



Universitat de Girona

CARACTERITZACIÓ DE LACTOBACILS D'ORIGEN INTESTINAL I AVALUACIÓ IN VIVO DEL SEU PODER PROBIÒTIC EN POLLASTRES

Mònica PASCUAL CAMPS

ISBN: 978-84-691-2353-9

Dipòsit legal: GI-163-2008

<http://hdl.handle.net/10803/7627>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT DE GIRONA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA I ENGINYERIA QUÍMICA,
AGRÀRIA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIA

**CARACTERITZACIÓ DE LACTOBACILS D'ORÍGEN
INTESTINAL I AVALUACIÓ *IN VIVO* DEL SEU PODER
PROBIÒTIC EN POLLASTRES.**

MÒNICA PASCUAL CAMPS
INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES (IRTA)
CENTRE DE TECNOLOGIA DE LA CARN (CTC)
MONELLS. GIRONA.

2002

AGRAÏMENTS

Quan vaig acabar la carrera (aviat farà 9 anys!) vaig dir que no volia continuar estudiant i no volia fer el doctorat (si me'n descuido...!). Uns mesos més tard el Dr. Jesús Garcia em va trucar a casa. Hi havia la possibilitat d'obtenir una beca pre-doctoral al Centre de Tecnologia de la Carn de l'IRTA, a Monells. El meu primer agraïment és per aquella trucada que va fer possible la resta. Gràcies per pensar en mi.

Recordo com si fos ara la meua arribada a aquell centre desconegut que ara s'ha fet tant familiar. El meu agraïment al Dr. Josep Ma. Monfort, director del centre i co-director d'aquest treball, per creure en les meves possibilitats, acceptar-me en aquest centre i proporcionar-me la seva orientació.

A la Dra. Margarita Garriga, co-directora d'aquest treball, per ensenyar-me tot el que sé dels bacteris làctics i els probiòtics. Gràcies per la seva dedicació, paciència i mil i una correccions que semblaven no tenir final.

A la Dra. Marta Hugas, cap de la Unitat de Biotecnologia Alimentària, per estar sempre disposada a donar els seus valuosos consells i opinions.

El meu agraïment a totes les "micro-girls" amb qui vaig compartir el laboratori durant quatre anys. A la Dra. Ma. Teresa Aymerich, la mama de tots els becaris de micro i d'unes quantes nenes més... A la Yolanda Beltrán, la millor localitzadora de material del laboratori, amb qui vaig passar moltes estones rient i treballant de valent. A la Cesca Pagès, la Ma. Gràcia Artigas i la Sònia Costa per compartir part d'aquest temps inoblidable.

Vull donar les gràcies al Centre de Mas Bové de Reus i a la Unitat de Sanitat Animal de Barcelona, especialment al Dr. Ignasi Badiola, per encarregar-se de l'allotjament i el sacrifici dels animals i les analítiques de patògens. Jo no hauria estat capaç de fer-ho.

Gràcies al Dr. Pere Gou per ajudar-me amb la maleïda estadística, encara que mai respectés el seu "horari de consultes".

El meu agraïment a tots els que van fer possible la meua estada al Laboratori de Microbiologia Tècnica de Weihenstephan a Alemanya. Al Dr. Rudi Vogel per acceptar-me en el seu laboratori, al Dr. Mathias Ehrman per les seves orientacions, a tots els que allí vaig conèixer i molt especialment a la Dra. Alexandra Remmiger per convertir-se, aquí i allà, en una amiga i fer tant fàcil la meua estada en terres estranyes (thanks a lot, Alex).

No puc deixar de mencionar a tots els "precaris" de la Sala Polivalent: el Dr. Josep Comaposada amb tot el seu misticisme, la Dra. Maria Font organitzadora de les sortides al cinema i la platja, el Dr. Xavi Serra i la seva lentitud, el Dr. Joan Gelabert organitzador de les teràpies de grup, en Filiberto Sánchez i el seu especial "humor" basc... Vam passar estones inoblidables.

A tot el personal del Centre de Tecnologia de la Carn que amb la seva simpatia han amenitzat la meva estada al Centre. A en Luis Guerrero i la Ma. Dolors Guardia que amb els seus panels van contribuir a la meva precària economia.

A la meva família que sempre m'ha recolzat.

I molt especialment a en Jordi, el meu maridet (quina ràbia et fa això, oi?), per aguantar-me tot aquest temps i confiar cegament en mi. Sense ell aquests anys no haurien estat possibles.

Vull aprofitar aquestes pàgines per demanar perdó als centenars de pollets que han hagut de sacrificar la seva vida perquè aquest treball hagi estat possible. A tots ells moltes gràcies de part meva i de la ciència.

Aquest treball s'ha pogut realitzar gràcies a la concessió d'una beca pre-doctoral del Centre de Referència d'R+D en Tecnologia d'Aliments de la Generalitat de Catalunya i a la Comissió Interministerial de Ciència i Tecnologia (CICYT) que mitjançant el projecte AGF94-0220 ha finançat el treball aquí recollit.

RESUM

En els animals sans la composició de la microbiota intestinal es manté estable. Quan aquesta estabilitat es trenca els patògens poden colonitzar el tracte gastrointestinal. *Campylobacter*, *Escherichia coli* i *Salmonella* són els més freqüents en pollastres, podent-se convertir en una font de contaminació per als humans on provoquen malalties serioses.

Durant anys els antibiòtics s'han utilitzat en alimentació animal, no només a nivell terapèutic sinó també a nivell profilàctic, donant lloc a l'aparició de bacteris resistents i de residus d'antibiòtics en la carn dels animals. La prohibició progressiva de l'ús d'antibiòtics com a promotors de creixement ha despertat l'interès creixent per la incorporació de soques bacterianes o probiòtics, cultius de microorganismes vius que reforcen la funció de barrera de la microbiota intestinal i incrementen el sistema immune de forma no específica.

En aquest treball es van aïllar 296 soques a partir del pap i el contingut intestinal de pollets. D'aquestes se'n van seleccionar 14 per la seva capacitat d'inhibir el creixement de *Salmonella enteritidis* CTC1026 i *Escherichia coli* CTC1028 i adherir-se a cèl.lules epitelials del pap. Excepte la soca CTC2233, totes elles van mostrar la seva resistència a un ambient àcid de pH 3, a la presència d'un 4% de sals biliars, a diversos antibiòtics i al coccidiostàtic monensina.

Totes les soques seleccionades es van identificar com a *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* en base al seu origen i les seves característiques bioquímiques i moleculars. La determinació del seu perfil plasmídic va mostrar que algunes de les soques estudiades eren iguals entre sí, de manera que la selecció es va reduir a 8 soques diferents. Totes elles van mostrar característiques hidrofòbiques i propietats d'agregació i coagregació degudes a un factor de la superfície cel.lular de naturalesa glicoproteica. Les 5 soques que van ser capaces de coagregar amb un major nombre de clons van ser seleccionades. Només dues d'aquestes, *L.salivarius* CTC2183 i *L.salivarius* CTC2197, van poder fer-ho també amb *S.enteritidis* CTC1026 i per això es van triar per a ser utilitzades en els assajos *in vivo*.

Quan ambdós clons es van provar en pollets es va veure que *L.salivarius* CTC2197^{R1} era capaç de desplaçar a l'altra soca en la colonització del tub digestiu, de manera que es va escollir com a soca probiòtica.

En els posteriors assajos *in vivo* es va observar que, 21 dies després d'una única administració de *L.salivarius* CTC2197^{R1} directament al proventricle, tots els animals van ser capaços de superar la infecció per *Salmonella*. La presència del patògen es va mantenir entre els pollets que no van rebre la soca probiòtica, 70 i 100% en el primer i segon assaig, respectivament.

La resistència a la rifampicina, juntament amb la comparació dels perfils plasmídics, es va utilitzar com a mètode per diferenciar la soca probiòtica de la resta de microbiota intestinal dels pollets. El desenvolupament de perfils de RAPD amb els encebadors OPK8, OPK18 i OPZ15 es va mostrar com un mètode alternatiu per a la identificació de *L.salivarius* CTC2197^{R1}, quan es va observar una pèrdua de resistència a l'antibiòtic *in vivo*.

L.salivarius CTC2197^{R1} va mostrar una gran sensibilitat a les elevades pressions i temperatures utilitzades durant el procés de granulació. Les pèrdues de viabilitat observades en aquest medi a les temperatures utilitzades durant l'emmagatzematge (temperatura ambient) i a les incubadores (30°C) van semblar ser degudes a la mateixa temperatura i no a la presència de substàncies acidificants en el pinso. La reinoculació successiva de la soca en el medi va donar lloc a una millora en la seva viabilitat, oferint la possibilitat d'utilitzar el pinso com una via per administrar el probiòtic a gran escala en la indústria avícola.

Quan es va assajar *in vivo*, es va observar que la inoculació de *L.salivarius* CTC2197^{R1} a nivells de 10⁵ ufc/g de pinso durant el primer dia de vida, era suficient per assegurar la seva presència en el tracte gastrointestinal dels pollets després d'una setmana.

La gran capacitat de *L.salivarius* CTC2197^{R1} per colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets després d'una sola inclusió en el pinso i superar la infecció per *S.enteritidis* C-114, l'assenyalen com una soca adient per a ser utilitzada com a probiòtic en la indústria avícola.

ÍNDEX

1-INTRODUCCIÓ	1
1.1-La microbiota intestinal	2
1.1.1-Els bacteris làctics	3
1.1.1.1-Filogènia	4
1.1.1.2-Tècniques bioquímiques i moleculars combinades en la classificació dels bacteris làctics	6
1.1.2-Funcions de la microbiota intestinal	8
1.2-Els bacteris làctics com a probiòtics	10
1.2.1-Propietats dels cultius probiòtics	12
1.2.2-Mecanismes d'adhesió	15
1.2.3-Mecanismes d'actuació	21
1.3-Els bacteris patògens	23
1.3.1-Patogènia a les aus	25
1.3.2-Patogènia als humans	28
1.3.3-Fonts de contaminació	30
1.4-Els probiòtics en aus	31
1.4.1-Mitjans d'administració	33
1.4.2-Valoració de l'aplicació dels probiòtics en aus	34
1.5-Legislació dels probiòtics	38
1.6-Objectius	41
2-MATERIAL I MÈTODES	42
2.1-Medis de cultiu	43
2.1.1-Medi MRS	43
2.1.2-Agar Rogosa	43
2.1.3-Brou infusió de cervell i cor	44
2.1.4-Brou amb soja triptica	44
2.1.5-Medi LB	45
2.1.6-Medi basal per a la fermentació de carbohidrats	45
2.1.7-Medi de Niven	45
2.1.8-Solució salina	46
2.1.9-Suero fisiològic	46
2.1.10-Solució salina tamponada	46
2.2-Aïllament de soques làctiques procedents del tracte gastrointestinal	47
2.3-Recompte de microorganismes	47

