3.2.2.10. Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido	Página 73
3.2.2.11. Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche	Página 75
3.2.2.12. Valoración sensorial y ensayo de fermentación de la leche	Página 77
3.2.2.13. Efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana	Página 80
3.2.2.14. Adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal	Página 83
<u>Adhesión a mucus</u>	Página 83
<u>Adhesión a células Caco-2</u>	Página 86
3.2.2.15. Inmunomodulación en humanos	Página 89

<u>Población de leucocitos</u>	Página 92
<u>Análisis plasmático de citocinas IL-10 e IL-1</u>	Página 93
<u>Detección y cuantificación de TGF-β</u>	Página 93
4. RESULTADOS	Página 97
4.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	Página 97
4.1.1. <u>Resultados de las encuestas realizadas</u>	Página 97
4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESADO DE LAS MUESTRAS, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS.....	Página 100
4.2.1. <u>Resultados de los crecimientos en los medios de cultivo específicos, posteriormente al pre-enriquecimiento y siembra en placa</u>	Página 100
4.2.2. <u>Resultados correspondientes a la selección de las posibles cepas de <i>Lactobacillus spp.</i></u>	Página 103
4.2.2.1. <u>Resultados correspondientes a las características morfológicas de las cepas</u>	Página 103
<u>Resultados de la observación macroscópica de las colonias</u>	Página 103
<u>Resultados de la tinción de Gram</u>	Página 104
<u>Resultados de la tinción de esporas</u>	Página 113
4.2.2.2. <u>Resultados de la prueba de la catalasa</u>	Página 115
4.2.2.3. <u>Resultados correspondientes a la evaluación de la actividad hemolítica</u>	Página 115
4.2.2.4. <u>Resultados de la identificación de las cepas seleccionadas</u>	Página 118
4.2.2.5. <u>Resultados de la evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales</u>	Página 119
4.2.2.6. <u>Resultados para la evaluación de las propiedades antibacterianas</u> ...	Página 121
4.2.2.7. <u>Resultados de la evaluación de la resistencia a antibióticos</u>	Página 123
4.2.2.8. <u>Resultados correspondientes al proceso de liofilización y ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas</u>	Página 125
<u>Proceso de liofilización</u>	Página 125
<u>Ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas</u>	Página 125
4.2.2.9. <u>Resultados correspondientes a la identificación de las cepas por la técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)</u>	Página 127
4.2.2.10. <u>Resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido</u>	Página 130
4.2.2.11. <u>Resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche</u>	Página 134
4.2.2.12. <u>Resultados relativos a la valoración sensorial y al ensayo de fermentación de la leche</u>	Página 137
4.2.2.13. <u>Resultados relativos a evaluar el efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana</u>	Página 138
<u>Resultados del efecto sobre el bienestar</u>	Página 138
<u>Resultados de los estudios de translocación bacteriana</u>	Página 139

4.2.2.14. Resultados correspondientes a los ensayos de adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal	Página 140
<u>Resultados de la adhesión a mucus</u>	Página 140
<u>Resultados de la adhesión a células Caco-2</u>	Página 141
4.2.2.15. Resultados correspondientes al estudio sobre inmunomodulación en humanos	Página 142
<u>Resultados referentes a la población de leucocitos</u>	Página 144
<u>Resultados referentes al análisis plasmático de las citocinas IL-1 e IL-10</u>	Página 144
<u>Resultados referentes a la detección y cuantificación de TGF-β</u>	Página 144
5. DISCUSIÓN	Página 147
5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y A LA OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	Página 147
5.1.1. <u>Discusión de los resultados de las encuestas realizadas</u>	Página 147
5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AL AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS	Página 148
5.2.1. <u>Discusión de los resultados de los crecimientos en los medios de cultivo específico, posteriormente al pre-enriquecimiento y siembra en placa</u>	Página 148
5.2.2. <u>Discusión de los resultados correspondientes a la selección de las posibles cepas de <i>Lactobacillus spp</i></u>	Página 150
5.2.2.1. Discusión de los resultados correspondientes a las características morfológicas de las cepas y la prueba de la catalasa	Página 150
5.2.2.2. Discusión de los resultados correspondientes a la prueba de la catalasa	Página 151
5.2.2.3. Discusión de los resultados correspondientes a la evaluación de la actividad hemolítica	Página 151
5.2.2.4. Discusión de los resultados de la identificación de las cepas seleccionadas	Página 151
5.2.2.5. Discusión de los resultados de la evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales	Página 152
5.2.2.6. Discusión de los resultados correspondientes a las propiedades antibacterianas	Página 154
5.2.2.7. Discusión de los resultados de la evaluación de la resistencia a antibióticos	Página 156
5.2.2.8. Discusión de los resultados correspondientes al proceso de liofilización y a los ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas	Página 156
5.2.2.9. Discusión de los resultados correspondientes a la identificación de las cepas por la técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	Página 157
5.2.2.10. Discusión de los resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido	Página 159
5.2.2.11. Discusión de los resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche	Página 160
5.2.2.12. Discusión de los resultados relativos a la valoración sensorial y al ensayo de fermentación de la leche	Página 160
5.2.2.13. Discusión de los resultados relativos a evaluar el efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana	Página 161

5.2.2.14. Discusión de los resultados correspondientes a los ensayos de adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal	Página 161
5.2.2.15. Discusión de los resultados correspondientes al estudio sobre inmunomodulación en humanos	Página 163
5.2.2.16. Características generales de las cepas seleccionadas	Página 165
6. CONCLUSIONES	Página 169
7. BIBLIOGRAFÍA	Página 173
ANEXO	Página 197
A.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL PRE-ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE HECES	Página 197
A.2. MEDIO CRIOPROTECTOR UTILIZADO EN EL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN	Página 199
A.3. SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR	Página 199

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos siglos, los microorganismos probióticos han sido utilizados de forma empírica, en la producción de alimentos como por ejemplo diversos productos lácticos y vegetales fermentados (Chukeatirote, 2003). Estos alimentos aportan características organolépticas, en base a la presencia de determinados microorganismos. En los últimos años se ha mostrado un interés específico sobre estos microorganismos debido a que su utilización puede mejorar la salud y prevenir enfermedades (Felley *et al.*, 2001; Reid, 2008).

Antiguamente los alimentos se conservaban mediante un proceso de secado o de fermentación natural entre otros. Los hombres aprendieron a producir la gran mayoría de alimentos fermentados, como cerveza, vino, aceitunas, etc.

Aunque el consumo de alimentos en muchos países, sea todavía una cuestión de supervivencia, cada vez más, se incrementa el número de consumidores que se preocupan por los aspectos saludables de los alimentos. Como consecuencia de este hecho, se han ido introduciendo en el mercado una amplia variedad de alimentos a los que se les atribuye efectos que les confieren un gran atractivo comercial. En el mercado actual, por ejemplo, se ha visto incrementado el consumo de leches fermentadas en aproximadamente un 10% en Europa y un 36% en Norte América entre 1998 y 2002.

Japón fue el primer país en etiquetar productos como alimentos funcionales y entre ellos, los probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados.

Según el ILSI (*International Life Sciences Institute*), se describe alimento funcional como el que “logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, mejora el estado de salud y el bienestar, o bien reduce el riesgo de enfermedad” (Diplock *et al.*, 1998; Young, 1996).

1.1. MICROORGANISMOS EN EL HOMBRE

El cuerpo humano posee diez veces más microbiota indígena que células eucariotas constitutivas (de sus propios tejidos), por ello los microorganismos propios de cada individuo se consideran parte del cuerpo humano. Se describen concentraciones muy elevadas de bacterias a nivel de la piel, cavidad oral y tracto intestinal y urogenital (Mandigan *et al.*, 1999).

Los microorganismos en el organismo desarrollan tres tipos de funciones básicas: metabólica (descomposición de alimentos), barrera (protección contra el exterior) e interacción con el huésped (a través del sistema inmunológico). Así por ejemplo, la presencia de bacterias en el colon aporta al hombre distintas actividades metabólicas que no sería capaz de llevar a cabo por sí solo (Gibson y Macfarlane, 1995).

La microbiota se va adquiriendo de manera posterior al nacimiento (Ahrné *et al.*, 2005; Bezirtzoglou *et al.*, 1997). En una primera fase, las cepas aerobias y anaerobias facultativas, colonizan el tubo digestivo, entre ellas las de *Lactobacillus* y *Escherichia coli* y se va instaurando, en consecuencia, un microsistema en el que también destaca una gran proliferación de bacterias anaerobias pertenecientes mayoritariamente a los géneros: *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Guarner y Malagelada, 2003; Macfarlane y Dillon, 2007). Transcurridos los primeros años de vida, puede indicarse que la microbiota en el tracto gastrointestinal establecida, es bastante definitiva (Ducluzeau, 1993).

Algunos autores (Kimura *et al.*, 1997; Macfarlane *et al.*, 1995; Penders *et al.*, 2006) indican que cada individuo posee cepas “propias” y específicas, y aunque la composición bacteriana pueda ser variable, las funciones metabólicas permanecen relativamente constantes.

La proporción entre los géneros de microorganismos que integran la microbiota gastrointestinal, varía considerablemente a lo largo del tracto digestivo. Así por ejemplo, en el intestino delgado, el rango es del orden que oscila entre 10^4 UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/mL a 10^{6-7} UFC/mL. Los factores limitantes del

crecimiento de microorganismos en el tracto gastrointestinal son fundamentalmente el tránsito intestinal del contenido y la secreción de ácidos biliares y pancreáticos.

La relación de los microorganismos comúnmente asociados al tracto gastrointestinal se presenta a continuación:

Géneros	Observación microscópica	Productos de fermentación
<i>Bacteroides</i>	Bacilo Gram negativo	A, P, S
<i>Eubacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, B, L
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, L, F, E
<i>Clostridium</i>	Bacilo Gram positivo	A, P, B, L, E
<i>Lactobacillus</i>	Bacilo Gram positivo	L
<i>Ruminococcus</i>	Coco Gram positivo	A
<i>Peptostreptococcus</i>	Coco Gram positivo	A, L
<i>Peptococcus</i>	Coco Gram positivo	A, B, L
<i>Metanobrevibacter</i>	Cocobacilo Gram positivo	C
<i>Desulfovibrio</i>	Bacilo Gram negativo	A
<i>Propionobacterium</i>	Bacilo Gram positivo	A, P
<i>Actinomyces</i>	Bacilo Gram positivo	A, L, S
<i>Streptococcus</i>	Coco Gram positivo	L, A
<i>Fusobacterium</i>	Bacilo Gram negativo	B, A L
<i>Escherichia</i>	Bacilo Gram negativo	Mezcla de ácidos

Tabla núm.1.- Principales bacterias presentes en el tracto intestinal del hombre (adaptada de Macfarlane *et al.*, 1995). A: Acetato; P: Propionato; B: Butirato; L: Lactato; S: Succinato; F: Formiato; E:Etanol ; C: Metano.

La mayoría de la microbiota, se adquiere fundamentalmente en el momento del nacimiento, siendo especies de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus* las dominantes en el intestino de bebés que se alimentan de leche materna. Inicialmente, abunda en mayor concentración el grupo de las bacterias anaerobias, pero poco a poco se va modificando dependiendo del tipo de dieta y, tras el destete, la microbiota tiene una marcada tendencia a estabilizarse.

1.2. PROBIÓTICOS Y SALUD

Existe una estrecha relación entre dieta y estado de salud (Holdeman *et al.*, 1976; Balmer y Wharton, 1989).

En los últimos años se ha observado un creciente interés tanto por la comunidad científica como por parte de la población por el papel de los probióticos en la salud humana (Desmazeaud, 1996; Guarner y Schaafsma, 1998).

La asociación sin duda más conocida de probióticos con derivados lácteos fermentados, es la que corresponde a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, tradicionalmente utilizada en la producción del yogur. En la actualidad, el abanico de cepas se ha incrementado con otros microorganismos que pueden estar presentes en la microbiota intestinal, como por ejemplo, otras especies de *Lactobacillus*, especies de *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, cepas de *Escherichia coli* e incluso de especies del género *Enterococcus* (Dominguez-Bello, 2008).

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que pertenecen a la microbiota natural humana y se caracterizan por tener una mínima o nula capacidad patógena, así como por desempeñar funciones favorables sobre la salud y el bienestar de los huéspedes.

Las bacterias probióticas, tanto autóctonas como las aportadas al organismo mediante la alimentación pueden controlar la instauración y/o el desarrollo de diversos microorganismos patógenos, entre los que destacan *Salmonella* Typhimurium, *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*, y también proporcionan una protección importante frente a patógenos urogenitales como *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivius*, *Candida albicans* y *Chlamydia trachomatis* (Hilton *et al.*, 1995).

1.2.1. Evolución de la definición de probiótico

El primer estudio que demostraba los efectos beneficiosos de los microorganismos que fermentaban los alimentos fue llevado a cabo por el microbiólogo ucraniano y Premio Nobel en Medicina Ilya Metchnikoff en 1908 quien señaló que estos microorganismos o sustancias producidas en alimentos fermentados (como el yogur) podían influir en el balance de la microbiota intestinal, y en parte, eran los responsables de la conocida longevidad de los habitantes de Bulgaria. Desde entonces y hasta día de hoy ha crecido el interés por estos alimentos que contienen microorganismos beneficiosos para la salud, y más concretamente por los productos lácticos fermentados (Felley *et al.*, 2001). En el año 1998 Spanhaak *et al.*, entre otros, demostraban que *Lactobacillus casei* Shirota en Yakult® (leche fermentada japonesa) era capaz de colonizar el epitelio intestinal, y en consecuencia, de delimitar el área de adherencia al intestino de otros microorganismos indeseables. Asimismo actúa frente infecciones intestinales en niños desencadenadas por *Rotavirus*, y también en procesos tumorales en ratones. Estos efectos pueden ser debidos a las glicoproteínas secretadas por las propias bacterias (Saavedra *et al.*, 1994; Isolauri *et al.*, 1995; Majamaa *et al.*, 1995; Matsuzaki, 1998; Spanhaak *et al.*, 1998; Lei *et al.*, 2006).

En este orden de ideas, podemos señalar que la ingestión de bacterias vivas a través del consumo de productos fermentados, actúa sobre la composición o la actividad de la microbiota autóctona, y por tanto puede modificar y favorecer el estado de salud del huésped.

La definición del término PROBIÓTICO proviene del griego (pro= a favor de; biótico= vida), y ha ido variando con el tiempo:

Se utilizó por primera vez el término de **probiótico** por Lilly y Stillwell en el año 1965, refiriéndose a “sustancia que estimula el crecimiento de otros microorganismos”. Éste termino se ha redefinido posteriormente como “agente microbiano viable que al utilizarse en animales o en el hombre aporta efectos beneficiosos en el huésped mejorando el balance de la microbiota intestinal” por Salminen *et al.*, 1998.

En 1970 un **microorganismo probiótico** se definía como “microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés”.

En el 2001 la WHO (*World Health Organization*) definió **probiótico** como “microorganismo vivo que cuando se administra en cantidades adecuadas confiere efectos beneficiosos en el huésped”.

En el informe conjunto de la FAO (*Food and Agriculture Organization*) y la WHO del 2002 el término **probiótico** se definió como “microorganismo vivo que ingerido en las cantidades adecuadas confiere un beneficio saludable al huésped”.

1.2.2. **Actividad de los probióticos en el hombre**

Todo tipo de yogur o de leche fermentada que contenga los cultivos iniciadores tradicionales *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, facilita la digestión de la lactosa en individuos con intolerancia a este compuesto ya que poseen una actividad β -galactosidasa que actúa durante la fermentación del producto y también en el intestino.

Se aconseja el consumo de estos productos, en ciertos estados patológicos entre los que destacan:

- Afecciones digestivas y diarreas, tanto por su fácil digestibilidad, como su efecto sobre el reestablecimiento de la microbiota intestinal (De Roos y Katan, 1988-1998; Ashenafi y Busse, 1989; Vanderhoof *et al.*, 1999; De Roos y Katan, 2000; Guandalini *et al.*, 2000; Szajewska *et al.*, 2001).
- Disbacteriosis intestinal debida a tratamientos con antibióticos, ya que éstos provocan reducciones en la microbiota intestinal y puede ser reestablecida por el consumo de probióticos (Coconnier *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2005).
- Personas poli-medicadas y en estados de inapetencia y convalecencia, ya que las leches fermentadas y especialmente el yogur es un alimento de mayor aceptación y que puede aumentar las defensas (Gilliland *et al.*, 1980; Gilliland *et al.*, 1984; Dunne *et al.*, 1999).

En general se considera que los probióticos tienen acción profiláctica y terapéutica permitiendo mejorar el estado de salud y la dinámica nutritiva.

1.2.3. Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos

Los requisitos que ha de cumplir un microorganismo para ser considerado como probiótico son (Castro y De Rovetto, 2006):

- Formar parte de la microbiota del intestino humano.
- No ser ni patógeno ni toxigénico.
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno.
- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota nativa ya existente.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas.

Las metodologías para evaluar estos requisitos han sido aportadas por diversos investigadores y entre ellas destacan: adherencia al epitelio gastrointestinal para reducir o prevenir la colonización por patógenos (Bernet *et al.*, 1994; Sarem–Damjerdii *et al.*, 1995; Kirjavainen *et al.*, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999; Reid y Boking, 2003; Collado *et al.*, 2007), crecimiento competitivo (Holzapfel *et al.*, 1998), producción de metabolitos que inhiben microorganismos patógenos (Reid y Burton, 2002) y adhesión a células Caco-2 (Crociani y Ballongue, 1994; Crociani *et al.*, 1995; Sarem–Damjerdii *et al.*, 1995).

El uso reciente de BAL genéticamente modificadas (GM-BAL) ha tenido la finalidad de mejorar la calidad, el aroma y la textura de productos alimentarios tales como el suero de la leche o el yogur (Calvo, 2001).

1.2.4. Mecanismos de acción de los probióticos

Entre los mecanismos de acción de los probióticos que se citan en la bibliografía podemos mencionar (Isolauri *et al.*, 1998; Alander *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 2001; Adelantado *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007):

- Producción de sustancias antimicrobianas como por ejemplo ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.
- Disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos.
- Aumento de la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio gastrointestinal.
- Competición por nutrientes.
- Estimulación de la respuesta inmune. La estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra la enfermedad intestinal, estimulando la producción de IgA (Inmunoglobulina A), activando macrófagos e incrementando la concentración del IFN-gamma (interferón gamma).

1.2.5. El grupo de bacterias potencialmente probióticas

Éste grupo está integrado por diversas especies incluyendo géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* y *Weissella*.

Dentro de este grupo el género del que se describen mayor cantidad de especies con características probióticas es *Lactobacillus*, que tienen propiedades beneficiosas para la salud.

Otros grupos bacterianos han sido reconocidos y aceptados como probióticos, entre ellos destacan: *Bacillus* spp. (Casula y Cutting, 2002), *Bifidobacterium* spp. (Saavedra

et al., 1994; Charteris *et al.*, 1998); *Propionibacterium* spp. (Young y Huffmans, 2003; Collado *et al.*, 2007; Hatakka *et al.*, 2008) y *Streptococcus* spp. (Saavedra *et al.*, 1994).

Las denominaciones taxonómicas de los géneros y especies que se indican en la Tabla núm.2 corresponden a las utilizadas habitualmente a nivel industrial si bien en la actualidad las denominaciones taxonómicas de algunos de estos microorganismos se han modificado (Axelsson, 2004).

Microorganismos de mayor aplicación como probióticos	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i>
<i>Lactobacillus casei immunitis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Saccharomyces</i> spp.

Tabla núm.2.- Denominaciones a nivel de la industria de los microorganismos de mayor interés aplicativo.

En la Tabla núm.3 se citan los principales géneros probióticos y los posibles efectos que pueden tener sobre la salud de los consumidores.

GÉNERO	EFFECTOS
<i>Lactobacillus</i>	En ningún caso son patógenos, aunque se han reportado algunas cepas oportunistas en personas inmunodeprimidas.
<i>Lactococcus</i>	En ningún caso son patógenos.
<i>Streptococcus</i>	Oportunista; sólo <i>Streptococcus thermophilus</i> se utiliza en productos lácteos.
<i>Enterococcus</i>	Oportunista, algunas cepas muestran resistencia a antibióticos.
<i>Bacillus</i>	Únicamente <i>Bacillus subtilis</i> se reconoce como microorganismo GRAS (<i>Generally Recognized As Safe</i>) y se puede utilizar con finalidad probiótica.
<i>Bifidobacterium</i>	Algunas cepas han sido aisladas a partir de procesos de infecciones humanas.
<i>Saccharomyces</i>	En ningún caso son patógenos; algunas cepas han sido aisladas de procesos infecciosos humanos.

Tabla núm.3.- Principales géneros probióticos y su nivel de seguridad. Adaptado de Salminen *et al.*, 1998.

1.2.6. Características del probiótico ideal

El probiótico destinado a consumo humano debería ser, en primer lugar, de origen humano (Lee y Salminen, 1995), ya que algunas acciones de estos cultivos vivos son específicas para el huésped del que han sido aislados y debe ser capaz de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y resistir a las secreciones digestivas (Mc Donald *et al.*, 1990; Marteau, 1997).

Paralelamente, debe poseer capacidad de adherencia al epitelio gastrointestinal con el fin de lograr una colonización eficaz e inhibir, en consecuencia, el crecimiento de

bacterias patógenas, colaborando con el balance ecológico del organismo que podría verse afectado por diversos motivos, entre los que destacan:

- La dieta.
- La administración de fármacos.
- La contaminación medioambiental.
- Las condiciones de estrés.
- La disminución de defensas inmunológicas.
- El envejecimiento natural.

En la Tabla núm.4, se aporta un resumen de los principales efectos beneficiosos atribuidos a las cepas principales descritas como probióticas.

CEPA	EFEECTO BENEFICIOSO
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Adherencia al epitelio intestinal humano. Equilibrio de la microbiota intestinal. Mejora de la respuesta inmune.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Prevención de la diarrea asociada a antibióticos. Tratamiento de la diarrea por <i>Rotavirus</i> . Tratamiento de la diarrea causada por <i>Clostridium difficile</i> . Mejoras en la enfermedad de Chron.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Prevención de la alteración de la microbiota intestinal. Efectos positivos para prevenir el cáncer de vejiga.
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Reducción de los enzimas carcinogénos.
<i>Bacillus subtilis</i>	Utilización para bacterioterapia oral. Restauración de la microbiota normal. Inmunoestimulación.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Prevención la diarrea viral.
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Crecimiento y estimulación de otras bacterias beneficiosas.

Tabla núm.4.- Microorganismos probióticos y sus efectos. Adaptada de Salminen *et al.*, 1998.

1.2.7. Aplicaciones clínicas

Algunos microorganismos bajo el nombre de “probióticos” han estado propuestos en un amplio rango de aplicaciones clínicas, que abarcan desde el tratamiento de diarreas hasta la posible prevención de algunos tipos de cáncer (Kaur *et al.*, 2001).

El efecto beneficioso para la salud es dependiente de cada una de las cepas administradas, de la dosis, de la forma de administración y de características inherentes al huésped.

Entre las principales aplicaciones clínicas de los probióticos podemos citar:

1.2.7.1. **Actividad frente a enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal**

Habitualmente se manifiestan alteraciones en el contenido de la microbiota intestinal. Determinados estudios defienden que una combinación de cepas como *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp., puede mejorar los síntomas de la enfermedad de Chron (Gupta *et al.*, 2000) y la colitis ulcerativa (Ishikawa *et al.*, 2002), así como también del síndrome del colon irritable (De Roos y Katan, 1988-1998; Pouwels *et al.*, 1998).

Por ejemplo la enfermedad de Chron está asociada con la discapacidad funcional de la barrera, que puede ser mejorada si se incluyen probióticos como suplementos en dietas de los pacientes (Isolauri *et al.*, 1998).

La producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas por parte de los probióticos ha mostrado también tener un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *Escherichia coli* y *Campylobacter* spp., reduciendo las mismas considerablemente (Gagnon *et al.*, 2004).

1.2.7.2. Prevención y tratamiento de diarreas

La prevención y tratamiento de las diarreas se cita en diversos estudios (Gilliland *et al.*, 1985; Guandalini *et al.*, 2000; Rolfe, 2000; Calvo, 2001; Goosems *et al.*, 2003; Zhou, 2005; Kaila *et al.*, 1992; Lei *et al.*, 2006; Liong, 2007) en los que se destacan tres tipos de procesos:

- Diarrea asociada a antibióticos

Saccharomyces boulardii fue uno de los primeros agentes bioterapéuticos estudiados en la prevención y tratamiento de la diarrea en adultos asociada a antibióticos como clindamicina, cefalosporina y penicilina.

- Diarrea aguda

Por lo general es causada por *Rotavirus* en lactantes y niños. Estudios sugieren que *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* y *Bifidobacterium lactis* tienen efectos beneficiosos en su prevención y tratamiento.

- Diarrea del viajero

Comúnmente causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica, mostró reducción de la viabilidad cuando se trataba con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii*.

1.2.7.3. Actividad frente a *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria involucrada en el desarrollo de la úlcera gastroduodenal y representa un factor de riesgo para la instauración de cáncer gástrico.

Los probióticos afectan negativamente a su crecimiento inhibiendo su capacidad de adherencia y disminuyendo la actividad ureasa necesaria para que sobreviva en el medio ácido del estómago (Midolo *et al.*, 1995; Aiba *et al.*, 1998; Coconnier *et al.*, 1998; Armuzzi *et al.*, 2001).

1.2.7.4.Reducción del riesgo de padecer cáncer de colon

Los malos hábitos alimentarios inducen a la microbiota intestinal a producir sustancias con actividad carcinógena. Estudios epidemiológicos elaborados en el año 1998 pusieron en evidencia que las dietas suplementadas con *Lactobacillus* spp. y/o *Bifidobacterium* spp. reducen el riesgo de contraer cáncer de colon (Aso *et al.*, 1995).

Este hecho se debe a que son capaces de:

- Disminuir las enzimas fecales asociadas a la conversión de sustancias pre-carcinógenas a carcinógenas.
- Inhibir directamente la formación de células tumorales.
- Unirse e inactivar la sustancia carcinógena.

1.2.7.5.Actuación frente infección del tracto genitourinario

Determinadas especies de probióticos tienen un efecto protector debido a la producción de peróxido de hidrógeno con actividad microbicida contra patógenos que alteran este microambiente.

La administración por vía oral y/o vaginal de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG o *Lactobacillus fermentum* ha demostrado su capacidad de reducir el riesgo de: infecciones del tracto urinario, vaginosis bacteriana, vulvovaginitis por *Candida* y enfermedades de transmisión sexual por *Neisseria gonorreae* y *Chlamydia trachomatis* (Tissier, 1906; Reid *et al.*, 2001; Reid y Bokring, 2003).

En la microbiota vaginal predominan las especies de *Lactobacillus*, y más concretamente *Lactobacillus acidophilus*, que actúan como protectores del micro hábitat en el que se encuentran. Los cambios hormonales que suceden durante la menopausia producen alteraciones en la microbiota, facilitando las infecciones oportunistas por *Candida* y por *Escherichia coli*. La aplicación directa mediante cremas u óvulos ginecológicos de *Lactobacillus fermentum* B54 ha mostrado su capacidad de restaurar la

microbiota vaginal y reducir el riesgo de infecciones oportunistas en mujeres menopáusicas (Marquina y Santos, 2001).

1.2.7.6.Efecto protector frente a infecciones y capacidad de estimulación del sistema inmune

La microbiota intestinal ejerce un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. Sus mecanismos de acción son muy variados: modificación de los niveles de adhesión celular, producción de sustancias antimicrobianas o estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal. El resultado es una estimulación del efecto barrera que puede prevenir la invasión por parte de microorganismos patógenos (Coconnier, *et al.*, 1993; Perdigon *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1996; Matsuzaki y Chin, 2000; Sheih *et al.*, 2001; Liong, 2007).

No se dispone de muchos datos acerca del efecto de los probióticos sobre el sistema inmune de niños tratados con *Lactobacillus casei*, sin embargo se ha demostrado que la cantidad de IgA circulante es más elevada que en los niños no tratados y que su respuesta ante infecciones del tracto digestivo es mucho mejor (Marquina y Santos, 2001).

Las BAL mejoran la barrera defensiva de la mucosa intestinal y actúan de barrera anti-antígenos (Fang *et al.*, 2000; Penders *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 1996a; Salminen *et al.*, 1996b).

El potencial probiótico de *Lactobacillus casei* Shirota se ha demostrado a partir de los estudios de Matsuzaki en 1998, ya que éste estimula respuestas inmunológicas, previniendo las infecciones por cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Lactobacillus rhamnosus* GG también ha sido utilizado como una vacuna efectiva frente a *Rotavirus* (Isolauri *et al.*, 1995; Majamaa *et al.*, 1995).

1.2.7.7.Reducción de los niveles de colesterol

Los niveles elevados de ciertos lípidos en sangre, son un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. La capacidad de ciertas bacterias probióticas como

algunas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de presentar actividad sobre los ácidos biliares sugiere que pueden tener un papel en el control de los niveles de colesterol en el hombre, ya que el colesterol es un precursor de los ácidos biliares (Gilliland *et al.*, 1985; Liong, 2007).

1.2.7.8.Reducción de la intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa es un problema que padece entre el 50 y el 70% de la población mundial en distinto grado. Este problema es debido a la incapacidad de metabolizar la lactosa que contienen algunos alimentos, ya que se da una situación de deficiencia congénita de la enzima β -galactosidasa intestinal ocasionando la dificultad de absorción y digestión de este azúcar a partir de productos lácteos. La ingestión de probióticos de forma continuada, bien liofilizados o como yogur, ha permitido reducir considerablemente la mala absorción de la lactosa. Este efecto parece deberse al aporte de β -galactosidasa exógena por parte de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* del yogur, ya que degradan parcialmente la lactosa contenida en este tipo de productos y permite una mejor absorción (Marquina y Santos, 2001).

1.2.7.9.Actuación frente la hipertensión

La administración por vía oral de fragmentos de paredes celulares de *Lactobacillus casei*, produce una marcada actividad sobre la presión sistólica y diastólica (Sanders, 1999). Este hecho se ha evidenciado al comparar grupos de individuos a los que se les administró con grupos de individuos control a los que se les administró placebo.

1.2.7.10.Aplicación frente a las alergias

La prevalencia de enfermedades atópicas como el eczema atópico, la rinoconjuntivitis alérgica y el asma, ha aumentado en los últimos años. Estas condiciones están asociadas a citocinas sintetizadas por los linfocitos T CD4+ que promueven la secreción de IgE. Algunos investigadores han demostrado que los probióticos pueden ser efectivos en la respuesta inmune para prevenir reacciones alérgicas (Isolauri *et al.*, 2000; Young y Huffmans, 2003).

1.2.8. El sistema inmunitario gastrointestinal

Los sistemas de defensa del intestino (Murphy *et al.*, 2007) pueden clasificarse en:

- La microbiota intestinal.
- El epitelio y la mucosa intestinal.
- El sistema inmunitario.

1.2.8.1. La microbiota intestinal

Los microorganismos que pertenecen a esta microbiota intestinal ejercen una importante influencia en el mantenimiento del equilibrio en la comunidad microbiológica (bacterias patógenas/bacterias beneficiosas). La microbiota produce una gran cantidad de enzimas que cumplen un sinnúmero de funciones metabólicas en el intestino, influyendo sobre la salud del huésped.

Se considera que diversas BAL tienen efectos tales como la adherencia a la superficie de la mucosa, y así se logra evitar o minimizar la colonización por parte de microorganismos patógenos y en consecuencia, las manifestaciones virulentas derivadas de su presencia en el organismo. Por ejemplo, la patogenicidad de las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* está directamente relacionada con su habilidad de adherirse a la mucosa intestinal.

La microbiota entérica constituye el 95% aproximadamente del total de número de células del cuerpo humano. Las bacterias residentes en el tracto gastrointestinal pueden estar implicadas en la patogenia de enfermedades como las que determinan reacciones inflamatorias del intestino.

1.2.8.2.El epitelio y la mucosa intestinal

El epitelio intestinal es una capa unicelular constituida por distintas poblaciones epiteliales. Las células epiteliales del intestino tienen una serie de mecanismos de defensa constitutivos e inducidos.

La capa mucosa es una capa viscosa y elástica formada en gran parte por glicoconjugados, que no sólo forman una barrera física, sino que también evitan que se adhieran bacterias patógenas a la superficie del intestino.

La capa epitelial de la mucosa del intestino delgado, está agrupada en pliegues y criptas, que incrementan la superficie de absorción de las células y la concentración de linfocitos intraepiteliales.

1.2.8.3.El sistema inmunitario

El sistema inmunitario comprende una compleja serie de mecanismos de interacción. Existe un tejido inmunitario local MALT (*Mucosa associated lymphoid tissue*) y el sistema inmunitario general (en sangre, bazo y médula ósea). Ambos componentes pueden clasificarse en dos tipos de respuesta: la respuesta inmunitaria innata (no específica) y la adaptativa (específica).

Inmunidad innata:

Cuando los agentes patógenos ingresan en el organismo, primero son combatidos por los mecanismos de defensa innatos que actúan inmediatamente después de la invasión. Cuando se detecta un agente patógeno, los macrófagos y neutrófilos lo fagocitan. Esta respuesta puede ser suficiente para prevenir una infección. En función de la importancia de la infección se pueden producir nuevas células fagocitarias.

Inmunidad adaptativa:

Este tipo de respuesta inmunitaria se produce cuando los agentes patógenos resisten a la respuesta inmunitaria natural de 4 a 7 días después del inicio de la infección.

Transcurrido este tiempo los linfocitos B y T (contra un antígeno determinado) ya se habrán multiplicado y diferenciado. Después de una respuesta inmunitaria adaptativa frente a un agente patógeno, la respuesta a una nueva infección por parte del mismo huésped es mucho más rápida ya que las células almacenan memoria inmunológica.

En este caso el organismo reacciona de forma específica a los antígenos, mediante dos mecanismos:

- Respuesta inmunitaria humoral: los linfocitos B se activan y producen anticuerpos (inmunoglobulinas) que actúan contra una infección específica.
- Respuesta inmunitaria por mediación celular: la inmunidad celular involucra los linfocitos T que tienen receptores específicos capaces de reconocer los péptidos de los antígenos. A partir de este reconocimiento los linfocitos T CD4+ (*helper*/inductores) se diferencian en células Th1 (linfocitos T *helper*) o Th2. Las células Th2 son los activadores más efectivos de los linfocitos B, mientras que las Th1 activan los macrófagos. Los linfocitos T CD8+ (supresores/citotóxicos) pueden destruir directamente las células infectadas por un agente patógeno.