2.4-Mètodes per a la conservació de lactobacils	48
2.4.1-Liofilització	48
2.4.2-Congelació	49
2.5-Estudi de l'activitat inhibidora	49
2.5.1-Soques bacterianes utilitzades	49
2.5.2-Multiplicació de les soques	50
2.5.3-Mètode de la gota en agar	50
2.5.4-Mètode de la difusió en pou del sobrenedant	50
2.6- Avaluació de la resistència de les soques làctiques a les condicions intestinals	51
2.6.1-pH àcid	51
2.6.2-Sals biliars	51
2.6.3-Antibiòtics	51
2.6.4-Coccidiostàtics	52
2.7-Characterització bioquímica per a la identificació de les soques	53
2.7.1-Creixement a diferents temperatures	53
2.7.2-Producció de gas	53
2.7.3-Producció d'àcid làctic. Isòmers i quantificació	53
2.7.4-Fermentació de carbohidrats i hidròlisi de l'esculina	53
2.7.5-Hidròlisi de l'arginina	54
2.8-Estudi de l'adhesió, hidrofobicitat, agregació i coagregació cel.lular	55
2.8.1-Determinació de la capacitat d'adhesió	55
2.8.1.1-Observació al microscopi electrònic de rastreig	56
2.8.2-Assaig d'hidrofobicitat	56
2.8.3-Test d'agregació cel.lular	57
2.8.3.1-Characterització de la naturalesa del factor d'agregació	57
2.8.4-Prova de coagregació cel.lular	57
2.9-Aïllament, visualització i quantificació de l'ADN	58
2.9.1-Aïllament d'ADN plasmídic i cromosòmic	58
2.9.1.1-Solucions per a l'aïllament d'ADN	58
2.9.1.2-Mètode per a l'aïllament d'ADN plasmídic d' <i>Escherichia coli</i> pUC18	60
2.9.1.3-Mètode per a l'aïllament d'ADN plasmídic de bacteris làctics	60
2.9.1.4-Mètode per a l'aïllament d'ADN cromosòmic de bacteris làctics	61
2.9.2-Visualització de l'ADN plasmídic i cromosòmic	62
2.9.3-Quantificació de l'ADN cromosòmic	63
2.10-Amplificació específica i a l'atzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	63
2.10.1-Descripció dels encebadors utilitzats	64
2.10.2-Reacció d'amplificació de l'ADN	66
2.10.3-Anàlisi de les bandes amplificades	66

2.11-Identificació de les soques per hibridació	66
2.11.1-Descripció de les sondes utilitzades per a la hibridació	67
2.11.2-Soques bacterianes utilitzades	67
2.11.3-Solucions per a l'assaig d'hibridació	67
2.11.4-Marcatge de la sonda amb digoxigenina	69
2.11.5-Transferència de l'ADN del gel a la membrana de niló	69
2.11.6-Hibridació i detecció	70
2.12-Seqüenciació del gen que codifica el 16S ARN ribosòmic	71
2.13-Resistència a la rifampicina	72
2.13.1-Presència de soques resistents a la rifampicina en la microbiota natural dels pollets	72
2.13.2-Selecció de soques resistents	72
2.14-Supervivència dels lactobacils en el pinso	73
2.14.1-Inoculació de lactobacils en el pinso	73
2.14.2-Supervivència de lactobacils en pinso acidificat a temperatura ambient	73
2.15-Pre-assaig <i>in vivo</i>	75
2.15.1-Preparació dels cultius	75
2.15.2-Inoculació dels animals	75
2.15.3-Sacrifici dels animals	75
2.16-Assaigs <i>in vivo</i>	76
2.16.1-Preparació dels cultius	76
2.16.2-Distribució dels animals	76
2.16.3-Inoculació dels animals	77
2.16.3.1-Primer assaig	77
2.16.3.2-Segon assaig	77
2.16.3.3-Tercer assaig	77
2.16.4-Determinació de lactobacils i <i>Salmonella</i>	77
2.16.5-Anàlisi estadístic	78
3-RESULTATS	79
3.1-Aïllament i detecció d'activitat inhibidora de lactobacils intestinals de pollets	80
3.2-Capacitat d'adhesió de les soques	84
3.3-Resistència a les condicions gastrointestinals	84
3.3.1-pH àcid	84
3.3.2-Sals biliars	87
3.3.3-Antibiòtics	87
3.3.4-Coccidiostàtics	87

3.4-Identificació de les soques a través de la caracterització bioquímica	88
3.4.1-Creixement a diferents temperatures	88
3.4.2-Producció de gas	88
3.4.3-Quantificació i configuració de l'àcid làctic	90
3.4.4-Fermentació de carbohidrats i hidròlisi d'esculina	90
3.4.5-Hidròlisi de l'arginina	90
3.5-Identificació de les soques a través dels mètodes moleculars	92
3.5.1-Determinació del perfil plasmídic	92
3.5.2-Perfils de RAPD	94
3.5.3-Hibridació	94
3.5.4-Seqüenciació del 16S ARN ribosòmic	97
3.6-Identificació de <i>L.salivarius</i> CTC2197 ^{R1} a través de perfils de RAPD	103
3.7-Characterització de l'activitat antagonista de les soques seleccionades	109
3.8-Hidrofobicitat, agregació i coagregació cel.lular	109
3.8.1-Hidrofobicitat	109
3.8.2-Agregació cel.lular	111
3.8.3-Coagregació cel.lular	111
3.9-Gen responsable de l'adhesió	112
3.10-Resistència a la rifampicina	115
3.10.1-Presència de soques resistents a la rifampicina en la microbiota natural dels pollets	115
3.10.2-Selecció de soques resistents a la rifampicina	115
3.10.3-Manteniment de la resistència a la rifampicina	118
3.10.4-Manteniment de les propietats antagonistes, d'agregació i de coagregació de les soques resistents a la rifampicina	118
3.11-Conservació de lactobacils al llarg del temps	119
3.11.1-Supervivència d'un cultiu liofilitzat	119
3.11.2-Supervivència d'un cultiu congelat	119
3.12-Inclusió dels lactobacils en el pinso	121
3.12.1-Resistència al procés de granulació del pinso	121
3.12.2-Supervivència en el pinso a 30°C	121
3.12.3-Supervivència en el pinso a temperatura ambient	122
3.12.3.1-Diferències en la viabilitat d'un cultiu líquid i liofilitzat	122
3.12.3.2-Supervivència d'un cultiu liofilitzat en pinso acidificat	122
3.12.3.3-Millora de la viabilitat de la soca probiòtica en pinso	124

3.13-Assaigs <i>in vivo</i>	125
3.13.1-Pre-assaig	125
3.13.2-Primer assaig	127
3.13.2.1-Recompte de lactobacils	127
3.13.2.2-Estudi dels perfils plasmídics	127
3.13.2.3-Infecció per <i>Salmonella</i>	127
3.13.3-Segon assaig	129
3.13.3.1-Recompte de lactobacils	129
3.13.3.2-Estudi dels perfils plasmídics	131
3.13.3.3-Colonització per <i>Salmonella</i>	131
3.13.4-Tercer assaig	133
3.13.4.1-Recompte de lactobacils	133
3.13.4.2-Estudi dels perfils plasmídics	135
4-DISCUSSIÓ	136
5-CONCLUSIONS	158
6-BIBLIOGRAFIA	161

1-INTRODUCCIÓ

1.1-LA MICROBIOTA INTESTINAL

Els animals i els humans sans tenen una microbiota natural que consisteix en organismes eucariotes i procariotes que es troben a les superfícies externes i internes del cos: pell, tracte respiratori superior, tracte urogenital inferior, cavitat oral i tracte gastrointestinal.

A l'intestí, el nombre de microorganismes que forma part de la microbiota sobrepasa al nombre de cèl·lules eucariotes pròpies de l'organisme, Luckey i Floch (1972) han calculat que un home adult està format per 10^{13} cèl·lules i conté 10^{14} bacteris.

La composició d'aquesta microbiota natural és molt variada i ve determinada per les condicions ambientals, és específica de cada espècie i fins i tot de cada individu. En el cas de l'home hi són presents més de 400 espècies bacterianes (Moore i Holdeman, 1974).

Segons la importància numèrica de la microbiota, aquesta es classifica en tres grups (Ducluzeau i col., 1989):

- Microbiota dominant- representa més del 90% de la població microbiana. Són microorganismes Gram positius, anaerobis facultatius, principalment *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.

- Microbiota subdominant- representa al voltant de l'1% de la població microbiana. Són microorganismes anaerobis facultatius, principalment *Escherichia coli* i *Enterococcus*.

- Microbiota residual- representa menys del 0'001% de la població microbiana. Està formada per *Bacteroides*, *Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, llevats i fongs.

De tota manera, cada espècie animal adulta es caracteritza per un perfil bacterià qualitatiu i quantitatiu. Hi ha un reduït nombre de gèneres bacterians que es troben formant part de la microbiota autòctona de moltes espècies animals: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium* i *Peptostreptococcus*. Altres gèneres bacterians són característics només d'una espècie animal determinada. Així el gènere *Lactobacillus*, que es troba formant part de la microbiota dominant dels rosegadors i el porc, només es troba ocasionalment a l'home, mentre que el gènere *Bifidobacterium* forma part de la microbiota dominant de l'home i no de la dels rosegadors (Ducluzeau, 1997).

La diversitat de soques és gran, però la majoria dels microorganismes són anaerobis, que superen al nombre d'aerobis en un factor de 10^2 - 10^4 . Sembla ser que els bacteris

patògens sempre es troben presents a l'intestí esperant que les condicions ambientals afavoreixin el seu creixement (March, 1979), actuant per tant com a oportunistes.

La densitat global de la població microbiana varia molt d'un lloc a l'altre (10^8 ufc/ml a la saliva, 10^{10} ufc/g al contingut intestinal (c.i. en endavant)) (Havenaar i Huis in't Veld, 1992). En termes generals, la seva distribució al llarg del tracte gastrointestinal seria:

-Estómac o tracte superior, població escassa (0 a 10^3 ufc/ml de c.i.) on predominen els Gram positius anaerobis facultatius com *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Lactobacillus*.

-Jejú o intestí prim, zona de transició amb una població força semblant a l'estómac. Es tracta d'una població (0 a 10^5 ufc/ml de c.i.) on predominen els Gram positius aerobis i en menor concentració els coliforms i els anaerobis.

-Ileum, població que oscil·la entre 10^3 i 10^7 ufc/ml de c.i. Els Gram negatius predominen sobre els Gram positius. Hi trobem principalment coliforms i anaerobis.

-Colon, presenta una gran concentració bacteriana (10^{11} a 10^{12} ufc/ml de c.i.) on hi trobem representats tots els microorganismes presents als trams anteriors (Goldin, 1986).

D'entre tots els bacteris presents a l'intestí, els bacteris làctics són els que es troben en major quantitat i regularitat al llarg de tot el tracte gastrointestinal. Les espècies més representades són: *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.salivarius*, *L.plantarum*, *L.cellobiosus*, *L.brevis*, *L.reuteri*, *Enterococcus faecium*, *E.faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B.thermophilum*, *B.pseudolongum*, *Pediococcus pentosaceus*. En l'intestí dels nadons alimentats amb llet materna, *Bifidobacterium* és l'organisme predominant (O'Sullivan i col., 1992).

És evident, doncs, que l'estudi dels bacteris làctics té un interès especial a l'hora d'estudiar la microbiota intestinal.

1.1.1-Els bacteris làctics

Gràcies a la seva capacitat d'adaptació fisiològica, els bacteris làctics poden colonitzar medis molt diferents des del punt de vista físico-químic i biològic. En alguns ecosistemes són dominants mentre que en altres són minoritaris però capaços d'exercir els seus efectes beneficiosos. La majoria dels bacteris làctics duen a terme activitats útils, ja sigui transformant i assegurant la conservació de matèries primeres alimentàries pels animals o l'home o protegint de forma eficaç de les afeccions intestinals a l'home i als animals. La seva presència en l'intestí és essencial per assegurar un bon

funcionament de la digestió i dels altres òrgans, que és la base per una bona salut i una bona productivitat animal (Dellaglio i col., 1994).

La transformació, per fermentació, de la majoria de les matèries primeres animals destinades a l'alimentació humana es fa gràcies a una microbiota làctica que, per la seva activitat acidificant i aromatitzant, participa en l'estructura, gust i sabor dels principals aliments fermentats (formatges, llets fermentades, embotits, vi, etc.) i que, per la seva activitat proteolítica moderada, en millora la digestibilitat.

Aquests bacteris també intervenen en la conservació de molts vegetals produint aromes i sabors característics, que són típics d'aliments fermentats tradicionals de diverses regions del món (cols, olives, soja, arròs, faves, etc.).

En els medis naturals exerceixen una acció irremplaçable en els equilibris microbians. La seva capacitat d'inhibir microorganismes, alguns d'ells patògens, els qualifica com un sistema biològic eficaç per augmentar la seguretat i conservació dels aliments.

1.1.1.1-Filogènia

Els bacteris làctics són cèl·lules procariotes, relativament evolucionats dins del grup, heteròtrofs i quimio-organotrofs (de Roissart, 1986). En general es caracteritzen per ser Gram positius, no mòbils, no patògens, no esporulats i anaerobis però aerotolerants, ja que malgrat no tenir catalasa tenen superòxid dismutasa i peroxidasa que destrueixen ràpidament l'O₂ i el H₂O₂ que es formen en condicions d'aerobiosis (Desmazeaud i de Roissart, 1994).

Poden créixer en un ampli espectre de temperatures, de 2 a 53°C, i són acidòfils amb un pH òptim de creixement situat entre 5'5 i 6'2.

Tenen un metabolisme fermentador que els permet produir àcid làctic com a producte final utilitzant les hexoses com a substrat. Segons el producte final del seu metabolisme, els bacteris làctics es poden classificar en tres grups:

- homofermentadors estrictes-produueixen majoritàriament àcid làctic per la via d'Embden-Meyerhof i no fermenten ni les pentoses ni el gluconat.

- heterofermentadors facultatius-disposen de fosfocetolasa, un enzim induïble de la via de les pentoses que els permet produir tant àcid làctic com àcid acètic.

- heterofermentadors estrictes-utilitzen la via de les pentoses i produeixen quantitats iguals d'àcid làctic, àcid acètic i CO₂.

Orla-Jensen (1919) fou el primer en classificar els bacteris làctics, segons la seva temperatura òptima de creixement i els productes de fermentació dels sucres, en tres subgèneres: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* i *Betabacterium*.

Els treballs de taxonomia molecular utilitzant les fraccions ribosomals 16S i 23S de l'ARN ribosòmic van portar a Kandler i Weiss (1986) a fer una nova classificació, en què els bacteris làctics es dividien en tres grups:

- el grup I està format per lactobacils homofermentadors estrictes i engloba els *Thermobacterium* i moltes altres espècies descrites recentment.

- el grup II està integrat per lactobacils heterofermentadors facultatius. Inclou els *Streptobacterium* i moltes espècies descrites recentment.

- el grup III està compost per lactobacils heterofermentadors estrictes. Engloba els *Betabacterium* i algunes espècies noves.

Els avenços realitzats en els darrers anys en les tècniques moleculars, principalment en la comparació de seqüències 16S de l'ARNr, han portat a profunditzar en les relacions filogenètiques dels bacteris làctics i segons la composició d'ADN expressat en percentatge de guanina i citosina (G+C), s'han fet dues subdivisions. La majoria dels bacteris làctics contenen menys del 50% de G+C i pertanyen al grup *Clostridium*: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Erysipelothrix*, *Gemella*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Alloicoccus*, *Atopobium*, *Weisella* i *Lactosphaera*, un gènere recentment proposat per Janssen i col. (1995). *Bifidobacterium* és l'únic gènere que té més del 50% de G+C i pertany al grup *Actinomycetes* (Stackebrandt i Teuber, 1988; Aguirre i Collins, 1993; Schleifer i col., 1995).

Dins el gènere *Lactobacillus* s'han descrit tres grups filogenèticament diferents després d'analitzar les seqüències de les subunitats 16S del ARNr de 55 espècies (Collins i col., 1991; Schleifer i Ludwig, 1995). El primer grup és format per *Lactobacillus delbrueckii*, *L.acidophilus*, *L.amylovorus*, *L.gallinarum*, *L.helveticus*, *L.jensenii* i altres homofermentadors estrictes juntament amb dues espècies heterofermentadores facultatives *L.acetotolerans* i *L.hamsteri*.

El segon grup és el més gran i heterogeni i comprèn més de 30 espècies de *Lactobacillus* i 5 espècies de *Pediococcus*. La majoria dels seus membres són heterofermentadors estrictes o facultatius. S'hi poden distingir quatre subgrups: el primer és el subgrup de *L.salivarius* format per homofermentadors obligats i heterofermentadors facultatius, amb tres espècies (*L.agilis*, *L.mali* i *L.ruminis*) que

contenen àcid meso-diaminopimèlic en lloc de lisina en el peptidoglicà; el segon és el subgrup de *L.buchneri* format per heterofermentadors obligats i amb remarcables diferències pel que fa a la composició d'ADN dels seus membres; el tercer és el subgrup de *L.reuteri* format per heterofermentadors obligats en que *L.fermentum* conté ornitina en lloc de lisina en el peptidoglicà; i el quart és el subgrup de *L.plantarum* que conté una espècie homofermentadora (*L.farciminis*), 2 espècies heterofermentadores facultatives (*L.alimentarius* i *L.plantarum*) i una espècie heterofermentadora obligada (*L.collinoides*).

El tercer grup és format per tots els membres del gènere *Leuconostoc* i 5 espècies de lactobacils heterofermentadors estrictes. Aquest tercer grup es pot dividir en tres subgrups: un primer subgrup que comprèn la majoria dels *Leuconostoc* (excepte *Lc.paramesenteroides* i *Lc.oenos*) i *L.fructosus*; un segon subgrup que inclou *Lc.paramesenteroides* i diversos lactobacils heterofermentadors obligats (posteriorment reclassificat per Collins i col., (1993) com a un nou gènere anomenat *Weisella*); i un tercer subgrup que conté *Lc.oenos* que posteriorment fou proposat com el nou gènere *Oenococcus* per Dicks i col. (1995).

1.1.1.2-Tècniques bioquímiques i moleculars combinades en la classificació dels bacteris làctics

La primera classificació taxonòmica dels bacteris làctics fou duta a terme l'any 1919 per Orla-Jensen, en base a les seves característiques físico-químiques. Durant un segle s'han proposat sistemes de classificació basats en només unes poques característiques amb poc o nul pes filogenètic. Els sistemes de classificació eren utilitzats per poc temps i reemplaçats quan es creia que unes característiques i/o trets metabòlics eren més significatius a l'hora de reflectir les relacions entre bacteris (Stackebrandt i Teuber, 1988). La classificació dels lactobacils normalment es feia segons la morfologia de la colònia i la cèl·lula i determinats tests bioquímics basats en la capacitat de fermentar sucres i produir àcids com el làctic i l'acètic.

Després de la Segona Guerra Mundial, els mètodes més moderns de bioquímica i biologia molecular van mostrar que la classificació feta fins al moment era insatisfactòria i no reflectia les relacions filogenètiques que hi havia realment entre les diferents soques i espècies (Stackebrandt i Teuber, 1988; Pot i col., 1993; Klein i col., 1998). Per això en els darrers anys s'han provat diversos mètodes basats en les noves tecnologies:

- patró d'electroforesis de les proteïnes cel·lulars solubles (Dicks i Van Vuuren, 1987)
- relacions immunològiques de la lactat deshidrogenasa (Stackebrandt i Teuber, 1988)
- enzims de la ruta glicolítica (Stackebrandt i Teuber, 1988)
- anàlisi del contingut plasmídic (Nes, 1984, Tannock i col., 1990)
- patrons amb endonucleases de restricció (Stahl i col., 1990, Roussel i col., 1993)
- mètodes utilitzant ADN amplificat per PCR (Jaho i col., 1993) particularment mètodes RAPD (Caetano-Anolles i col., 1991)
- patró d'electroforesis de les proteïnes cel·lulars en gels de SDS-poliacrilamida (Pot i col., 1993)
- seqüenciació de l'ARN ribosòmic (Pot i col., 1993)
- hibridació ADN-ADN amb sondes específiques (Pot i col., 1993; Rodtong i Tannock, 1993)
- estructura i composició de la paret cel·lular (Hammes i Vogel, 1995)

Finalment l'anàlisi de l'ADN i l'ARN ribosòmic han demostrat ser per ara el millor camí.

Segons això, s'han desenvolupat diverses tècniques per determinar les relacions filogenètiques dels microorganismes en base als àcids nucleics (Stackebrandt i Teuber, 1988):

- hibridació ADN-ADN per reconèixer organismes estretament relacionats (nivell d'espècie i subespècie)
 - seqüència complerta de la regió ITS ("Internal transcriber spacer") entre els gens 16S i 23S de l'ARN ribosòmic que permet establir relacions filogenètiques intraespecífiques (Leblond-Bourget i col., 1996).
 - seqüència complerta del 5S ARNr per a l'anàlisi d'espècies moderadament relacionades (nivell intra i intergenèric)
 - seqüenciació del 16S ARNr per a organismes més remotament relacionats (nivell interfamiliar i interdivisional)
 - seqüenciació complerta o quasi complerta del 16S i 23S ARNr per relacionar els grups més allunyats de procariotes

Amb els resultats així obtinguts s'ha vist que hi ha poca correlació entre la classificació tradicional i les relacions filogenètiques dels bacteris làctics. Així els gèneres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*, que són morfològicament diferents, estan barrejats filogenèticament. El mateix passa amb les classificacions tradicionals fetes fins al moment dins del gènere *Lactobacillus* (Collins i col., 1991).

Els diferents mètodes s'han d'aplicar en combinació perquè només la taxonomia polifàsica (Vandamme i col., 1996) pot diferenciar espècies que són fenotípicament semblants però genotípicament diferents, o al revés.