El intestino humano contiene más de 10^6 linfocitos por gramo de tejido. Además el 60% de la inmunoglobulina total producida diariamente es secretada en el tracto gastrointestinal. Las células inmunes intestinales están organizadas en distintos compartimentos, agregadas en los Folículos de Peyer, y distribuidas entre la mucosa y las poblaciones de linfocitos y en el epitelio.

Tras el nacimiento, el intestino es colonizado rápidamente por las bacterias, que tienen actividad como fuente de antígenos e inmunomoduladores no específicos. La microbiota intestinal tiene un doble rol, ya que es considerada como un grupo de antígenos que provocan respuestas específicas y locales al mismo tiempo.

El sistema inmunitario se ve afectado por el envejecimiento (inmunosenescencia), y por tanto, se reduce la esperanza de vida en los ancianos, ya que disminuye la resistencia

frente a enfermedades por el funcionamiento sub-óptimo del sistema inmunitario celular.

Los cambios más conocidos relacionados con el envejecimiento involucran a los linfocitos T. Estos cambios incluyen la disminución cuantitativa de células maduras CD3+ en la circulación periférica, una disminución del *pool* de CD45RA+ (precuroras de las células T) que predispone a la expresión fenotípica de las Th2, así como la incapacidad de que proliferen las células T de la sangre periférica y puedan secretar IL-2 (Interleucina-2), para contribuir de forma eficaz a disminuir las respuestas frente a la hipertensión *in vivo*.

La inmunosenescencia se puede determinar por cambios en la función o proporciones de los leucocitos que contribuyen en la inmunidad innata, como los fagocitos y las *Natural Killer* (NK). Más del 70% de las personas de 70 años tienen niveles de células NK inferiores al 40% en comparación con los niveles que presentan los adolescentes.

Las células NK y los fagocitos (particularmente monocitos) secretan muchas citocinas inmunoregulatoras, y la disminución de la función potencial de éstas puede tener efectos negativos en el sistema inmunitario integral de los ancianos, como la activación y diferenciación de linfocitos (Isolauri, 1995). Si se actúa a este nivel se puede combatir la inmunosenescencia aumentando la función celular inmune hasta los niveles deseables.

Las investigaciones en este sentido indican que estas diferencias pueden ser superadas modulando el sistema inmunitario, estimulándolo con productos naturales y químicos y/o productos con propiedades inmunomoduladoras (Erickson y Hubbard, 2000; Gill *et al.*, 2001).

El desarrollo de alimentos naturales capaces de aumentar la inmunidad en los que no se hayan descrito efectos secundarios, puede implicar un beneficio significativo para los grupos de población con la función inmunitaria dañada, y además, una manera atractiva de restaurar la función inmunológica mediante la intervención en la dieta.

En los adultos se ha observado que al suplementar la dieta con micronutrientes como las vitaminas A, C, E y β -caroteno, entre otros, se realzan algunos aspectos de la inmunidad celular, incluyendo la proporción de los linfocitos T en sangre y la actividad *in vitro* en células NK derivadas de sangre. Otra opción capaz de beneficiar la inmunoestimulación de los ancianos, es suplementar la dieta con un probiótico como pueden ser cepas de BAL (Meydani y Ha, 2000).

Algunas cepas de BAL muestran propiedades que aumentan la inmunidad y que ofrecen beneficios clínicos en grupos definidos. Por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG ha sido utilizada con éxito como suplemento inmunomodulador en niños. Sin embargo no se ha podido determinar la habilidad de modular la inmunidad en ancianos (De Vries *et al.*, 2006).

Asimismo debemos señalar que aunque determinadas cepas de *Lactobacillus plantarum* se comercializan como probióticos, no se ha determinado hasta el presente cuáles de entre ellas son capaces de mejorar la función inmune e incluso potenciarla (Fuller, 1994).

Se ha demostrado que las propiedades inmunomoduladoras de los probióticos y su patrón de comportamiento, dependen de las especies bacterianas involucradas, de cada cepa, así como de la dosis bacteriana administrada (Nagafuchi *et al.*, 1999).

La producción de citocinas (De Simone *et al.*, 1986; Aatouri y Lemonnier, 1997), la actividad fagocitaria (Shiffrin *et al.*, 1995) y la producción de anticuerpos (Link-Amster *et al.*, 1994) y de células NK (De Simone *et al.*, 1986), aumentan cuando se consume yogur ya que las bacterias de este producto pueden regular asimismo, la proliferación de linfocitos *in vitro* (Nagafuchi *et al.*, 1999) así como la producción de anticuerpos específicos (He *et al.*, 2000) y no específicos (Vitini *et al.*, 2001).

En este sentido, es de interés notorio la búsqueda de nuevas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que sean capaces de aumentar la inmunidad, proporcionando nuevos agentes con propiedades probióticas beneficiosas para la salud (incluyendo el cuidado geriátrico) y que posean propiedades inmunomoduladoras.

1.2.9. Guía para la evaluación de los probióticos

En mayo de 2001 la FAO y la WHO definieron conjuntamente nuevas guías para la evaluación de los probióticos.

El informe comprende los siguientes puntos:

- IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA: mediante técnicas que incluyen métodos moleculares aceptados internacionalmente para establecer fenotipo, genotipo, género y especie de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura. Se sugiere asimismo el depósito en una colección internacional de cultivos.
- CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA: se debe demostrar el efecto beneficioso mediante pruebas *in vitro*, determinando características de adhesión a epitelio gastrointestinal, producción de bacteriocinas, ácido láctico y peróxido de hidrógeno, y la habilidad de inhibir la adherencia de patógenos. También incluye ensayos *in vivo* en modelos animales para conocer los mecanismos potenciales de acción.
- SEGURIDAD: precaución al administrar probióticos a personas inmunodeprimidas, ya que en algunos casos estas bacterias pueden convertirse en patógenos oportunistas. Es necesario establecer y conocer los patrones de resistencia a antibióticos, la actividad metabólica, la producción de toxinas, la actividad hemolítica, la capacidad de infectividad en modelos animales inmunodeprimidos y los posibles efectos adversos en el consumidor. Garantizar que se tratan de microorganismos GRAS.
- EFICACIA: se debe comprobar en estudios clínicos el efecto esperado del probiótico en humanos. También hay que asociar un efecto a una cepa concreta y poder realizar el seguimiento en estudios tecnológicos, clínicos e epidemiológicos.

- ESPECIFICACIONES: se debe definir en la etiqueta o documento explicativo, las características del producto, como el género y especie de la cepa, la concentración del microorganismo, las condiciones de almacenamiento y el efecto beneficioso específico.

Los ensayos específicos para demostrar el cumplimiento de las exigencias requeridas podemos resumirlos en:

1.2.9.1. Pruebas *in vitro* para la selección de probióticos útiles para el hombre

Para que una cepa bacteriana pueda ser considerada un potencial probiótica debe cumplir las siguientes premisas (Mejía *et al.*, 2006):

- Resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares.
- Adherencia al mucus y a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- Habilidad para reducir la adhesión de microorganismos patógenos.
- Capacidad de hidrolizar sales biliares.

Algunos metabolitos producidos por las BAL (bacteriocinas, entre otros), tienen efectos antimicrobianos. Las bacteriocinas tienen actividad inhibitora frente a especies similares, pero en este caso, este efecto también se observa frente a otras especies menos relacionadas.

Se han descrito este tipo de metabolitos en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aislados de íleo humano tienen actividad frente a un amplio rango de microorganismos incluyendo cepas de *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactococcus* (Ingolf *et al.*, 1996; Adelantado *et al.*, 2006).

1.2.9.2. Seguridad de los probióticos

Un aspecto fundamental en la elección de un probiótico es el nivel de seguridad de la cepa. Las cepas más utilizadas pertenecen generalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que han sido catalogados como microorganismos seguros en la fermentación de los alimentos (Salminen *et al.*, 1998). Aunque teóricamente el uso en alimentación de estos microorganismos podría tener efectos colaterales, los casos que relacionan infecciones sistémicas y consumo de probióticos son muy escasos y todos se han detectado en pacientes inmunodeprimidos (Dickgiesser *et al.*, 1984; Antony *et al.*, 1996; Sanz *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2005; Salvana y Frank, 2006).

Aunque se consideran microorganismos GRAS, se recomienda que sean sometidos a diferentes pruebas, entre las que destacan:

- Resistencia a antibióticos (verificando la ausencia de genes transferibles).
- Evaluación de posibles actividades metabólicas perjudiciales (producción de ácido D-láctico).
- Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.
- Determinación de la producción de posibles toxinas y capacidad hemolítica.
- Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.

1.2.9.3. Estudios *in vivo* en el hombre y en los animales

Estos estudios, tienen como finalidad relacionar las propiedades atribuidas a los probióticos con la condición de una mejoría clínica, bienestar, calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad y rapidez de la recuperación de la enfermedad.

1.2.9.4. Etiquetado

Es necesario que el etiquetado de productos que contengan probióticos, indique los siguientes aspectos:

- Género, especie y nombre de la cepa.
- Concentración mínima de UFC de la cepa probiótica al final de la vida útil.
- Ingesta recomendada para que la dosis sea efectiva en relación con la mejora de la salud declarada.
- Efectos beneficiosos sobre la salud.
- Condiciones de almacenamiento.
- Dirección de contacto de los centros de atención al consumidor.

Algunos estudios han determinado la eficacia de la administración de BAL para usos profilácticos y terapéuticos en bebés prematuros, recién nacidos, niños y personas de la tercera edad. Debe tenerse en cuenta que la administración o consumo de probióticos exige que los ensayos clínicos en humanos estén garantizados y permitan demostrar su inocuidad (Gionchetti *et al.*, 2000; Kalliomaki *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2003).

1.2.10. **Probióticos comercialmente disponibles**

Actualmente hay un amplio rango de productos probióticos comercialmente disponibles para los consumidores. Estos productos son: productos lácteos, alimentos para niños y bebés, zumos, cereales, productos farmacéuticos y alimentos para animales (Saxelin *et al.*, 1996; Pouwels *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2004).

En algunos preparados no se administran microorganismos aislados sino que constituyen mezclas. Entre ellas podemos citar la mezcla de cepas de *Lactobacillus* y de *Streptococcus* que han sido utilizadas como fermentadores de productos lácteos con el fin de promover y mejorar la salud humana.

El consumo de probióticos ante un proceso de infección exige el control exhaustivo de la administración de antibióticos ya que estos pueden afectar, no sólo a la microbiota habitual del organismo, sino que también pueden impedir la viabilidad de las cepas probióticas (Reid, 2006).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta Tesis es aislar cepas de *Lactobacillus* que manifiesten capacidad probiótica e inmunomoduladora.

Las hipótesis de trabajo son las siguientes:

H₀: Cepas de *Lactobacillus* aisladas de heces de niños poseen una marcada capacidad probiótica e inmunomoduladora.

H₁: Cepas de *Lactobacillus* aisladas de heces de niños no poseen una marcada capacidad probiótica ni inmunomoduladora.

Los objetivos específicos de esta investigación se resumen en:

- 1.- Aislar cepas del género *Lactobacillus* a partir de heces de niños peruanos de corta edad.
- 2.- Evaluar y seleccionar las cepas de *Lactobacillus* aisladas en base a ensayos que permitan considerarlas como probióticas.
- 3.- Evaluar la capacidad inmunomoduladora de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

2.2. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo desarrollado, se resume en los apartados siguientes:

- 1.-Revisión de la bibliografía sobre *Lactobacillus* y su capacidad inmunomoduladora.
- 2.- Elección de la zona de muestreo. Obtención de las muestras, conservación, envío y tratamiento de las muestras.
- 3.- Aislamiento y selección de cultivos de *Lactobacillus*, en base a las características morfológicas y bioquímicas.
- 4.- Evaluación y selección de cepas de *Lactobacillus* valorando su resistencia a las condiciones físico-químicas del tracto gastrointestinal, su capacidad de elaborar sustancias antimicrobianas y su resistencia a antibióticos definidos por la legislación europea.
- 5.- Liofilización de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas y estudios de viabilidad.
- 6.- Estudio de la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medios de cultivo y en leche.
- 7.- Ensayos de adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- 8.- Ensayos para evidenciar el efecto inmunomodulador de las cepas seleccionadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

3.1.1. Elección de las zonas de muestreo

Con el fin de poder aislar cepas de posibles probióticos, se eligieron para la toma de muestras diversas zonas de Perú, zonas donde todavía existen poblaciones indígenas que se autoabastecen y son independientes.

Perú posee una compleja geografía dominada principalmente por las elevaciones de la cordillera de los Andes y las corrientes del Pacífico, que le confiere climas y paisajes tan ampliamente variados como la costa desértica, los altos Andes o la selva tropical de la cuenca amazónica, siendo todos ellos ambientes que configuran al país como un territorio de gran variedad de recursos naturales (Figura núm.1).

La población peruana, es de origen multiétnico, multicultural y mestizo, de importante sustrato indígena a la cual se han sumado ascendencias europeas, africanas y asiáticas. Se manifiesta la coexistencia de setenta y dos etnias, siete de las cuales se distribuyen en la región andina y las sesenta y cinco restantes en el espacio amazónico.



Figura núm.1.- Mapa de Perú

3.1.2. Obtención de muestras

Las muestras elegidas fueron heces obtenidas de niños de distintas poblaciones de Perú.

En la Fotografía núm.1, se observa una de las niñas de las que se obtuvo muestras.



Fotografía núm.1.- Una de las niñas de las que se obtuvo muestra, con parte de su familia, en su población de origen.

Se recogieron un total de 49 muestras de heces de niños de edades comprendidas entre uno y once meses. La toma de muestras se llevó a cabo por personal especializado de la Universidad César Vallejo (Trujillo, La Libertad) y de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, La Libertad) entre los días 13 y 16 de octubre de 2005 y con el apoyo de los centros de salud de las poblaciones seleccionadas.

Las muestras se tomaron en condiciones de esterilidad, en un total de once poblaciones de Perú pertenecientes a tres Departamentos: La Libertad, Cajamarca y Ancash.

La situación geográfica de las poblaciones en las que obtuvieron las muestras, se puede observar en la Figura núm. 2.



Figura núm.2.- Mapa de localización de los tres Departamentos de los que se obtuvieron las muestras.

Las aldeas que constituyen los tres Departamentos son las siguientes:

- Cajamarca: San Agustín, Tanque y San Bartolo.
- La Libertad: Campiña de Moche, Chao, Pueblo Joven y Puente de Moche.
- Ancash: Buenavista, Curva Sun, California y Los Ángeles.

Antes de la toma de muestras se procedió a explicar a las familias como se llevaría a cabo y con qué finalidad, como puede observarse en la Fotografía núm.2.



Fotografía núm.2.-Explicación a las familias del proceso de la toma de muestras.

El tipo de alimentación, el clima, la edad, la medicación, las enfermedades, el estrés y el estilo de vida puede afectar a la microbiota intestinal, y por este motivo, consideramos interesante recopilar información al respecto, mediante una encuesta que cumplimentaban las familias con la ayuda de las personas encargadas de obtener las muestras (Chukeatirote, 2003).

Siguiendo los criterios establecidos por Mata *et al.* en 1972, para este tipo de encuestas (Silvi *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2006; Razz *et al.*, 2007), se obtenían datos referentes a:

- Sexo.
- Edad.
- Tipo de alimentación.
- Estado de salud.
- Tratamiento (si es el caso).

En la Fotografía núm.3 se observa cómo se cumplimentaba la encuesta.



Fotografía núm.3.- Recopilación de datos para cumplimentar la encuesta.

Una vez obtenidas las muestras, adecuadamente identificadas y acompañadas de las fichas correspondientes, se procedió a su envío en condiciones controladas de refrigeración hasta el laboratorio del Grupo de Investigación de Microbiología Aplicada y Medio Ambiental de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, para llevar a cabo a su procesado.

3.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS

Tras la recepción de las muestras en el laboratorio, se llevó a cabo la siembra de las mismas, con el fin de proceder al aislamiento de las cepas de *Lactobacillus* con posible potencial probiótico, siguiendo las directrices contenidas en el documento: “*Guidelines for the evaluation of probiotics in Food*” elaborado por el Grupo de Trabajo conjunto FAO/WHO en 2002.

3.2.1 Procesado de las muestras

A partir de alícuotas de las muestras se procedió a llevar a cabo el pre-enriquecimiento a modo de activación (Curk *et al.*, 1996) en diversos medios de cultivo, dependiendo del microorganismo que se deseaba aislar, durante 3-4 horas en una bolsa de *Stomacher* (*Bag mixer*) o en un contenedor estéril.

Aunque el objetivo fundamental de la Tesis doctoral ha sido la detección de cepas de *Lactobacillus* con probable actividad como probióticos, el hecho de disponer de este tipo de muestras, determinó que también se analizara la posible presencia de otros grupos bacterianos de interés en futuras investigaciones.

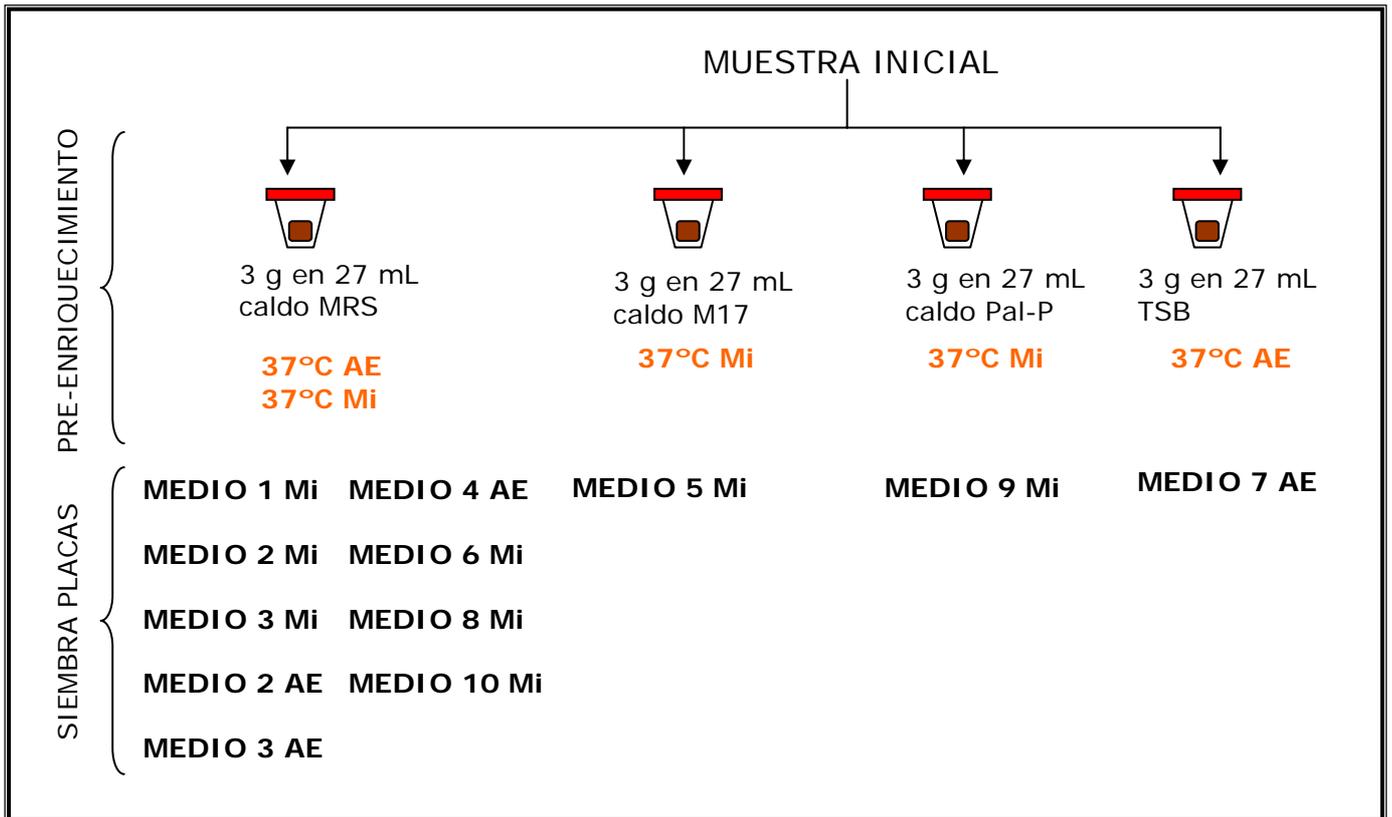
En este sentido los medios de cultivo de pre-enriquecimiento seleccionados, fueron:

- Caldo MRS (Liofilchem) para BAL en general, y en particular para especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.
- Caldo M17 (Liofilchem) para especies del género *Lactococcus*.
- Caldo Pal-P (Standa) para especies del género *Propionibacterium*.
- TSB (Liofilchem) para especies del género *Streptococcus*.

Tras la pre-incubación de las diversas alícuotas, se procedió a preparar bancos de diluciones decimales seriadas de cada alícuota en PBS. Posteriormente se realiza la siembra en los medios de cultivo para el aislamiento específico de cada grupo de microorganismos.

En el Esquema núm.1, se resume la metodología seguida a partir de la recepción de la muestra inicial.

La composición de cada uno de los medios de cultivo se indica en el Anexo A.1.



Esquema núm.1.- Metodología seguida en el procesado de las muestras. **AE**: Condiciones de incubación en aerobiosis. **Mi**: Condiciones de incubación en 5% CO₂ (microaerofilia).

Las condiciones de incubación fueron las específicas para cada uno de los grupos bacterianos investigados (Benkerrouym *et al.*, 1993; Thierry y Madec ,1995; Witthuhn *et al.*, 2005).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Los medios de cultivo así como las condiciones de incubación para cada uno de los géneros bacterianos investigados se aportan en la Tabla núm.5.

Cepa	Respiración	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Medio de cultivo
BAL en general	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 1
<i>Lactobacillus</i>	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 2
	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 3
	AE	24-48 h	37 °C	MEDIO 2
	AE	24-48 h	37 °C	MEDIO 3
	AE	5-10 d	37 °C	MEDIO 4
<i>Lactococcus</i>	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 5
	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 6
<i>Streptococcus</i>	AE	24-48 h	37 °C	MEDIO 7
<i>Leuconostoc</i>	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 8
<i>Propionobacterium</i>	Mi	6 d	37 °C	MEDIO 9
<i>Pediococcus</i>	Mi	24-48 h	37 °C	MEDIO 10

Tabla núm.5.- Medios de cultivo y condiciones de aislamiento de las cepas. **AE**: Condiciones de incubación en aerobiosis. **Mi**: Condiciones de incubación en 5% CO₂ (microaerofilia). **h**: horas. **d**: días.

3.2.2. Aislamiento y selección de las posibles cepas de *Lactobacillus* spp.

A partir de las cepas aisladas de las muestras de heces, se procedió a la selección de aquellas que cumplieran las características que presumiblemente permitían considerarlas como BAL de interés para nuestro estudio (Adelantado, 2007).

3.2.2.1. Características morfológicas de las cepas

Las pruebas iniciales podemos diferenciarlas en:

- Observación macroscópica de las colonias.
- Tinción de Gram.
- Tinción de esporas

Observación macroscópica de las colonias

Las colonias pueden ser diferenciadas en base a las características morfológicas a partir de cultivos puros.

Las características a considerar en la diferenciación de una colonia bacteriana son las siguientes:

FORMA	Puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, etc.
TAMAÑO	Estimar el diámetro en mm.
SUPERFICIE	Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.
ELEVACIÓN	Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umbilicada, etc.
BORDE	Continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festoneado, filamentoso, etc.
ESTRUCTURA INTERNA	Amorfa o granulosa.
COLOR	Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.
OPACIDAD	Transparente, opaca, etc.
CONSISTENCIA	Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc. Se determina mediante el asa de Nicrom.

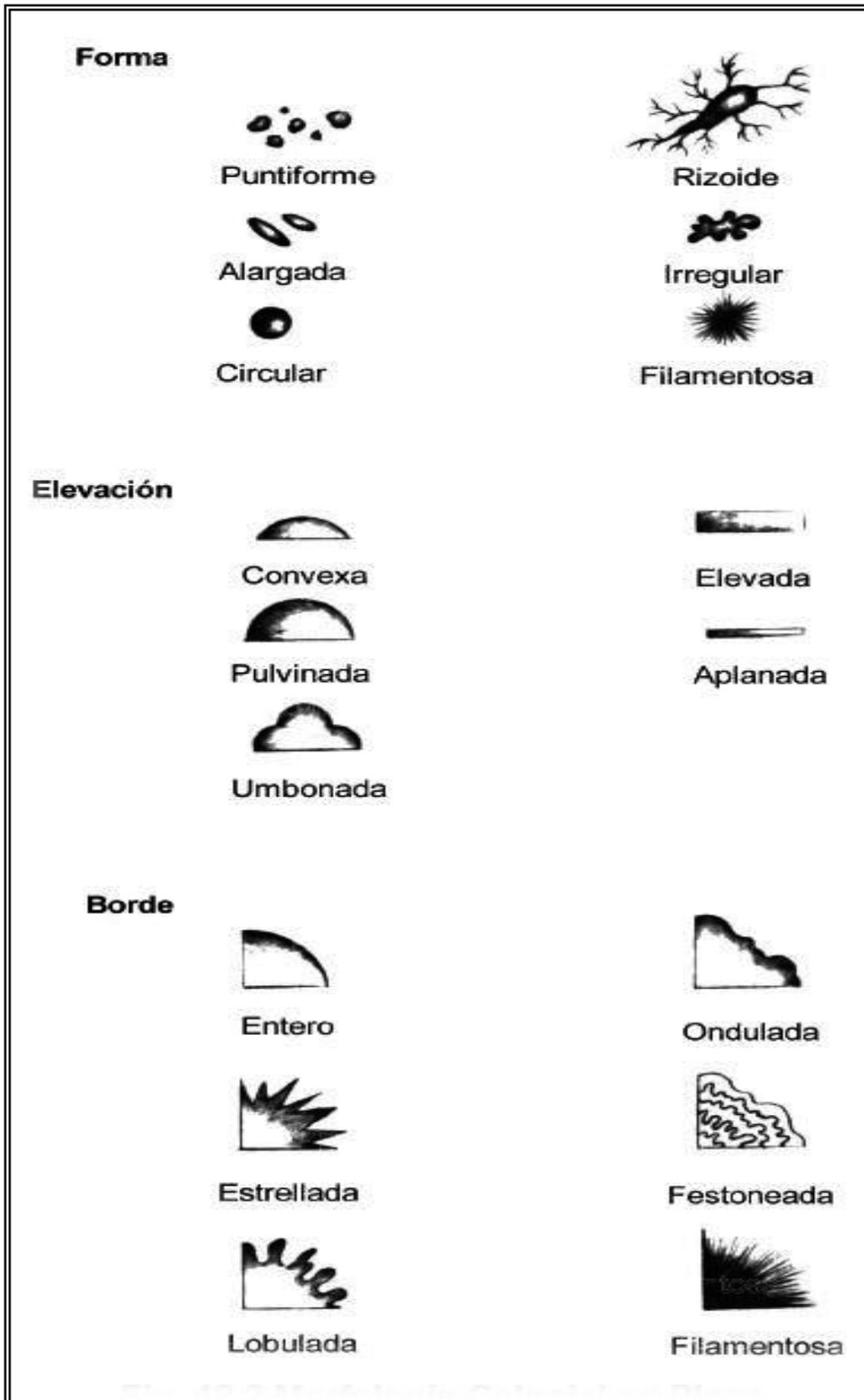


Figura núm.3.-Morfología de las colonias en placa. Adaptado de Gastón de Iriarte ,1975.

Tinción de Gram

- Objetivo y campo de aplicación

Clasificar las bacterias según su pared celular en Gram positivos y Gram negativos. La tinción de Gram es una tinción diferencial que permite observar la morfología bacteriana.

- Método de ensayo

Se extiende una colonia bacteriana sobre un cubreobjetos con una gota de agua y se fija en la llama. Se realiza la tinción con el primer colorante (violeta de genciana) y se deja en contacto 2 minutos. Se lava con agua, eliminando el exceso de colorante. Se añade lugol y se mantiene en contacto durante un 1 minuto. Nuevamente se lava con agua y se trata con alcohol-acetona. Posteriormente se añade safranina durante 1 minuto (colorante de contraste). Se seca a calor suave y se procede a la observación bajo microscopio óptico.

- Principio del ensayo

El fundamento radica en las diferencias estructurales de la pared celular de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacárida externa. (Figura núm.4).

Al añadir alcohol-acetona se arrastrará el colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecerán de color violeta. Las células Gram negativas se teñirán de color rosado por el colorante de contraste utilizado (safranina).

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- Cepas aisladas.

Material de laboratorio

- Asa de Nicrom.
- Violeta genciana o Metilrosanilina cloruro (Roig Farma, S.A.).
- Yodo Ph. (Roig Farma, S.A.).
- Yoduro Potásico (Acofarma).
- Safranina O (Panreac).
- Alcohol parcialmente desnaturalizado 96,05° (Alcoholes Gual, S.A.).
- Acetona para síntesis (Scharlau).
- Portaobjetos (Menzel-Glaser).
- Aceite de inmersión (Panreac).
- Microscopio (Olympus CX21).

- Expresión de los resultados

La tinción de Gram permite, además de diferenciar las bacterias en cuanto a las características de su pared, observar las distintas morfologías (cocos, bacilos, cocobacilos, etc.), su forma de agrupación (células aisladas, en cadena, en racimo, en tétradas, etc.) y también la medida de las células (pequeñas, grandes, cortas, largas, etc.).

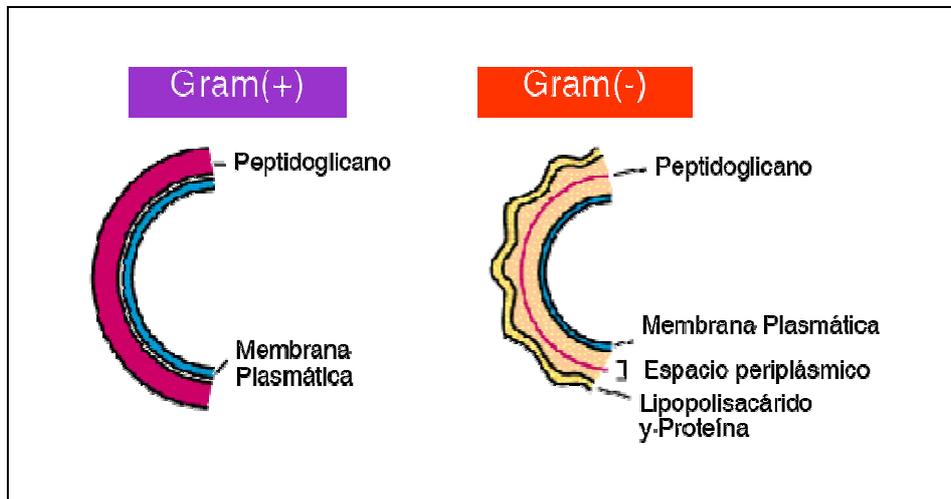


Figura núm.4.- Composición de la pared de las bacterias diferenciadas por la tinción de Gram. (Adaptado de Mandigan *et al.*, 1999).

Tinción de esporas

- Objetivo y campo de aplicación

Determinar la formación de endosporas por parte de las cepas seleccionadas.

Las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* se caracterizan porque forman endosporas. Las endosporas son formas de resistencia que garantizan la supervivencia del microorganismo en situaciones adversas (agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura, acumulación de metabolitos tóxicos, entre otros). Estas estructuras, que contienen una copia completa del genoma, se desarrollan en el interior de la célula bacteriana y cuando la célula muere y se lisa, la endospora queda libre. Las endosporas germinarán cuando las condiciones ambientales sean óptimas. Por el contrario, las cepas de *Lactobacillus* no forman endosporas.

- Método de ensayo

Se extiende una porción de una colonia bacteriana sobre una gota de agua en un portaobjetos y se fija a la llama. Se coloca un papel de filtro sobre la muestra y se sujeta con una pinza. Se empapa el papel con verde malaquita y se pasa por encima de la llama del mechero bunsen para que haya emisión de vapores. Cuando éstos se dejen de emitir se vuelven a pasar las muestras por encima de la llama, volviendo a empapar el papel con colorante si es necesario. Repetir hasta 5 veces.

Se retira el papel y se lava con agua. Seguidamente se añade safranina (colorante de contraste) durante medio minuto. Se retira el exceso de colorante con agua y se seca con calor suave.

- Principio del ensayo

Las cepas del género de *Lactobacillus* no forman endosporas.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Asa de Nicrom.
- Verde de Malaquita (Panreac).
- Safranina O (Panreac).
- Portaobjetos (Menzel-Glaser).
- Aceite de inmersión (Panreac).
- Microscopio CX21 (Olympus).

- Expresión de los resultados

La observación bajo microscopio óptico permite diferenciar la presencia de endosporas (estructuras de color verde) y células vegetativas (teñidas de color rosado).

3.2.2.2. Prueba de la catalasa

- Objetivo y campo de aplicación

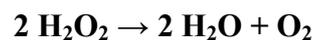
Capacidad de destruir los derivados tóxicos del oxígeno generados por algunas bacterias mediante la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno (Naidu *et al.*, 1999). El género *Lactobacillus* es catalasa negativo ya que las especies que lo componen son anaerobias estrictas o facultativas y carecen de esta enzima.

- Método de ensayo

Se dispone una alícuota de una colonia sobre un portaobjetos (no se le añade agua). Se añade a la colonia unas gotas de agua oxigenada al 10 %.

- Principio del ensayo

La reacción positiva de la catalasa, implica desprendimiento de oxígeno.



- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Asa de Nicrom.
- Portaobjetos (Menzel-Glaser).
- Peróxido de hidrógeno al 10% (Sigma).

- Expresión de los resultados

La formación de burbujas indica la presencia de la enzima catalasa.

3.2.2.3. **Actividad hemolítica**

- Objetivo y campo de aplicación

Poner de manifiesto la posible capacidad patógena de las cepas, mediante la prueba de hemólisis en medios de cultivo que contienen sangre.

- Método de ensayo

Se resiembró en estría una placa de Agar Columbia que contiene un 5% de sangre de cordero, una colonia de un cultivo axénico previamente crecido *o/n (overnight)* en un medio general. La placa se mantiene en estufa durante 24-48 horas a la temperatura y a las condiciones de incubación de la cepa en estudio.