Molts dels cultius bacterians utilitzats en productes comercials no estan assignats a l'espècie correcte. La taxonomia, incloent identificació i classificació, és essencial per garantir la qualitat que demanen les lleis governamentals i els consumidors. No n'hi ha prou amb conèixer el gènere, cal identificar l'espècie o subespècie de manera fiable i les tècniques moleculars han de poder solventar aquests problemes (Klein i col., 1998). A títol d'exemple, des de 1900 fins a 1980 la majoria de les soques aïllades a partir del tracte gastrointestinal van ser classificades com a *L.acidophilus* per la seva morfologia i reaccions fenotípiques (Mitsuoka, 1992). Els mètodes actuals d'identificació i classificació han mostrat que aquesta classificació era incorrecte ja que es tracta d'un grup molt heterogeni que actualment inclou fins a 6 espècies diferents, de manera que *L.acidophilus* ja no és l'espècie dominant entre els lactobacils intestinals d'homes i animals (Klaenhammer, 1995).

En els últims anys la seqüenciació completa dels gens que codifiquen el 16S ARN ribosòmic d'espècies noves o ben conegudes de bacteris làctics, ha permès el disseny de sondes ARNr específiques d'espècie (Hensiek i col., 1992; Hertel i col., 1993; Ehrmann i col., 1994; Vogel i col., 1994). Aquestes sondes no només permeten identificar i classificar correctament un microorganisme determinat, sinó també detectar a través de PCR la presència d'una soca determinada en una població mixta evitant així l'ambigüitat i llarga durada dels mètodes tradicionals. A més en els darrers anys s'està treballant en la identificació a través de PCR directament sobre colònia, sense necessitat d'extracció d'ADN, que augmentaria la rapidesa i disminuiria el cost de la tècnica (Lucchini i col., 1998).

1.1.2-Funcions de la microbiota intestinal

Tots els microorganismes presents al tracte gastrointestinal interaccionen entre sí i amb l'organisme hoste on habiten, de manera que tots contribueixen a la tasca realitzada per

la microbiota gastrointestinal. La importància numèrica dels lactobacils dins d'aquesta microbiota fa que també tinguin un paper molt important en les funcions que aquesta du a terme.

Entre aquestes funcions trobem (Sandine, 1979; Savage, 1986; Humbert, 1988; Praso i col., 1989; Delbecque, 1991; Fuller, 1992):

1- A nivell anatòmic

- Augmenta el volum dels compartiments digestius i la superfície d'absorció cel·lular.

- Afavoreix la renovació de les cèl·lules epitelials i augmenta el tamany de les vellositats i les criptes glandulars.

- Afavoreix el trànsit intestinal.

2-A nivell metabòlic

- Síntesi de vitamines del grup B i vitamina K.

- Influeix en les secrecions digestives i hormonals.

- Intervé en el reciclatge d'enzims i macromolècules.

- Disminueix els nivells de les amines tòxiques i de l'amoniac.

- Desconjuga els àcids biliars de manera que es converteix en una forma més inhibidora pels bacteris que la conjugada.

3-A nivell nutricional

- Degradació de glúcids i proteïnes.

- Digestió dels nutrients no digerits.

- Digestió i/o absorció dels aminoàcids.

- Hidròlisi de lípids.

4-Defensa antimicrobiana

- Produeix àcids orgànics, acètic i làctic, a partir dels carbohidrats de manera que fa disminuir el pH intestinal.

- Sintetitza àcids grassos de cadena curta.

- Afavoreix el desenvolupament de cèl·lules productores de Ig A a la mucosa intestinal.

- Fabrica substàncies que són inhibidores del creixement dels patògens: peròxid d'hidrogen, àcids biliars, substàncies antienterotoxigèniques, enzims, bacteriocines...

-Produeix antibiòtics (acidofilina, acidolina, lactobacilina, lactocidina...) que tenen activitat inhibidora contra diversos patògens.

-Colonitza l'intestí formant un "biofilm", evitant així la colonització per part de microorganismes patògens.

Totes aquestes funcions es poden resumir en dos punts principals: la microbiota intestinal ajuda a mantenir l'equilibri del tracte digestiu i a inhibir l'establiment i creixement de bacteris entèrics patògens o oportunistes.

1.2-ELS BACTERIS LÀCTICS COM A PROBIÒTICS

L'aparició dels antibiòtics en l'àmbit zootècnic, a nivell terapèutic però sobretot a nivell profilàctic, va suposar una millora important en les condicions de vida dels animals de cria i per tant en la seva productivitat. A partir de l'any 1946 es van començar a utilitzar regularment com a promotors de creixement. Els antibiòtics són substàncies que provoquen la mort cel·lular tant dels bacteris patògens com dels no patògens que hi siguin sensibles (de manera no selectiva), tenen èxit a l'hora de tractar la malaltia, però després l'efecte beneficiós pot ser anul·lat per una diarrea post-antibiòtica deguda al creixement de patògens després de la destrucció de la microbiota intestinal (Fox, 1988). El seu ús continuat en els animals destinats al consum humà pot crear bacteris multiresistents i agressius. Malgrat que no hi ha prou dades científiques que ho demostrin, hi ha una gran preocupació pel fet que l'ús d'antibiòtics com a promotors de creixement en els animals pugui portar a un augment de la resistència antibiòtica en l'home i, per tant, es pugui reduir la seva eficàcia per tractar infeccions humanes (Anadón, 1999).

L'evolució de la resistència als antibiòtics en les comunitats microbianes s'ha vist afavorida per la transferència horitzontal de gens de resistència entre les diferents espècies i gèneres a través de plàsmids, transposons, bacteriòfags lítics i temperats i la possessió d'elements d'inserció (Davies, 1994). En els ambients naturals els principals mecanismes implicats en la transferència d'aquests elements són la conjugació (Clewell i col., 1995) i la utilització de bacteriòfags (Schmieger i Schicklmaier, 1999).

Els plàsmids (Teuber, 1995) i els transposons (Clewell, 1994) són els principals vehicles de transferència de gens de resistència als antibiòtics en els bacteris de l'àcid làctic. Aquests elements es poden transferir d'una cèl·lula a una altra gràcies a la

proximitat cel·lular pròpia dels ambients altament poblats (10^9 - 10^{10} bacteris/cm³) en què es troben aquests microorganismes.

Durant molts anys hi ha hagut pocs estudis sobre la resistència adquirida als antibiòtics entre els bacteris de l'àcid làctic. No obstant el creixent interès en la utilització d'aquests microorganismes com a probiòtics n'ha fet augmentar el nombre (Kullen i Klaenhammer, 1998). De tots aquests estudis es dedueix que la resistència als antibiòtics a *Leuconostoc*, algunes espècies de *Lactobacillus* i altres, no només és adquirida sinó que també hi ha una certa resistència intrínseca, malgrat que és molt difícil distingir-les. Si els bacteris de l'àcid làctic viuen en un hàbitat que es troba sotmès de manera regular a la presència d'antibiòtics (com ara l'intestí dels animals), la resistència adquirida als antibiòtics s'acabarà detectant entre aquests microorganismes. Per altra banda cal destacar que no s'ha detectat cap diferència pel que fa a l'adquisició de resistències entre els bacteris patògens, els potencialment patògens i els bacteris de l'àcid làctic comensals (Teuber i col., 1999).

L'aparició i l'augment continuat de soques bacterianes resistents als antibiòtics a partir del 1960 va portar, des del 1970, a una restricció progressiva dels antibiòtics utilitzables en els animals de cria (Guillot, 1997). Aquesta tendència va culminar a finals de l'any 1998 quan la Comissió Europea va decidir prohibir, a partir del juliol del 1999, l'ús de quatre antibiòtics (espiramicina, bacitracina de zinc, virginamicina i fosfat de tilosina) utilitzats sovint com a promotors de creixement, per la possible transmissió de bacteris resistents als humans on aquests antibiòtics també són utilitzats com a terapèutics (Reglament 2821/98, DOCE n° L351, 29/12/1998).

Aquesta decisió ha despertat un interès creixent per la incorporació de soques bacterianes com a probiòtics en nutrició animal per tal de mantenir l'efecte beneficiós obtingut amb els antibiòtics. Els probiòtics no són una alternativa als antibiòtics a l'hora de curar una malaltia, però tenen un paper molt important a l'hora de prevenir-la, reduir el temps de recuperació i augmentar la gana després de patir-la.

Parker (1974) va ser el primer a utilitzar el terme probiòtic que ell definia com a organismes i substàncies que contribueixen al balanç microbiològic intestinal.

Fuller (1989 a) redefineix el terme probiòtic com a microorganismes vius que s'inclouen en el menjar per tal de beneficiar a l'hoste tot augmentant el seu balanç microbiològic intestinal.

Un probiòtic és un cultiu de microorganismes vius que és administrat a l'animal amb la primera intenció de prevenir malalties infeccioses, tot reforçant la funció de barrera de

la microbiota intestinal o amb un increment no específic del sistema immune (Søgaard i Suhr-Jessen, 1990).

Havenaar i Huis in't Veld (1992) defineixen probiòtic com un monocultiu o cultiu mixta de microorganismes que, aplicat a l'home o a l'animal (ja sigui com a cèl·lules liofilitzades o com a producte fermentat), té un efecte beneficiós sobre l'hoste tot augmentant les propietats de la microbiota indígena en el tracte respiratori superior, el tracte gastrointestinal i el tracte urogenital.

Al "LABIP-workshop probiotics" celebrat a Frankfurt el 1995 es va proposar una nova definició de probiòtic segons la qual es tracta de microorganismes vius que, al ser ingerits en un cert nombre, exerceixen efectes beneficiosos a més dels propis efectes deguts a la nutrició.

Els probiòtics es poden consumir com a components propis del menjar o bé com a preparats que no formen part de l'aliment.

Un altre camp d'estudi s'ha obert en els darrers anys, ja que s'ha vist que a través de la inclusió de certs ingredients en la dieta es pot promoure el creixement de determinats microorganismes en detriment d'altres. D'aquesta manera es pot afavorir el creixement dels bacteris làctics nadius i potenciar la seva activitat probiòtica. El terme prebiòtic defineix els substrats de creixement que estimulen el desenvolupament dels bacteris intestinals beneficiosos.

El terme simbiòtic defineix les barreges de probiòtics i prebiòtics que afecten beneficiosament a l'hoste ja que proporcionen tant els cultius vius com els compostos nutricionals que promouran selectivament el seu creixement, supervivència o activitat.

1.2.1-Propietats dels cultius probiòtics

La majoria dels probiòtics que trobem actualment en el mercat i que són utilitzats en la cria d'animals contenen un nombre relativament petit d'espècies entre les que trobem :

-*Lactobacillus* spp.: *L.acidophilus*, *L.brevis*, *L.bulgaricus*, *L.casei* subspècie *casei*, *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.fermentum*, *L.lactis*, *L.plantarum*, *L.salivarius*.

-*Bifidobacterium* spp.: *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*, *B.thermophilus*.

-*Streptococcus* spp.: *S.diacetilacti*, *S.lactis*, *S.thermophilus*.

-*Bacillus* spp.: *B.cereus*, *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *B.toyoi*, *B.nato*

-Altres: *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces boulardii*, *S.cerevisiae*.

Així doncs, la gran majoria dels probiòtics contenen bacteris làctics, ja sigui com a soques individuals o com a combinació de diverses soques. Això és degut a que formen part de la microbiota natural de quasi tots els organismes, rarament són patògens i presenten propietats antagonistes davant els bacteris patògens. Això els fa ideals per a ser utilitzats com a probiòtics tant en animals com en humans.

La hipòtesi probiòtica (Fox, 1988) postula que si es poden introduir suficients bacteris làctics a l'intestí en el moment en què hi ha situacions d'estrès, enfermetat, o bé abans o després d'un tractament amb antibiòtics (moments en què el balanç de la microbiota intestinal afavoreix els patògens) els bacteris entèrics poden ser, aleshores, minimitzats o superats.

Per tal que un probiòtic sigui efectiu i pugui assolir els seus objectius, ha de complir tot un seguit de característiques:

- Ha de ser un habitant normal del tracte gastrointestinal dels individus sans i preferiblement ha de provenir de la mateixa espècie animal on se'l vol introduir (Juven i col., 1991).

- Ha de ser capaç d'arribar fins al tracte intestinal i, per tant, ha de ser resistent a: els enzims digestius i de la boca, principalment la lisozima, així com el pH gàstric (1'8 a 3'2) durant més d'unes poques hores; els àcids biliars desconjugats i els mecanismes immunes del tracte intestinal. A més haurà de superar la mobilitat intestinal i la velocitat amb què el menjar passa pel tracte gastrointestinal (Wolter i Henry, 1988; Raibaud i Raynaud, 1989).

- Un cop ingerit ha de ser capaç d'activar-se ràpidament, colonitzar el tracte gastrointestinal i desenvolupar-s'hi (Juven i col., 1991; Havenaar i Huis in't Veld, 1992).

- Alguns autors consideren que ha de ser capaç d'adherir-se a les cèl·lules intestinals per proliferar-hi (Savage, 1983; Jones i Thomas, 1987; Fuller, 1989b), mentre que d'altres consideren que si el bacteri té un temps de generació curt no fa falta que s'adhereixi a la superfície epitelial (Vanbelle i col., 1990; Fuller, 1992).

- S'ha de garantir un temps de vida acceptable (Fox, 1988).

- Ha d'exercir efectes beneficiosos en l'hoste (Fuller, 1989a).

- Ha de ser capaç de produir substàncies antimicrobianes (bacteriocines, peròxid d'hidrogen, àcids orgànics,...) a l'intestí per tal de prevenir el desenvolupament de microorganismes patògens i reduir la producció de substàncies tòxiques i nocives (Fuller, 1973).

-No ha de trastornar el balanç normal de la microbiota intestinal tot i que ha de ser capaç de competir amb la microbiota autòctona i per tant ser resistent a les bacteriocines, àcids i altres antimicrobians produïts per la microbiota resident (Fondén, 1989).

-No ha de produir reaccions patògenes, tòxiques, al·lèrgiques, mutagèniques o carcinogèniques degudes a la pròpia soca, als seus productes de fermentació o als seus components cel·lulars després de la mort del bacteri (Havenaar i Huis in't Veld, 1992).

-No ha de portar plàsmids que codifiquin per resistència a antibiòtics perquè podrien propagar-se a altres bacteris, incloent els patògens, i ha de ser genèticament estable (Fondén, 1989).

-Ha de mantenir la seva viabilitat i activitat durant els processos de manufactura, emmagatzematge i distribució i ho ha de fer a altes concentracions (10^6 - 10^8 ufc/g) (Hutcheson, 1987; Havenaar i Huis in't Veld, 1992).

-Ha de mantenir les propietats organolèptiques del producte on es troba, fonamentalment quan s'inclou en productes fermentats (Fondén, 1989).

Entre els bacteris làctics podem trobar soques que compleixen la majoria d'aquestes característiques i això els fa ideals per a ser utilitzats com a probiòtics. Per això en parlar de probiòtics es parla especialment dels bacteris làctics.

Normalment passen de 2 a 3 setmanes abans de que el probiòtic que ha sigut administrat s'adapti a l'organisme hoste (Ducluzeau i col., 1989). Com que no podem verificar que els microorganismes s'adhereixin a les parets de l'intestí, cal assegurar que el nombre de microorganismes que hi arriba sigui el màxim possible (Humbert, 1988). Per això s'han d'administrar dosis elevades, aproximadament 10^6 o 10^7 ufc/g de menjar (Vanbelle i col., 1990). Les dosis han de ser més elevades en els animals joves que encara no tenen una microbiota gastrointestinal ben adaptada. Es considera que una concentració de probiòtic inferior a 10^6 - 10^7 ufc/g de contingut digestiu, no permet obtenir un equilibri entre els microorganismes probiòtics i els bacteris de la microbiota resident i observar un efecte notable sobre l'hoste (Guillot, 1997).

En general l'efecte dels probiòtics està limitat al temps en què són subministrats a través de l'aliment, i després d'un curt període de temps aquest s'atura. L'única manera d'assegurar la seva acció és administrar-los de manera continuada o bé a intervals regulars (Fuller, 1989b, 1992), o disposar d'un que sigui capaç de colonitzar permanentment el tracte gastrointestinal i per tant de reproduir-s'hi.

1.2.2-Mecanismes d'adhesió

A les aus el pap és la font principal de bacteris làctics que serveixen per mantenir el balanç de la microbiota intestinal (Smith, 1965; Fuller i Turvey, 1971). És molt important que aquests bacteris s'uneixin fortament a l'epiteli del pap per assegurar que podran quedar-s'hi després del pas del menjar i seguir proporcionant una font constant de bacteris (Fuller i Turvey, 1971). Un cop els microorganismes probiòtics han arribat al tracte gastrointestinal, també han de ser capaços d'adherir-se a les cèl·lules epitelials per evitar ser eliminats per les secrecions mucoses i els moviments peristàltics. Això implica que els bacteris que presentin una major capacitat d'adhesió seran els més indicats per a ser utilitzats com a probiòtics.

Segons diversos autors l'adhesió bacteriana és hoste específica (Fuller, 1975; Suegara i col., 1975; Barrow i col., 1980). La capacitat de *Lactobacillus* d'adherir-se *in vitro* a les cèl·lules epitelials intestinals varia considerablement entre espècies i entre soques d'una mateixa espècie, de manera que hi ha una gran especificitat d'adhesió (Jin i col., 1996c). L'adhesió dels lactobacils a les cèl·lules epitelials del tracte gastrointestinal té lloc en una interfase sòlid-líquid. Aquest fenomen es desenvolupa en varies fases (Van Loosdrecht i col., 1990):

1-Transport de la cèl·lula a la superfície intestinal que pot tenir lloc de tres maneres diferents:

a-Transport difusiu-el moviment brownià del bacteri fa que aquest entri en contacte amb les interfases de forma aleatòria.

b-Transport convectiu-degut al flux del líquid on es troben suspeses les cèl·lules. Hi ha situacions en què la part final del camí és controlada per difusió.

c-Moviment actiu-quan el bacteri es troba a prop d'una superfície hi entra en contacte per resposta quimiotàctica a un gradient de concentració que hi hagi a la regió interfacial.

2-Adhesió inicial

Es tracta d'un procés físico-químic que pot ser:

a-Reversible-el bacteri es pot tornar a separar de la superfície pel seu propi moviment brownià o per una força suau. Això implica un intercanvi continuat entre les cèl·lules adherides i les cèl·lules lliures, de manera que es fa difícil distingir entre l'activitat d'unes i altres.

b-Irreversible-el bacteri ja no manté el seu moviment brownià i només pot ser eliminat de la superfície per una força elevada.

3-Adhesió

Determinades estructures especials de la superfície, com les fimbries o els polímers, poden formar forts lligams entre la cèl·lula i la superfície sòlida.

4-Colonització superficial

Aquesta etapa té lloc quan les cèl·lules ja estan fortament adherides i comencen a créixer de manera que es desenvolupen microcolònies. Si les cèl·lules s'han adherit de manera reversible, una part de les noves cèl·lules poden ser alliberades al medi mentre les altres resten adherides (Harvey i Young, 1980).

El desenvolupament d'aquestes dues últimes fases depèn del tipus d'organisme i són més específiques que les dues primeres.

Els microorganismes no només tenen la capacitat d'adherir-se a les superfícies sinó que també poden adherir-se entre sí, ja sigui a bacteris que pertanyen a la mateixa línia cel·lular (autoagregació) o a bacteris que pertanyen a diferents línies cel·lulars (coagregació). Aquesta propietat sembla ser molt important a l'hora de permetre la colonització del tracte gastrointestinal per part dels lactobacils. Així s'ha observat que la variant autoagregant de *Bifidobacterium suis* BSu 895 s'adhereix més eficientment al teixit intestinal que la variant no autoagregant (Del Re i col., 1998).

Els lactobacils són els microorganismes predominants en el tracte gastrointestinal dels pollastres. Vandevorde i col. (1992) afirmen que entre aquestes soques hi predominen els lactobacils coagregants, i que la seva capacitat d'aparellament és específica de soca. Així doncs, la prevalència de lactobacils coagregants en el tracte gastrointestinal de pollastre dona suport a la idea de que les interaccions intragenèriques poden tenir una gran importància ecològica.

El potencial de colonització dels lactobacils en el pap de pollastre pot augmentar gràcies a la capacitat d'interaccionar amb altres cèl·lules microbianes. D'aquesta manera, els lactobacils que són capaços d'adherir-se a altres cèl·lules tenen més oportunitats d'establir-se en temps de residència curts (Vandevorde i col., 1992). A llarg termini la situació canvia perquè ja hi intervenen altres factors.

Així mateix la coagregació entre la microbiota nativa i els patògens presents al tracte gastrointestinal és un bon mecanisme per excloure els microorganismes nocius de l'organisme hoste (Spencer i Chesson, 1994).

Les condicions ambientals afecten a l'afinitat de la coagregació, segurament perquè afecten a la càrrega superficial del bacteri. Quan disminueix el pH i augmenta la concentració d'electrolits es redueixen les forces repulsives de Coulomb i augmenta la coagregació (Vandevoorde i col., 1992; Kolebrander i London, 1993).

La gran varietat d'estructures superficials presents als bacteris implica un gran espectre de mecanismes d'adherència (Schneitz i col., 1993). Això fa que sigui difícil conèixer de quina manera un microorganisme determinat s'adhereix a una superfície.

Les adhesines de *Lactobacillus* són de naturalesa variada. S'han descrit amb major freqüència carbohidrats i proteïnes, tant extracel·lulars com presents a les superfícies bacterianes (Coconnier i col., 1992; Chauvière i col., 1992; Reid i col., 1993) tot i que també s'ha proposat que l'àcid lipoteicoic podria estar implicat en l'adhesió a cèl·lules epitelials (Chan i col., 1985; Sherman i Savage, 1986).