- Principio del ensayo

La actividad hemolítica, se relaciona con la posible patogenicidad de las cepas ya que demuestra la presencia de antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Asa de Nicrom.
 - Placas agar Columbia 5% de sangre de cordero (Biomérieux).
 - Estufa de 37 °C (Heraeus).
 - Estufa de 37°C 5% CO₂ (Heraeus).
- Expresión de los resultados

Se pueden evidenciar tres tipos de hemólisis.

La lectura e interpretación de los mismos se detalla en la Tabla núm.6.

α-hemólisis o hemólisis incompleta	Se observa clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias.
β-hemólisis o hemólisis verdadera	Se observa una clarificación total del medio de cultivo alrededor de las colonias.
γ-hemólisis	No se observa clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias.

Tabla núm.6.- Tipos de hemólisis.

Se seleccionan las colonias que son γ -hemolíticas ya que no presentan factores de virulencia que puedan representar problemas en el individuo al que se administre el posible probiótico.

3.2.2.4. Identificación de las cepas seleccionadas

Las identificaciones bioquímicas se han llevado a cabo mediante técnicas miniaturizadas, concretamente mediante el sistema API50CHL[®], específico para cepas de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*.

- Objetivo y campo de aplicación

Determinar el patrón de fermentación de carbohidratos y derivados por parte de los microorganismos (heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos. Kandler, 1983).

Consiste en un método estándar que consta de 50 microtubos que contienen diferentes sustratos.

- Método de ensayo

Se prepara una suspensión del microorganismo en el diluyente suministrado, posteriormente se inocula cada tubo de la galería. Se deben seguir las instrucciones suministradas por la casa comercial.

- Principio del ensayo

Establecer el patrón de fermentación de los cuarenta y nueve compuestos de la galería API50CHL[®].

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Galería API50CHL[®] (Biomerieux).
 - Patrón McFarland (Biomerieux).
 - Aceite de inmersión (Panreac).
 - Micropipeta 100-1000 µL (Thermolabsystems).
 - Software de interpretación de resultados APIWEB[®] (Biomerieux).
- Preparación de cultivos y reactivos

Inoculación de las galerías

Es necesario disponer de un cultivo axénico. Se realiza la suspensión en el medio diluyente suministrado con el API50CHL[®] y se distribuye el contenido en todos los tubos de la galería. Se llena la cúpula de cada tubo con parafina estéril para garantizar la anaerobiosis. Se incuban las galerías a 37 °C durante 48 horas y posteriormente se realiza la lectura de las pruebas.

Lectura de las galerías

La fermentación de los sustratos implica un cambio de color en la cúpula que viene determinado por un indicador de pH incorporado en cada sustrato.

- Expresión de los resultados

Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de las cepas, se basa en la observación de la coloración desarrollada en cada uno de los tubos (Figura núm.5) y se establece mediante el programa informático APIWEB[®], suministrado por la casa comercial.

En la Tabla núm.7, se indican los componentes activos ensayados en la galería API50CHL®.

TUBO	ENSAYO	SUSTRATO	TUBO	ENSAYO	SUSTRATO
0		Control negativo	25	ESC	Esculina y citrato férrico
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritrirol	27	CEL	D-Celobiosa
3	DARA	D-Arabinosa	28	MAL	D-Maltosa
4	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-Lactosa
5	RIB	R-Ribosa	30	MEL	D-Melibiosa
6	DXYL	D-Xilosa	31	SAC	D-Sacarosa
7	LXYL	L-Xilosa	32	TRE	D-Trealosa
8	ADO	D-Adonitol	33	INU	Inulina
9	MSX	Metil-βD-Xilpiranósido	34	MLZ	D-Melecitosa
10	GAL	D-Galactosa	35	RAF	D-Rafinosa
11	GLU	D-Glucosa	36	AMD	Almidón
12	FRU	D-Fructosa	37	GLYG	Glicógeno
13	MNE	D-Manosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L-Sorbosa	39	GEN	Gentiobiosa
15	RHA	L-Ramnosa	40	TUR	D-Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-Tagatosa
18	MAN	D-Manitol	43	DFUC	D-Fucosa
19	SOR	D-Sorbitol	44	LFUC	L-Fucosa
20	MDM	Metil-αD-Manopiranósido	45	DARL	D-Arabitol
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranósido	46	LARL	L-Arabitol
22	NAG	N-Acetilglucosamina	47	GNT	Gluconato potásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-cetogluconato potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-cetogluconato potásico

Tabla núm.7.- Sustratos ensayados mediante la galería API50CHL®.



Figura núm.5.- Interpretación visual de los resultados obtenidos con API50CHL®.

3.2.2.5. Evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales

- Objetivo y campo de aplicación

Evaluar la resistencia de las cepas al tracto gastrointestinal en humanos. Para ello se realizaron ensayos específicos que permiten cuantificar la supervivencia de las mismas, tras el tratamiento con lisozima, sales biliares, peróxido de hidrógeno y pH ácido. Dunne *et al.*, 2001.

- Método de ensayo

Específico para cada condición de ensayo y que se detalla en las páginas 57 y 58.

- Principio del ensayo

Establecer la posible resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Microplacas ELISA 96 pocillos Microtiter (Deltalab SL).
- Lisozima (Sigma).
- Ácido clorhídrico (Panreac).
- Hidróxido de sodio (Panreac).
- PERDROGEN[®] 30% H₂O₂ (p/p) (Sigma).
- Sales biliares Ox-Gall (Sigma).
- Lector ELISA (Labsystems Multiscan RC).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).
- Estufa de 42 °C (Raypa).
- pHmetro (Hanna).
- Micropipeta 0,5-10 µL (Extend).
- Micropipeta 40-200 µL (Extend).
- Micropipeta 100-1000 µL (Thermolabsystems).
- Balanza de precisión 0,001 g-200 g (Denver Instrument).

- Preparación de los cultivos y reactivos

- Preparación de los cultivos a ensayar

Se preparan cultivos de las BAL en 3 mL de caldo MRS y se incuban *o/n* en las condiciones adecuadas de respiración según cada cepa.

- Preparación de los productos

Se prepara la cantidad de reactivo necesaria en función del número de cepas a ensayar, teniendo en cuenta que cada prueba se realiza por triplicado.

Tolerancia a lisozima

Concentración	Para 1 cepa	
	MRS	Lisozima
100 µg/mL	0,6 mL	60 µg
200 µg/mL	0,6 mL	120 µg
300 µg/mL	0,6 mL	180 µg

Tabla núm.8.- Concentraciones de lisozima y ejemplo de preparación para una cepa.

Tolerancia a pH ácido (mediante adición de HCl 1M).

Se preparan alícuotas de caldo MRS que se ajustarán mediante pHmetro a diferentes valores de pH: 1,5 a 6, en intervalos de 0,5.

Tolerancia a sales biliares

Se evalúan tres concentraciones de sales biliares (0,3% p/v; 0,5% p/v y 1% p/v) ajustadas a pH 3, y además una cuarta concentración de 0,3% p/v sin ajustar el pH.

Se preparan alícuotas de 100mL de caldo MRS a las que se añaden 0,3 g; 0,5 g o 1 g de sales biliares de origen bovino, según corresponda. El pH se determina con el pHmetro y se ajusta añadiendo HCl 1M.

Tolerancia a peróxido de hidrógeno

Se prepara una dilución 1/10 en agua del producto adquirido PERDROGEN[®] (peróxido de hidrógeno concentrado al 30%).

Para obtener las concentraciones deseadas se mezcla el producto con el diluyente a las siguientes proporciones:

Concentración	Caldo MRS	PERDROGEN [®] (H ₂ O ₂ 30%)	MOLARIDAD
30 µg/mL	1 mL	111,111 µL	0,882 mM
20 µg/mL	1 mL	71,428 µL	0,588 mM
10 µg/mL	1 mL	34,482 µL	0,294 mM

Tabla núm.9.- Proporciones de MRS y PERDROGEN[®] para obtener la concentración deseada de peróxido de hidrógeno.

Inoculación de las microplacas de ELISA

Se depositan 200 µL de cada uno de los reactivos en la microplaca de ELISA y se le añaden 20 µL del cultivo de cada cepa incubada a la temperatura y tiempo

correspondiente según la prueba, y en condiciones de aerobiosis o microaerofilia (5% CO₂) según el requerimiento propio de respiración de cada cepa a ensayar.

En todos los casos se realizan controles en caldo MRS que permiten determinar los valores máximos de crecimiento de cada cepa. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

En el estudio de la **tolerancia a lisozima**, las microplacas se mantienen a 37 °C de temperatura durante 60 minutos. en condiciones de respiración adecuadas para cada cepa. Transcurrido este tiempo se procesan por el lector ELISA.

En la evaluación de la **tolerancia a medio ácido**, las microplacas se mantienen a 42 °C de temperatura durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se procesan por el lector ELISA.

Para estudiar la **tolerancia a sales biliares**, las microplacas se mantienen durante 3 horas en la estufa de 37 °C y 5% CO₂ para todas las cepas. Transcurrido este tiempo se procesan por el lector ELISA.

En cuanto a la **tolerancia a peróxido de hidrógeno**, las microplacas se mantienen durante media hora en la estufa de 37 °C según las condiciones de respiración adecuada para cada cepa. Transcurrido este tiempo se pasan por el lector ELISA.

Lectura de las placas:

Se realiza mediante lector ELISA a longitud de onda de 620 nm.

- Expresión de los resultados

En todos los ensayos, el crecimiento máximo de la cepa se observa en el ensayo control en caldo MRS.

Tolerancia a lisozima: Se expresa como la menor concentración capaz de inhibir completamente el desarrollo de la cepa.

Tolerancia a medio ácido: Se expresa como el menor pH en el cual la densidad óptica detectada es como mínimo el 40% de la detectada a pH 6,5.

Tolerancia a sales biliares: Permite comparar entre cepas cuál es la más resistente a este parámetro.

Tolerancia a peróxido de hidrógeno: Se expresa como la menor concentración capaz de inhibir completamente el desarrollo de la cepa.

3.2.2.6. Propiedades antibacterianas

- Objetivo y campo de aplicación

Determinar la actividad antibacteriana de las BAL seleccionadas.

- Método de ensayo

Se aplica el protocolo de Campbell a las BAL seleccionadas (Campbell, 1960; Bauer, 1966).

Las cepas a ensayar se siembran en masa en las placas de medio de cultivo específico. Tras la incubación durante 24 horas, se procede a realizar el ensayo.

- Principio del ensayo

La suspensión de cada uno de los microorganismos seleccionados en contacto con diferentes microorganismos es capaz de producir su inhibición total o parcial.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

En la Tabla núm.10, se aporta la relación de cepas frente a las que se evalúa la capacidad inhibidora de los microorganismos seleccionados y la cepa control.

CEPA	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>	CECT 434
<i>Salmonella Enteritidis</i>	CECT 4155
<i>Salmonella Typhimurium</i>	CECT 4296
<i>Bacillus subtilis</i>	CECT 4071
<i>Clostridium botulinum</i>	CECT 4611
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCTC 10460
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031 T

Tabla núm.10.- Cepas frente a las que se ensaya la actividad inhibidora por el método de Campbell. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo. NCTC: *National Collection of Type Cultures* (UK).

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- Medio de cultivo TSB (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo TSA (Liofilchem).
- Patrón McFarland (Biomerieux).
- Pipetas Pasteur (Sudelab).

- Micropipeta 0,5-10 μL (Extend).
- Micropipeta 40-200 μL (Extend).
- Micropipeta 100-1000 μL (Thermolabsystems).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).
- Centrífuga (Sigma-202M).

Debe indicarse que con el fin seguir las normas de seguridad en el caso de trabajar con aquellas cepas definidas como altamente patógenas y de nivel 3, se han realizado los estudios en el Laboratorio de Alta Seguridad Biológica, ubicado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

- Preparación de los cultivos y reactivos

Los medios de cultivo para el ensayo se preparan mediante las especificaciones de los fabricantes.

Preparación de los cultivos seleccionados

Se realizan cultivos de las BAL en placas de MRS y se incuban *o/n* en las condiciones adecuadas de respiración según cada cepa. Se realizan cultivos de las cepas frente a las que se ensayará la actividad inhibidora en placas de TSA y se incuban *o/n* en las condiciones adecuadas de respiración para cada cepa.

Inoculación de las placas

A partir del crecimiento *o/n* de cada una de las cepas sobre las que se ensayará la actividad inhibidora, se siembran placas en masa con una concentración de 0,5 McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Paralelamente, se preparan cilindros a partir de las placas de 24 horas de crecimiento de las BAL seleccionadas. Se depositan cilindros de las cepas en estudio en las placas de medio de cultivo sembradas con las bacterias frente a las que se realizará el ensayo.

Preparadas las placas, se incuban durante 24 horas en las condiciones adecuadas que faciliten el desarrollo de las cepas frente a las que se evalúa la capacidad de inhibición.

- Expresión de los resultados

Se observan halos de inhibición alrededor de los cilindros, ya que se producen compuestos que inhiben el crecimiento de las cepas a ensayar. Las zonas de inhibición se miden en milímetros (mm). La actividad inhibitoria se calcula por la medida del valor de inhibición, calculado como:

$$\text{VALOR DE INHIBICIÓN} = (I-DC) / 2$$

Para una correcta interpretación de la fórmula, debe tenerse en cuenta que:

DC = DIÁMETRO DEL CILINDRO DE CULTIVO (mm).

I = DIÁMETRO DE INHIBICIÓN (mm).

3.2.2.7. Resistencia a antibióticos

- Objetivo y campo de aplicación

Determinar la resistencia o sensibilidad de las BAL seleccionadas a los antibióticos y diferentes concentraciones de los mismos, indicadas por la *EFSA (European Food Safety Authority)*.

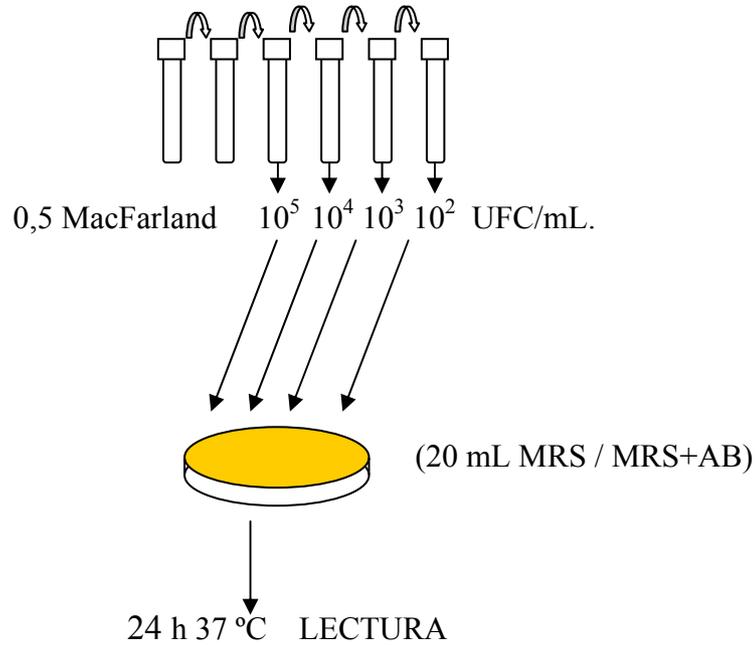
- Método de ensayo

Se inoculan cepas en medio líquido y se obtiene un crecimiento de 24 horas de cada una de las BAL seleccionadas. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugan y se procede a prepararlos a diferentes concentraciones teniendo en cuenta los recuentos obtenidos con la cámara de Neubauer (2×10^3 UFC/mL; 2×10^4 UFC/mL; 2×10^5 UFC/mL y 2×10^6 UFC/mL).

Paralelamente, se preparan placas de medio de cultivo MRS al que se adicionan los antibióticos (uno para cada ensayo), previamente esterilizados por filtración. Cuando los

medios se han solidificado se procede a la siembra de las diferentes suspensiones de microorganismos en estudio a las concentraciones indicadas.

El ensayo se realiza según el siguiente esquema (Esquema núm.2.):



Esquema núm.2.-Metodología de análisis para detección de la resistencia a antibióticos.

Los antibióticos ensayados así como las concentraciones de cada uno de ellos, se indican en la Tabla núm.11.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN
Ampicilina	4 µg/mL
Gentamicina	64 µg/mL
Kanamicina	64 µg/mL
Estreptomicina	64 µg/mL
Neomicina	32 µg/mL
Eritromicina	4 µg/mL
Clindamicina	4 µg/mL
Tetraciclina	32 µg/mL
Cloramfenicol	8 µg/mL

Tabla núm.11.- Relación de antibióticos ensayados y concentraciones.

Las placas inoculadas, se incuban por espacio de 24-48 horas según las condiciones para cada cepa.

- Principio del ensayo

Determinar las posibles resistencias de las BAL seleccionadas a los antibióticos ensayados, comparándolas con las de *Lactobacillus rhamnosus* GG, de aplicación industrial reconocida (Saxelin, 1997). El cultivo tipo está depositado en la *American Type Culture Collection* con la referencia ATCC 53103.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.
- Cepa control: *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- PBS (Calbiochem).
- Antibióticos: Ampicilina; Gentamicina; Kanamicina; Estreptomicina; Neomicina; Eritromicina; Clindamicina; Tetraciclina; Cloramfenicol (todos ellos de Sigma).
- Patrón McFarland (Biomérieux).
- Micropipeta 40-200 µL (Extend).
- Micropipeta 100-1000 µL (Thermolabsystems).
- Centrífuga (Sigma-202M).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).
- Microscopio (Olympus CX21).
- Cámara Neubauer (Brand).

- Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en UFC/mL, indicando el porcentaje de reducción del recuento en placa al comparar con el desarrollo de las cepas en el medio de cultivo control, es decir sin adición alguna de antibióticos.

3.2.2.8. Proceso de liofilización y ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas

- Objetivo y campo de aplicación

Evaluar la conservación de las cepas por medio del proceso de liofilización, así como su capacidad de recuperación y persistencia a diferentes condiciones medio-ambientales (a temperatura ambiente y a 4 °C), con el fin de asegurar la viabilidad de las cepas y el mantenimiento de la concentración óptima en los productos finales para poder ser realmente definida como un probiótico ideal.

- Método de ensayo

Se preparan suspensiones de las cepas seleccionadas a partir de cultivos *o/n*, que se ajustan a la concentración de 1×10^9 UFC/mL. Los cultivos se centrifugan a 8000 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y el *pellet* obtenido se resuspende en una solución del medio de liofilización de 9 mL de (ANEXO A.2) para conseguir una concentración final de 1×10^8 UFC/mL. Se distribuye 1 mL de la suspensión en viales de liofilización previamente esterilizados.

Los viales se congelan a -20 °C durante 24 horas. A continuación se colocan en el soporte del liofilizador y se comprueba que todas las válvulas del liofilizador estén cerradas correctamente para evitar la pérdida de vacío preciso para un correcto proceso.

Obtenidos los liófilos, se mantienen en cajas para tal fin a dos temperaturas diferentes: temperatura ambiente, o bien a 4 °C, protegidos de la exposición lumínica directa.

Se resuspende el contenido de los liófilos en 9 mL en una solución de PBS. Se prepara un banco de diluciones decimales a partir de la dilución inicial, teniendo en cuenta la concentración esperable en el liófilo.

Se siembran placas de MRS agar y se incuban a las condiciones para cada cepa.

El proceso se lleva a cabo a tiempo cero, a los 7 y a los 14 días del final de la liofilización.

- Principio del ensayo

Determinar la viabilidad de las cepas después de la liofilización, comparándola con la de *Lactobacillus rhamnosus* GG, de aplicación industrial reconocida (Saxelin, 1997). El cultivo tipo está depositado en la *American Type Culture Collection* con la referencia ATCC 53103.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- PBS (Calbiochem).
- Leche en polvo semidesnatada (Central Lechera Asturiana).
- Sacarosa (Sigma).
- Micropipeta 40-200 µL (Extend).
- Micropipeta 100-1000 µL (Thermolabsystems).
- Tubos de centrifuga estériles (Sudelab).
- Centrífuga (Sigma 202M).

- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C CO₂ (Heraeus).
- Liofilizador (Christ Alfa 1-2 LD).
- Viales de liofilización (Vidrafoc).
- Tapón de butilo para viales (Vidrafoc).
- Arandelas para los viales (Vidrafoc).
- Congelador -20 °C (Philips).

- Expresión de los resultados

Se procede al recuento de las colonias desarrolladas por placa a las 24 y 48 horas de la siembra.

Los resultados se presentan como UFC/mL.

3.2.2.9. Identificación de las cepas por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

- Objetivo y campo de aplicación

Establecer mediante técnicas de PCR el género al que pertenece un microorganismo, amplificando una secuencia determinada de su código genético (Castellanos *et al.*, 1996; Parola *et al.*, 1998; Torriani *et al.*, 2001; Klaenhammer *et al.*, 2002; Sánchez *et al.* 2004).

- Método de ensayo

- Caracterización taxonómica de las BAL seleccionadas

Las cepas seleccionadas, se sembraron en placas de MRS. Obtenido el desarrollo de las cepas y confirmado que se trataba de cultivos axénicos, se escogieron colonias que se procedieron a lavar y resuspender con tampón de pre-lisis (ANEXO A.3.1). Se

sometieron a incubación a 37 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se extrajo el DNA mediante el kit de extracción de DNA Wizard (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Finalizado el proceso de rehidratación durante 1 hora a 65 °C, las muestras se almacenaron a 2-8 °C.

- Identificación genética del género y la especie

El rRNA 16S se amplificó por PCR utilizando los *primers* universales Eub27f y Eub1492r, que producen un fragmento de más de 1000 nucleótidos.

En la Tabla núm.12, se resumen los *primers* seleccionados para el ensayo.

PROCESO	<i>primer</i>	Orientación	Secuencia 5' → 3'
Amplificación	Eub25f	Directa	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO:1)
	Eub1492r	Reversa	TACGGYTACCTTGTACGACTT (SEQ ID NO:2)
Secuenciación	27f	Directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO:3)
	357f	Directa	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCC GCCCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO:4)
	907r	Reversa	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID NO:5)
	1492r	Reversa	GGTTACCTTGTACGACTT (SEQ ID NO:6)

Tabla núm.12.- Relación de *primers* utilizados para la amplificación y secuenciación del gen 16S.

Posteriormente se procedió al lavado del DNA obtenido, mediante el kit *Quiaquick*.

Se llevaron a cabo cuatro reacciones de secuenciación, para cada muestra en el *Genetic Analyzer 3130* mediante el kit *BigDye kit v.3.1*, y los *primers* mostrados en la Tabla núm.12.

Los resultados se obtuvieron utilizando el *DNA Sequence Analysis v.5.2 software* y fueron corroborados por análisis visual con *Chromas* y *BioEdit*.

La identificación del género se llevó a cabo mediante la herramienta *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2007).

La identificación de las especies se realizó por comparación de las secuencias 16S obtenidas de los dos microorganismos F35 y F47, mediante la base de datos *RefSeq* mediante *BLASTN*, y el *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2007).

- Determinación del genotipo de las cepas

La caracterización genotípica de las BAL seleccionadas se llevó a cabo mediante digestión genómica y por gel de electroforesis de campo pulsado.

Las BAL seleccionadas fueron sometidas al protocolo siguiente (Rodas *et al.*, 2005):

Tras el desarrollo de las cepas en placas de MRS agar, incubadas a 37 °C, en una atmósfera con un 5% CO₂ durante 18 horas, se aisló un número determinado de colonias que se sometieron al lavado por tres veces consecutivas en 8 mL de Tampón pH 7,6 (ANEXO A.3.2). A continuación se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos. Los precipitados, se resuspendieron en 700 µL del tampón de lisis I (ANEXO A.3.3). A continuación se les añadió un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% y se mantuvieron a 4 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se transfirieron 2 mL de los fragmentos a tampón de lisis II (ANEXO A.3.4) y se sometieron a incubación durante 48 horas a 50 °C. Posteriormente, los fragmentos fueron lavados a temperatura ambiente con el tampón TE (ANEXO A.3.5). El DNA total se digirió con enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I según las condiciones para cada enzima.

Los marcadores de DNA utilizados, fueron *Lambda ladder PFG Marker* y *Low Range PFG Marker*.

La electroforesis de campo pulsado se llevó a cabo en CHEF DRIII. Los fragmentos a analizar se dispusieron en un gel de agarosa al 1%.

Finalizada la electroforesis, los geles de agarosa con bromuro de etidio, se revelaron utilizando un transiluminador ultravioleta Doc System.

En la Tabla núm.13, se resumen las condiciones en las que se llevó a cabo la electroforesis.

ENZIMA	BLOCK	PULSO INICIAL (seg)	PULSO FINAL (seg)	TIEMPO (h)
Sfi-I	1	2	10	10
	2	15	20	6
Sma-I	1	0,5	5	16

Tabla núm.13.- Condiciones de la electroforesis. **seg**: segundos; **h**: horas.

- Principio del ensayo

Se utiliza la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a tiempo real.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Tampón de pre-lisis. ANEXO A.3.1.
- Kit de extracción de DNA genómico Wizard (Promega).
- *Primers* universales Eub27f y Eub1492r.
- Lavado DNA Kit *Quiaquick* (*Quiagen*[®]).
- *Genetic Analyzer* 3130 (Applied Biosystems).
- Kit *BigDye v.3.1* (Applied Biosystems).
- *Software DNA Sequence Analysis v.5.2 software* (Applied Biosystems).

- *Chromas* (Technelysium PTY LTD.).
- *BioEdit* (Ibis Biosciences).
- Base de datos *Ribosomal Database Project (RDP)*.
- Base de datos *RefSeq* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>).
- Base de datos *BLASTN*.
- Base de datos *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>).
- Tampón pH 7,6. ANEXO A.3.2.
- Tampón de Lisis I. ANEXO A.3.3.
- Tampón de Lisis II. ANEXO A.3.4.
- Tampón TE. ANEXO A.3.5.
- Enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I (Roche Diagnostics)
- Marcadores DNA *Lambda ladder PFG Marker* y *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs).
- Equipo electroforesis en campo pulsante CHEF DRIII (Biorad Laboratoires).
- Gel de agarosa al 1% (SeaKem ME agarose, FMC BioProducts, ME, USA).
- Transiluminador ultravioleta Doc System (Biorad).
- Agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA).
- Centrífuga.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Micropipetas.
- Estufa a 80 °C.
- Estufa a 65 °C.
- Estufa a 37 °C.
- Nevera 4 °C.

3.2.2.10. **Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido**

- Objetivo y campo de aplicación

Observar la cinética de desarrollo de las cepas seleccionadas a lo largo de 15 horas en medio de cultivo líquido para cada una de las cepas.

- Método de ensayo

Se obtiene un inóculo inicial de cada cepa en estudio, mediante cultivo en caldo MRS. Para el estudio de la cinética de cada cepa se añade un 5% (v:v) del inóculo del cultivo a matraces que contienen 250 mL de caldo MRS.

El cultivo se realiza en agitación constante a 150 rpm y a 37 °C.

Se evalúan alícuotas de 4,5 mL de cada cultivo, a tiempo cero y cada 60 minutos.

En cada muestreo se determina el recuento de UFC/mL, el pH y peso seco.

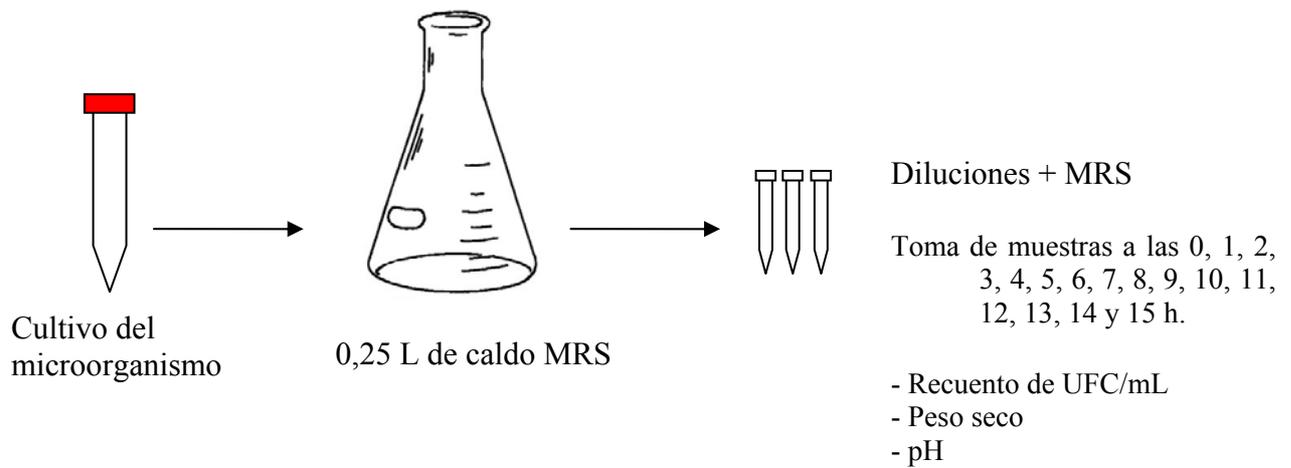
Se prepara un banco de diluciones y se siembran placas de MRS. Las placas se incuban durante 24-48 horas a 37 °C en 5% CO₂.

Todos los ensayos se realizan por duplicado.

Para determinar el peso seco del cultivo, se parte de 1 mL de medio de cultivo en el que se ha desarrollado la cepa en estudio. Esta alícuota se somete a centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante, y se somete el precipitado a 25 °C durante 72 horas. Se calcula el peso en una balanza de precisión.

La evolución del pH, se ha realizado a partir de las alícuotas obtenidas del medio de cultivo, mediante pHmetro.

En el Esquema núm.3., se resume la metodología de ensayo.



Esquema núm.3.- Metodología desarrollada para evaluar la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido.

- Principio del ensayo

Determinar la cinética de crecimiento de las cepas, la producción de biomasa, y las variaciones de pH a lo largo del ensayo.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- PBS (Calbiochem).
- Micropipeta 40-200 μ L (Extend).
- Micropipeta 100-1000 μ L (Thermolabsystems).
- Placas estériles (Bibby Sterilin LTD).

- *Eppendorf* de 1,5 mL estériles (Daslab).
- Matraces de 250 mL estériles.
- Centrífuga 202M (Sigma).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).
- Balanza de precisión 0,001 g-200 g (Denver Instrument).
- Estufa de secado a 25 °C (Ehret).
- pHmetro (Hanna Instruments).
- *Shaker* (LH Fermentation).
- Congelador a -20 °C (Philips).
- pHmetro (Hanna Instruments).

- Expresión de los resultados

Los resultados para la curva de crecimiento se expresan en UFC/mL. Los resultados del peso seco se expresan en gramos. También se determina el pH a lo largo del tiempo.

3.2.2.11. **Cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche**

- Objetivo y campo de aplicación

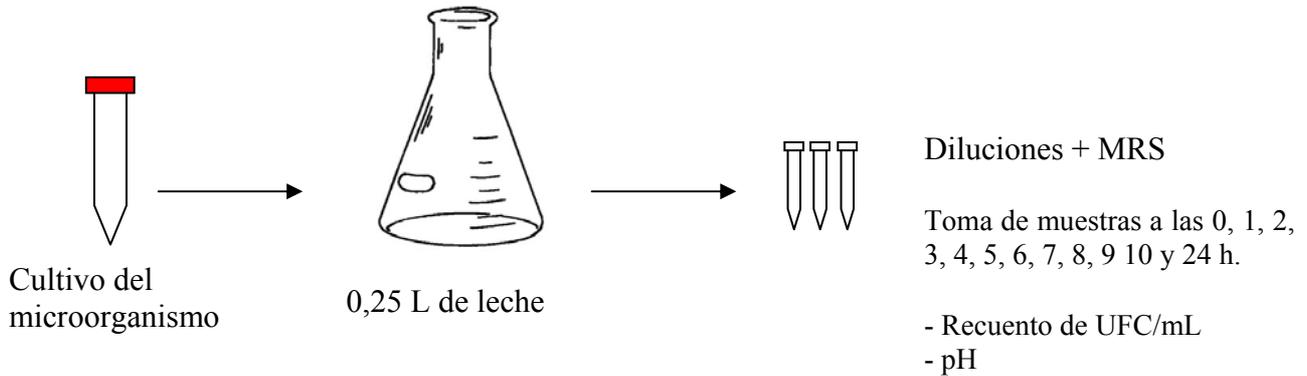
Establecer la cinética de crecimiento en leche de las BAL desarrolladas a lo largo de 24 horas. Se determinan los parámetros de pH y UFC/mL en placa a lo largo del periodo de crecimiento para establecer la relación entre estos dos parámetros.

- Método de ensayo

Se proceden a inocular 3 mL de leche en polvo semidesnatada reconstituida estéril con cultivos recientes de las cepas a ensayar. Se incuban 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂. El cultivo así obtenido se adiciona a matraces de 250 mL de leche en polvo semidesnatada reconstituida estéril, en la proporción al 5% (v:v). El cultivo se incubaba a 37 °C en agitación, por espacio de 24 horas.

A partir de alícuotas de 2 mL del cultivo, obtenidas a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 24 horas se procede a determinar el pH y el recuento de UFC/mL.

Todos los ensayos se realizan por duplicado. En el Esquema núm.4, se resume la metodología de ensayo.



Esquema núm.4.- Metodología para evaluar la cinética de crecimiento de las cepas en leche.

- Principio del ensayo

Determinar la curva de crecimiento y el pH de la cepa al desarrollarse en leche.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- Leche en polvo semidesnatada no enriquecida (Central lechera Asturiana).
- PBS (Calbiochem).
- Micropipeta 40-200 μ L (Extend).

- Micropipeta 100-1000 μL (Thermolabsystems).
- *Eppendorf* de 1,5 mL estériles (Daslab).
- Tubos estériles (Daslab).
- Matraces de 250 mL estériles.
- Centrífuga 202M (Sigma).
- Estufa de 37°C 5% CO₂ (Heraeus).
- Balanza de precisión 0,001 g-200 g (Denver Instrument).
- pHmetro (Hanna Instruments).
- *Shaker* (LH Fermentation).

- Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como UFC/mL y se determina el pH a lo largo del tiempo.

3.2.2.12. Valoración sensorial y ensayo de fermentación de la leche

- Objetivo y campo de aplicación

Determinar la capacidad de las cepas seleccionadas de fermentar la leche y la capacidad de producir de aromas desagradables.