Brooker i Fuller (1975) van demostrar que el material responsable de l'adhesió dels lactobacils al pap del pollastre era un polisacàrid àcid, ja que el van poder tenyir amb vermell de ruteni, blau alcià i ferro coloidal. Per altra banda també van veure que algunes espècies de *Lactobacillus* spp. produïen fibres de lligament. De manera semblant Hood i Zottola (1987) van observar que les soques de *L. acidophilus* que s'adherien a les cèl·lules intestinals del fetus humà presentaven polisacàrids a l'exterior de la paret cel·lular, que eren més abundants com més fortament s'adheria la cèl·lula.

Alguns patògens intestinals s'uneixen a determinats glicoesfingolípids de la superfície epitelial per establir una infecció (Bock i col., 1985; Stromberg i Karlsson, 1990). Per això s'especula que determinades espècies de *Lactobacillus* intestinals poden unir-se als glicoesfingolípids de la superfície del tracte digestiu (Yamamoto i col., 1996).

Són molts els autors que consideren que les proteïnes són les estructures responsables d'aquesta capacitat adhesiva. Vandevoorde i col. (1992) han descrit que la lipasa no redueix la coagregació mentre que la pepsina, el periodat i el tractament tèrmic sí que ho fan. Tot i que el periodat actua principalment a nivell dels carbohidrats, s'ha vist que alguns enllaços C-C dels aminoàcids també hi són sensibles (Dyer, 1956). A més les estructures responsables de la coagregació es poden eliminar de la paret cel·lular per sonicació. Aquestes estructures bloquejarien els llocs de reconeixement de les cèl·lules i per tant impedirien que les altres cèl·lules hi interaccionessin. Quan s'escalfa el

sobrenedant que conté aquestes estructures alliberades es restableix la coagregació. La sensibilitat al calor de l'agent bloquejant estaria d'acord amb la hipòtesi de que l'estructura que intervé en el fenomen de la coagregació és de naturalesa proteica.

Mukai i Arihara (1994) han descrit la presència de lectines, proteïnes capaces d'unir-se a determinats grups carbohidrats, a la superfície cel·lular de *L.acidophilus*, suggerint un mecanisme d'adhesió en què el bacteri reconeix sucres específics a la superfície epitelial de l'intestí. Les lectines també podrien trobar-se a les cèl·lules epitelials de l'organisme hoste o bé procedir de la seva dieta i situar-se a la superfície cel·lular. D'aquesta manera s'unirien als carbohidrats de la superfície bacteriana o de les cèl·lules epitelials, segons qui fos el portador de les lectines, establint-se així una unió específica (McGroarty, 1993; Mukai i Arihara, 1994).

Reniero i col. (1992) van demostrar que la presència del fenotip agregant a *L.plantarum* 4B2 (aïllat de femtes de nadons, posteriorment identificat com a *L.gasseri* 4B2 (Lucchini i col., 1998)) estava mediada per una proteïna secretada de 32 KDa anomenada Factor Promotor de l'Agregació (APF) que pot establir un pont entre dos bacteris que continguin àcids lipoteicoics o teicoics amb substitucions laterals de α -D-glucopiranosil-(1,2)-D-glucosa.

Posteriorment Kmet i col. (1995) ha descrit dues soques de *L.reuteri* (aïllat intestinal de porc) en què l'agregació de les cèl·lules està associada a una proteïna de 32 KDa, immunològicament semblant a la proteïna APF de *L.gasseri* 4B2.

L'adherència bacteriana també s'ha relacionat a la presència de la "S-layer". Es tracta d'una proteïna de superfície amb estructura paracristalina que cobreix tota la paret cel·lular durant totes les etapes del creixement (Messner i Sleytr, 1992; Beveridge, 1994). S'ha detectat tant en organismes Gram positius com Gram negatius, suggerint que la seva presència a la natura és més comuna del que es pensava en un principi. En els bacteris Gram positius la "S-layer" està associada a la capa de peptidoglicà, que és el component més rígid de la paret cel·lular, mentre que en els Gram negatius està associada a la superfície externa de la membrana externa (Beveridge i Graham, 1991). La seva presència s'ha detectat en diverses espècies de *Lactobacillus* que habiten el tracte gastrointestinal (Lortal, 1993).

Degut a la seva naturalesa paracristalina, la "S-layer" presenta diversos porus en la seva estructura. Les subunitats que la conformen es troben unides als components integrals de la superfície cel·lular (lipopolisacàrids, àcids teicoics, peptidoglicans, etc.) per enllaços no covalents com ara interaccions hidrofòbiques, ponts d'hidrogen i

interaccions electrostàtiques (Severina, 1995). L'anàlisi química ha mostrat que la majoria de les "S-layer" consten d'un sol polipèptid d'elevat pes molecular que conté carbohidrats units covalentment com a components minoritaris. Aquests carbohidrats juguen un paper important en l'adhesió cel·lular, l'estabilitat conformacional i la resistència a la degradació proteolítica. La massa molecular dels monòmers pot variar de 40 a 200 KDa (Boot i col., 1993).

La "S-layer" pot constituir el 10% de les proteïnes totals durant la fase de creixement, i requereix un gran aport energètic per part de la cèl·lula. Això implica que aquesta estructura ha de representar un gran avantatge ecològic en l'ambient en què normalment es desenvolupa el bacteri (Boot i col., 1993). Degut a la seva localització a la superfície cel·lular, la "S-layer" és responsable de les propietats superficials del bacteri. Així contribueix al manteniment de la forma de la cèl·lula, especialment en els arqueobacteris en què és l'únic compost rígid de la coberta cel·lular. També exerceix una funció protectora i contribueix a l'estabilitat de la temperatura del bacteri i a la seva adaptació a diversos factors ambientals. Protegeix a les cèl·lules bacterianes dels bacteriòfags, tot i que també pot funcionar com a receptor específic. Gràcies a la seva localització en la superfície cel·lular, promou l'adhesió cel·lular (Sleytr i Messner, 1988).

En lactobacils s'ha establert l'existència d'una relació entre la capacitat d'adhesió a les cèl·lules epitelials, l'activitat agregant i la hidrofobicitat superficial (Wadstrom i col., 1987; Kmet i Lucchini, 1997), de manera que com més hidròfoba és la seva superfície més fortament s'adhereixen.

S'ha observat que els bacteris poden adherir-se a determinades superfícies amb les que normalment no es troben en contacte. Si una determinada espècie bacteriana pot adherir-se a superfícies amb les que mai ha estat en contacte és, segurament, perquè les superfícies diana comparteixen determinades característiques, permetent l'adhesió dels bacteris per un mecanisme comú (Rosenberg i col., 1981). S'ha detectat que hi ha una relació entre la capacitat d'*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 per adherir-se a les cèl·lules epitelials, superfície que normalment no colonitza, i a hidrocarburs com l'hexadecà. La seva adhesió als hidrocarburs està mediada per una interacció hidrofòbica general i sembla que l'adhesió a les cèl·lules epitelials pot involucrar mecanismes semblants entre llocs hidrofòbics del bacteri i les superfícies epitelials (Rosenberg i col., 1981).

Així mateix s'ha vist que *Streptococcus pyogenes* M-5 s'uneix a les cèl·lules epitelials a través d'una interacció hidrofòbica entre la fracció lipídica de l'àcid lipoteicoic de la superfície bacteriana i la cèl·lula (Beachey i Ofek, 1976). També és capaç d'adherir-se a determinats hidrocarburs, malgrat no estar-hi normalment en contacte, propietat que podria ser deguda als mateixos lípids units covalentment (Rosenberg i col., 1981).

L'adhesió dels bacteris als hidrocarburs proporciona, per tant, un mètode senzill per mesurar la hidrofobicitat de les superfícies cel·lulars i indirectament la seva capacitat adhesiva; no obstant hi ha algunes soques que, a pesar de les seves propietats hidrofíliques, s'han mostrat adhesives. Això suggereix que hi ha múltiples mecanismes que estan involucrats en el procés d'adhesió (Del Re i col., 1998).

Sovint s'ha observat que l'adhesió augmenta durant la fase exponencial del creixement, com a resultat de l'augment de la hidrofobicitat que té lloc durant aquesta fase (Van Loosdrecht i col., 1987). En principi aquesta hidrofobicitat s'atribuïa a la presència del material capsular. No obstant, la gran quantitat de lactobacils altament hidrofòbics que s'ha aïllat fa pensar que aquests poden produir altres polímers superficials que contribueixen a aquest fenomen (Wadstrom i col., 1987). Aquesta idea ve avalada per alguns estudis que s'han fet sobre *Enterococcus faecium* en què s'ha trobat una elevada hidrofobicitat en absència de material capsular (Ljungh i col., 1987).

La hidrofobicitat de la superfície bacteriana es veu afectada pel calor, acompanyat o no de digestió proteolítica. Això, juntament amb la presència de proteïnes distribuïdes de manera regular en la paret cel·lular dels lactobacils i l'observació que aquests s'adhereixen al teixit de l'estómac de les rates mitjançant proteïnes o un complexa proteïna-àcid lipoteicoic, ha portat a pensar que les proteïnes superficials determinen la hidrofobicitat en soques que mostren una hidrofobicitat moderada o extremadament elevada (Wadstrom i col., 1987).

Tant si els bacteris s'adhereixen entre sí com si ho fan a altres superfícies, el que és cert és que les superfícies són el principal lloc d'activitat bacteriana (Van Loosdrecht i col., 1990). Normalment a les poblacions naturals els bacteris adherits són més actius que les cèl·lules lliures (Pearl, 1985; Jeffrey i Paul, 1986), però no perquè hi hagi una major concentració de nutrients sinó perquè la curta distància de difusió fa que la transferència de massa sigui més ràpida. En la majoria dels casos que s'han estudiat, la influència d'un sòlid en l'activitat microbiana és un efecte indirecte perquè la seva presència influeix en el medi més que no pas en el bacteri (Van Loosdrecht i col., 1990).

1.2.3-Mecanismes d'actuació

No es coneix exactament el mètode d'actuació dels probiòtics. S'han suggerit diversos mecanismes a través dels quals els probiòtics podrien dur a terme la seva tasca i probablement actuen a través de la combinació de varis. Entre aquests mecanismes caldria destacar:

1-Producció de substàncies anti-bacterianes

-Bacteriocines-són proteïnes bacteriològicament actives que tenen activitat antagonista i no són mai letals per a la cèl·lula productora (Konisky, 1982).

-Peròxid d'hidrogen-pot actuar directament oxidant altres cèl·lules o bé pot actuar indirectament activant el sistema de la lactoperoxidasa-tiocianat-peròxid d'hidrogen (Juven i col., 1991; Fuller, 1992).

-Àcids orgànics-l'alliberació d'àcids orgànics fa disminuir el pH intestinal (Humbert, 1988). D'aquesta manera s'evita la proliferació dels organismes patògens que no són resistents a un pH tant àcid, i a la vegada s'incrementa l'activitat enzimàtica del sistema digestiu (Fuller, 1977).

La presència d'àcids orgànics també ajuda a mantenir un potencial d'oxidació-reducció més baix (Sandine i col., 1972). Els potencials negatius afavoreixen el desenvolupament de bacteris anaerobis i, per tant, dels microorganismes propis de la microbiota gastrointestinal que són capaços de sobreviure en un ambient àcid (Fernandes i Shahani, 1989).

-Altres metabolits-capaços de neutralitzar les toxines bacterianes o inhibir-ne la producció (Mitchell i Kenworthy, 1976).

-Àcids biliars desconjugats-els lactobacils són capaços de desconjugar els àcids biliars a través de les hidrolases de les sals biliars. La forma desconjugada és més inhibidora que la conjugada perquè és capaç de penetrar les cèl·lules bacterianes i, per tant, té un major efecte contra patògens (Kashket, 1987).

2-Competició pels receptors d'adhesió

Alguns bacteris són presents a l'intestí perquè són capaços d'adherir-se a l'epiteli intestinal de manera que queden immobilitzats a la paret intestinal i no són arrossegats pel flux de la peristalsi. Si els bacteris presents al probiòtic són capaços d'adherir-se d'aquesta manera, els receptors de la superfície epitelial estaran saturats i, per tant, els microorganismes patògens no podran colonitzar l'intestí (Fox, 1988; Sarra i Trovatelli, 1990). És el que es coneix com a exclusió competitiva (Fuller, 1992).

També actuen competint directament amb els bacteris patògens pels nutrients disponibles al medi.

3-Estimulació de la immunitat

L'ús de probiòtics augmenta la resistència a les infeccions ja que estimula la resposta inespecífica del sistema immune (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; Ducluzeau, 1997). Estimula la producció d'immunoglobulines, macròfags i limfòcits (Perdigon i col., 1986 i 1990).

4-Activitat anticarcinogènica

Sembla que els probiòtics són capaços de prevenir alguns processos cancerosos a través de:

- la unió, inhibició o inactivació de mutàgens *in vivo*

- la reducció de l'activitat dels enzims bacterians fecals com la nitroreductasa, l'azoreductasa o la β -glucuronidasa, que poden activar la conversió dels procarcinògens en carcinògens.

- l'estimulació o intensificació de la resposta immune.

- la supressió de la formació de tumors (Arihara i Luchansky, 1994; Nadathur i col., 1994).

5-Estimulació de la microbiota indígena

Els microorganismes utilitzats com a probiòtics creen l'ambient adequat per estimular el creixement de la microbiota indígena en detriment dels bacteris patògens. D'aquesta manera contribueixen al creixement i l'estabilització de la microbiota intestinal o urogenital normal.

Per altra banda, aquesta estimulació inhibeix el creixement de bacteris no desitjables, molts dels quals produeixen ureasa que provoca la producció d'amoníac a l'intestí. D'aquesta manera l'ús de probiòtics inhibeix la producció d'amoníac (Hill, 1970).

6-Altres mecanismes

Els probiòtics estimulen la pre-digestió de proteïnes així com la síntesi de vitamines.

També provoquen un augment en l'absorció del calci i, per tant, eviten la descalcificació dels ossos en les persones grans (Havenaar i Huis in't Veld, 1992).

S'ha observat que els probiòtics redueixen els nivells de colesterol en sang. Durant la fermentació, els lactobacils produeixen quantitats elevades d'hidrolases de les sals biliars. Aquestes desconjuguen els àcids biliars i donen com a resultat una pèrdua de solubilitat i la seva co-precipitació amb el colesterol, de manera que redueixen l'absorció en sang del colesterol de la dieta i del colesterol endogen (Gilliland i col., 1985; Klaver i van der Meer, 1993).

També s'ha vist que l'ús de probiòtics alleuja la intolerància a la lactosa perquè els microorganismes la fermenten parcialment abans de la digestió i, a més, produeixen lactasa a l'intestí que ajuda a digerir-la (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; O'Sullivan i col., 1992).

1.3-ELS BACTERIS PATÒGENS

La producció mundial de pollastres es troba en creixement constant ja que és una carn fonamental en la dieta habitual de, pràcticament, tots els països del món. A Espanya l'any 2000 es van sacrificar 544.370.000 pollastres i es van consumir al voltant de 850.000 tonelades de carn de pollastre, amb una mitjana de 16 Kg/persona/any (Alimarket 2001). Malgrat que el consum de carn de pollastre ha disminuït en els darrers anys, segueix essent la carn més consumida i la més barata, lleugerament per darrera dels productes carnis transformats. Només a les poblacions de menys de 2.000 habitants, el seu consum es va veure superat pel de la carn de porc. En el conjunt de l'Estat espanyol, el consum de carn de pollastre a Catalunya és superior al de la mitjana juntament amb les Balears, Aragó, el País Valencià, Murcia, Galícia i les Illes Canàries. El seu cost de producció s'ha mantingut estable de manera que és fàcilment assequible per a la població de baix poder adquisitiu. Això fa que tot el que afecta a aquest producte sigui de gran importància econòmica.

La contaminació per enterobacteriàcies (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*...) en aus té implicacions negatives en la qualitat dels aliments, la productivitat animal i la seguretat alimentària per a l'home. Als Estats Units, en el període 1977-1984, l'aviram va ser identificat com el responsable del 10% de les toxiinfeccions alimentàries en les quals l'agent causal es va poder identificar; els indiots van ser responsables del 56% dels brots i els pollastres del 44%. En un període de 15 anys (1973-1987), els percentatges es van mantenir i la distribució entre aquestes dues

espècies va ser del 64% i 34%, respectivament. En els darrers anys s'ha detectat que *Salmonella* i *Campylobacter* són els dos patògens més freqüents en les toxiinfeccions alimentàries dels humans, els vehicles més freqüents dels quals són la carn d'aviram i els productes alimentaris derivats. El CDC (Center for Diseases Control and Prevention) estima que cada any 75 milions de persones es posen malaltes i 5.000 persones moren a causa de toxiinfeccions alimentàries. Aproximadament uns 2 milions de casos a l'any són deguts a *Campylobacter*, 1'6 milions són a causa de *Salmonella* i uns 20.000-40.000 són provocats per *E.coli* O157:H7.

Salmonella és un bacil Gram negatiu patògen, normalment mòbil per flagels i anaerobi facultatiu. Pot créixer i multiplicar-se en un ampli rang de temperatures (dels 5°C als 60°C) i de pH (de 4 a 9) tot i que la temperatura òptima de creixement se situa entre els 25°C i els 40°C i el pH òptim entre 6'5 i 7'5. Es troba al tracte gastrointestinal humà i d'altres animals de sang calenta i freda. Si les condicions ambientals són les adequades pot sobreviure fora del cos de l'animal hoste. Es coneixen uns 2.300 serovars de *Salmonella*, però cada any se'n descobreixen de nous (Langlois, 1993). Els diferents serovars reben el seu nom segons els antigens de superfície ja que no hi ha dos serovars amb el mateix patró. La majoria d'aquests serovars no estan adaptats a cap hoste en particular, de manera que es poden trobar en qualsevol hoste i arreu del món, podent arribar a provocar-los la mort. Menys de l'1% dels serovars coneguts estan adaptats a l'hoste, de manera que poden infectar a una espècie animal però no a una altra. Així *S.typhi* infecta exclusivament a l'home mentre que *S.pullorum* i *S.gallinarum* només als pollastres (Sarra i Badini, 1997).

Escherichia coli és un bacil Gram negatiu patògen que pot ser mòbil per flagels o no mòbil i anaerobi facultatiu amb metabolisme respiratori i fermentador. La seva temperatura òptima de creixement és de 37°C. Es troba al tram final de l'intestí d'animals de sang calenta. A més del flagel proteic la majoria de les soques presenten fimbries o proteïnes fibrilars que s'extenen en gran nombre des de la superfície bacteriana cap al medi. Algunes d'aquestes fimbries tenen una funció específica com a òrgans adhesius.

Algunes soques d'*E.coli* produeixen enterotoxines. Entre les produïdes en destaquen dues que han estat ben estudiades, la termolàbil i la termoestable, que es poden trobar juntes o per separat i la producció de les quals ve determinada per plàsmids (Ørskov, 1984).

En els darrers anys *E.coli* O157:H7 ha sorgit com un important patògen humà que provoca una diarrea hemorràgica extremadament aguda acompanyada de rampes abdominals, i en alguns pacients provoca un síndrome urèmic hemolític (Neill, 1989; Anònim, 1991). La dosis d'infecció requerida per als humans és molt baixa (Willshaw i col., 1994). Tot i que s'ha demostrat la transmissió home a home (Griffin i Tauxe, 1991), la majoria d'infeccions s'han associat al consum de carn poc cuita, principalment hamburgueses de vedella (Willshaw i col., 1994), i altres productes d'origen boví incloent llet no pasteuritzada. Així mateix s'ha associat al consum de productes carnis fermentats com el salami (Tilden i col., 1996). També s'ha aïllat de carns crues incloent porc, pollastre i xai (Doyle i Schoeni, 1987) i s'ha associat a brots de toxiinfeccions alimentàries produïdes per aliments molt àcids com maionesa (Raghubeer i col., 1994), suc de poma (Besser i col., 1993) i iogurt (Morgan i col., 1993).

Campylobacter és un bacil Gram negatiu patògen, curvat, que pot presentar una o més voltes d'hèlix. És mòbil a través d'un flagel polar a un extrem de la cèl·lula o a través de dos flagels a ambdós extrems. És un microorganisme microaerofilic amb metabolisme respiratori que necessita per viure una concentració del 3 al 15% d'oxigen i del 3 al 5% de CO₂. Es troba als òrgans reproductors, tracte intestinal i cavitat oral d'homes i animals.

Les toxiinfeccions alimentàries degudes a aquests patògens comporten tot un seguit de pèrdues tant humanes com en el sector animal. Entre les pèrdues humanes hi ha les que es desprenen del tractament de la malaltia, la pèrdua de productivitat, els perjudicis en el benestar i, fonamentalment, les morts que es poden donar entre els grups de risc elevat. Entre les pèrdues en el sector animal hi ha les pèrdues econòmiques per canvis en el mercat i pèrdua d'imatge, la disminució en la productivitat i les despeses originades en la granja per les mesures de combat i eradicació que cal aplicar (Noordhuizen i Frankena, 1994).

1.3.1-Patogènia a les aus

Els bacteris patògens com *Salmonella*, *E.coli* i *Campylobacter* no són membres nadius de la microbiota dels pollastres, però són capaços de colonitzar el seu intestí de forma molt ràpida i persistir-hi de forma no patològica (Stavric, 1992). Quan es donen les condicions favorables que permeten el seu creixement, aquests microorganismes poden arribar a una massa crítica i produir prou toxines com per provocar una malaltia en l'animal (Zeidler, 1996). En aquests casos la presència del patògen és detectada

fàcilment i pot ser eliminat de la cadena alimentària, evitant així la seva propagació a altres animals i als humans.

El problema es presenta quan la infecció provoca pocs símptomes en l'animal de manera que, tot i que el patògen es troba present al cec, la seva presència no és detectada podent persistir en la cadena alimentària i extenent la infecció a altres animals i a l'home en últim terme.