- Método de ensayo

Se inoculan en un volumen determinado de leche esterilizada un 5% de los cultivos *o/n* en medio líquido de las cepas a ensayar. Los ensayos se realizan por duplicado. Los cultivos en leche se incuban a 37 °C durante 18 horas.

A partir del desarrollo de las cepas, se evalúan semicualitativamente los siguientes parámetros:

- **Grado de coagulación**
- **Aroma**

- Principio del ensayo

Determinar la fermentación de las cepas en leche comercial semidesnatada sin vitaminas ni calcio añadido.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- PBS (Calbiochem).
- Leche semidesnatada, no enriquecida en vitaminas A, D ni calcio añadido (Central Lechera Asturiana).
- Micropipeta 40-200 μ L (Extend).
- Micropipeta 100-1000 μ L (Thermolabsystems).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).

- Expresión de los resultados

Los parámetros evaluados han sido:

Grado de coagulación:

GRADO DE COAGULACIÓN	VALOR
Ausente	0
Parcial	1
Mayoritario, con residuo líquido	2
Total, sin residuo líquido	3

Tabla núm.14.- Valoración del grado de coagulación.

Aroma:

La evaluación se realiza independientemente por dos personas distintas.

AROMA	VALOR
Muy desagradable	0
Ligeramente desagradable	1
Neutro	2
Agradable	3

Tabla núm.15.- Valoración del aroma.

3.2.2.13. Efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana

- Objetivo y campo de aplicación

Evaluar los posibles efectos sobre el bienestar y también evaluar la translocación de las bacterias administradas por vía oral a los ganglios linfáticos en los animales de laboratorio.

- Método de ensayo

El protocolo utilizado recibió la aprobación del Comité de revisión de protocolos de experimentación con animales de la Universidad Autónoma de Barcelona. El tratamiento, cría y sacrificio de los animales se llevó a cabo de forma rigurosa y siguiendo las directrices de la Unión Europea.

Las cepas en estudio se administraron a la concentración de 5×10^{10} UFC/kg de peso vivo en suspensión en PBS, a dieciocho ratas *Winstar* de 9 semanas (machos y hembras) durante siete días.

Las ratas se distribuyeron en tres lotes: lote control, lote al que se administró la cepa F35 y lote al que se administró la cepa F47. Cada lote estaba constituido por seis animales y la proporción macho: hembra fue 1:1.

Los animales fueron alimentados con Teklad 2014 y agua *ad libitum*. La administración de las cepas se realizó tras la alimentación y directamente a estómago, por medio de una sonda oro-gástrica.

Cada 48 horas, se determinó el comportamiento y el grado de bienestar de los animales, asignándoles los valores detallados en la Tabla núm.16.

	PARÁMETROS	VALOR
PESO	Normal	0
	Pérdida < 10%	1
	Pérdida < 10-20%	2
	Pérdida > 20%	3
COMPORTAMIENTO	Normal	0
	Pelo dañado	1
	Pelo dañado y secreción ocular	2
	Postura anormal	3
	Automutilación o expresión de dolor	3
RESPUESTA AL ESÍMULO	Normal	0
	Agresivo	3
	Comatoso	3

Tabla núm.16.-Parámetros que permiten evaluar el estado de bienestar de los animales y valores semicuantitativos atribuidos.

Asimismo, y tras sacrificar a los animales siguiendo los criterios establecidos por el Comité, se realizó la necropsia con el fin tal de determinar los posibles daños macroscópicos en los órganos.

Paralelamente y a partir de muestras de ganglio linfoide mesentérico obtenidas en condiciones de esterilidad, se evaluó la posible translocación de los microorganismos administrados.

La metodología seguida, podemos resumirla en:

Se procedió a homogenizar 5 mg de la muestra con 1 mL de PBS, conteniendo un 0,01% de gelatina, previamente esterilizada. Posteriormente, se sembraron 100 µL del homogenizado en placas de agar McConkey y de agar MRS. Las placas se incubaron a 37 °C por espacio de 48 horas.

- Principio del ensayo

Determinar el estado general de los animales tras la administración de los probióticos y la posible translocación de los microorganismos administrados por vía oral a los ganglios linfáticos.

- Microorganismos, animales y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.

Animales de experimentación

- Ratas *Winstar*, machos y hembras de 9 semanas.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- Placas de Agar McConkey (Liofilchem).
- PBS (Calbiochem).
- Micropipeta 40-200 μL (Extend).
- Micropipeta 100-1000 μL (Thermolabsystems).
- *Eppendorf* de 1,5 mL estériles(Daslab).
- Centrífuga 202M (Sigma).
- Estufa de 37 °C (Heraeus).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).
- Balanza de precisión 0,001 g- 200 g (Denver Instrument).

- Expresión de los resultados

Se determinó el grado de bienestar de los animales, también fueron detectadas el número de UFC/mg de ganglio mesentérico.

3.2.2.14. Adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal

Adhesión a mucus

- Objetivo y campo de aplicación

Evaluar la capacidad de adhesión de las BAL seleccionadas a células del tracto gastrointestinal. Se llevó a cabo un estudio comparativo con los resultados obtenidos con la cepa comercial control (*Lactobacillus rhamnosus* GG).

- Método de ensayo

- Preparación del mucus

El mucus intestinal se obtuvo lavando el estómago e intestino porcino con PBS a pH 7,4 y gelatina al 0,01% adicionado de un inhibidor de proteasas (Complete[®]). La mucosa se recuperó y se depositó en un recipiente con tampón 10 mM *HEPES-Hank's salt* a pH 7,4 y los mismos inhibidores. Posteriormente el mucus se lavó mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos con el mismo tampón. Se recuperaron los sobrenadantes y su contenido en mucus se evaluó por el Método de Bradford (Bradford, 1976).

El mucus restante se guardó en *eppendorf* estériles a -20 °C.

- Realización del ensayo

Se obtuvo un cultivo *o/n* de los microorganismos en estudio en 3 mL de caldo MRS, con la finalidad de tener un cultivo reciente. Simultáneamente, se descongeló la cantidad de mucus gastrointestinal requerido (de estómago, de intestino delgado o de intestino grueso).

Tras 18 horas de incubación se inoculó una alícuota de 300 µL del cultivo a 3 mL de caldo MRS con 5 µL de timidina tritiada. Se agitó y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Al mismo tiempo se preparó la placa de mucus. Se realizaron dos diluciones del mucus en PBS (1:100). A continuación, se inoculó cada pocillo con 2,5 mL de esta dilución en placa. Se tapó y se guardó en nevera (24 horas) con el fin de que la mucina sedimentara.

Transcurridas 24 horas se centrifugaron los medios de cultivo inoculados con timidina tritiada a 8000 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó en viales de centelleo para el posterior análisis. Se rotularon como **X**. Se resuspendió el precipitado obtenido en 3 mL de PBS y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se ajustó la concentración en cámara de Neubauer en PBS para alcanzar la concentración deseada ($\pm 2 \times 10^8$ UFC/mL).

A continuación, se realizaron tres lavados de la placa de mucus con PBS, dejando 200 μ L en el pocillo para que no se secase la mucina. En este punto del ensayo, se añadieron a cada pocillo 500 μ L del cultivo tritiado (por triplicado) ajustado a la concentración deseada.

Se incubó durante 60 minutos a 37 °C en ambiente de microaerofilia (5% CO₂).

Se realizó también la siembra de cada uno de los cultivos en placa para asegurar la concentración inoculada. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar los microorganismos no adheridos (**Y**). Con el último volumen de PBS se realizó un raspado. El material recuperado se nombró como **C**.

- Principio del ensayo

La suspensión de microorganismos se pone en contacto con la mucina seleccionada para el ensayo y se determina la adhesión de los microorganismos seleccionados a ésta, comparándola con la cuantificada para *Lactobacillus rhamnosus* GG, de aplicación industrial reconocida (Saxelin, 1997). El cultivo tipo está depositado en la *American Type Culture Collection* con la referencia ATCC 53103.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.
- Cepa control: *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- 5'-3H-Timidina (Amersham).
- PBS (Calbiochem).
- Autoclave (Selecta).
- Placa de 24 pocillos para cultivo celular (Becton Dickinson Labware Europe).
- Contador de centelleo modelo 1410 (Wallac).
- Viales de centelleo de 20 mL de plástico.
- *Eppendorf* de 1,5 mL estériles (Daslab).
- Centrífuga 202M (Sigma).
- Estufa de 37 °C 5%CO₂ (Heraeus).
- *HEPES-Hank's salt* a pH 7,4.
- Gelatina (Sigma).
- Inhibidor de Proteasas Complete[®] (Sigma).
- Congelador -20 °C (Philips).

- Expresión de los resultados

Los microorganismos incorporan timidina tritiada que se valora en dpm (C). Se calcula el total de microorganismos adheridos a mucosa a partir de conocer el valor inicial de timidina tritiada (μ L de timidina tritiada del medio de cultivo, X) y el valor de dpm del sobrenadante del medio de cultivo de la incubación de los microorganismos en la placa (Y).

Adhesión a células Caco-2

- Objetivo y campo de aplicación

Seleccionar cepas con capacidad de adhesión *in vitro* a líneas celulares (células Caco-2)

En un tratamiento con probióticos es de importancia fundamental determinar la capacidad de los mismos de colonizar y desarrollarse en el epitelio intestinal. Esta característica se puede evaluar aplicando un protocolo con timidina tritiada, que permite establecer el nivel de adhesión de los probióticos a las células Caco-2.

- Método de ensayo

- Preparación de las células Caco-2

Se introdujeron cubreobjetos en los 24 pocillos de la placa en la que se ensayó *in vitro* la adhesión a células Caco-2. Se procedió a sembrar del orden de $2,66 \times 10^4$ células Caco-2 por pocillo en los 24 pocillos con 0,5 mL de medio, que equivale a $1,4 \times 10^4$ células/cm². Se cambió el medio de cultivo de las células cada 48 horas, para lograr su perfecto desarrollo y estabilidad.

Transcurridos entre 7 y 8 días de la siembra inicial de las células, se habrán colonizado aproximadamente el 100% de los cubreobjetos. A continuación, se realizó el cambio de medio de cultivo cada 2-3 días añadiendo 1 mL de medio completo a cada pocillo.

A los 22 días post-siembra, el cultivo de células está preparado para proceder al ensayo con los cultivos de probióticos seleccionados.

- Realización del ensayo

Se realiza un cultivo *o/n* de los microorganismos en 3 mL de MRS líquido, con la finalidad de tener un cultivo reciente.

Transcurridas 18 horas del inicio del cultivo, se transfiere una alícuota de 300 µL del cultivo a 3 mL de MRS conteniendo 5 µL de timidina tritiada. Se somete a agitación mecánica y se incuba durante 24±2 horas a 37 °C.

Transcurridas 24 horas se centrifuga a 8000 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante se guarda en viales de centelleo para el posterior análisis. Se rotulan como **X**. Se resuspende el precipitado obtenido, en 3 mL de PBS y se centrifuga a 8000 rpm durante 10 minutos. Se ajusta la concentración en cámara de Neubauer para alcanzar la deseada ($\pm 2 \times 10^8$ UFC/mL) en PBS.

Obtenidos los cultivos, se centrifugan a 8000 rpm durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en medio MEM (Medio Esencial Mínimo).

Preparada la suspensión de microorganismos y el cultivo de células Caco-2, se procede a aspirar el medio de cultivo de cada pocillo, y a realizar un lavado con PBS. A continuación se añaden 500 µL de la suspensión bacteriana marcada con timidina tritiada a cada pocillo (por triplicado para cada cepa). Las placas preparadas se incuban durante una hora a 37 °C.

Finalizada la incubación se procede a realizar tres lavados sucesivos de los pocillos de las placas con 500 µL de PBS cada uno. El sobrenadante (**Y**) con los microorganismos no adheridos, así como el PBS de cada uno de los 3 lavados realizados (con 500 µL de PBS cada uno), se guardan en un tubo de centelleo.

Se añaden 400 µL de PBS a cada pocillo y se pipetea cuidadosamente para levantar la monocapa de células. Las células recuperadas se transfieren a un tubo de centelleo (uno para cada pocillo (**C**), para proceder a la lectura de la timidina tritiada adherida, lectura directa de la presencia de microorganismos adheridos a células Caco-2.

- Principio del ensayo

La suspensión de microorganismos se pone en contacto células Caco-2 y se determina la adhesión de los microorganismos seleccionados a éstas, comparándola con la cuantificada para *Lactobacillus rhamnosus* GG, de aplicación industrial reconocida (Saxelin, 1997). El cultivo tipo está depositado en la *American Type Culture Collection* con referencia ATCC 53103.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas.
- Cepa control: *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Material de laboratorio

- Caldo MRS (Liofilchem).
- Placas de medio de cultivo MRS (Liofilchem).
- 5'-3H-Timidina (Amersham).
- Líquido de centelleo ECOLUME de ICN.
- PBS (Calbiochem).
- Medio MEM Alpha (Gibco).
- Placa de 24 pocillos para cultivo celular, fondo plano, (Becton Dickinson Labware Europe).
- Cubreobjetos redondos (Becton Dickinson Labware Europe).
- Contador de centelleo modelo 1410 (Wallac).
- Viales de centelleo de 20 mL de plástico.
- Centrífuga (Sigma-202M).
- Estufa de 37 °C 5% CO₂ (Heraeus).

- Expresión de los resultados

Los microorganismos incorporan timidina tritiada que se valora en dpm. Se calcula el total de microorganismos adheridos a células Caco-2 a partir de conocer el valor inicial de timidina tritiada (μL de la timidina tritiada incorporados al medio de cultivo) y el valor de dpm del sobrenadante.

3.2.2.15. **Inmunomodulación en humanos**

- Objetivo y campo de aplicación

Describir los efectos inmunomoduladores de las BAL en humanos. El estudio fue planteado en doble ciego y de forma aleatoria incluyendo un placebo como control negativo (Gill *et al.*, 2001).

- Método de ensayo

El protocolo utilizado recibió la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Fueron seleccionados sesenta individuos sanos entre 65-70 años de edad en base a los siguientes criterios de exclusión: no haber padecido ninguna enfermedad aguda en el período comprendido entre un mes antes y la fecha del ensayo; no padecer ninguna enfermedad neoplásica; no presentar intolerancia a la lactosa; no presentar problemas de ingestión que impidan consumir el preparado elaborado para el estudio. La dieta se suplementó con vitaminas/oligoelementos, un mes previo al ensayo.

- Principio del ensayo

Determinar posibles efectos inmunomoduladores de las cepas seleccionadas.

- Microorganismos y material de laboratorio

Microorganismos

- BAL seleccionadas

Material de laboratorio

- Anticuerpos: *PECy5 conjugated mouse anti-human CD3+*; *PE conjugated mouse anti-human CD25+*; *APC conjugated mouse anti-human CD8+*; *FITC conjugated mouse anti-human CD4+*; *FITC conjugated mouse anti-human CD3+*; *APC conjugated mouse anti-human CD19+*; *PE conjugated anti-human CD56/16* y *PECy5 conjugated mouse anti-human HLA-DR* (BIONOVA CIENTIFICA, S.L).
- Kits y reactivos: *FACSlysing Buffer Solution* y *BDTM CBA Flex Sets: IL-1 β humano* y *IL-10 humano* (BD Bioscience); *ELISA para TGF- β humano*(Bionova Cientifica S.L). *Kit Human Soluble Protein Master Buffer* (BD).
- Aparato de citometria de flujo (FACScalibur).
- Centrifuga
- Liofilizador (Christ Alfa 1-2 LD).
- Viales de liofilización (Vidrafoc).
- Tapón de butilo para viales (Vidrafoc).
- Arandelas para los viales (Vidrafoc).
- Congelador -20 °C (Philips).

- Preparación de productos a ensayar

Se prepararon tres grupos de productos:

- 1- Productos con dosis baja de microorganismos (n=20): 5×10^8 UFC/día en 20 g leche desnatada en polvo.
- 2.- Productos con dosis alta de microorganismos (n=20): 5×10^9 UFC/día en 20 g leche desnatada en polvo.
- 3.- Productos Placebo (n=20): 20 g leche desnatada en polvo.

Las personas evaluadas recibieron al azar uno de los tres tratamientos a lo largo de un período de 12 semanas. Cada dosis de producto se presentaba envasada al vacío y se administraba por vía oral, disuelta en 200 mL de agua u otra bebida.

Las muestras se obtuvieron a tiempo cero, a las doce semanas (final del ensayo) y transcurridas veinticuatro semanas del inicio del ensayo, tiempo considerado suficiente para una eliminación (*washout*) del tratamiento y establecer así el posible efecto residual del tratamiento.

- Análisis de sangre y evaluación de estado general

Por medio del personal adecuado y cualificado, se evaluó el estado general de cada una de las personas implicadas en el ensayo.

Los parámetros considerados han sido: examen físico, historial clínico (enfermedades crónicas, cirugía, defecaciones/semana), hábitos de automedicación, altura, peso y calidad de vida.

A partir de muestras de sangre y por métodos analíticos habituales se procedió al control de los siguientes parámetros: hemograma, recuento de leucocitos, coagulación, glicemia, colesterol, triglicéridos, urea, creatinina, ionograma, bilirrubina y proteína C-reactiva.

- Ensayos inmunológicos

Los valores analizados fueron los siguientes: población de leucocitos, número total de células T (CD3+), células T (CD4+), células T (CD8+), células activadas T (CD25+), células B (CD19+), células NK (CD56+), células presentadoras del antígeno (HLA-DR+), citocinas: IL-1, IL-10 y el *Transforming growth factor-β* (TGF-β).

Población de leucocitos

A partir de muestras de sangre obtenidas de cada uno de los individuos que formaron parte del estudio se procedió a la caracterización fenotípica de las mismas por citometría de flujo.

Se procesan dos tubos que contienen 50 µL de sangre total cada uno.

- Al tubo 1 se adicionan: 2 µL de *anti-human CD25+PE*, 4 µL de *anti-human CD4+ FITC*, 5 µL de *anti-human CD8 APC* y 2 µL de *anti-human CD3+ PECy5*.
- Al tubo 2 se añaden: 2 µL de *anti-human CD56/16 PE*, 2 µL *anti-human CD3+ FITC* y 2 µL *anti-human CD19 APC*.

Se procede a la incubación durante 15 minutos en oscuridad. A continuación, se añaden 2 mL de solución tampón FACSlysing y se mantienen 7 minutos en oscuridad, con el fin de lisar los eritrocitos.

Finalizado este proceso, se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Los precipitados obtenidos se lavan por dos veces con PBS, mediante un proceso de centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. El *pellet* obtenido, se resuspende en PBS y se analiza por citometría de flujo mediante FACScalibur. Los valores obtenidos por la citometría se expresan como el porcentaje de cada marcador fenotípico en 10000 células CD3+.

El análisis plasmático de citocinas IL-10 e IL-1

El ensayo se realiza tomando 50 μ L de plasma obtenido. Por procedimientos rutinarios se incuban durante 1 hora con 50 μ L de una mezcla de los anticuerpos anti-IL-10 y anti-IL-1 adheridos a perlas de vidrio de tamaño diverso.

Asimismo, se añaden 50 μ L de la solución que contiene los anticuerpos específicos PE-marcados frente a otras citocinas y se mantienen en incubación durante 2 horas. Finalizado el período de incubación, se procede al lavado de las muestras y a su análisis por citometría de flujo con el FACScalibur. Se establece una curva patrón de IL-10 e IL-1, con el fin de normalizar los resultados, siguiendo las instrucciones del método.

El análisis se llevó a cabo mediante el Kit *Human Soluble Protein Master Buffer* para el inmunoensayo.

La detección y cuantificación de TGF- β

El ensayo se realizó por el método ELISA, siguiendo la metodología indicada por el fabricante del kit, paralelamente a los ensayos anteriores.

El proceso seguido se puede resumir en:

El plasma obtenido a partir de las muestras de sangre, se diluye en proporción 1:50. Posteriormente se acidifica con HCl 1N y se neutraliza con NaOH 1N. El tratamiento se lleva a cabo durante 70 minutos. Con este procedimiento, se logra activar el TGF- β .

Se prepara una curva estándar a partir de diluciones decimales TGF- β a una concentración inicial de 600 pg/mL.

Para el desarrollo del análisis ELISA, se parte de 100 μ L de los controles y de cada muestra, que se depositan por duplicado en una placa de 96 pocillos y se incuban a 4 °C *o/n*. Posteriormente, se añaden 100 μ L de anti-TGF- β monoclonal de ratón a cada pocillo, y se incuban durante 2 horas en agitación. Finalizado este proceso, se añaden 100 μ L anticuerpo de ratón anti IgG marcado con biotina y se incuban durante 45 minutos en agitación. Posteriormente se procede a realizar lavados progresivos y se añaden 100 μ L de una solución de estreptovidina peroxidasa, incubándose durante 45

minutos en agitación. Se lleva a cabo un nuevo lavado y se añaden 100 μL de una solución que incorpora el sustrato peroxidasa. Tras 15 minutos de contacto, se detiene la reacción y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

Los valores de la concentración de las muestras se obtuvieron por extrapolación de la absorbancia en la curva de regresión estándar.

- Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en función de los valores obtenidos aplicando las metodologías expuestas.

Se realizó el estudio estadístico de los resultados con el software SPSS v12 (USA). Las comparaciones intra grupos se realizaron con el test de los signos de *Wilcoxon* y para comparación inter grupos se llevó a cabo mediante el test de *Kruskal-Wallis*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1.1. Resultados de las encuestas realizadas

En la Tabla núm.17, se observan los datos recopilados a partir de las encuestas que se facilitó a las familias. Los parámetros evaluados fueron: edad, sexo, alimentación, estado de salud y posible tratamiento con antibióticos, así como también la población y el Departamento del Perú en el que se obtuvieron las muestras.

Se recogieron muestras de cuarenta y nueve niños de edades comprendidas entre uno y once meses.

NÚMERO DE MUESTRA	SEXO (H/M)	EDAD (MESES)	LUGAR RECOGIDA	ALIMENTACIÓN	ESTADO DE SALUD
01	M	1	B	Leche materna	Normal
02	M	2	B	Leche evaporada, puré de patatas, sopa de quinua	Enfermo
03	M	6	B	Sopa de fideos, habas, huevos	Normal
04	M	4	P	Leche de vaca	Normal
05	H	1	V	Leche materna	Normal
06	H	4	P	Avena, té	Normal
07	H	5	Ca	Leche de vaca	Normal
08	H	10	Ca	Leche de vaca	Normal
09	M	3	Ca	Leche de vaca y avena	Normal
10	M	11	Ca	Leche de vaca y avena	Normal
11	H	1	Ca	Leche materna	Normal
12	H	3	LA	Leche evaporada avena, quinua, chuño	Normal

Tabla núm.17.- Resultados correspondientes a las encuestas que se facilitó a las familias. **B**: Buenavista. **LA**: Los Angeles. **V**: Virú. **Ca**: California. **P**: Pueblo Joven.

NÚMERO DE MUESTRA	SEXO (H/M)	EDAD (M)	LUGAR RECOGIDA	ALIMENTACIÓN	ESTADO DE SALUD
13	M	3	LA	Avena	Normal
14	H	2	V	Leche evaporada	Normal
15	M	9	V	Leche evaporada	Normal
16	M	4	V	Avena y otros alimentos	Normal
17	M	4	SB	Leche de vaca y avena	Normal
18	M	3	SB	Leche evaporada y otros alimentos	Normal
19	M	4	SB	Leche de vaca y avena	Normal
20	M	9	V	Leche de vaca y avena	Normal
21	H	6	CM	Leche de vaca y otros alimentos	Resfriado (garganta)
22	H	3	CM	Leche materna y otros alimentos	Normal
23	M	2	CM	Leche de vaca y avena	Normal
24	H	9	CM	Leche materna y otros alimentos	Normal
25	M	4	CM	Leche de vaca	Normal
26	H	6	CM	Leche de vaca y otros alimentos	Normal
27	M	2	SA	Leche de vaca, avena y otros alimentos	Normal
28	H	4	SA	Leche de vaca y otros alimentos	Normal
29	H	1	SA	Leche materna y otros alimentos	Normal
30	M	4	SA	Avena	Normal
31	H	3	SA	Leche de vaca, avena y otros alimentos	Normal

Continuación Tabla núm.17.-Resultados correspondientes a las encuestas que se facilitó a las familias. **LA**: Los Angeles. **SA**: San Agustín. **SB**: San Bartolo. **V**: Virú. **CM**: Campiña Moche.

Resultados

NÚMERO DE MUESTRA	SEXO (H/M)	EDAD (M)	LUGAR RECOGIDA	ALIMENTACIÓN	ESTADO DE SALUD
32	M	2	SA	Leche evaporada	Normal
33	M	3	SA	Leche evaporada, avena y otros alimentos	Normal
34	H	2	C	Leche evaporada, zumo de papaya, sémola	Infección estomacal
35	H	1	C	Leche evaporada	Gripe
36	M	1	C	Leche materna, sopa de fideos, puré de patatas	Tiene tos
37	H	6	C	Leche, fideos, frutas	Normal
38	M	8	V	Leche de vaca, soja, sopa de fideos, legumbres	Infección estomacal
39	H	8	V	Legumbres, verduras, patatas	Normal
40	M	2	V	Leche de vaca, huevos y maíz cancha	Normal
41	H	6	CM	Leche de vaca, avena, legumbres	Normal
42	M	9	PM	Avena, arroz, legumbres	Resfriado
43	M	2	PM	Leche evaporada, legumbres, sopa	Normal
44	H	8	PM	Leche materna, sopa, chuño	Normal
45	H	9	CS	Zumo, leche de vaca, pollo, sopa, arroz, legumbres	Diarrea
46	H	1	T	Leche de vaca, arroz, legumbres, patatas	Normal
47	M	4	PM	Arroz, legumbres, pollo, hígado	Gripe
48	H	3	CS	Leche evaporada y avena	Normal
49	M	1	PM	Harina de maíz, avena, fideos, hígado, verdura	Normal

Continuación Tabla núm.17.- Resultados correspondientes a las encuestas que se facilitó a las familias. **C**: Chao. **PM**: Puente Moche. **T**: Tanque. **CS**: Curva Sun. **SA**: San Agustín. **V**: Virú. **CM**: Campiña Moche.

A partir de los datos de las encuestas realizadas, podemos establecer el estado de salud de los niños de los que se tomaron muestras, de los cuales el 18,4% estaban enfermos, como se aporta en la Tabla núm.18, y de éstos, el 66,7% estaban en tratamiento con antibióticos.

NÚMERO MUESTRA	ESTADO DE SALUD	TRATAMIENTO
02	Enfermo	Furazolidona, Metamizol y Mebendazol
21	Resfriado (garganta)	Sulfametoxazol y Trimetoprim
34	Infección estomacal	Combinación de trimetoprim y sulfamida
35	Gripe	Eritromicina
36	Tiene tos	Salbutamol
38	Infección estomacal	No indicado
42	Resfriado	No indicado
45	Diarrea	Manzanilla
47	Gripe	Ibuprofeno

Tabla núm.18.- Relación de niños, en los que se indica en la encuesta que están enfermos y en tratamiento.

4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESADO DE LAS MUESTRAS, AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS

4.2.1. Resultados de los crecimientos en los medios de cultivo específicos, posteriormente al pre-enriquecimiento y siembra en placa

Las muestras fueron pre-enriquecidas y sembradas en distintos medios de cultivo e incubadas en diferentes condiciones de respiración.

Resultados

En la Tabla núm.19, se observan las condiciones y medios de cultivo en las que se sembraron las muestras, con el fin de poder interpretar mejor los resultados obtenidos.

Se valoró el crecimiento según los requerimientos para cada medio selectivo.

Medio de cultivo	Condiciones de respiración	Período de incubación	T ^a
MRS a pH 6,4	Mi	24-48 h	37 °C
RA + 64 µg/mL vancomicina	Mi	24-48 h	37 °C
RA + 4 µg/mL vancomicina	Mi	24-48 h	37 °C
RA + 64 µg/mL vancomicina	Ae	24-48 h	37 °C
RA + 4 µg/mL vancomicina	Ae	24-48 h	37 °C
MRS + 3 g /100 mL etanol + 0,5 g/100 mL ciclohexamida	Ae	5-10 d	37 °C
M17	Mi	24-48 h	37 °C
LUSM+TTC	Mi	24-48 h	37 °C
TSA	Ae	24-48 h	37 °C
LUSM+ 30 µg/mL vancomicina	Mi	24-48 h	37 °C
Pal-P	Mi	6 d	37 °C
MRS + HCl a 0,05% (p/v), 100 µg/L de novobiocina + 10 µg/mL de vancomicina + 1 mg/L de ampicilina + 50.000 U/L de nistatina.	Mi	24-48 h	37 °C

Tabla núm.19.- Medios de cultivo y condiciones en las que se incubaron las placas. **Ae**: Aerobiosis. **Mi**: Microaerofilia (5% CO₂). **MRS**: De Man Rogosa Agar. **RA**: Rogosa Agar. **T^a**: Temperatura de incubación. **h**: horas. **d**: días.

En la Tabla núm.20, se observan los resultados correspondientes a los aislamientos realizados a partir de las heces analizadas, se siguió la metodología indicada en el Esquema núm.1. En el ANEXO A.1. se indican los medios de cultivo utilizados.

MUESTRAS	MEDIOS DE CULTIVO											
	M1*	M2*	M2	M3*	M3	M4	M5*	M6*	M7	M8*	M9*	M10*
1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
5	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
6	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
8	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
11	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
14	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
21	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
22	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
24	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
26	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
27	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
28	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
29	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
30	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
31	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
32	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
35	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
36	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
37	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
38	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
39	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tabla núm.20.- Resultados del crecimiento de BAL obtenidos.+ : Crecimiento. - : No crecimiento. * Medio incubación en microaerofilia 5% CO₂.M1: Medio 1, M2: Medio 2, M3: Medio 3, M4: Medio 4, M5: Medio 5, M6: Medio 6, M7: Medio 7, M8: Medio 8, M9: Medio 9, M10: Medio 10.

MUESTRAS	MEDIOS DE CULTIVO											
	M1*	M2*	M2	M3*	M3	M4	M5*	M6*	M7	M8*	M9*	M10*
40	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
41	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
42	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
43	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
44	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
45	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
46	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
47	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
48	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
49	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

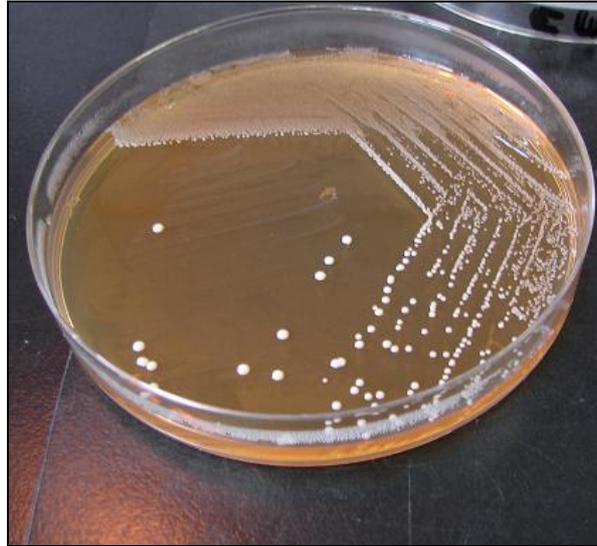
Continuación Tabla núm.20.- Resultados del crecimiento BAL obtenidos.+ : Crecimiento. - : No crecimiento.* Medio incubación en microaerofilia 5% CO₂.
M1: Medio 1, **M2**: Medio 2, **M3**: Medio 3, **M4**: Medio 4, **M5**: Medio 5, **M6**: Medio 6, **M7**: Medio 7, **M8**: Medio 8, **M9**: Medio 9, **M10**: Medio 10.

4.2.2. Resultados correspondientes a la selección de las posibles cepas de *Lactobacillus* spp.

4.2.2.1. Resultados correspondientes a las características morfológicas de las cepas

Resultados de la observación macroscópica de las colonias

A partir de las cuarenta y nueve muestras de heces sembradas en los diversos medios de cultivo indicados en el apartado 3.2.1. de Material y Métodos, se aislaron un total de trescientas treinta y cinco cepas. En general, las colonias seleccionadas presentaban un aspecto circular, una ligera elevación, eran convexas y de borde entero (Fotografía núm.4).



Fotografía núm .4.- Observación macroscópica .

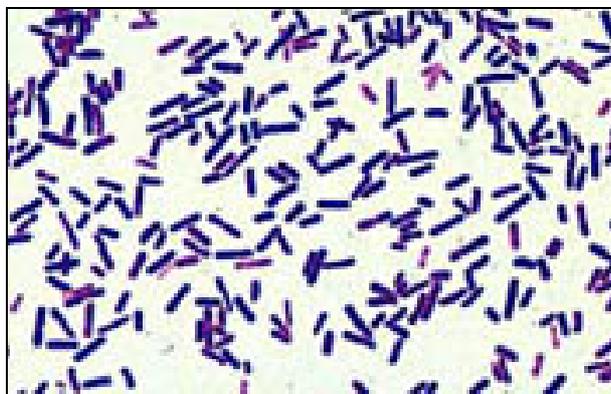
Con las trescientas treinta y cinco cepas aisladas se llevó a cabo el proceso de selección que se detalla a continuación.

Resultados de la tinción de Gram

En la Tabla núm.21, se indica el resultado obtenido tras realizar la tinción de Gram de las cepas aisladas (Fotografía núm.5).

- Criterio de selección de las cepas

En color verde se destacan las cepas compatibles con bacilos del grupo de BAL, y por tanto fueron las cepas seleccionadas para llevar a cabo el siguiente ensayo.



Fotografía núm .5.- Observación microscópica.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F1	1	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F2	1	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F3	1	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F4	1	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F5	1	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F6	2	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F7	2	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F8	2	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F9	3	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F10	3	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F11	3	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F12	3	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F13	3	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F14	3	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F15	3	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F16	3	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F17	3	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F18	4	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F19	4	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F20	4	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F21	4	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F22	4	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F23	4	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F24	4	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F25	4	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F26	4	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F27	5	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F28	5	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F29	5	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F30	5	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F31	5	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F32	5	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F33	5	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F34	5	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F35	5	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F36	5	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F37	6	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F38	6	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F39	6	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F40	6	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F41	6	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo

Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños. Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F42	6	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F43	6	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F44	6	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F45	6	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F46	7	Mi	24-48 h	Cocos Gram positivo
F47	7	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F48	7	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F49	7	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F50	7	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F51	7	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F52	7	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F53	7	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F54	7	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F55	8	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F56	8	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F57	8	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F58	8	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F59	8	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F60	8	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F61	8	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F62	8	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F63	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F64	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F65	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F66	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F67	8	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F68	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F69	8	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F70	8	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F71	8	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F72	9	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F73	9	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F74	9	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F75	9	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F76	9	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F77	9	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F78	9	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F79	9	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F80	10	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F81	10	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F82	10	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.

Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F83	10	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F84	10	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F85	10	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F86	10	Mi	6 d	Coco Gram positivo
F87	10	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F88	10	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F89	10	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F90	11	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F91	11	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F92	11	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F93	12	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F94	12	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F95	12	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F96	12	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F97	12	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F98	12	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F99	12	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F100	12	Ae	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F101	12	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F102	13	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F103	13	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F104	13	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F105	13	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F106	13	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F107	13	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F108	13	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F109	13	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F110	13	Ae	10 d	Levadura
F111	14	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F112	14	Mi	24-48 h	Levadura
F113	14	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F114	14	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F115	14	Ae	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F116	14	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F117	14	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F118	14	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F119	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F120	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F121	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F122	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F123	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F124	15	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.

Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F125	15	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F126	15	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F127	15	Ae	24-48 h	Levadura
F128	15	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F129	15	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F130	15	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F131	16	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F132	16	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F133	16	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F134	16	Mi	24-48 h	Levadura
F135	16	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F136	16	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F137	16	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F138	16	Mi	6 d	Levadura
F139	16	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F140	16	Ae	24-48 h	Levadura
F141	16	Ae	24-48 h	Levadura
F142	16	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F143	16	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F144	16	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F145	16	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F146	17	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F147	17	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F148	17	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F149	17	Mi	24-48 h	Levadura
F150	17	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F151	17	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F152	17	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F153	17	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F154	17	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F155	17	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F156	18	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F157	18	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F158	18	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F159	18	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F160	18	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F161	18	Mi	6 d	Bacilo Gram positivo
F162	18	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F163	18	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F164	18	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F165	18	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F166	18	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.

Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F167	18	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F168	19	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F169	19	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F170	19	Mi	6 d	Coco Gram positivo
F171	19	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F172	19	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F173	20	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F174	20	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F175	20	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F176	20	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F177	20	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F178	20	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F179	20	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F180	20	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F181	20	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F182	20	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F183	21	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F184	21	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F185	21	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F186	21	Mi	6 d	Bacilo Gram positivo
F187	21	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F188	21	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F189	21	Ae	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F190	21	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F191	22	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F192	22	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F193	22	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F194	22	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F195	23	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F196	23	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F197	24	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F198	24	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F199	24	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F200	24	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F201	24	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F202	25	Mi	24-48 h	Levadura
F203	25	Mi	24-48 h	Levadura
F204	25	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F205	25	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F206	25	Mi	6 d	Bacilo Gram positivo
F207	25	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F208	25	Ae	24-48 h	Levadura

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.
Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F209	25	Ae	24-48 h	Levadura
F210	25	Ae	10 d	Coco Gram positivo
F211	26	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F212	26	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F213	26	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F214	26	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F215	26	Mi	6 d	Levadura
F216	26	Ae	24-48 h	Levadura
F217	26	Ae	24-48 h	Levadura
F218	27	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F219	27	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F220	27	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F221	27	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F222	27	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F223	27	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F224	27	Mi	6 d	Coco Gram positivo
F225	27	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F226	27	Ae	24-48 h	Levadura
F227	27	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F228	27	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F229	27	Ae	10 d	Levadura
F230	28	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F231	28	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F232	28	Mi	6 d	Bacilo Gram positivo
F233	28	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F234	28	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F235	28	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F236	28	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F237	29	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F238	29	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F239	29	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F240	29	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F241	29	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F242	29	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F243	29	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F244	29	Ae	10 d	Bacilo Gram positivo
F245	30	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F246	30	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F247	30	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F248	30	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F249	30	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F250	30	Mi	6 d	Bacilo Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.

Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F251	30	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F252	30	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F253	30	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F254	30	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F255	31	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F256	31	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F257	31	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F258	31	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F259	31	Ae	24-48 h	Levadura
F260	31	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F261	32	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F262	32	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F263	32	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F264	32	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F265	33	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F266	33	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F267	33	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F268	33	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F269	34	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F270	34	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F271	34	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F272	34	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F273	34	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F274	35	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F275	35	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F276	35	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F277	35	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F278	36	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F279	36	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F280	36	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F281	36	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F282	36	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F283	36	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F284	36	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F285	37	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F286	37	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F287	37	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F288	37	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F289	38	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F290	38	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F291	38	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F292	38	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.
Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Referencia CEPA	Ref. NIÑO	Condiciones óptimas respiración	Tiempo crecimiento óptimo	Morfología/Tinción de Gram
F293	39	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F294	39	Mi	24-48 h	Cocobacilo Gram negativo
F295	39	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F296	40	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F297	40	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F298	40	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F299	40	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F300	41	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F301	41	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F302	41	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F303	41	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F304	42	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F305	42	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F306	42	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F307	42	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F308	42	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F309	43	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F310	43	Mi	24-48 h	Levadura
F311	43	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F312	43	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F313	43	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F314	44	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F315	44	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F316	44	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F317	45	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F318	45	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F319	45	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F320	45	Ae	24-48 h	Coco Gram positivo
F321	46	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F322	46	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F323	46	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F324	46	Mi	24-48 h	Coco Gram positivo
F325	46	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F326	47	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F327	47	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F328	47	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F329	48	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F330	48	Mi	24-48 h	Bacilo Gram negativo
F331	48	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F332	48	Ae	24-48 h	Levadura
F333	49	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F334	49	Mi	24-48 h	Bacilo Gram positivo
F335	49	Ae	24-48 h	Bacilo Gram positivo

Continuación Tabla núm.21.- Cepas aisladas en placa a partir de las muestras de heces de niños.

Ae: Aerobiosis, Mi: Microaerofilia 5%CO₂. h: horas. d: días.

Resultados de la tinción de esporas

En la Tabla núm.22 se indica el resultado tras la tinción de esporas de todas las cepas de bacilos Gram positivos seleccionadas.

- Criterio de selección de las cepas

Se destacan en color verde las cepas no formadoras de esporas, que cumplen la premisa establecida.

CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS
F1	1	Ausencia
F3	1	Ausencia
F4	1	Ausencia
F7	2	Ausencia
F9	3	Ausencia
F11	3	Ausencia
F15	3	Ausencia
F16	3	Ausencia
F18	3	Ausencia
F21	4	Ausencia
F22	4	Ausencia
F24	4	Presencia
F29	5	Ausencia
F30	5	Ausencia
F34	5	Ausencia
F35	5	Ausencia
F37	6	Ausencia
F40	6	Ausencia
F41	6	Ausencia
F42	6	Ausencia
F43	6	Ausencia
F44	6	Ausencia
F45	6	Ausencia
F47	7	Ausencia
F49	7	Ausencia
F53	7	Ausencia
F55	8	Ausencia
F56	8	Ausencia
F59	8	Ausencia
F61	8	Presencia
F71	8	Ausencia

CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS
F75	9	Ausencia
F80	10	Ausencia
F90	11	Presencia
F92	12	Ausencia
F93	12	Ausencia
F95	12	Ausencia
F101	12	Ausencia
F103	13	Ausencia
F106	13	Ausencia
F107	13	Presencia
F108	13	Ausencia
F113	14	Ausencia
F114	14	Ausencia
F116	13	Presencia
F118	14	Ausencia
F119	15	Ausencia
F120	15	Ausencia
F122	15	Ausencia
F123	15	Ausencia
F124	15	Ausencia
F125	15	Ausencia
F126	15	Presencia
F129	15	Ausencia
F131	16	Ausencia
F136	16	Ausencia
F137	16	Presencia
F142	16	Ausencia
F143	16	Ausencia
F144	16	Presencia
F145	16	Presencia
F146	17	Ausencia

Tabla núm.22.- Resultado de la tinción de esporas.

Resultados

CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS	CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS
F147	17	Ausencia	F232	28	Ausencia
F152	17	Ausencia	F233	28	Ausencia
F155	17	Ausencia	F234	28	Ausencia
F156	18	Ausencia	F235	28	Ausencia
F157	18	Presencia	F236	28	Ausencia
F158	18	Ausencia	F238	29	Ausencia
F159	18	Ausencia	F239	29	Ausencia
F160	18	Ausencia	F240	29	Ausencia
F161	18	Ausencia	F243	29	Ausencia
F162	18	Ausencia	F244	29	Ausencia
F163	18	Ausencia	F247	30	Ausencia
F164	18	Ausencia	F248	30	Ausencia
F168	19	Ausencia	F249	30	Ausencia
F172	19	Ausencia	F250	30	Ausencia
F177	20	Ausencia	F251	30	Presencia
F178	20	Presencia	F253	30	Ausencia
F180	20	Ausencia	F254	30	Ausencia
F181	20	Ausencia	F255	31	Ausencia
F182	20	Ausencia	F257	31	Ausencia
F183	21	Ausencia	F258	31	Ausencia
F184	21	Ausencia	F260	31	Ausencia
F185	21	Ausencia	F262	32	Ausencia
F186	21	Ausencia	F263	32	Ausencia
F187	21	Ausencia	F264	32	Ausencia
F188	21	Ausencia	F265	33	Ausencia
F192	22	Presencia	F266	33	Presencia
F193	22	Ausencia	F267	33	Ausencia
F195	23	Presencia	F268	33	Ausencia
F197	24	Ausencia	F272	34	Presencia
F199	24	Presencia	F273	34	Ausencia
F204	25	Ausencia	F274	35	Ausencia
F205	25	Ausencia	F275	35	Presencia
F206	25	Ausencia	F278	36	Ausencia
F207	25	Presencia	F279	36	Ausencia
F211	26	Ausencia	F280	36	Ausencia
F213	26	Ausencia	F281	36	Ausencia
F214	26	Ausencia	F282	36	Ausencia
F220	27	Ausencia	F283	36	Presencia
F221	27	Presencia	F284	36	Ausencia
F225	27	Ausencia	F285	37	Ausencia
F227	27	Ausencia	F286	37	Ausencia
F230	28	Ausencia	F287	37	Ausencia
F231	28	Ausencia	F288	37	Ausencia

Continuación Tabla núm. 22.- Resultado de la tinción de esporas.

CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS	CEPA	NIÑO	AUSENCIA/ PRESENCIA ESPORAS
F292	38	Ausencia	F318	45	Ausencia
F297	40	Ausencia	F319	45	Ausencia
F298	40	Ausencia	F322	46	Ausencia
F301	41	Ausencia	F323	46	Ausencia
F303	41	Ausencia	F325	46	Ausencia
F304	42	Ausencia	F326	47	Ausencia
F308	42	Presencia	F327	47	Ausencia
F311	43	Ausencia	F328	47	Ausencia
F312	43	Ausencia	F329	48	Ausencia
F313	43	Ausencia	F330	48	Ausencia
F314	44	Ausencia	F331	48	Ausencia
F315	44	Ausencia	F333	49	Ausencia
F316	44	Ausencia	F334	49	Ausencia
F317	45	Ausencia	F335	49	Ausencia

Continuación Tabla núm. 22.- Resultado de la tinción de esporas.

4.2.2.2. Resultados de la prueba de la catalasa

Todas las cepas seleccionadas hasta este punto presentan una actividad catalasa negativa.

- Criterio de selección de las cepas

Se seleccionan las cepas que tengan actividad catalasa negativa.

4.2.2.3. Resultados correspondientes a la evaluación de la actividad hemolítica

En la Tabla núm.23 se indica la capacidad hemolítica de cada una de las cepas.

En verde se marcan las cepas no hemolíticas y que cumplen con las exigencias establecidas para ser consideradas posibles probióticos (Fotografía núm. 5).

- Criterio de selección de las cepas

Se seleccionan las cepas que no presentan actividad hemolítica.

CEPA	HEMÓLISIS	CEPA	HEMÓLISIS	CEPA	HEMÓLISIS
F1	α- hemólisis	F103	α- hemólisis	F181	γ-hemólisis
F3	α- hemólisis	F106	α- hemólisis	F182	γ-hemólisis
F4	γ-hemólisis	F108	α- hemólisis	F183	γ-hemólisis
F7	α- hemólisis	F113	γ-hemólisis	F184	α- hemólisis
F9	α- hemólisis	F114	α- hemólisis	F185	γ-hemólisis
F11	α- hemólisis	F118	γ-hemólisis	F186	α- hemólisis
F15	γ-hemólisis	F119	α- hemólisis	F187	α- hemólisis
F16	α- hemólisis	F121	α- hemólisis	F188	γ-hemólisis
F18	α- hemólisis	F122	α- hemólisis	F193	α- hemólisis
F21	α- hemólisis	F123	α- hemólisis	F197	α- hemólisis
F22	α- hemólisis	F124	γ-hemólisis	F204	α- hemólisis
F29	γ-hemólisis	F125	γ-hemólisis	F205	α- hemólisis
F30	α- hemólisis	F129	α- hemólisis	F206	γ-hemólisis
F34	α- hemólisis	F131	γ-hemólisis	F211	γ-hemólisis
F35	γ-hemólisis	F136	α- hemólisis	F213	γ-hemólisis
F37	α- hemólisis	F142	γ-hemólisis	F214	γ-hemólisis
F40	α- hemólisis	F143	γ-hemólisis	F220	γ-hemólisis
F41	α- hemólisis	F146	α- hemólisis	F225	γ-hemólisis
F42	α- hemólisis	F147	α- hemólisis	F227	γ-hemólisis
F43	γ-hemólisis	F152	α- hemólisis	F230	γ-hemólisis
F44	α- hemólisis	F155	α- hemólisis	F231	α- hemólisis
F45	α- hemólisis	F156	α- hemólisis	F232	γ-hemólisis
F47	γ-hemólisis	F158	γ-hemólisis	F233	γ-hemólisis
F49	α- hemólisis	F159	α- hemólisis	F234	γ-hemólisis
F53	α- hemólisis	F160	α- hemólisis	F235	α- hemólisis
F55	α- hemólisis	F161	γ-hemólisis	F236	α- hemólisis
F56	α- hemólisis	F162	α- hemólisis	F238	γ-hemólisis
F59	α- hemólisis	F163	γ-hemólisis	F239	α- hemólisis
F71	α- hemólisis	F164	γ-hemólisis	F240	α- hemólisis
F75	α- hemólisis	F168	α- hemólisis	F243	γ-hemólisis
F80	α- hemólisis	F169	α- hemólisis	F244	α- hemólisis
F92	α- hemólisis	F172	α- hemólisis	F247	γ-hemólisis
F93	α- hemólisis	F177	α- hemólisis	F248	α- hemólisis
F95	α- hemólisis	F180	γ-hemólisis	F249	α- hemólisis
F101	α- hemólisis	F180	γ-hemólisis	F250	γ-hemólisis

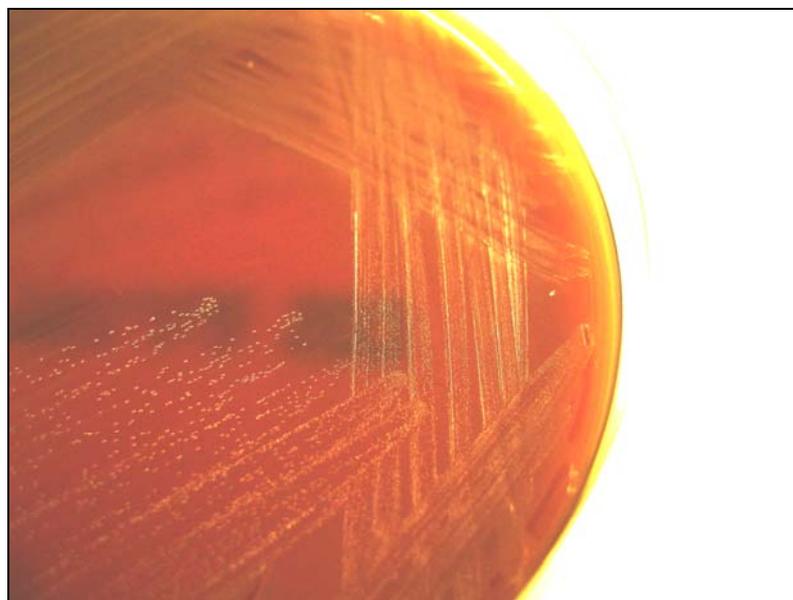
Tabla núm.23.- Actividad hemolítica.

CEPA	HEMÓLISIS
F253	α- hemólisis
F254	γ-hemólisis
F255	γ-hemólisis
F257	α- hemólisis
F258	α- hemólisis
F260	γ-hemólisis
F262	α- hemólisis
F263	α- hemólisis
F264	α- hemólisis
F265	α- hemólisis
F267	α- hemólisis
F268	γ-hemólisis
F273	α- hemólisis
F274	α- hemólisis
F278	α- hemólisis
F279	α- hemólisis
F280	γ-hemólisis

CEPA	HEMÓLISIS
F281	γ-hemólisis
F282	γ-hemólisis
F284	γ-hemólisis
F285	α- hemólisis
F286	γ-hemólisis
F287	γ-hemólisis
F288	α- hemólisis
F292	α-hemólisis
F297	α- hemólisis
F298	α- hemólisis
F301	α-hemólisis
F303	α- hemólisis
F304	α-hemólisis
F311	γ-hemólisis
F312	α- hemólisis
F313	α- hemólisis
F314	α- hemólisis
F314	α- hemólisis

CEPA	HEMÓLISIS
F315	α- hemólisis
F316	α- hemólisis
F317	α- hemólisis
F318	γ-hemólisis
F319	α- hemólisis
F322	α- hemólisis
F323	α- hemólisis
F325	α- hemólisis
F326	α- hemólisis
F327	α- hemólisis
F328	α- hemólisis
F329	α- hemólisis
F330	α- hemólisis
F331	γ-hemólisis
F333	α- hemólisis
F334	α- hemólisis
F335	α- hemólisis
F335	α- hemólisis

Continuación Tabla núm.23.- Actividad hemolítica.



Fotografía núm.5.- Detalle de la γ-hemólisis de una cepa.

4.2.2.4. Resultados de la identificación de las cepas seleccionadas

En la Tabla núm.24 se indica la identificación a nivel de especie, mediante el sistema API50CHL® de las cepas que han sido seleccionadas por cumplir los criterios de selección pre-establecidos.

CEPA	IDENTIFICACIÓN	CEPA	IDENTIFICACIÓN
F4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F214	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F15	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F220	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F29	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	F225	<i>Lactobacillus buchnerii</i>
F35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F227	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F43	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F230	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F232	<i>Lactobacillus fermentum</i>
F113	<i>Lactobacillus jensenii</i>	F233	<i>Lactobacillus fermentum</i>
F118	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F234	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F124	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	F238	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F125	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F243	<i>Lactobacillus fermentum</i>
F131	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F247	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F142	<i>Lactobacillus fermentum</i>	F250	<i>Lactobacillus fermentum</i>
F143	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F254	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F158	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F255	<i>Lactobacillus fermentum</i>
F161	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F260	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F163	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F268	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
F164	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F280	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F180	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F281	<i>Lactobacillus buchnerii</i>
F181	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F282	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F182	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F284	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
F183	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F286	<i>Lactobacillus jensenii</i>
F185	<i>Lactobacillus plantarum</i>	F287	<i>Lactobacillus buchnerii</i>
F188	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F311	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F206	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	F318	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F211	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F331	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F213	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		

Tabla núm.24.- Identificación a nivel de especie de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

4.2.2.5. Resultados de la evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales

En la Tabla núm.25, se indican los resultados obtenidos en la evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones fisico-químicas gastrointestinales.

- Criterio de selección de las cepas:

Se seleccionaron las cepas que presentaron:

- CMI igual o superior a 300 µg/mL de lisozima.
- Resistencia a pH entre 2 y 4.
- Capacidad de crecimiento en un 0,3% de sales biliares.
- CMI igual o superior a 30 µg/mL de PERDROGEN® (H₂O₂).

En la Tabla núm.25, se destacan en color verde las cepas que cumplen todos los requisitos indicados.

CEPA	SALES BILIARES	pH	LISOZIMA (µg/mL)	H ₂ O ₂ (µg/mL)
F4	Resistente	2	>300	>30
F15	No resistente	5	200-300	>30
F29	Resistente	4	>300	>30
F35	Resistente	2	>300	>30
F43	Resistente	2	>300	>30
F47	Resistente	<2	>300	>30
F113	No resistente	4	>300	>30
F118	Resistente	<2	>300	>30
F124	Resistente	<2	>300	>30
F125	Resistente	<2	>300	>30
F131	Resistente	<2	>300	>30
F142	Resistente	<2	>300	>30
F143	No resistente	5	200-300	>30
F158	Resistente	2	>300	>30
F161	No resistente	2	>300	>30
F163	Resistente	2	>300	>30
F164	Resistente	2	>300	>30
F180	Resistente	2	>300	>30

Tabla núm.25.- Resultados de la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas.

CEPA	SALES BILIARES	pH	LISOZIMA ($\mu\text{g/mL}$)	H ₂ O ₂ ($\mu\text{g/mL}$)
F181	Resistente	2	>300	>30
F182	Resistente	2	>300	>30
F183	Resistente	2	>300	>30
F185	Resistente	2	>300	>30
F188	No resistente	5	200-300	>30
F206	Resistente	2	>300	>30
F211	Resistente	2	>300	>30
F213	Resistente	2	>300	>30
F214	Resistente	2,5	>300	>30
F220	Resistente	2	>300	>30
F225	Resistente	2	>300	>30
F227	Resistente	2	>300	>30
F230	Resistente	2	>300	>30
F232	Resistente	2	>300	>30
F233	Resistente	2	>300	>30
F234	Resistente	2	>300	>30
F238	Resistente	2	>300	>30
F243	Resistente	<2	>300	>30
F247	Resistente	<2	>300	>30
F250	Resistente	3	>300	>30
F254	Resistente	<2	>300	>30
F255	Resistente	4	>300	>30
F260	Resistente	<2	>300	>30
F268	No resistente	<2	200	>30
F280	No resistente	<2	>300	>30
F281	Resistente	<2	>300	>30
F282	Resistente	<2	>300	>30
F284	Resistente	<2	>300	>30
F286	Resistente	<2	>300	>30
F287	Resistente	<2	>300	>30
F311	Resistente	<2	>300	>30
F318	No resistente	<2	>300	>30
F331	No resistente	5	200	>30

Continuación Tabla núm .25.- Resultados de la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas.

4.2.2.6. Resultados para la evaluación de las propiedades antibacterianas

Los valores correspondientes a la capacidad antibacteriana que manifiestan las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, se observan en la Tabla núm.26.

El valor de inhibición (VI) se expresa en mm. En la tabla se indican dos números: el valor absoluto de inhibición y entre paréntesis el valor relativo de inhibición, calculado según la fórmula:

$$\text{VALOR DE INHIBICIÓN} = (I-DC) / 2$$

Para una correcta interpretación de la fórmula, debe tenerse en cuenta que:

DC = DIÁMETRO DEL CILINDRO DE CULTIVO (mm).

I = DIÁMETRO DE INHIBICIÓN (mm).

- Criterio de selección de las cepas:

Se seleccionaron aquellas cepas de *Lactobacillus* que como mínimo eran activas frente a seis o más de los microorganismos ensayados y se comprueba su capacidad de inhibición.

Resultados

CEPA	A	B	C	D	E	F	G
F4	-	-	-	9 (1,5)	-	-	-
F29	-	-	-	-	-	-	-
F35	7 (0,5)	7 (0,5)	8 (1)	10 (2)	8 (1)	9(1,5)	7(0,5)
F43	-	-	-	7 (0,5)	-	-	-
F47	7 (0,5)	8 (1)	8 (1)	11 (2,5)	7 (0,5)	7 (0, 5)	-
F118	-	-	-	-	-	-	-
F124	-	-	-	-	-	-	-
F125	-	-	-	-	-	-	-
F131	-	-	-	-	-	-	-
F142	-	-	-	-	-	-	-
F158	-	-	-	-	-	-	-
F163	-	-	-	-	-	-	-
F164	-	-	-	-	-	-	-
F180	-	-	-	-	-	-	-
F181	8(1)	-	-	10 (2)	-	-	-
F182	7 (0,5)	-	-	-	-	-	-
F183	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-
F185	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-
F206	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-
F211	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F213	-	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F214	-	-	7 (0,5)	-	-	-	7(0,5)
F220	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-
F225	-	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F227	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F230	-	-	-	-	-	-	-
F232	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F233	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F234	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	7 (0,5)	-	-	-
F238	14 (4)	-	-	-	-	-	-
F243	8(1)	-	-	-	-	-	-
F247	7 (0,5)	-	-	-	-	-	7(0,5)
F250	-	-	-	-	-	-	-
F254	-	-	-	-	-	-	-
F255	-	-	-	11(2,5)	-	-	-
F260	-	8(1)	7 (0,5)	-	-	-	-
F281	-	10 (2)	-	7 (0,5)	-	-	-
F282	-	13(3,5)	-	-	-	-	-
F284	-	7 (0,5)	-	-	-	-	-
F286	-	-	-	10 (2)	-	-	-
F287	-	8(1)	-	10 (2)	-	-	-
F311	-	7 (0,5)	-	-	7 (0,5)	9 (1,5)	-

Tabla núm.26.- Resultados de las propiedades antibacterianas de las cepas.**A:** *Escherchia coli*, **B:** *Salmonella* Typhimurium, **C:** *Salmonella* Enteritidis, **D:** *Yersinia enterocolitica*, **E:** *Clostridium botulinum*, **F:** *Bacillus subtilis*, **G:** *Listeria monocytogenes*.

SELECCIÓN PRIMARIA DE LAS CEPAS

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los criterios de selección pre-establecidos, sólo dos cepas del total de las trescientas treinta y cinco aisladas de las muestras iniciales, cumplen con los requisitos para proseguir con su evaluación como posibles probióticos. En consecuencia, las pruebas que se realizaron, establecida esta selección primaria, se llevaron a cabo sólo con estas dos cepas y, cuando era preciso, con la cepa comercial considerada como control, como ya se ha indicado en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Las cepas seleccionadas han sido: *Lactobacillus plantarum* F35

Lactobacillus plantarum F47

4.2.2.7. Resultados de la evaluación de la resistencia a antibióticos

Las cepas se consideran resistentes o sensibles teniendo en cuenta su respuesta a la concentración en µg/mL de cada antibiótico, según la relación indicada en la Tabla núm.11, de Material y Métodos.

Si no se observa crecimiento, o se observa una reducción en el crecimiento en las placas adicionadas con el antibiótico, la cepa se considera sensible. Si, por el contrario el número de UFC/mL, alcanza el mismo valor o superior al que presenta en los ensayos control, en los que las cepas se desarrollan en MRS agar sin adición alguna de antibióticos, se considera que la cepa es resistente.

- Criterio de selección de las cepas:

Se eligen aquellas cepas que son sensibles a todos los antibióticos ensayados. En el caso del control positivo los resultados se expresan en UFC/mL.

En la Tabla núm.27, se indican los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad a antibióticos, en el caso de las cepas seleccionadas.

CEPA	Dil.	Clo	K	ES	N	E	G	A	Cli	T	C+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	10²	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4,96x10 ²
	10³	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5,30x10 ³
	10⁴	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4,12x10 ⁴
	10⁵	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4,20x10 ⁵
<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	10²	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6,64x10 ²
	10³	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5,00x10 ³
	10⁴	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2,30x10 ⁴
	10⁵	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3,60x10 ⁵
<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	10²	S	S	S	S	S	S	S	S	S	7,76x10 ²
	10³	S	S	S	S	S	S	S	S	S	8,12x10 ³
	10⁴	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4,60x10 ⁴
	10⁵	S	S	S	S	S	S	S	S	S	8,10x10 ⁵

Tabla núm.27.- Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, a antibióticos recomendados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. **Dil:** dilución del cultivo inicial. **S:** Sensible. **Clo:** Cloramfenicol. **K:** Kanamicina. **ES:** Estreptomycin. **N:** Neomicina. **E:** Eritromicina. **G:**Gentamicina. **A:** Ampicilina. **Cli:** Clindamicina. **T:** Tetraciclina, **C+:** medio control sin adición de antibiótico.

4.2.2.8. Resultados correspondientes al proceso de liofilización y ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas

Proceso de liofilización

Se procedió a partir de las cepas seleccionadas, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.2.8 de Material y Métodos, a la preparación de viales que contenían las cepas liofilizadas.

Ensayos de recuperación de las cepas a partir de los cultivos liofilizados

En la Tabla núm.28, se aportan los resultados obtenidos, comparando con los relativos a la cepa control (*Lactobacillus rhamnosus* GG). Los ensayos se realizaron con diez viales para cada condición y cepa evaluada. Los valores expresados en la tabla corresponden a los valores de cada uno de los viales analizados.

Los resultados se expresan en UFC/mL.

Resultados

CEPAS	TIEMPO 0 (UFC/mL)		7 DÍAS (UFC/mL)		14 DÍAS (UFC/mL)	
	T ^a AMBIENTE	T ^a 4 °C	T ^a AMBIENTE	T ^a 4 °C	T ^a AMBIENTE	T ^a 4 °C
LGG	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,3 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,4 x10 ⁸	1,05 x10 ⁸
	1,0 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸
	1,0 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	2,2 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸
	1,1 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,5 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	8,95 x10 ⁷
	1,5 x10 ⁸	1,4 x10 ⁸	1,3 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸
	1,0 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸
	1,3 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	9,5 x10 ⁷	1,0 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,3 x10 ⁸
	2,0 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,3 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸
	1,0 x10 ⁸	1,4 x10 ⁸	1,5 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸
	1,0 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸	1,6 x10 ⁸	1,1 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	1,0 x10 ⁸
F 35	5,6 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸
	4,9 x10 ⁸	6,7 x10 ⁸	4,7 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,3 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸
	5,5 x10 ⁸	5,6 x10 ⁸	4,8 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸	6,3 x10 ⁸	6,7 x10 ⁸
	5,3 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	4,7 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,3 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸
	7,0 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,3 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸
	6,3 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	4,95 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸
	5,0 x10 ⁸	5,1 x10 ⁸	4,8 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸
	5,0 x10 ⁸	5,6 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸
	5,1 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸	4,9 x10 ⁸	5,85 x10 ⁸	6,3 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸
	5,6 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	5,7 x10 ⁸	4,5 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	5,9 x10 ⁸
F 47	8,1 x10 ⁸	8,7 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸	8,0 x10 ⁸
	7,3 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	9,0 x10 ⁸	9,0 x10 ⁸	9,3 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸
	7,9 x10 ⁸	8,5 x10 ⁸	9,0 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	7,8 x10 ⁸
	8,0 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸	9,0 x10 ⁸	9,0 x10 ⁸	8,0 x10 ⁸
	7,9 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸	9,8 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸	8,5 x10 ⁸	7,9 x10 ⁸
	9,0 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	7,9 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	7,8 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸
	8,0 x10 ⁸	7,8 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	8,89 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸
	8,0 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸	8,1 x10 ⁸
	7,9 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	8,6 x10 ⁸	8,0 x10 ⁸
	7,85 x10 ⁸	7,8 x10 ⁸	9,3 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	9,1 x10 ⁸	7,8 x10 ⁸

Tabla núm.28.-Resultados expresados en UFC/mL de los ensayos de recuperación de las cepas liofilizadas.

T^a: Temperatura. **LGG:** *Lactobacillus rhamnosus* GG.

4.2.2.9. Resultados correspondientes a la identificación de las cepas por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Caracterización taxonómica e identificación genética del género y especie de las cepas.

Tras la aplicación de la técnica PCR y mediante la herramienta *Ribosomal Database Project* (RDP), se ha podido establecer que las dos cepas seleccionadas: F35 y F47 pertenecen al género *Lactobacillus*.

Los resultados demuestran que las cepas F35 y F47 presentan respectivamente un 98% y 99% de identidad con la cepa *Lactobacillus plantarum* WCFS1 como puede observarse en la Figuras núms.6 y 7.

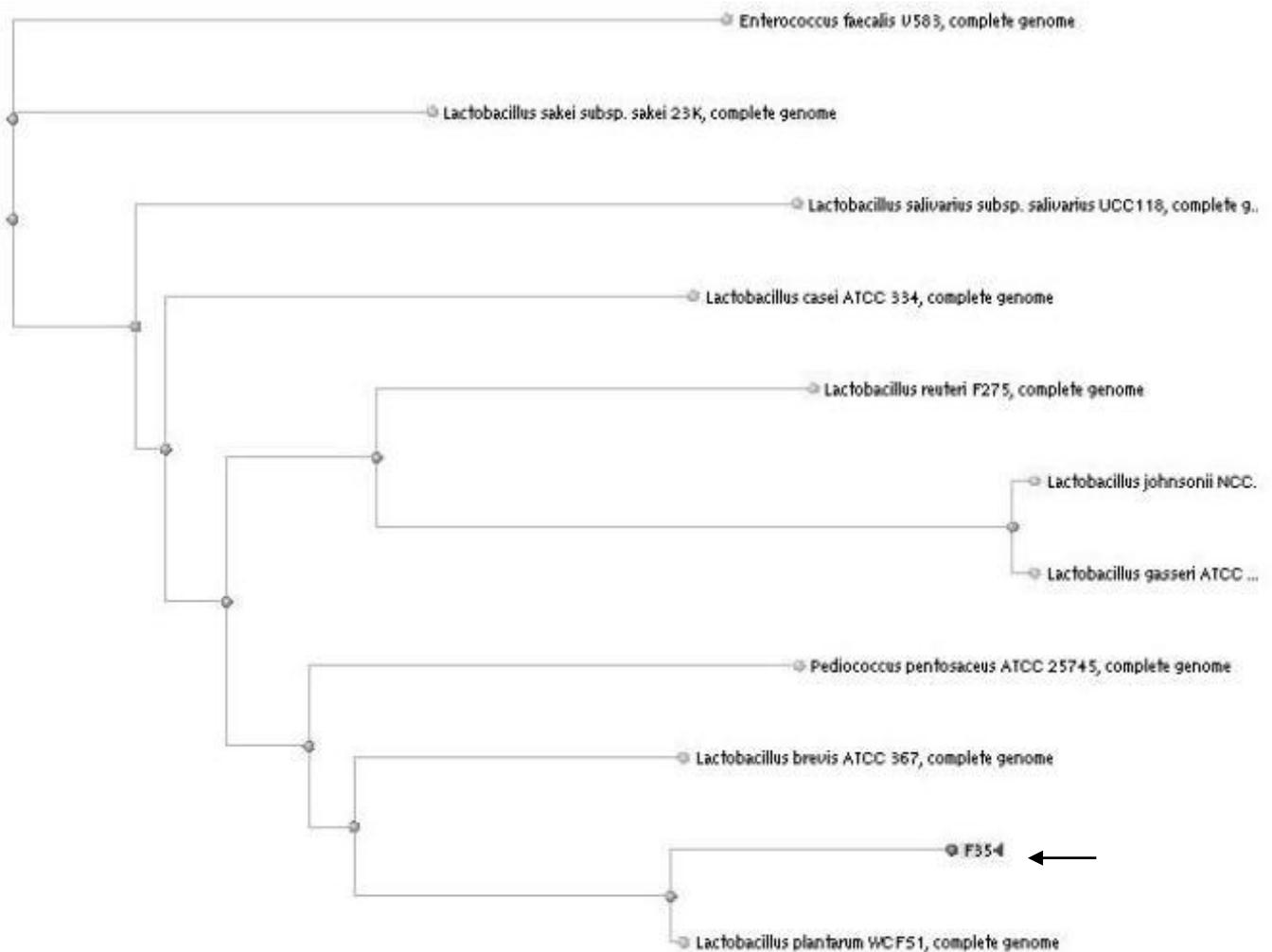


Figura núm.6.- Dendrograma en el que observa la relación entre la cepa F35 y *Lactobacillus plantarum* WCFS1.

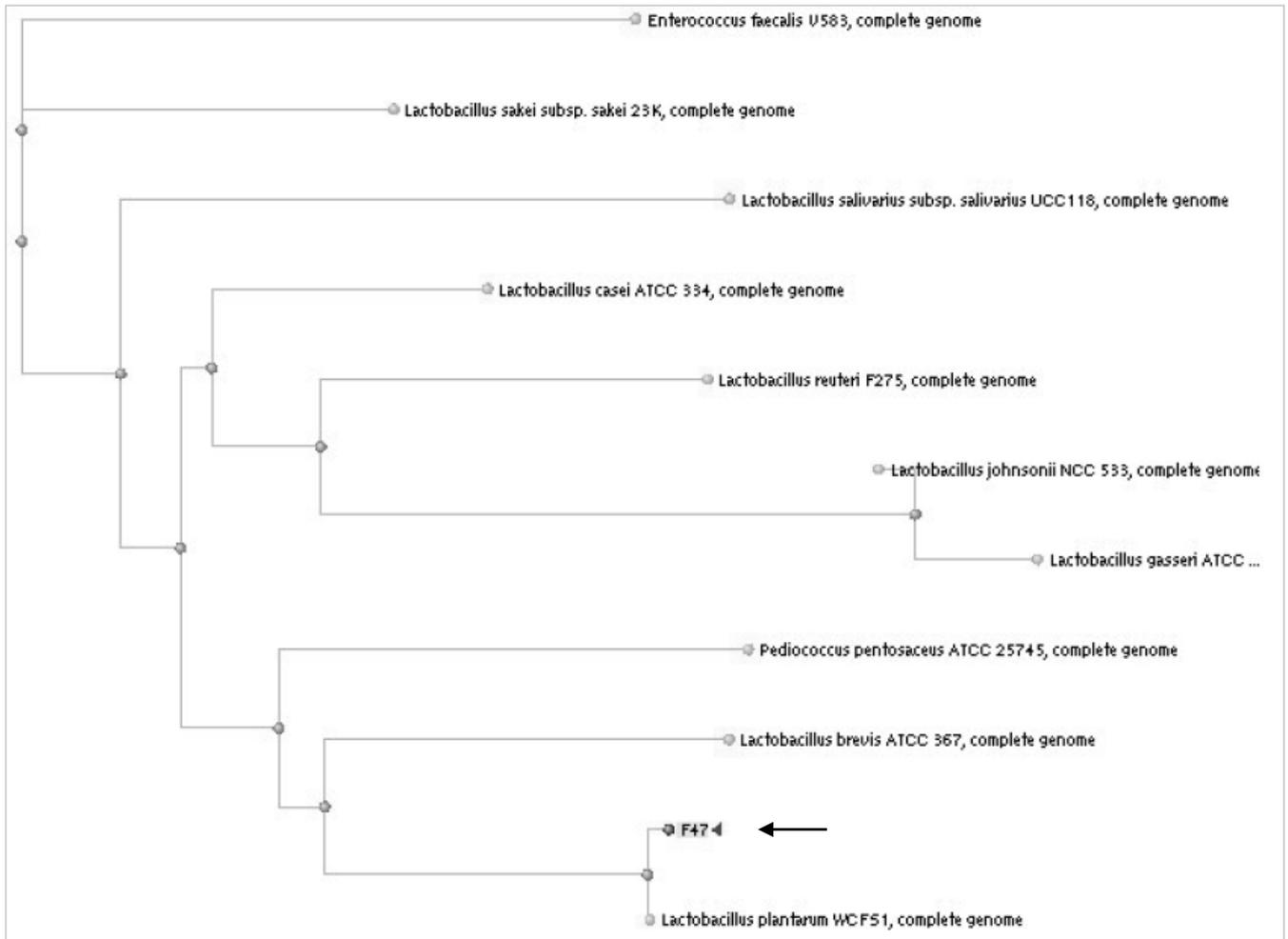


Figura núm.7.- Dendrograma en el que observa la relación entre la cepa F47 y *Lactobacillus plantarum* WCFS1.

Determinación del genotipo de las cepas

Los resultados obtenidos con las dos enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I ensayadas, fueron similares, como puede observarse en la Figura núm.8.

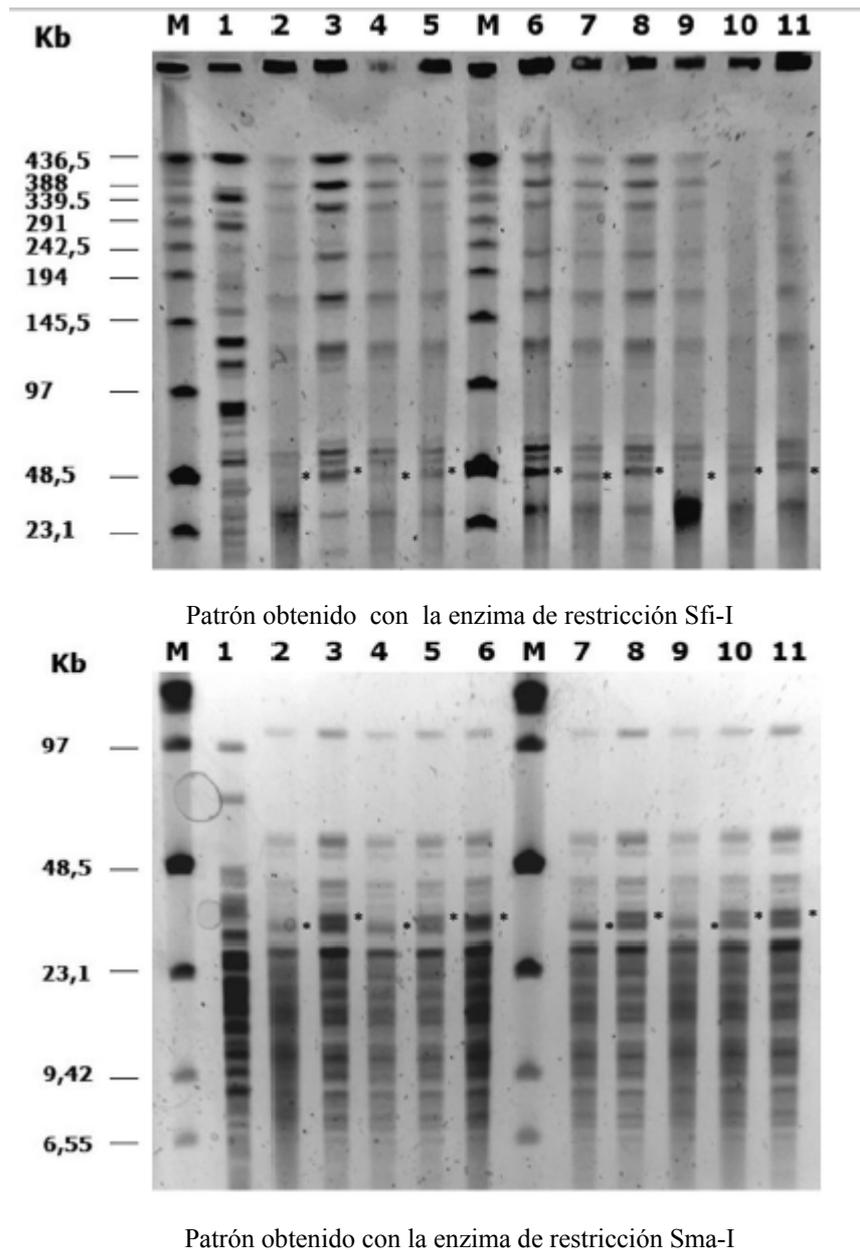


Figura núm.8.- Resultados obtenidos con las dos enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I. **M:** Marcador **1:** *Lactobacillus plantarum* 299v **2:** cepa *Lactobacillus plantarum* F35 **3:** cepa *Lactobacillus plantarum* F47.

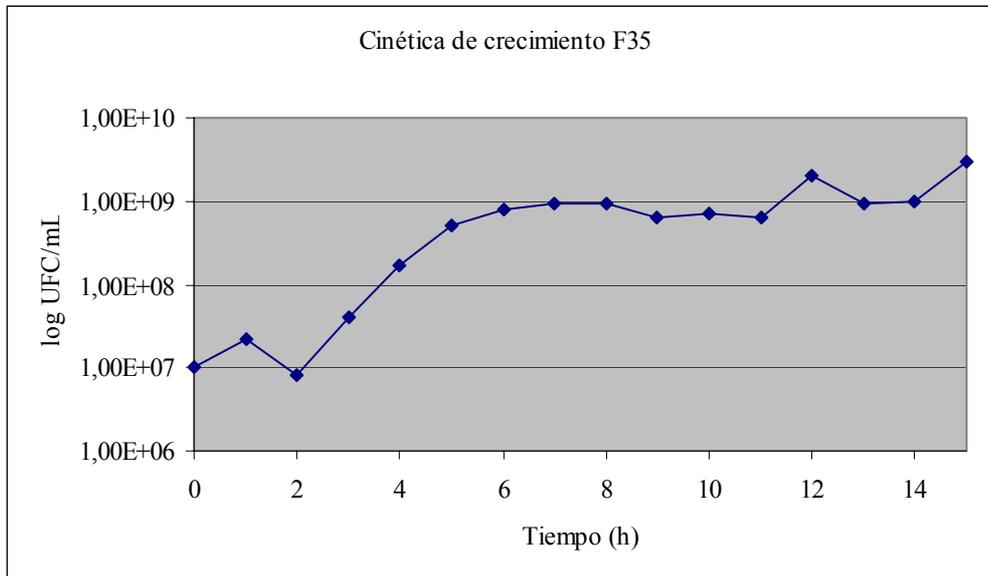
4.2.2.10. Resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido

Los resultados obtenidos al realizar las cinéticas de crecimiento de las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas (F35 y F47), se resumen en la Tabla núm.29 y en las Gráficas núms.1 y 2.

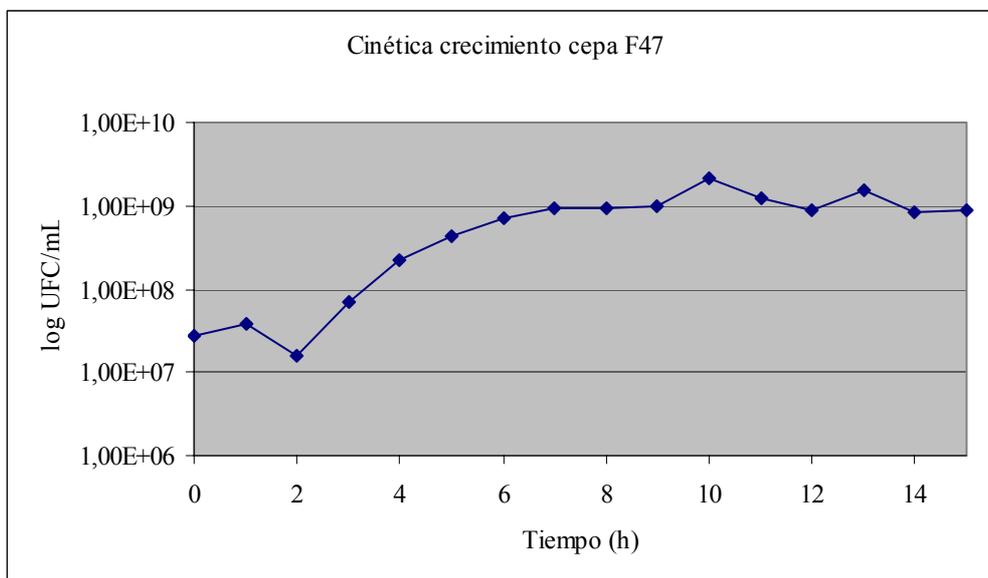
Asimismo se aportan en la tabla los valores relativos a la evolución del pH y del peso seco de las cepas a lo largo del período en estudio.

TIEMPO (h)	RECuento UFC/mL		pH		PESO SECO (g)	
	F 35	F 47	F 35	F 47	F 35	F 47
0	1,00 x10 ⁷	2,80 x10 ⁷	6,24	6,24	0,002	0,001
1	2,20 x10 ⁷	3,85 x10 ⁷	5,73	5,76	0,002	0,001
2	8,00 x10 ⁶	1,60 x10 ⁷	5,6	5,65	0,002	0,001
3	3,95 x10 ⁷	7,10 x10 ⁷	5,43	5,5	0,002	0,001
4	1,70 x10 ⁸	2,20 x10 ⁸	5,17	5,3	0,002	0,003
5	5,20 x10 ⁸	4,30 x10 ⁸	4,87	5,02	0,004	0,003
6	8,10 x10 ⁸	7,20 x10 ⁸	4,62	4,76	0,004	0,003
7	9,20 x10 ⁸	9,50 x10 ⁸	4,42	4,59	0,004	0,003
8	9,15 x10 ⁸	9,10 x10 ⁸	4,16	4,38	0,004	0,004
9	6,30 x10 ⁸	9,60 x10 ⁸	3,97	4,15	0,005	0,004
10	7,10 x10 ⁸	2,10 x10 ⁹	3,88	4,01	0,005	0,004
11	6,22 x10 ⁸	1,24 x10 ⁹	3,79	3,94	0,005	0,004
12	2,00 x10 ⁹	8,80 x10 ⁸	3,74	3,83	0,005	0,005
13	9,40 x10 ⁸	1,50 x10 ⁹	3,68	3,73	0,005	0,005
14	1,00 x10 ⁹	8,40 x10 ⁸	3,67	3,73	0,006	0,006
15	3,00 x10 ⁹	9,05 x10 ⁸	3,67	3,73	0,006	0,006

Tabla núm.29.- Resultados del recuento UFC/mL, pH y peso seco de las cepas en MRS. **F35**: *Lactobacillus plantarum* F35. **F47**: *Lactobacillus plantarum* F47.

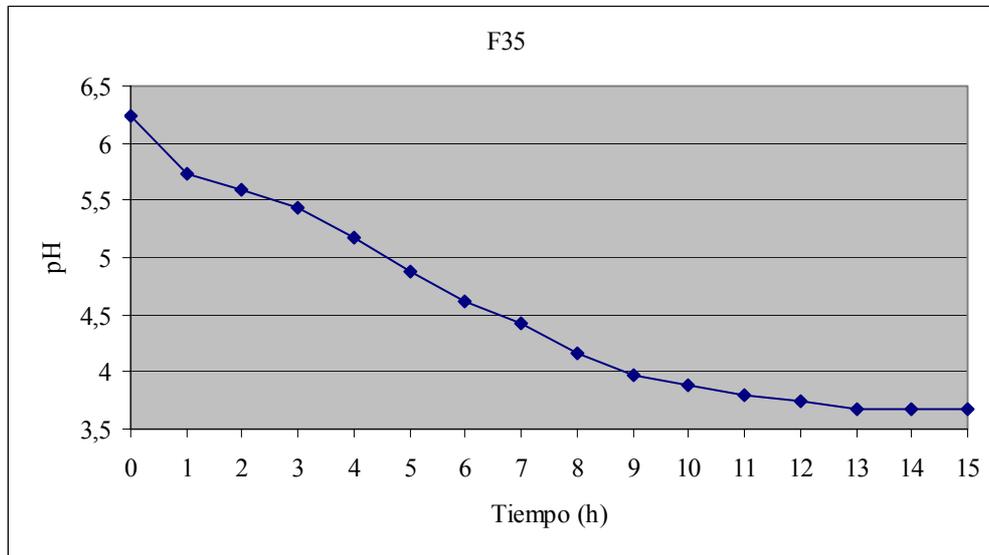


Gráfica núm.1.- Cinética de crecimiento en medio de cultivo de la cepa F35.
F35: *Lactobacillus plantarum* F35.

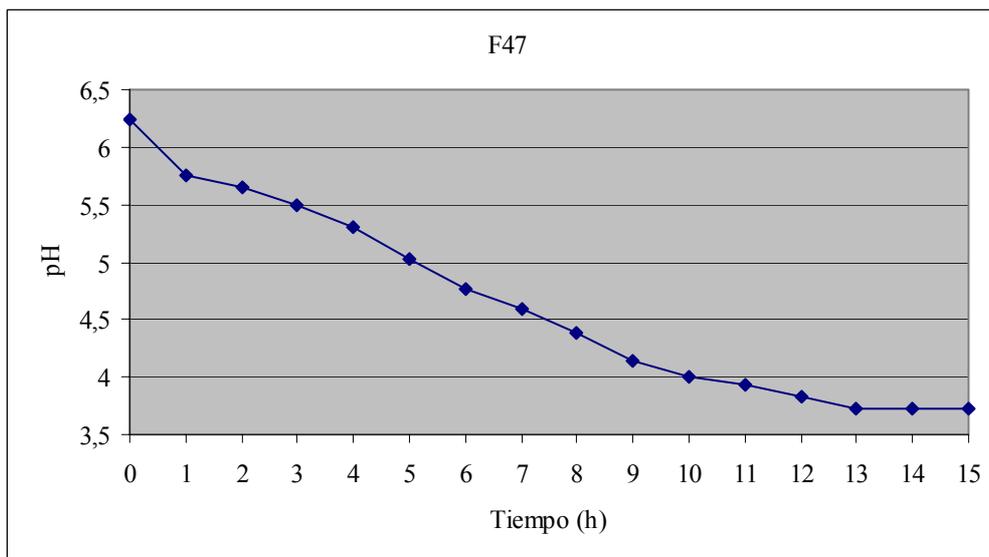


Gráfica núm.2.- Cinética de crecimiento en medio de cultivo de la cepa F47.
F47: *Lactobacillus plantarum* F47.

En las Gráficas núms.3 y 4, se observa la evolución del pH del medio de cultivo para cada una de las cepas a lo largo de las 15 horas de estudio.

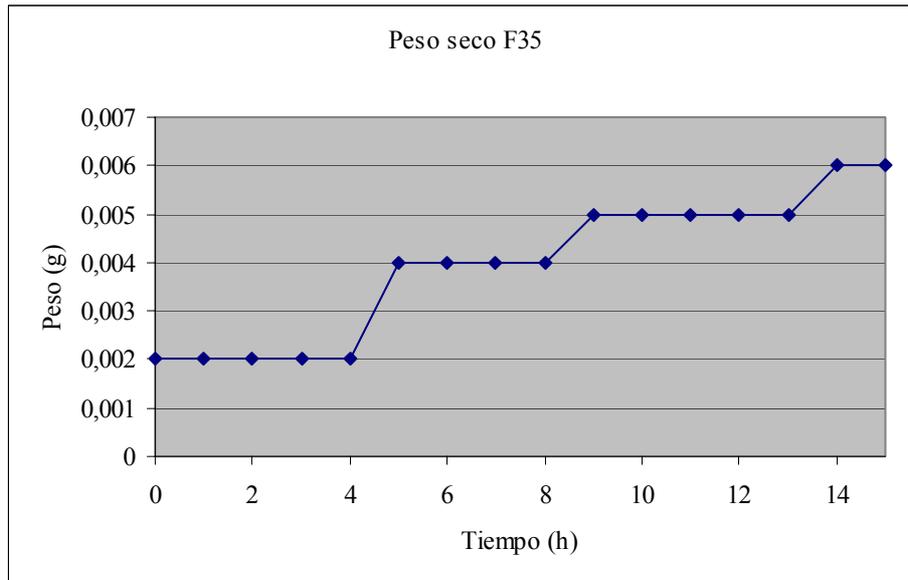


Gráfica núm.3.- Evolución del pH del medio de cultivo al desarrollarse la cepa F35. **F35:** *Lactobacillus plantarum* F35.

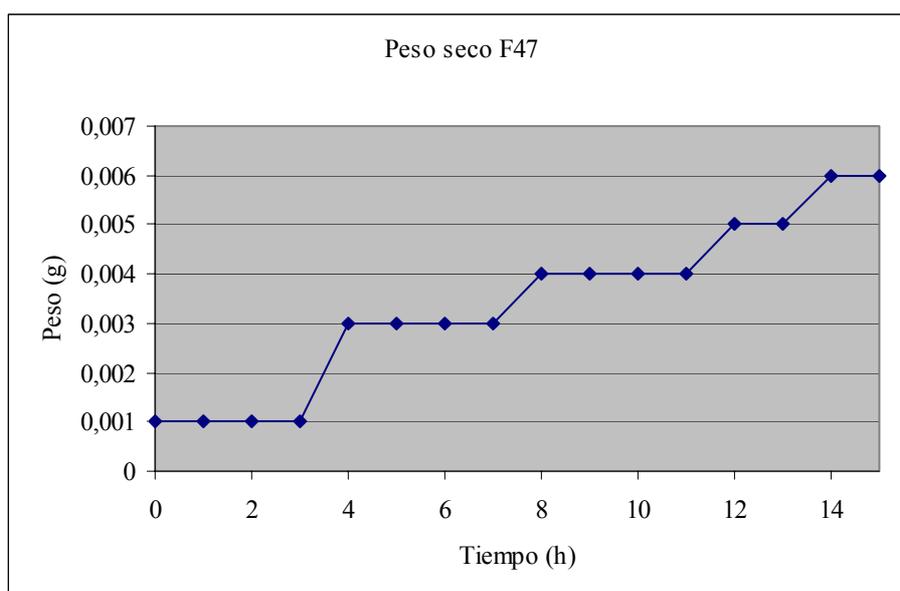


Gráfica núm.4.- Evolución del pH del medio de cultivo al desarrollarse la cepa F47. **F47:** *Lactobacillus plantarum* F47.

En las Gráficas núms.5 y 6, se puede apreciar la evolución del peso seco, expresado en gramos para cada una de las dos cepas en estudio



Gráfica núm.5.- Evolución del peso seco de la cepa F35. **F35:** *Lactobacillus plantarum* F35.



Gráfica núm.6.- Evolución del peso seco de la cepa F47. **F47:** *Lactobacillus plantarum* F47.

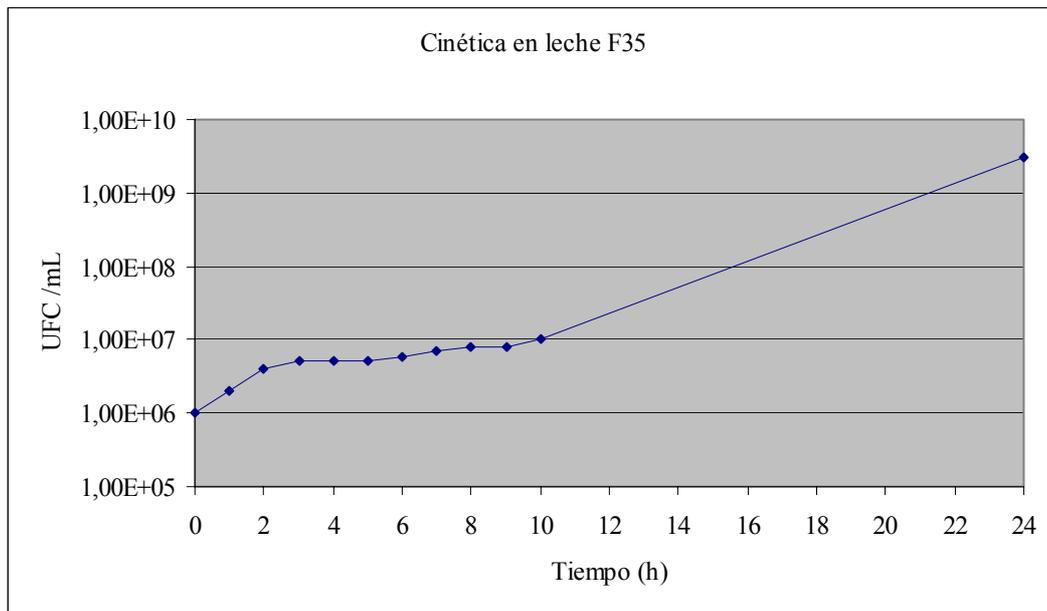
4.2.2.11. Resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche

Los resultados obtenidos, se resumen en la Tabla núm.30 y en las Gráficas núms.7 y 8.

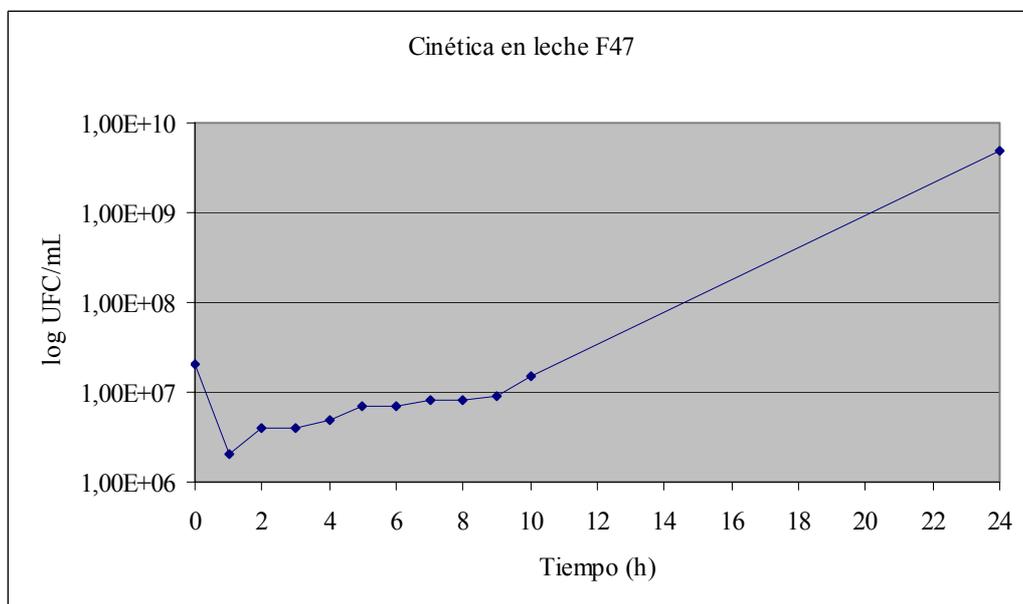
Asimismo se aportan en la Tabla núm.30 los valores relativos a la evolución del pH de las cepas a lo largo del período en estudio.

TIEMPO (h)	RECUESTO UFC/mL		pH	
	F 35	F 47	F 35	F 47
0	1,00 x10 ⁶	2,00 x10 ⁶	6,31	6,41
1	2,00 x10 ⁶	2,00 x10 ⁶	6,3	6,39
2	4,00 x10 ⁶	4,00 x10 ⁶	6,29	6,39
3	5,00 x10 ⁶	4,00 x10 ⁶	6,29	6,36
4	5,00 x10 ⁶	5,00 x10 ⁶	6,25	6,34
5	5,00 x10 ⁶	7,00 x10 ⁶	6,25	6,33
6	6,00 x10 ⁶	7,00 x10 ⁶	6,23	6,31
7	7,00 x10 ⁶	8,00 x10 ⁶	6,22	6,31
8	8,00 x10 ⁶	8,00 x10 ⁶	6,21	6,31
9	8,00 x10 ⁶	9,00 x10 ⁶	6,2	6,31
10	1,00 x10 ⁷	1,50 x10 ⁷	6,2	6,28
24	3,00 x10 ⁹	5,00 x10 ⁹	6,19	6,13

Tabla núm.30.- Resultados del recuento de UFC/mL y del pH de la leche al desarrollarse las cepas en estudio. **F35:** *Lactobacillus plantarum* F35.
F47: *Lactobacillus plantarum* F47.

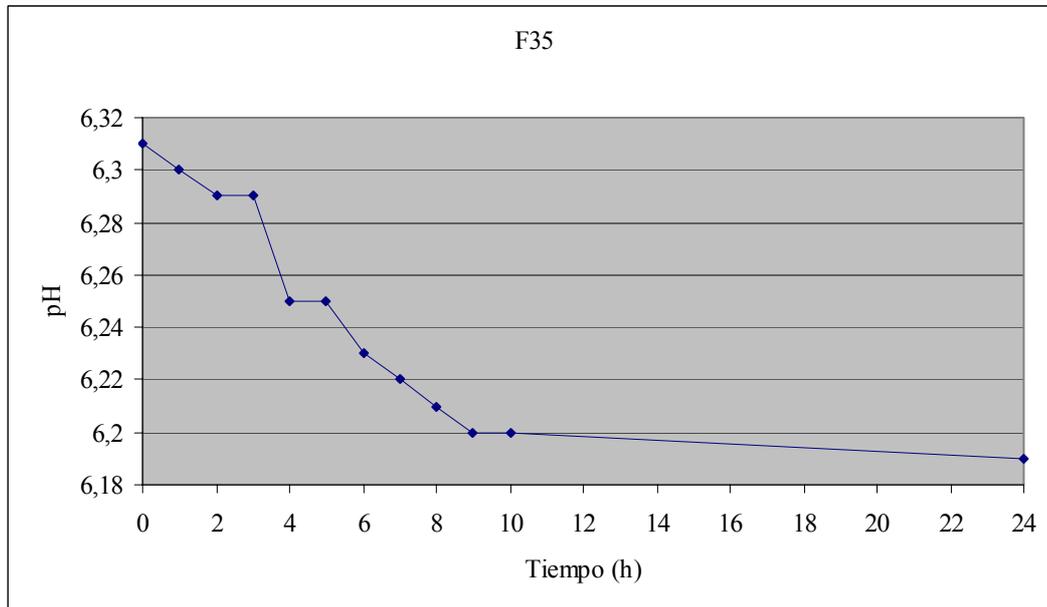


Gráfica núm.7.- Cinética de crecimiento en leche de la cepa F35. **F35:** *Lactobacillus plantarum* F35.

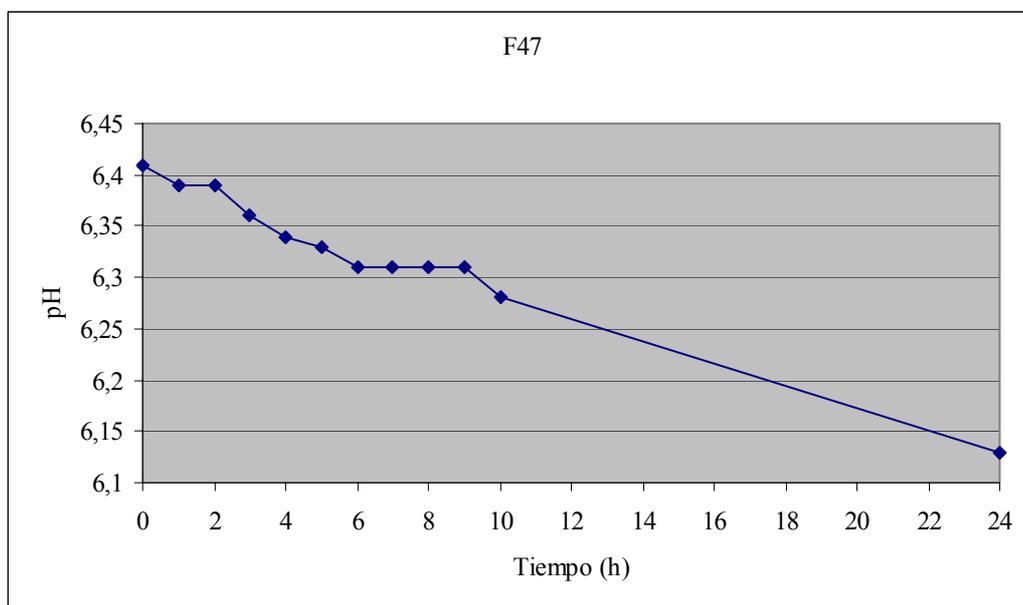


Gráfica núm.8.- Cinética de crecimiento en leche de la cepa F47. **F47:** *Lactobacillus plantarum* F47.

En las Gráficas núms. 9 y 10, se observa la evolución del pH de la leche a lo largo de las 24 horas de cultivo.



Gráfica núm.9.- Evolución del pH de la leche al desarrollarse la cepa F35. **F35:**
Lactobacillus plantarum F35.



Gráfica núm.10.- Evolución del pH de la leche al desarrollarse la cepa F47. **F47:**
Lactobacillus plantarum F47.

4.2.2.12. Resultados relativos a la valoración sensorial y al ensayo de fermentación de la leche

Grado de coagulación:

En la Tabla núm.31 se aportan los resultados relativos a la capacidad de las dos cepas seleccionadas de producir la coagulación de la leche, siguiendo los criterios indicados en el apartado 3.2.12 de Material y Métodos.

CEPAS	GRADO DE COAGULACIÓN
<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	2

Tabla núm.31.- Grado de coagulación de la leche fermentada según los catadores.

Aroma:

En la Tabla núm.32, se muestran los resultados aportados por cada catador por lo que se refiera al aroma.

CATADOR	CEPA	AROMA
Catador 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	Agradable
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	Neutro
Catador 2	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	Neutro
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	Neutro

Tabla núm.32.- Características del aroma de la leche fermentada según los catadores.

4.2.2.13. Resultados relativos a evaluar el efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana

Resultados del efecto sobre el bienestar

En la Tabla núm.33, se indican los resultados relativos a la evaluación de los parámetros indicativos del bienestar de los animales a los que se les administraron las cepas *Lactobacillus plantarum* F35 ó *Lactobacillus plantarum* F47, comparando con el lote control.

PARÁMETRO	GRUPO	VALOR
PESO	CONTROL	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	0
COMPORTAMIENTO	CONTROL	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	0
RESPUESTA AL ESÍMULO	CONTROL	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	0
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	0

Tabla núm.33.- Resultados de los efectos de la administración de las cepas seleccionadas sobre el bienestar de los animales.

Resultados de los estudios de translocación bacteriana

En la Tabla núm.34, se resumen los resultados obtenidos en el estudio de translocación bacteriana.

GRUPO	SEXO	ENTEROBACTERIAS TOTALES	BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO	TRANSLOCACIÓN MÁXIMA OBSERVADA UFC/mg
CONTROL	MACHO	0/3	2/3	2
	HEMBRA	0/3	2/3	2
<i>Lactobacillus plantarum F35</i>	MACHO	0/3	1/3	2
	HEMBRA	0/3	2/3	4
<i>Lactobacillus plantarum F47</i>	MACHO	0/3	1/3	4
	HEMBRA	0/3	0/3	0

Tabla núm.34.- Resultados de la translocación bacteriana. Los cocientes expresan el número de animales en los que se observaba translocación de grupo bacteriano estudiado frente al total de animales ensayados para cada grupo.

4.2.2.14. Resultados correspondientes a los ensayos de adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal

Resultados de la adhesión a mucus

En la Tabla núm.35 se expresan los resultados de las pruebas de adhesión a mucus gastrointestinal, según el protocolo indicado en el apartado 3.2.14, de Material y Métodos.

MUESTRA	CEPA	dpm
X	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	1814738
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	1775110
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	5998493
Y	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	79223
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	73497
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	199118
C	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	57742
		59487
		75275
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	89400
		116368
		109712
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	41939
		39359
		28654

Tabla núm.35.- Resultados obtenidos en el estudio de la adhesión de las cepas seleccionadas a mucus gastrointestinal. **X**: dpm de timidina no incorporada por los microorganismos. **Y**: dpm del PBS procedente del lavado de pocillos: microorganismos no adheridos al mucus. **C**: dpm correspondiente a los microorganismos adheridos a mucus. dpm: desintegraciones por minuto.

Resultados de la adhesión a células Caco-2

En la Tabla núm.36 se expresan los resultados de las pruebas de adhesión a las células Caco-2, según el protocolo indicado en el apartado 3.2.14, de Material y Métodos.

MUESTRA	CEPA	dpm
X	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	1637271
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	1538100
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	8620461
Y	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	53334
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	45209
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	380714
C	<i>Lactobacillus plantarum</i> F35	6205
		7047
		6021
	<i>Lactobacillus plantarum</i> F47	2313
		3139
		2227
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	6162
		3103
		2205

Tabla núm.36.- Resultados obtenidos en el estudio de la adhesión de las cepas seleccionadas a células Caco-2. **X**: dpm de timidina no incorporada por los microorganismos. **Y**: dpm del PBS procedente del lavado de pocillos: microorganismos no adheridos a células Caco-2. **C**: dpm correspondiente a los microorganismos adheridos a células Caco-2. dpm: desintegraciones por minuto.

4.2.2.15. Resultados correspondientes al estudio sobre inmunomodulación en humanos

Los resultados obtenidos tras los análisis de sangre y la evaluación del estado general de las personas que intervinieron en el ensayo clínico, pusieron de manifiesto que no se detectan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aquéllos a los que se les administró el placebo y los que recibieron las diferentes dosis del producto ensayado, excepto en el caso del tránsito intestinal, valorado en función del número de defecaciones por semana, parámetro para el que se observa en la Figura núm.9, los resultados obtenidos.

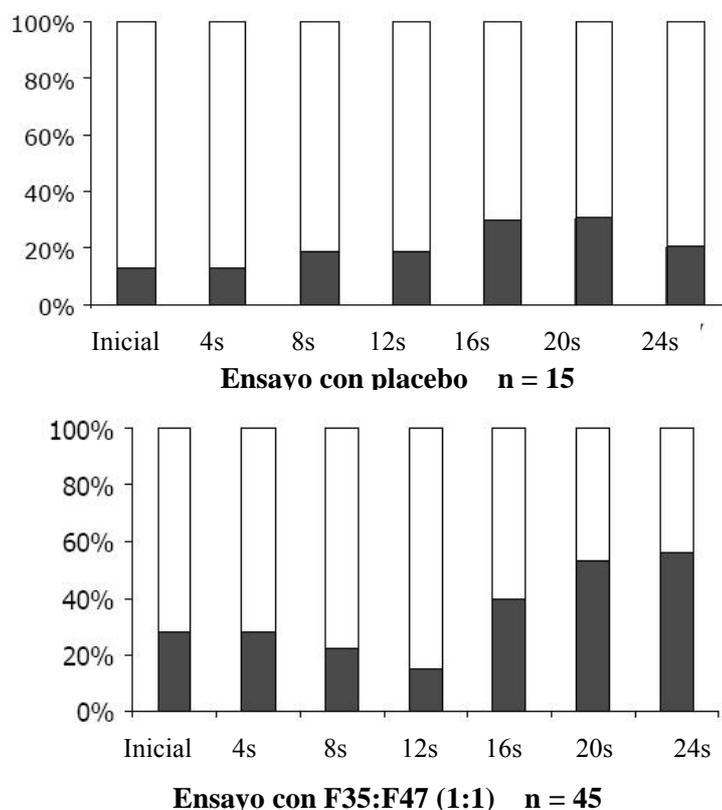


Figura núm.9.- Resultados del estudio de la regulación del tránsito intestinal. La zona sombreada de la barra, indica el número de individuos que efectuaron entre 0 y 3,5 deposiciones por semana, y la parte sombreada los que efectuaron de 3,5 a 7 deposiciones por semana.

En la Tabla núm.37 se muestran los resultados de los ensayos inmunológicos de la administración de la mezcla (1:1) de las cepas *Lactobacillus plantarum* F35 y

Resultados

Lactobacillus plantarum F47 o el producto placebo (leche) al grupo de personas en estudio y su efecto sobre los parámetros indicativos de su respuesta inmunitaria seleccionados, tal como se indica en el apartado 3.2.15 de Material y Métodos.

Tiempo Dosis	Tiempo cero	Semana 12 Final del estudio	Semana 24 Washout	Parámetro inmunológico
Placebo	67,8 (51,9-73,5)	61,0 (59,6-71,8)	64,3 (56,2-69,0)	CD3+
Dosis baja	71,1 (56,5-73,1)	67,7 (56,6-75,6)	64,7 (58,6-73,3)	
Dosis alta	66,8 (59,1-75,6)	71,6 (58,0-76,4)	65,5 (59,5-70,1)	
Placebo	23,8 (20-28,19)	26,7 (18,8-31,5)	23,3 (19,0-29,2)	CD3+CD25+
Dosis baja	17,7 (13,2-23,3)	22,8 (15,1-34,4)	18,2 (15,0-32,6)	
Dosis alta	21,6 (16,0-25,3)	24,3 (15,1-28,2)	19,4 (14,5-23,5)	
Placebo	37,7 (32,3-45,0)	34,1 (27,8-43,3)	37,5* (32,6-40,4)	CD4+
Dosis baja	37,5 (27,4-46,8)	36,1 (30,1-44,9)	36,1 (30,8-45,2)	
Dosis alta	33,9 (22,9-38,8)	30,9 (26,3-37,8)	28,0 (24,9-38,4)	
Placebo	13,9 (10,3-22,4)	14,2 (13,3-26,4)	15,3 (12,4-22,3)	CD4+CD25+
Dosis baja	12,2 (8,9-18)	17,0* (11,1-22,2)	14,3 (10,2-21,9)	
Dosis alta	11,6 (10,6-20,2)	15,4 (11,0-21,3)	14,5 (9,8-20,1)	
Placebo	21,3 (12,2-26,3)	18,5 (12,9-26,2)	21,7 (13,2-28,4)	CD8+
Dosis baja	20,6 (13,3-28,4)	19,1 (12,3-30,4)	19,4 (12,9-30,1)	
Dosis alta	22,2 (17,7-36,4)	24,4 (21,7-36,9)	24,5 (20,9-37,7)	
Placebo	3,3 (1,6-3,8)	3,2 (2,2-4,5)	3,1 (2,5-4,1)	CD8+CD25+
Dosis baja	3,4 (2,2-5,9)	3,7 (2,6-6,3)	3,9 (2,3-4,9)	
Dosis alta	2,9 (2,1-4,6)	3,8* (1,9-6,0)	3,6 (2,4-5,0)	
Placebo	6,3 (6,0-8,3)	6,4 (6,2-10,7)	6,4 (5,9-10,4)	CD19+
Dosis baja	5,9 (4,9-8,4)	6,8* (6,2-9,1)	7,6 (5,4-11,9)	
Dosis alta	6,7 (4,9-7,5)	6,8 (4,8-7,9)	6,7 (4,5-9,9)	

Tabla núm.37.- Resultados de la inmunomodulación.*Las medias de los valores son significativos ($p < 0,05$).

Tiempo Dosis	Tiempo cero	Semana 12 Final del estudio	Semana 24 Washout	Parámetro inmunológico
Placebo	19,1 (10,3-33,6)	18,4 (14,3-27,1)	18,4 (15,5-26,9)	CD56+
Dosis baja	17,2 (11,4-25,5)	19,5 (11,4-27,9)	15,2 (14,4-26,9)	
Dosis alta	16,4 (10,4-24,4)	19,8* (10,4-32,8)	18,0 (12,5-23,5)	
Placebo	6,8 (6,3-8,3)	6,1 (5,8-7,4)	7,3 (5,9-8,6)	HLA-DR+
Dosis baja	6,5 (6,2-9,3)	7,5* (6,9-9,2)	7,5 (5,4-9,7)	
Dosis alta	6,1 (5,6-7,1)	6,3 (5,6-7,0)	6,0 (5,0-6,9)	
Placebo	16,5 (5,2-23,0)	14,1 (3,8-19,1)	10,2 (6,6-17,2)	TGF-β
Dosis baja	25,9 (15,7-31,2)	12,5* (7,2-22,6)	8,2 (6,9-15,3)	
Dosis alta	24,0 (10,4-30,1)	10,2* (5,8-16,7)	8,4 (6,4-12,9)	

Continuación Tabla núm.37.- Resultados de la inmunomodulación.*Las medias de los valores son significativos ($p < 0,05$).

Resultados referentes a la población de leucocitos

Los leucocitos T (CD4+ y CD8+) muestran un incremento en cuanto a número, este aumento implica un aumento de actividad por parte de estas células y por tanto, también un aumento de la expresión del CD25+ como se observa en la Tabla núm.37.

Los linfocitos B (CD19+) y las NK (CD19+) se ven aumentadas en número, y también la presentación del antígeno HLA-DR+ como se observa en la Tabla núm.37.

Resultados referentes al análisis plasmático de las citocinas IL-1 e IL-10

No se detectan diferencias entre los niveles de estas dos citocinas pro-inflamatorias, hecho que indica que la población evaluada no presentaba ningún tipo de afección.

Resultados referentes a la detección y cuantificación de TGF-β

Se detectan niveles menores de la citocina TGF-β en los grupos administrados con la mezcla (1:1) de las cepas *Lactobacillus plantarum* F35 y *Lactobacillus plantarum* F47, como se observa en la Tabla núm.37.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y A LA OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

5.1.1. **Discusión de los resultados de las encuestas realizadas**

A partir de los datos recopilados en las encuestas cumplimentadas por las familias, podemos indicar que un 18,4% de los niños de los que se obtuvieron muestras presentaron algún proceso clínico, como puede observarse en la Tabla núm.18.

Los procesos indicados fueron fundamentalmente de tipo respiratorio y sólo en tres de los niños se mencionó una alteración de tipo intestinal. Indicaremos asimismo que en uno de los niños con sintomatología, no se precisó el tipo de afección, aunque se sometió a tratamiento antibiótico. De los nueve niños con algún tipo de sintomatología, el 66,7% recibieron tratamiento antibiótico y al resto se les administró un broncodilatador, antitérmicos o bien infusiones de productos naturales, principalmente manzanilla.

A pesar de hallarse en tratamiento se decidió no eliminar ninguna de las muestras obtenidas, con el fin de determinar, en estos casos, la posible influencia del mismo sobre el aislamiento de cepas del género *Lactobacillus*, objeto fundamental de nuestro estudio (Bartosch *et al.*, 2004).

Asimismo debemos indicar que si bien el objetivo fundamental de la Tesis doctoral ha sido la detección de cepas de *Lactobacillus* con probable actividad como probióticos, el hecho de disponer de un tipo de muestras de difícil obtención, determinó que también se analizara la posible presencia de otros grupos bacterianos de interés en futuras investigaciones, en relación con este tema podemos indicar que se aislaron cepas del género *Streptococcus* que han demostrado una marcada capacidad de producción de bacteriocinas con posible aplicación en procesos que afectan a la cavidad bucal.

La alimentación de los niños de los que se obtuvieron las muestras, era fundamentalmente de tipo natural, constituida por leche materna o de vaca (evaporada o no). Los niños que recibieron otra alimentación, se basaba en productos de avena, patatas, arroz y legumbres. En algunos casos los niños se alimentaban también de productos específicos del país y con una tradición de consumo ancestral en Perú y países limítrofes, como son el chuño (patata fermentada), la chufla (harina de maíz) o la quinua (semilla de *Chenopodium quinoa*), todos ellos de alto valor nutricional.

Entre los niños de las diferentes poblaciones de Perú evaluadas no se observan marcadas diferencias en el tipo de alimentación que reciben.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AL AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS

5.2.1. Discusión de los resultados de los crecimientos en los medios de cultivo específico, posteriormente al pre-enriquecimiento y siembra en placa

A partir de la mayor parte de las muestras analizadas se aislaron cepas compatibles con BAL, en las condiciones siguientes:

- MRS a pH 6,4, en un ambiente de incubación con un 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C: 96% de las muestras.
- M17, en un ambiente de incubación con un 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C: 100% de las muestras.
- TSA, en un ambiente de incubación en aerobiosis a una temperatura de 37 °C: 100% de las muestras.

Por el contrario, menos del 10% de las muestras analizadas, presentaron desarrollos bacterianos compatibles con BAL, en los siguientes medios de cultivo y condiciones de aislamiento:

- LUSM+TTC, ambiente de incubación con un 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C.
- MRS + HCl al 0,05% (p/v), 100 µg/L de novobiocina + 10 µg/mL de vancomicina + 1mg/L de ampicilina + 50.000 U/L de nistatina en un ambiente de incubación con un 5% de CO₂ a 37 °C.

En el 34% de las muestras en las que se aislaron cepas compatibles con *Lactobacillus* en las placas de MRS a pH 6,4, incubadas en una atmósfera con un 5%CO₂, también se observó crecimiento en las alícuotas sembradas en las placas de los medios constituidos por agar Rogosa adicionado con 4 ó 64 µg/mL de vancomicina (R4 y R64, respectivamente de la Tabla núm.19) en las mismas condiciones de incubación.

De la muestra obtenida del niño al que se le asignó el número cinco y que se caracteriza por ser un niño de un mes de edad, natural de Virú (La Libertad), se aislaron cepas compatibles con *Lactobacillus*, a partir de cinco de los doce medios de cultivo en los que se sembraron alícuotas. Se aislaron un total de diez cepas de las cuales, cinco se desarrollaron en aerobiosis y las otras cinco en microaerofilia.

En el caso de la muestra del niño con el número siete, se aislaron cepas a partir de nueve de los doce medios de cultivo. Nueve de las cepas presentaban respiración aeróbica y cinco manifestaban un óptimo desarrollo en microaerofilia (5% CO₂). Se trata de un niño de cinco meses de edad, natural de la población de California (Ancash).

A partir de la muestra de heces obtenida del niño con el número ocho, de diez meses de edad y de la población de California (Ancash), se aislaron el 5% del total de las cepas aisladas, aunque ninguna de ellas, fue seleccionada posteriormente como probable probiótico, debido que los resultados obtenidos en las diversas pruebas realizadas no cumplían con los criterios de selección establecidos.

Otros niños de los que se aislaron un número elevado de cepas, igual o superior a diez, fueron los que corresponden a los números de muestra: diez, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, veinte, veintisiete y treinta. A partir de ellos se aislaron el 27,16% del total de las cepas, si no tenemos en cuenta los dos niños de los que se obtuvieron el número más elevado de cepas (niños números cinco y ocho).

Los niños en los que se encontró un mayor número de cepas se alimentaban mayoritariamente de leche (tanto evaporada como de vaca o materna) y de avena.

Tras la pre-incubación y siembra de las muestras en los diversos medios de cultivo citados en la Tabla núm.19, se aislaron un total de trescientas treinta y cinco cepas a partir de las cuarenta y nueve muestras de heces de niños.

5.2.2. Discusión de los resultados correspondientes a la selección de las posibles cepas de *Lactobacillus* spp.

5.2.2.1. Discusión de los resultados correspondientes a las características morfológicas de las cepas y la prueba de la catalasa

Las colonias seleccionadas son de color blanco y carecen de pigmentos. Presentan un aspecto circular, una ligera elevación, son convexas, opacas y con márgenes enteros, coincidiendo con la descripción del género indicada por Kandler y Weiss, en 1992.

Realizada la tinción de Gram se pudo determinar que el 53,13% de las cepas seleccionadas eran bacilos Gram positivos de tamaño variable aislados o en cadenas, características propias de cepas del género *Lactobacillus*.

La tinción de esporas, aplicada a las cepas seleccionadas, permitió evidenciar que el 86,52% de las cepas seleccionadas eran bacilos no formadores de esporas, y que cumplían las premisas pre-establecidas para ser elegidas y proseguir con ellas el proceso de investigación.

El porcentaje de cepas seleccionadas del total de cepas aisladas de las muestras de heces de niños, es superior al indicado en el año 2007 por Adelantado, en su investigación llevada a cabo para el aislamiento de cepas con capacidad probiótica a partir de heces de vacas. Este autor destacó que de las treinta muestras de heces de vaca analizadas, aisló noventa y siete cepas. De ellas sólo veintiocho cepas que corresponde al 28,87%, eran bacilos Gram positivos no esporulados. En el caso de las heces de niños, el número de cepas que cumplían con este pre-requisito fue de ciento cincuenta y cuatro, constituyendo el 86,52% del total de cepas presuntivas aisladas.

5.2.2.2. Discusión de los resultados correspondientes a la prueba de la catalasa

Todas las cepas seleccionadas hasta este punto presentan una actividad catalasa negativa, característica de este género, citada por Kandler y Weiss, en 1992.

5.2.2.3. Discusión de los resultados correspondientes a la evaluación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica, se relaciona con la posible patogenicidad de las cepas ya que demuestra la presencia de antígenos somáticos y/o flagelares capaces de destruir los eritrocitos. En consecuencia las cepas potencialmente probióticas no deben presentar capacidad hemolítica (Pineda de Mora y Rodriguez Lemoine, 1990).

Tras la siembra en placa de agar Columbia con un 5% de sangre de cordero se determinó que el 33,12% de las cepas seleccionadas eran γ -hemolíticas, es decir que no eran hemolíticas y en consecuencia susceptibles de ser consideradas candidatas a probióticos de aplicación industrial, por lo que a este parámetro se refiere.

5.2.2.4. Discusión de los resultados de la identificación de las cepas seleccionadas

Las cepas del género *Lactobacillus* presentan particularidades para cada especie respecto a diversos requerimientos nutricionales, entre los que destacan los carbohidratos fermentables (Samaniego y Sosa del Castillo, 2000).

En este hecho se basan los principales métodos bioquímicos y fisiológicos que permiten identificar a las cepas, entre los que destaca el sistema API50CHL[®], seleccionado en nuestro caso para la identificación de las cepas en estudio.

A partir de las cepas seleccionadas, en base a los criterios fijados en los anteriores ensayos, de un total del 33,11% de las cepas aisladas inicialmente de las muestras de heces, se procedió a la identificación de las mismas por el sistema API50CHL[®].

A tenor de los resultados obtenidos, se confirmó que todas las cepas elegidas pertenecían al género *Lactobacillus* y la distribución taxonómica por especies fue la siguiente:

Lactobacillus acidophilus 29,51%; *Lactobacillus plantarum* 27,45%; *Lactobacillus rhamnosus* 17,65%; *Lactobacillus fermentum* 11,76%; *Lactobacillus buchnerii* 5,88%; *Lactobacillus jensenii* 3,92% y *Lactobacillus delbrueckii* 3,92%.

Entre las especies identificadas, podemos citar que diversas cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Gilliand *et al.*, 1980; Gilliand *et al.*, 1984; Gilliand *et al.*, 1985; Coconnier *et al.*, 1993; Bernet *et al.*, 1994; Coconnier *et al.*, 1994; Hosada *et al.*, 1996; Šuškovci *et al.*, 1997; Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Kos *et al.*, 2003), *Lactobacillus plantarum* (Filya, 2003; De Vries *et al.*, 2006), *Lactobacillus rhamnosus* (Alander, 1999; Gardiner *et al.*, 2001; Sheih 2001), *Lactobacillus fermentum* (Gardiner *et al.*, 2001; Adesogan *et al.*, 2003), *Lactobacillus buchnerii* (Adesogan *et al.*, 2003; Filya 2003; Kung *et al.*, 2003; Filya *et al.*, 2006), *Lactobacillus jensenii* (Donnet-Hughes *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2008) y *Lactobacillus delbrueckii* (Nagafuchi *et al.*, 1999) han sido descritas y registradas como probióticos y se utilizan en la actualidad tanto en alimentación humana como animal.

5.2.2.5. Discusión de los resultados de la evaluación de la resistencia de las BAL seleccionadas a las condiciones gastrointestinales

Para evaluar la resistencia de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas al tracto gastrointestinal de los mamíferos, se realizaron ensayos específicos que permitieron

cuantificar la supervivencia de las mismas, tras el tratamiento con lisozima, sales biliares, peróxido de hidrógeno y pH ácido.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar las cepas con mayor capacidad probiótica y que cumplieran los requisitos exigidos en las *Guidelines for the evaluation of probiotics in Food* (2002).

Los resultados de la resistencia de las cepas a cada una de las condiciones ensayadas se evaluaron independientemente a partir de las lecturas ópticas de las densidades de crecimiento obtenidas, comparándolas con un control específico para cada ensayo.

Por este motivo es imprescindible disponer de controles tanto del medio de cultivo sin desarrollo bacteriano alguno, como también del medio de cultivo adicionado con los reactivos para cada una de las pruebas.

Los resultados obtenidos se recalcularon en función de los valores hallados en el caso de los controles específicos para cada parámetro valorado.

A partir de la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales se determinó que el 82,35% de las cepas seleccionadas, cumplieran con los criterios para estos parámetros, dado que las tres cepas de *Lactobacillus büchnerii*, las seis cepas de *Lactobacillus fermentum* y las dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii* aisladas, superaron este pre-requisito, al igual que el 50% de las cepas de *Lactobacillus jensenii*. En relación con las cepas de *Lactobacillus plantarum*, el 85,71% presentaron resistencia a las condiciones gastrointestinales evaluadas, así como el 77,70% de las cepas identificadas como *Lactobacillus rhamnosus* y también el 73,33% de las cepas de *Lactobacillus acidophilus*.

Fujisawa *et al.*, en 1992, indicaron a partir de los estudios realizados que las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri*, provocan un adecuado efecto probiótico en el intestino humano dado que son capaces de resistir las condiciones de este microhábitat. Estos resultados coinciden parcialmente con los resultados obtenidos en nuestro estudio por lo que a las cepas de *Lactobacillus acidophilus* se refiere, evaluadas en ambas investigaciones.

5.2.2.6. Discusión de los resultados correspondientes a las propiedades antibacterianas

Una de las características que facilitó la selección de cepas que puedan definirse como potenciales probióticas, es su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables en el organismo. En este sentido se llevó a cabo un estudio con el fin de evidenciar la posible capacidad inhibidora de las cepas aisladas de las heces de los niños y que cumplía con los requisitos de selección pre-establecidos.

Para superar esta nueva fase de selección de cepas, el criterio seguido implicó que como mínimo las cepas fueran activas frente a seis o más de los microorganismos ante los que se comprueba su capacidad de inhibición.

Entre los metabolitos o sustancias elaboradas por las BAL con capacidad antimicrobiana, se citan en la bibliografía a las siguientes: nicinas, bacteriocinas, acidofilinas y toxinas (Gedek, 1974; 1975; 1980; 1981; Polonelli y Morace, 1986). Estos productos son activos frente a una amplia gama de bacterias y levaduras.

Silva *et al.*, en 1987, Davidson y Hoover en 1993 y posteriormente Saxalin en 1997, demostraron la capacidad de determinadas cepas de *Lactobacillus* de inhibir el desarrollo de otros microorganismos, destacando su efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp. y *Bifidobacterium* spp.

Los metabolitos implicados en esta actividad inhibidora no son activos frente a cepas de *Lactobacillus* diferentes de las productoras.

El efecto antimicrobiano de determinadas cepas de *Lactobacillus*, tiene una destacada aplicación en los procesos de bioconservación tal como señalaron Hurst en 1973; Holzapfel *et al.*, 1996; Stiles 1996; Samaniego y Sosa en el año 2000, y Soomro *et al.*, 2002, indicando asimismo que productos como la nicina, elaborada por cepas de BAL

es capaz de mantener en condiciones microbiológicas controladas a los alimentos, fundamentalmente por su acción inhibidora sobre *Staphylococcus aureus* o por controlar la formación de gas por parte de cepas del género *Clostridium*.

Entre las especies de *Lactobacillus* que desempeñan un papel fundamental en los procesos de bioconservación podemos citar las cepas de *Lactobacillus plantarum*, de las que se menciona su actividad inhibidora frente a cepas de *Enterobacteriaceae* y frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (Ashenafi y Busse, 1989; Bengmarl, 1997), coincidiendo los resultados frente a determinados géneros de *Enterobacteriaceae* con los obtenidos a lo largo de nuestra investigación.

El hecho de que las cepas sean productoras de sustancias antimicrobianas, determina un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *Escherichia coli* y *Campylobacter* spp., pudiendo contribuir a la reducción de las mismas de forma notable, como menciona Gagnon *et al.*, en el año 2004.

A tenor de los resultados, podemos indicar que de las cuarenta y dos cepas que habían superado los anteriores criterios de selección, solamente dos que representa el 4,76% de las cepas, cumplen con el criterio de selección para este ensayo.

Las cepas seleccionadas y con las que se llevaron a cabo los ensayos restantes han sido:

***Lactobacillus plantarum* F35**

***Lactobacillus plantarum* F47**

Así mismo se realizaron ensayos con la cepa control cuando fue preciso:

***Lactobacillus rhamnosus* GG**

5.2.2.7. Discusión de los resultados de la evaluación de la resistencia a antibióticos

La capacidad que manifiestan determinadas cepas bacterianas de ser resistentes a los antibióticos, es un criterio determinante y restrictivo para su elección como posibles probióticos.

Las cepas que pueden ser consideradas como probióticos no deben manifestar resistencia al grupo de antibióticos indicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria.

En relación con las dos cepas seleccionadas por cumplir todos los criterios exigidos, podemos indicar que son sensibles a todos los antibióticos ensayados.

En todos los ensayos control se obtuvieron desarrollos de las dos cepas, así como de la cepa control: *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Estos resultados coinciden con los aportados en la definición del género *Lactobacillus* en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, indicada por Kandler y Weiss, en 1992, en la que destacan que las cepas de *Lactobacillus* son sensibles a la mayoría de antibióticos de elección en terapéutica humana y veterinaria, ante procesos cuyo agente etiológico sean bacterias Gram positivas.

5.2.2.8. Discusión de los resultados correspondientes al proceso de liofilización y a los ensayos de recuperación de las cepas seleccionadas.

Con el fin de mantener las cepas seleccionadas, se procedió a aplicar el proceso de liofilización. Uno de los problemas del sistema de conservación de cepas, puede centrarse en la pérdida de viabilidad de las mismas o en la reducción de su concentración, tras el proceso de liofilización. En este sentido se procedió a comprobar

la concentración de cada una de las cepas, tras el proceso de liofilización, comparándola con la concentración inicial de las mismas.

El estudio de viabilidad de las cepas se llevó a cabo a los siete y a los catorce días del proceso de liofilización.

Se evaluó asimismo, la posible influencia de la temperatura de almacenamiento (4 °C o temperatura ambiente) de los viales liofilizados en la viabilidad de las cepas seleccionadas.

Los resultados obtenidos se aportan en la Tabla núm.28 y en ella se pone manifiesto que las dos cepas seleccionadas y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG no ven afectada su viabilidad de forma significativa después del proceso de liofilización y que las temperaturas de almacenamiento ensayadas no son un factor limitante en el mantenimiento de la viabilidad de las mismas. A partir de estos resultados, podemos indicar que el proceso de liofilización de las cepas de *Lactobacillus*, utilizando como medio crioprotector el constituido por leche en polvo semidesnatada al 15% (p/v en PBS) y sacarosa al 4% (p/v en PBS), es un método recomendable para la conservación de las cepas de posterior aplicación industrial.

5.2.2.9. Discusión de los resultados correspondientes a la identificación de las cepas seleccionadas, por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Los resultados obtenidos tras el proceso de identificación de las dos cepas seleccionadas por la técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), demostraron que las cepas F35 y F47 presentaban un 98% y 99% de identidad con la cepa *Lactobacillus plantarum* WCFS1 respectivamente, como puede observarse en las Figuras núms.6 y 7.

Asimismo, podemos indicar que los resultados obtenidos con las dos enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I ensayados, fueron similares para las dos cepas, como puede observarse en Figura núm.8.

El patrón obtenido para la cepa *Lactobacillus plantarum* 299v presenta marcadas diferencias con los patrones detectados en las cepas seleccionadas F35 y F47.

Podemos destacar que los patrones obtenidos para las dos cepas (F35 y F47), difieren en la posición de las bandas en el caso del estudio realizado con el enzima de restricción Sfi-I y en el caso del enzima de restricción Sma-I. La cepa F47 muestra una banda adicional, respecto a la cepa F35, como puede observarse en la Figura núm.8.

Sánchez *et al.*, 2004, describieron que las cepas de *Lactobacillus plantarum* presentan una elevada heterogeneidad, por lo que las diferencias detectadas entre las cepas e incluso con el control pueden ser debidas a este fenómeno.

Finalmente podemos señalar que aplicando los criterios aportados por Tenover *et al.*, 1995, las cepas F35 y F47, están muy relacionadas, por lo que podemos indicar que podrían provenir del mismo clon.

Establecida la especie a la que pertenecen las dos cepas de *Lactobacillus* seleccionadas y dado su origen específico, las cepas fueron remitidas a la Colección Española de Cultivos Tipo.

Siguiendo los criterios indicados a nivel internacional y tras comprobar que se trataba de dos cultivos axénicos, quedaron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo, con las siguientes referencias:

Cepa F35: *Lactobacillus plantarum* CECT 7315

Cepa F47: *Lactobacillus plantarum* CECT 7316

5.2.2.10. Discusión de los resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en medio de cultivo líquido

La cinética de crecimiento de las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316 en medio de cultivo (caldo MRS), puso de manifiesto que a partir de las seis horas de iniciado el ensayo, los cultivos entran en fase de meseta y se mantienen en ella hasta el final del estudio (15 horas), tal como se observa en la Tabla núm.29 y en las Gráficas núms.1 y 2.

Asimismo se observó una disminución del pH, sin duda directamente relacionada con la presencia de un mayor número de BAL en el medio de cultivo.

En cuanto a la evolución del peso seco, expresado en gramos para cada una de las dos cepas en estudio, podemos indicar que en ambas cepas, se siguió un patrón semejante a las respectivas curvas de crecimiento.

En el estudio de la cinética de crecimiento de cepas de *Lactobacillus*, realizado por Adelantado en 2007, destaca que las tres cepas de *Lactobacillus* seleccionadas, por su capacidad como posibles probióticos de aplicación industrial, pueden multiplicarse rápidamente en caldo MRS, alcanzado la fase estacionaria aproximadamente a las nueve horas posteriores de haberse iniciado el ensayo, es decir unas tres horas después de las cepas seleccionadas para nuestro caso.

5.2.2.11. Discusión de los resultados correspondientes a la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas en leche

Una de las posibles aplicaciones de las BAL seleccionadas es adicionarlas a leche con el propósito de obtener un producto de fermentación de la misma.

En este sentido es fundamental establecer las cinéticas de crecimiento de las dos cepas seleccionadas: *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 (F35) y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316 (F47) en leche.

Utilizando la leche como sustrato para el desarrollo de las cepas, como se observa en las Figuras núms.7 y 8 las cepas siguen una curva de crecimiento semejante en los dos casos. Las dos cepas de *Lactobacillus*, tras un período de adaptación que oscilaba entre ocho y nueve horas posteriores al inicio de la curva de ensayo, manifestaron un incremento en forma exponencial que se cifró en tres unidades logarítmicas a las veinticuatro horas de iniciado el cultivo. A diferencia del desarrollo en caldo MRS, ninguna de las dos cepas alcanzó la fase de meseta a las seis horas de cultivo y podemos indicar que a las veinticuatro horas de iniciado el cultivo no habían alcanzado la fase de meseta.

En relación con los cambios de pH en la leche, podemos indicar que en las cepas se mantiene en valores semejantes y en ningún caso desciende de seis a lo largo de todo el período de duración del ensayo.

5.2.2.12. Discusión de los resultados relativos a la valoración sensorial y al ensayo de fermentación de la leche

Otros aspectos a considerar tras la adición de cepas seleccionadas a la leche para producir productos derivados de la misma, son los posibles cambios organolépticos y/o en la textura de la leche que pudieran producirse a lo largo del proceso de fermentación.

Los resultados, obtenidos en nuestros estudios, demostraron que las dos cepas seleccionadas, son capaces de fermentar adecuadamente la leche sin desencadenar la formación de aromas inapropiados o indeseables tal como se indica en las Tablas núms.31 y 32, por lo que las características que adquiere la leche tras el desarrollo de cualquiera de las dos cepas inoculadas son aceptables para su aplicación industrial.

5.2.2.13.Discusión de los resultados relativos a evaluar el efecto de la administración de las cepas seleccionadas en el bienestar de ratas y ensayos de translocación bacteriana

Evaluado el efecto de la administración de los dos probióticos, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.13, podemos destacar que no se observaron efectos negativos ni en el comportamiento ni en el bienestar de las dieciocho ratas *Winstar* de 9 semanas (machos y hembras), a lo largo de todo el estudio realizado con el fin de establecer la posible toxicidad aguda, derivada del consumo del producto realizado.

Siguiendo la clasificación indicada en la Tabla núm.16, se consideró que los parámetros: peso, comportamiento y respuesta al estímulo, fueron normales en todos los animales y el valor final del estudio fue de cero, para la media de los animales frente a las dos cepas, evidenciando que no producen efectos negativos.

Asimismo podemos destacar que la administración oral de las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, no determinó un incremento a nivel basal de BAL en los ganglios mesentéricos de las ratas evaluadas y tampoco facilitó la translocación de cepas de *Enterobacteriaceae*, como se deduce de los datos aportados en la Tabla núm.34.

5.2.2.14.Discusión de los resultados correspondientes a los ensayos de adhesión a células epiteliales del tracto gastrointestinal

Las dos cepas seleccionadas: *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, presentaron una marcada capacidad de adhesión al mucus intestinal superior a la manifestó la cepa control *Lactobacillus rhamnosus* GG, en las

mismas condiciones de ensayo, según puede deducirse de los resultados aportados en la Tabla núm.35.

En la Tabla núm.35 se aportan los valores de desintegraciones por minuto (indicador que pone en evidencia los microorganismos capaces de adherirse a mucus), relativas a las dos cepas. Estos valores permitieron evidenciar que en el caso de las pruebas de adhesión a mucus, las dpm alcanzaron valores medios del orden de 64.168 dpm en el caso de la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y de 105.160 dpm, en la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, frente a las 36.650 dpm que se detectaron en el caso de la cepa control (*Lactobacillus rhamnosus* GG), en consecuencia la capacidad de adhesión de las cepas seleccionadas al mucus intestinal es de 1,75 y 2,87 veces superior respectivamente a la cepa considerada control.

En el caso de la adhesión a células Caco-2, los resultados que se indican en la Tabla núm.36, permiten diferenciar la capacidad de las cepas estudiadas. *Lactobacillus plantarum* CECT 7315, posee mayor capacidad de adhesión a este tipo de células que *Lactobacillus rhamnosus* GG, ya que la media de dpm, para la cepa seleccionada era del orden de 6.424, frente a los 3.859 dpm que corresponden a la cepa control. Estos valores indicaron que *Lactobacillus plantarum* CECT 7315, es capaz de adherirse 1,7 veces más que la cepa control, en tanto que *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, manifiesta un menor grado de adherencia las células Caco-2 ya que sólo se detectaron 2.560 dpm por término medio, representado el 0,7 veces menos de la capacidad de adherencia de la cepa control.

En consecuencia podemos indicar que administrar una mezcla de las dos cepas puede determinar un grado de adhesión notable y que facilita el desplazamiento de bacterias patógenas o no deseables a nivel del tracto intestinal de los individuos.

A la vista de estos resultados se planteó el ensayo sobre inmunomodulación en humanos, administrando una mezcla en la proporción 1:1 de las dos cepas seleccionadas a lo largo del estudio.

5.2.2.15. Discusión de los resultados correspondientes al estudio sobre inmunomodulación en humanos

En relación con los resultados obtenidos en el estudio en humanos, podemos indicar que la administración conjunta de las dos cepas: *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, determina una completa activación del sistema inmunitario, como se puede observar en los resultados aportados en la Tabla núm.37, de las que podemos destacar que:

- Las células CD4+ y CD8+ muestran una actividad inmunomoduladora como queda demostrado por la expresión de las CD25+, la activación del sistema inmunitario determina un aumento en los niveles de linfocitos T.
- Los leucocitos que contribuyen a la inmunidad innata linfocitos B (CD19+) y las células *Natural Killer* (CD59+) muestran un incremento en número y en concentración de antígeno que presentan, no es necesario secretar citocinas inmunoreguladoras. Se estimula la presentación del antígeno HLA-DR+ en las células.
- La liberación de citocinas (TGF- β) disminuye, evitando así la respuesta pro-inflamatoria.

Si consideramos todos los resultados obtenidos de forma global, podemos destacar que la inmunidad celular se recupera y ello puede ser indicio de que la regulación inmunitaria se modifica, inicialmente desde un nivel más inespecífico mediado por citocinas, hacia un nivel más específico de tipo celular.

En otro orden de ideas podemos indicar que se observó que en los individuos que recibieron una dieta suplementada con el preparado que incluyó las dos cepas de probióticos, se incrementó la frecuencia en sus deposiciones, como se indica en la Figura núm. 8, por lo que podemos destacar que las cepas seleccionadas manifiestan un efecto regulador en el tránsito intestinal.

Los resultados obtenidos permitieron corroborar que la administración de las cepas seleccionadas como probióticos, estimulan la actividad de los órganos linfoides asociados al tracto intestinal, coincidiendo con los resultados aportados en sus

investigaciones Coconnier *et al.*, 1993; Perdigon *et al.*, 1995; Schiffrin *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1996; Matsuzaki y Chin, 2000; Sheih *et al.*, 2001; Liong, 2007.

Finalmente y a tenor de los resultados obtenidos, podemos considerar que las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, estimulan el efecto barrera y por tanto pueden prevenir la invasión de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal.

A diferencia de los datos indicados por De Vries *et al.*, en el año 2006, se ha podido determinar la habilidad de estas dos cepas de modular la inmunidad en ancianos y por tanto pueden ser utilizadas con éxito como inmunomoduladores en esta etapa de la vida.

5.2.2.16. Características generales de las cepas seleccionadas

Lactobacillus plantarum CECT 7315 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7316, fueron aisladas de los niños a los que se adjudicaron los números cinco y siete respectivamente, y que como hemos indicado, se alimentaban con leche de materna y leche de vaca respectivamente.

Las cepas seleccionadas se desarrollaron en MRS a pH 6,4 y en condiciones de atmósfera del 5% de CO₂ a una temperatura de 37 °C, durante 24-48 horas.

Las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de heces, son aptas como potenciales probióticos, ya que cumplen todos los requisitos pre-establecidos:

- Tienen un crecimiento eficiente que permite su producción a nivel industrial. Su producción es económicamente viable.
- Son capaces de fermentar leche para formar yogur y no presentan aromas desagradables.
- Son capaces de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (lisozima, entorno ácido, sales biliares y peróxido de oxígeno).
- Se adhieren al epitelio intestinal, hecho que permite menos transición de estas en el tracto gastrointestinal y provoca efectos probióticos.
- No tienen efectos negativos en el comportamiento de animales que han ingerido las cepas ni en su bienestar.
- Manifiestan un adecuado nivel adecuado de seguridad ya que no se manifiesta un incremento en la translocación en el caso de BAL y no facilitan la translocación de cepas de *Enterobacteriaceae*.
- Tienen un efecto positivo en la microbiota intestinal, como resultado de la inhibición de algunas cepas no deseables.
- Tienen efecto inmunomodulador, a tenor de los resultados obtenidos en la evaluación de los factores inmunológicos estudiados.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1.- Entre los medios de cultivo ensayados para el aislamiento de *Lactobacillus* a partir de las heces analizadas, el de elección es MRS pH 6,4.

2.- Los resultados obtenidos a partir de la detección de la capacidad hemolítica conjuntamente con la evaluación de la capacidad inhibidora de las cepas frente a microorganismos patógenos, permite seleccionar de forma restrictiva las cepas de *Lactobacillus* con posible aplicación probiótica.

3.- A tenor de los criterios establecidos, sólo dos de las trescientas treinta y cinco cepas aisladas fueron seleccionadas como posibles probióticos y corresponden a F35 y F47.

4.-El estudio taxonómico y genético determinó que las dos cepas seleccionadas (F35 y F47) pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum*.

5.- Las cepas F35 y F47 de *Lactobacillus plantarum* están depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo, con los números 7315 y 7316, respectivamente y constituyen la patente número 07121817.6-1212 con la denominación “Strains of *Lactobacillus plantarum* as probiotics”.

6.- Las dos cepas seleccionadas cumplen todas las exigencias establecidas en nuestro estudio, basadas en las *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* por lo que podemos considerarlas como probióticos de aplicación biotecnológica.

7.- Los resultados relativos a la inmunomodulación determinan que las dos cepas pueden ser utilizadas para mejorar el sistema inmune de los animales y del hombre.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

Aatouri, N. y Lemonnier, D. 1997. Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus*: role of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 8: 25-31.

Adelantado, C. 2007. Proposta de metodologia per l'avaluació del potencial probiòtic de soques de *Lactobacillus* aïllades de substrats naturals i destinades a alimentació animal. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 185 pp.

Adelantado C., Carrión M., Rodríguez M., Guiu N., Shiva C., Arosemena L. y Calvo MA. 2006. Evaluation of the inhibitory activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural sources. Presentació al *20th International ICFMH Symposium food safety and food biotechnology: diversity and global impact*. Bologna (Italia), 29 de agosto al 2 de septiembre de 2006.

Adesogan A.T., Salawu M.B., Ross A.B., Davies D.R. y Brook A.E. 2003. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a Chemical Additive on the Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value of Crimped Wheat Grains. *Journal of Dairy Science*. 86: 1789–1796.

Ahrné S., Lönnemark E., Wold A.E., Åberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegård I.L. , Molin G. y Adlerberth I. 2005 .Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and Infection*. 7: 1256–1262.

Aiba Y., Suzuki N., Kabir A.M.A., Takagi A. y 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. *American Journal of Gastroenterology*. 93: 2097-2101.

- Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T. y Wright A.V.** 1999. Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption. *Applied and Environmental Microbiology*.65 (1):351–354.
- Antony S.J., Stratton Ch.W. y Dummer J.S.** 1996. *Lactobacillus* bacteremia: Description of the clinical course in adult patients without endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*.23 :773-778.
- Apostolou E., Kirjavainen P.V., Saxelin M., Rautelin H., Valtonen V., Salminen S.J. y Ouwehand A.C.** 2001. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31 (1): 35-39.
- Armuzzi A., Cremonini F., Bartolozzi F., Canducci F., Candelli M., Ojetti V., Cammarota G., Anti M., De Lorenzo A., Pola P., Gasbarrini G. y Gasbarrini A.** 2001. The effect of oral administration of *Lactobacillus* LGG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Alimentary Pharmacology Therapy*. 15 (2): 163-169.
- Aso Y., Akaza H., Kotake T., Tsukamoto T., Imai K. y Naito S.** 1995. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrent of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group European. *Urology*.27: 104-109.
- Ashenafi M. y Busse M.** 1989. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on *Salmonella infantis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* during tempeh fermentation. *Journal of Food Protection*. 52: 169-172.

- Axelsson L.** 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En el libro: Lactic Acid Bacteria, microbiological and functional aspects. Third edition, Marcel Dekker Inc. 1-65 pp.
- Balmer S.E. y Wharton B.A.** 1989. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood*.64: 1672-1677.
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T. y McMurdo M.E.T.** 2004.Characterization of bacterial communities in faeces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using Real-Time PCR and effects of antibiotic treatment on the faecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (6): 3575–3581.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. y Turck M.** 1966. Antibiotic susceptibility by standardized single disk method. *American Journal of clinical Pathology*. 45 (4): 493-96.
- Benkerrouym N., Houatwi G., Sandine E. y Tantaoui-Elaraki, A.** 1993. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. *Letters in Applied Microbiology*. 17: 78-81.
- Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R. y Servin A.L.** 1994 .*Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* .35(4):483-489.
- Bezirtzoglou E.** 1997.The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 3: 173–177.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.7(72) :248-254.

- Calvo MA.** 2001. Microorganismos en alimentos funcionales: Aspectos beneficiosos para la salud humana. Discurso de ingreso a la Real Academia de Farmacia de Catalunya 41 pp.
- Campbell A.H.** 1960. Antibiotics in medicine: The search for new antibiotics. *British Medical Bulletin*.16 (1): 82-85.
- Cannon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T, y Danziger L.H.** 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 24:31-40.
- Castellanos M.I., Chauvet A., Deschamps A. y Barreau C.** 1996. PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria. *Current Microbiology*. 33:100-103.
- Castro L.A. y De Rovetto, C.** 2006. Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*. 37 (4): 308-314.
- Casula G. y Cutting S.M.** 2002. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (5):2344.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. y 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. *Journal of Applied Microbiology*.84: 759–768.
- Chukeatirote E.** 2003. Potential use of probiotics. *Songklanakarin Journal of Science Technology*. 25(2): 275-282.
- Coconnier M.H., Bernet M.F., Kerneis S., Chauviere G., Fourniat J. y Servin A.L.** 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*. 110: 299-306.

- Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E. y Servin, A.L.** 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*.64 (11): 4573–4580.
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Bandela A.M., Cardenas E., Garrity G.M. y Tiedje J.M.** 2007. The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*. 35: 169- 172.
- Collado M.C., Meriluoto J. y Salminen S.** 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 454-460.
- Curk M.C., Hubert J.C. y Bringel F.** 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species Related to *Lactobacillus plantarum*.. *International Journal of Systematic Bacteriology*.46: 595-598.
- Delgado S., O’Sullivan E., Fitzgerald G. y Mayo B.** 2007. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *Journal of Food Science*.72 (8): 310-315.
- De Roos N.M. y Katan M.B.** 1988-1998. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Review Articles*. 71(2): 405-411.
- De Roos N.M. y Katan M.B.** 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71: 405-411.
- De Simone C., Bianchi-Salvadori B., Negri M., Ferrazzi M., Baldinelli L. y Veseley R.** 1986. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon

by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutrition Reports International*. 33: 419-433.

Desmazeaud M. 1996. Les bactéries lactiques Dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahier Agricultures*.5: 331-343.

De Vries M.C., Vaughan E.E. Kleerebezem M. y De Vos W.M. 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 16: 1018-1028.

Dickgiesser U., Weiss N., Fritsche D. 1984. *Lactobacillus gasseri* as the cause of septic urinary infection. *Infection*.12 :14-16.

Diplock A.T., Agget P.J, Ashwell M., Bornet F., Fern E.B. y Roberfroid M.B. 1998. Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document (ff-27-de98). Bruselas ISLI Europa.

Dominguez-Bello M.G. y Blaser, M.J. 2008. Do you have a probiotic in your future?. *Microbes and Infection* .10 (9):1072-1076.

Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J.M. y Schiffrin E.J. 1999. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: Effective dose. *Journal of Dairy Science*. 82: 863-869.

Ducluzeau R .1993. Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne du nouveau-né. *Anales de pediatrie*.40 (1): 13-22.

Dunne C., Murphy L., Flynn S., O'Mahony L., O'Halloran S., Feeney M., Morrissey D., Thornton G., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., Quigley E.M.M., O'Sullivan G.C., Shanahan F. y Collins J.K. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 279-292.

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

Erickson KL. y Hubbard N.E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. Symposium: Probiotic Bacteria: implications for human health.10 (suppl.): 403S-409S

Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina.

Fang H., Elina T., Heikki A. y Seppo, S. 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.29: 47-52.

FAO/OMS. 2001. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación 85. 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 del Ácido Láctico.

Felley C.P., Corthesy-Theulaz I., Rivero J.L., Sipponene P., Kaufmann B.P., Wiesel P.H., Brassart D., Pfeifer A., Blum A.L. y Michetti P. 2001. Favourable effect of acidified milk (LC-1) on *Helicobacter* gastritis in man. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 13 (1): 25-29.

Ferrer Lorente B. y Dalmau Serra J. 2001. Alimentos funcionales: probióticos *Acta Pediátrica Española*. 59: 150-155.

- Filya I.** 2003. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*.86: 3575–3581.
- Filya I., Sucu E. y Karabulut A.** 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*. 101 (6): 1216-1223.
- Fuller R.** 1994. Probiotics: an overview. In: Human health: the contribution of microorganisms. New York: Springer-Verlag. 63-73 pp.
- Gagnon M., Kheadr E.E., Gwenaëlle L.B. y Fliss I.** 2004. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*. 92: 69-78.
- Gardiner G., Heinemann C., Madrenas J., Bruce A.W., Beuerman D., Baroja L. y Reid G.** 2001. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 2605-2616.
- Gastón de Iriarte E.** 1975. Técnicas, controles y análisis clínicos. Ed. Augusta.687 pp.
- Gedek B.** 1974. Auswirkungen der Zusammensetzung und Stoffwechsellatigkeit der Darmflora auf Gesundheitszustand des Makroorganismus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 240: 418-423.
- Gedek B.** 1975. Zur Wirkung des Hefepreparates Perentol. *Münchener medizinische Wochenschrift*. 117: 97-98.
- Gedek B.** 1980. Modern growth promoters and bacterial resistance (Moderni promoteri de crescita e resistenza batteriana), Tavola Rotondo di Milano, 11-10-1979, Edizioni Minerva Medica. 103-116 pp.

- Gedek B.** 1981. Factors influencing multiple resistances in enteric bacteria in animals. Proc. AVI Symposium "Ten Years On From SWANN".111-126 pp.
- Gibson G.R., Glenn R. y Macfarlane G.T.** 1995. Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology. Boca Raton, FL: CRC Press.75-100 pp.
- Gill H.S., Cross M.L., Rutherford K.J. y Gopal P.K.** 2001. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. *British Journal of Biomedical Sciences.* 57(2): 94-96.
- Gill H., Rutherford K.J., Cross M.L. y Gopal P.K.** 2001.Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *American Journal of Clinical Nutrition.* 74: 833-839.
- Gilliland S.E., Bruce B.B., Bush L.J. y Stanley T.** 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *Journal of Dairy Science.*63 : 964.
- Gilliland S.E., Staley T.E. y Bush L.J.** 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science.*67: 3045-3051.
- Gilliland S.E., Nelson C.R. y Maxwell C.** 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.*49: 377.
- Gionchetti P., Rizzello F., Venturi A., Brigidi P., Matteuzzi D., Bazzocchi G., Poggioli G., Miglioli M. y Campieri M.** 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic puchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.*119: 305-309.

- Goosems D., Jonkers D., Stobberingh E., Van den Bogaard A., Russel M. Y Stokbrügger R.** 2003. Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* .239 (supl): 15-23.
- Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A., Dias J.A., Casali L.G., Hoesktra H., Kolacek S., Massar K., Micetic-Turk D., Papadopoulou A., De Sousa J.S., Sandhu B., Szajewska H. y Weizman Z.** 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: A multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 30: 50-64.
- Guarner F. y Schaafsma G.J.** 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 39: 237-238.
- Guarner F. y Malagelada J.R.** 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*.360: 512-519.
- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada
- Gupta P., Andrew H., Kirschner B.S. y Guandalini S.** 2000. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.31: 453-457.
- Hatakka K., Mutanen M., Holma R., Saxelin M. y Korpela R.** 2008. *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp shermanii JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids. *Journal of the American College of Nutrition*. 27 (4): 441-447.

- He F., Tuomola E., Arvilommi H. y Salminen, S.** 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 29: 47-52.
- Hilton E., Rindos P. y Isenberg H.D.** 1995. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1433.
- Holdeman L.V., Good I.J. y Moore, W.E.C.** 1976, Human faecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 31 (3): 359-375.
- Holzapel W. H; Geisen R. y Schillinger U.** 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 343-362.
- Holzapel W.H. , Haberer P., Snel J., Schillinger U. y Huis in't Vels J.H.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41 (2): 85-101.
- Hosada M., Hashimoto H., He D., Morita H. y Hosono A.** 1996. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *Journal of Dairy Science*. 79: 745-749.
- Ingolf E., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V. y Holo H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 113-128.
- Ishikawa H., Akedo I., Umesaki Y., Tanaka R., Imaoka A., y Otani, T.** 2002. Randomized Controlled Trial of the Effect of Bifidobacteria-Fermented Milk on Ulcerative Colitis. *Journal of the American College of Nutrition*. 22 (1): 56-63.

- Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H., Luomalat M. y Vesikari, T.** 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*. 13 (3): 310-312.
- Isolauri E., Salminen E. y Salminen, S.** 1998. Lactic acid bacteria and immune modulation. En el libro: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (S. Salminen, A. von Wright y A. Owehand,). 255-268 pp.
- Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E. y Salminen S.** 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy*. 30: 1604-1610.
- Isolauri E., Siitas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H. y Salminen, S.** 2001. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(suppl):444S-450S.
- Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. y Arvilommi H.** 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*. 32: 141-144.
- Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P. y Isolauri E.** 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 357: 1076-1079.
- Kandler O.** 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49: 209-224.
- Kandler O. y Weiss N.** 1992. Regular nonsporng Gram-positive rods. P. 1208-1260. En P. H. A.Sneath, M. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (Editor). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 10th edition, vol. 2. The Williams and Wilkins Co; Baltimore.

- Kaur I.P., Chopra K. y Saini, A.** 2001. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.15: 1-9.
- Kimura K., McCartney A.I., McConell M.A. y Tannock, G.W.** 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacterium and lactobacilli and investigation of immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 : 3394-3398.
- Kirjavainen P.V., Ouwehand A.C., Isolauri E. y Salminen S.J.** 1998.The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*.15 (2):185-189.
- Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F., Broadbent J., Cano R., Chaillou S., Deutscher J., Gasson M., Van de Gutche M., Guzzo J., Hartke A., Hawkins T., Hols P., Hutkins R.W., Kleerebezem M., Kok J., Kuipers O., Lubbers M., Maguin E., McKay L., Mills D., Nauta A., Overbeek R., Pel H., Pridmore D., Saier M., Van Sinderen D., Sorokin A., Steele J., O'Sullivan D., De Vos W., Weimer B., Zagorec M., y Seizen R .**2002.Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 29–58.
- Kos B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. y Matosic, S.** 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 981–987.
- Kung L.Jr., Taylor C.C., Lynch M. P y Neylon J.M.** 2003.The Effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86: 336–343.
- Lee Y.K y Salminen S.** 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 241-245.

- Lei V., Friis H. y Michaelsen K.F.** 2006. Spontaneously fermented millet product as a natural probiotic treatment for diarrhoea in young children: an intervention study in Northern Ghana. *International Journal of Food Microbiology*.110 (3): 246-256.
- Lilly D.M. y Stillwell R.H.** 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*. 147 : 747-748 .
- Link-Amster H., Rochat F., Saudan K., Mignot O. y Aeschlimann J.** 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.10: 55-64.
- Liong M.T.** 2007. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensive, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. *Nutrition reviews*. 65 (7): 316-328.
- Macfarlane G.T., Gibson G.R., Drasar B.S., y Cummings, J.H.** 1995. Metabolic significance of the colonic microflora. *Gastrointestinal and Oesophageal Physiology*.249–274 pp.
- Macfarlane S. y Dillon J.F.** 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1187–1196.
- Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M. y Vesikari T.** 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 20: 333-338.
- Mandigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** 1999. Brock Biología de los Microorganismos. Editorial. Prentice Hall Iberia. 984 pp.
- Marquina D. y Santos A.** 2001. Actualidad SEM. Probióticos, prebióticos y salud. 32: 24-27.

- Marteau P., Minekus M., Havenaar R. y 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 effects of bile. *Journal of Dairy Science*. 80: 1031–1037.
- Martín R., Soberón N., Vaneechoutte M., Flórez A.B., Vázquez F. y Suárez J.E.** 2008.Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *International Microbiology*.11 (4):261-266.
- Mata LJ, Mejicanos ML y Jimenez F.** 1972. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 25: 1380-1390.
- Matsuzaki T.** 1998.Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shiota. *International Journal of Food Microbiology*. 41:133 –140
- Matsuzaki, T. y Chin, J.** 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*. 78: 67-73.
- Mc Donald L.C, Fleming H.P. y Hassan H. M.** 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*.56: 2120-2124.
- Mejía J.A., Chacón Z., Guerrero B., Otoniel J. y López G.** 2006. Obtención de cepas de *Lactobacillus*.Caracterización *in-vitro* como potenciales probióticas. *Revista científica FCV-LUZ*.17 (2): 178-185.
- Meydani S. y Ha W.** 2000.Immunologic effects of yogurt. *American Journal of Clinical Nutrition*.71: 861-872.
- Midolo P.D., Lambert J.R, Hull R., Luo F. y Grayson M.L.** 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*.79: 475-479.

- Mueller S., Saunier K., Hanisch ., Norin E., Alm L., Midtvedt T., Cresci A., Silvi S., Orpianesi C., Verdenelli M.C., Clavel T., Koebnick C., Franz Zunft H-J., Doré J. y Blaut M.** 2006. Differences in faecal microbiota in different european study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2):1027–1033.
- Nagafuchi S., Takahashi T., Yajima T., Kuwata T., Hirayama K. y Itoh K.** 1999. Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 63 (3): 474-479.
- Naidu A.S., Biblack W.R. y Clemens R.A.** 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39: 13-126.
- Ouwehand A.C., Niemi P. y Salminen S.J.** 1999. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*. 177 (1): 35-38.
- Parola P., Maurin M., Alimi Y., Juhan C. y Brouqui P.** 1998. Use of 16S rRNA gene sequencing to identify *Lactobacillus casei* in septicaemia secondary to a paraprostatic enteric fistula. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 17: 203–205.
- Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., Van den Brandt P.A. y Stobberingh E.E.** 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* .118 (2): 511- 521.
- Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G. y Gobbato, N.** 1995. Immune system stimulation by probiotics. *Journal Dairy Science*. 78: 1597–1606.
- Pineda de Mora Y. y Rodriguez Lemoine, V.** 1999. Producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* en cerdos con diarrea. *Veterinaria Tropical*. 15: 87-98.

- Polonelli L. y Morace G.** 1986. Reevaluation of the killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology*. 24: 866-869.
- Pouwels P.H., Leer R.J., Shaw M., den Bak-Glashouwer H., Tielen M.J., Smit F.D., Martinez E., Jore B.J. y Conway P.L.** 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 155–167.
- Raz I., Gollop N., Polak-Charcon S. y Schwartz B.** 2007. Isolation and characterisation of new putative probiotic bacteria from human colonic flora. *British Journal of Nutrition*. 97: 725–734.
- Reid G., Bruce A.W., Fraser N., Heinemann C., Owen J. y Henning B.** 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Microbiology Immunology*. 30: 49-52.
- Reid G. y Burton J.** 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*. 4 (3): 319-324.
- Reid G. y Bokring A.** 2003. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* .189: 1202-1208.
- Reid G.** 2006. Probiotics to prevent the need for and augment the use of, antibiotics. AMMI Canada annual meeting symposium. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 17 (5):291-295.
- Reid G.** 2008. How science will help shape future clinical applications of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 46: 62S–66S.
- Rolfe R.D.** 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal The Probiotic Bacteria: Implications for Human Health. *Journal of Nutrition Health and Aging*. 130: 396-402. Symposium.

- Saavedra J.M., Barman 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. *The Lancet*. 344: 1046-1049.
- Salminen S., Isolauri E. y Salminen, E.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 347-358.
- Salminen S., Isolauri E. y Salminen E.** 1996a. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 5: 53–56.
- Salminen S., Isolauri E. y Salminen, E.** 1996b. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leewenhoek*. 70: 347–358.
- Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson, G.R., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M. y Rowland, I.**1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* . 80 (suppl): 147S -171S.
- Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E. y Mattila-Sandholm T.** 1998. Demonstration of safety of probiotics- a review. *International Journal of Food Microbiology*.44(1-2): 93-106.
- Salminen M.K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M. y Valtonen T.** 2004. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* LGG. *Clinical Infectious Diseases*.38: 62-69.
- Salvana E.M.T. y Frank M.** 2006. *Lactobacillus* endocarditis: case report and review of cases reported since 1992. *Journal of Infection*. 53: 5-10.

- Samaniego L.M. y Sosa del Castillo M .**2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Ed.Universitaria. Cuba. 21 pp.
- Sánchez I., Seseña S. y Palop LL.** 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Journal of Applied Microbiology.* 97: 446-458.
- Sanz Y., Collado M.C. y Dalmau J.** 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española.* 61(9): 476-482.
- Sanz Y., Collado M.C., Haros M. y Dalmau J.** 2004. Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española.*62 (11): 520-526.
- Sarem –Damjerdii L.O., Sarem F., Marchal L. y Nicolas J.P.** 1995. *In vitro* colonization ability of human colon mucosa by exogenous *Lactobacillus* strain. *FEMS Microbiology Letters.*131: 133-137.
- Saxelin M.** 1997. *Lactobacillus GG*: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International.* 13 (2): 293-313.
- Saxelin M., Rautelin H., Salminen S. y Mäkelä P.H.** 1996. The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Clinical Infectious Diseases.* 5(5): 331-335.
- Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschimann J.M. y Donnet-Hughes A.** 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of acid lactic bacteria. *Journal of Dairy Science.* 78: 491-497.

- Schiffrin E.J. y Blum S.** 2001. Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Food Biotechnology* . 12 (5): 499-502.
- Schrezenmeir J. y De Vrese M.** 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl): 361S–364S.
- Sheih Y.H., Chiang B.L., Wang L.H., Chuh L.K. y Gills H.S.** 2001. Systemic immunity-enhancing effect in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of the American College of Nutrition*. 20: 149-156.
- Silvi S., Verdenelli M.C., Orpianesi C. y Cresci A.** 2003. EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Journal of Food Engineering*. 56: 195–200.
- Stiles M.E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Stiles M.E. y Holzapfel W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36(1): 1-29.
- Soomro A.H., Masud T. y Anwaar K.** 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(1): 20-24.
- Spanhaak S., Havenaar R. y Schaafsma G.** 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal Clinical Nutrition*. 12: 899-907.

- Šuškovi J., Brkić B., Matosić S. y Marić V.** 1997. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*. 52: 430-435.
- Szajewska H., Kotowska M., Mrukowicz J.Z., Armanska M. y Mikolajczyk W.** 2001. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. *The Journal of Pediatrics*. 138 (3):361-365.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. y Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2233-2239.
- Thierry A. y Madec M.N.** 1995. Enumeration of propionibacteria in raw milk using a new selective medium. *Lait*. 75 : 315-323.
- Tissier H.** 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Comptes rendus de la Société de Biologie*. 60: 359-361.
- Torriani S., Felis G.E. y Dellaglio F.** 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8): 3450–3454.
- Vanderhoof J.A., Whitney D.B., Antonson D.L., Hanner T.L., Lupo J.V. y Young R.J.** 1999. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *The Journal of Pediatrics*. 135: 564-568.
- Vitiñi E., Alvarez S., Median M., Medici M., Budeguer M. y Perdigon G.** 2000. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell*. 24 (3): 223-232.

Witthuhn R.C., Schoeman T. y Britz T.J. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*. 15: 383–389.

Young J. 1996. A perspective on functional foods. *Food Sciences and Technology*. 10: 18-21.

Young R.J. y Huffmans S. 2003. Probiotic use in children. *Journal Pediatric Health Care*. 17 :277-283.

Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K. y Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 211-217.

ANEXO

ANEXO

A.1.MEDIOS DE CULTIVO PARA EL PRE-ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE HECES

A.1.1. Medio 1

Se prepara medio de cultivo convencional De Man-Rogosa Sharpe Agar (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante y se ajusta el pH a 6,4.

A.1.2. Medio 2

Se prepara medio de cultivo convencional Rogosa Agar (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante y se suplementa con 64 µg/mL de vancomicina.

A.1.3. Medio 3

Se prepara medio de cultivo convencional Rogosa Agar (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante y se suplementa con 4 µg/mL de vancomicina.

A.1.4. Medio 4

Se prepara medio de cultivo convencional de De Man-Rogosa Sharpe (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante y se suplementa con 3 g/100 mL de etanol y 0,5 g/100 mL ciclohexamida.

A.1.5. Medio 5

Se prepara el medio de cultivo M17 (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante.

A.1.6. Medio 6

Es el medio de cultivo LUSM (ANEXO A.1.11) adicionado con TTC (Sigma).

A.1.7. Medio 7

Se prepara el medio de cultivo Triptone Soy Agar (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante.

A.1.8. Medio 8

Al medio de cultivo LUSM (ANEXO A.1.11) se le adiciona 30 µg/mL vancomicina.

A.1.9. Medio 9

Se prepara el medio de cultivo Pal-P (Standa Laboratoires) según las especificaciones del fabricante.

A.1.10. Medio 10

Se prepara el medio de cultivo De Man-Rogosa Sharpe (Liofilchem) según las especificaciones del fabricante y se suplementa con HCl a 0,05% (p/v) ,100 µg/L de novobiocina ,10 µg/mL de vancomicina, 1mg/L de ampicilina y 50.000 U/L de nistatina (Sigma).

A.1.11. Medio de cultivo LUSM

El medio de cultivo basal está constituido por:

- 1,0% de glucosa (Panreac).
- 1,0% de Bacto peptona (Difco).
- 0,5% extracto de levadura (BBL).
- 0,5% extracto de carne (Difco).
- 0,25% extracto de gelatina (Difco).
- 0,5% de lactato de calcio (Sigma).
- 0,05% ácido sórbico (Sigma).
- 75 ppm de ácido sódico (Sigma).
- 0,25% acetato sódico (Sigma).
- 0,1% Tween 80 (Sigma).
- 15% zumo de tomate natural.

El medio basal se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, el pH final debe ser de 5,3 - 5,8. Si el pH es inferior a 5 se ajusta con NaOH a pH 5,5.

Preparación del zumo de tomate:

- Se pican en la batidora, tomates frescos con agua (1:1).
- El zumo de tomate se centrifuga a 8000 rpm durante 15 minutos y se añade directamente sin filtración previa a un recipiente.

Se preparan soluciones en agua de vancomicina (10 mg/mL) y cisteína-HCl (1 g/mL) y en etanol de tetraciclina (5 mg/mL) que se adicionan al medio base, previamente esterilizado. Estas soluciones se esterilizan por filtración (0,22 µm) y se almacenan a temperatura de -20 °C hasta su utilización. La solución de tetraciclina debe protegerse de la luz.

A.2.MEDIO CRIOPROTECTOR UTILIZADO EN EL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

En un volumen concocido de agua destilada con PBS se le añade leche en polvo semidesnatada al 15% (p:v) y sacarosa 4% (p:v).

A.3.SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR

A.3.1. **Tampón de pre-lisis**

Se prepararn 480 µL EDTA 50 mM a pH 8,0 al que se Le añaden 120 µL de lisozima 10 mg/mL.

A.3.2. **Tampón pH 7,6**

Se prepara una solución de Tris 10 mM a pH 7,6 y NaCl 1 M.

A.3.3. **Tampón de lisis I**

Se prepara una solución de Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS 0,5%, 0,2 % de ácido deoxicólico, lisozima 1 mg/mL, mutanolisina 40 U/mL y RNasa 20 µg/mL.

A.3.4. **Tampón de lisis II**

Se prepara una solución de EDTA 0,5 M a pH 9,2, 1% de N-lauril sarcosina y pronasa 1 mg/mL.

A.3.5. **Tampón TRIS EDTA (TE)**

Se prepara una solución de Tris 10 mM con EDTA 1 mM a pH 8,0.