Són diversos els factors que afecten a la susceptibilitat dels pollastres a la colonització per part dels patògens (Bailey, 1993), un d'ells és l'edat. Els animals joves són els més afectats per les infeccions ja que encara no disposen d'una microbiota pròpia ben desenvolupada que els protegeixi. Per contra, els animals adults presenten una major resistència a les infeccions intestinals de manera que, fins i tot quan aquesta es produeix, hi ha poca o nul·la mortalitat i la fertilitat no es veu reduïda de forma significativa (Lister, 1988; McIlroy i col., 1989). El potencial de supervivència del bacteri patògen a través de la barrera gàstrica, la competició amb altres microorganismes del tracte gastrointestinal i la seva capacitat de colonització de l'intestí són altres factors a tenir en compte. La susceptibilitat dels animals també es veu afectada per la composició de la dieta amb què són alimentats. També l'estat fisiològic i de salut de l'au així com la seva càrrega genètica són factors condicionants. La seva resistència també es pot veure influïda per la medicació utilitzada així com per les situacions d'estrès que es donen durant la recollida, càrrega i transport dels animals (Jones, 1990).

Salmonella és el patògen més conegut com a responsable de les infeccions en pollastres. En els darrers anys l'aïllament de *S. enteritidis* ha augmentat espectacularment fins al punt de considerar les infeccions causades per aquest serovar com una nova pandèmia. A més aquest serovar ha desplaçat a *S. typhimurium* com el més freqüentment aïllat (Rodríguez i col., 1990; Plummer i col., 1995). Hi ha dos sistemes fonamentals de transmissió: la transmissió vertical en què el patògen passa de generació en generació a través de les granges de cria i les línies de posta d'ous, i la transmissió horitzontal en què *Salmonella* es transmet d'unes aus a les altres en granges de cria, granges d'engreix i escorxadors a través dels aerosols, el contacte i els insuficients programes de desinfecció (Cox i col., 1993).

La seva presència sol manifestar-se en forma d'enteritis; algunes espècies, com *S. enteritidis* o *S. typhimurium*, tenen la propietat de ser invasives de manera que poden infectar el tracte reproductor, el fetge i altres òrgans podent-se transmetre a través de l'ou (Miles i Butcher, 1993). En alguns casos *Salmonella* pot arribar també al sistema

limfàtic o fins i tot, però més rarament, al torrent sanguini on pot multiplicar-se provocant una infecció generalitzada que pot tenir lloc amb o sense diarrea (Kamata, 1992).

La contaminació del contingut de l'ou amb *Salmonella* pot tenir lloc a través de dues vies principals: a partir de la contaminació fecal arribant a l'interior de l'ou a través de la closca o bé a partir del teixit reproductor de l'oviducte (Humphrey, 1994; Suzuki, 1994). Tenint en compte que no s'ha trobat cap relació directe entre la contaminació de la closca o la càrrega fecal de *Salmonella* i la contaminació del contingut de l'ou (Humphrey i col., 1991a), i s'ha pogut detectar la presència del patògen en el teixit reproductor d'animals que no el presentaven en el seu intestí (Bygrave i Gallagher, 1989; Timoney i col., 1989), sembla més probable que la infecció del contingut de l'ou estigui més relacionada amb la infecció del teixit reproductor (Humphrey, 1994).

Els òrgans reproductors de la gallina estan formats per l'ovari i l'oviducte. A l'ovari es produeix l'òvul i el rovell es forma a partir de l'oocit amb materials sintetitzats pel fetge. L'oviducte s'encarrega de conduir l'òvul cap a la cloaca i d'afegir-hi successivament l'albúmina, les membranes i la closca (King, 1982).

El rovell podria ser contaminat pel patògen quan l'ou surt de l'ovari i abans de ser cobert per la closca (Suzuki, 1994). El fet que l'albumen i la part externa de la membrana vitalina siguin els principals llocs de contaminació (Gast i Beard, 1990; Humphrey i col., 1991b) suggereix que alguns ous són infectats en l'oviducte (Shivaprasad i col., 1990; Timoney i col., 1989). Durant l'emmagatzematge *S. enteritidis* pot migrar de l'albumen al rovell (Braun i Fehlhaber, 1995).

Les gallines portadores de *Salmonella* rarament posen ous infectats, però aquests poden ser-ho posteriorment a través de la superfície externa. S'ha vist que el microorganisme és capaç de travessar la closca si hi ha un grau adequat d'humitat i de diferència de temperatura entre l'exterior i l'interior (Sarra i Badini, 1997). Quan el patògen és present a l'interior de l'ou s'hi troba en un nombre força baix degut al complex sistema de membranes barrera, als compostos antibacterians de l'albumen i a la gran quantitat d'anticossos del rovell (Dadrast i col., 1990).

El màxim nivell de colonització per part de *Salmonella* sol tenir lloc durant la segona o tercera setmana de creixement. Després, a no ser que l'animal es vegi afectat per alguna malaltia o situació d'estrès, hi ha una disminució gradual de la freqüència (Bailey, 1993).

La complerta i permanent eradicació de la salmonel·losis aviar és difícil degut a diversos factors. En primer lloc la falta d'especificitat cap a l'hoste, ja que la majoria de serovars són capaços d'infectar i/o provocar malalties en diferents espècies aviar. L'estat sanitari de l'animal portador és un altre factor a tenir en compte. *Salmonella* pot estar present a l'intestí dels animals sans en baixes concentracions. Diversos factors d'estrès poden provocar-ne un increment donant com a resultat una major excreció del patògen a través de les femtes i, per tant, un major risc d'extensió de la infecció. La contaminació del pinso és la via d'infecció i reinfecció més comú, degut a la presència de subproductes animals contaminats per *Salmonella*. La gran varietat de serovars de *Salmonella* fa que sigui molt difícil preparar una vacuna que pugui protegir contra totes les possibles infeccions d'aquest patògen. També s'ha vist que les substàncies antimicrobianes i acidificants, que s'utilitzen normalment com a additius en el pinso, poden estimular l'excreció fecal del patògen en les aus infectades incrementant així el risc de transmissió. Finalment cal tenir en compte que, malgrat que l'ús d'antibiòtics suprimeix la infecció alliberant a les aus de *Salmonella*, la interrupció de la medicació pot potenciar la seva susceptibilitat a la reinfecció per l'alteració provocada en el balanç global de la microbiota de l'intestí (Kamata, 1992).

Tot i que *Salmonella* és el patògen més conegut, *Campylobacter* és el principal responsable de les infeccions en aus. En un estudi de l'any 1996 sobre la incidència de *Campylobacter* i *Salmonella* en els pollastres, Mulder va observar que el 82% de les aus eren contaminades per *Campylobacter*, essent *C.jejuni* l'espècie dominant, mentre que només el 27% eren contaminades per *Salmonella*.

La infecció per part de *Campylobacter* provoca enteritis en els pollastres i es pot observar una variació estacional, amb unes taxes màximes d'infecció durant l'estiu (juny-setembre) i unes taxes mínimes durant l'hivern i la primavera (Mulder, 1996).

C.jejuni sol ser patògen per als animals joves, però poques vegades ho és per als adults (Pearson i col., 1996). La seva presència s'ha detectat en pollastres d'entre 2 i 4 setmanes d'edat (Jacobs-Reitsma i col., 1995; Berndtson i col., 1996). Si es produeix un brot infecció, pràcticament tots els animals resulten infectats en pocs dies i aquesta infecció es manté durant tot el creixement (Bailey, 1993).

1.3.2-Patogènia als humans

A través dels pollastres contaminats els patògens poden arribar a l'home. L'enteritis humana causada per *Salmonella*, *Campylobacter* o *E.coli* és deguda principalment al

consum de carn de pollastre, ous o productes derivats contaminats. En aquests casos els productes solen ser ingerits crus o poc cuits, tot i que si la població del patògen és molt elevada aquest no pot ser destruït per cap mètode estàndard de cocció (Miles i Butcher, 1993).

Les vies d'infecció poden ser diferents:

- toxiinfeccions alimentàries en què el microorganisme produeix i excreta toxines al menjar, que ataquen al sistema digestiu (enterotoxines) o al sistema nerviós (neurotoxines). Un cop s'han secretat les toxines la presència del microorganisme no és necessària i sovint és destruït durant la cocció de l'aliment. Per contra la toxina es manté activa i provoca la malaltia.

- infeccions alimentàries en què el microorganisme és ingerit amb el menjar i produeix toxines de manera activa en l'intestí de l'hoste. Aquestes toxines ataquen el teixit digestiu o interfereixen en les funcions normals del sistema digestiu i/o altres òrgans interns. En aquests casos s'ha d'ingerir una massa crítica de microorganismes perquè es desencadeni la malaltia (Zeidler, 1996).

És difícil conèixer el nombre exacte de casos que tenen lloc al món degut a infeccions d'aquest tipus. En molts països, com els Estats Units, la llei no obliga a declarar totes les malalties i poques víctimes segueixen un tractament mèdic, de manera que totes les dades que es puguin tenir són estimatòries (Zeidler, 1996).

La salmonelosi és la principal d'aquestes malalties. Els símptomes apareixen de 12 a 72 hores després del consum del producte contaminat i solen ser gastroenteritis aguda, febre, mal de cap, rampes abdominals, vòmits i diarrea (Benenson, 1990).

Després de recuperar-se de casos clínics de salmonelosi, alguns pacients continuen mantenint un reservori de *Salmonella* durant setmanes, mesos o anys que moltes vegades eliminen a través de les femtes i que és un vehicle més per a la disseminació del bacteri. A més, els antibiòtics que són actius contra la malaltia, com el cloramfenicol o el trifenicol, no són efectius per tractar aquests reservoris (Le Minor, 1984).

E.coli també és responsable d'un bon nombre de malalties relacionades amb la ingesta de productes derivats de pollastres contaminats. De tots els serovars coneguts d'*E.coli* podem diferenciar-ne tres grups principals, segons el tipus de malaltia que provoquen en els humans (Ørskov, 1984). El grup dels serovars d'*E.coli* enteropatògens és format per uns pocs serovars associats a diarrees infantils, els d'*E.coli* enterotoxigènics ho és per un nombre limitat de soques que produeixen enterotoxines causant diarrees en animals i

homes i els d'*E.coli* enteroinvasius és format per serovars que poden causar malalties semblants a la disenteria.

En els darrers anys s'ha vist que *C.jejuni* és el responsable d'un nombre important d'enterocolitis humana a tot el món (Berndtson i col., 1996). *C.jejuni* provoca febre, nàusees, rampes abdominals i eliminació de sang en les femtes, infectant a gent de totes les edats tot i que normalment es diagnostica amb més freqüència en nens (Butzler i Skirrow, 1979).

1.3.3-Fonts de contaminació

Hi ha molts punts d'entrada pels enteropatògens en tota la cadena alimentària. Sembla ser que la presència d'aquests patògens en els productes finals consumits per l'home està en funció de la seva presència en el cec de l'animal viu. Així doncs, per controlar la contaminació en l'home primer és necessari fer-ho en les aus.

És important controlar la presència de patògens tant en el propi animal com en l'entorn on viu. Les principals fonts de contaminació en els pollastres són: els animals que arriben a les granges procedents de l'exterior, el menjar, l'aigua, els encenalls de fusta de les gàbies, els rosegadors, els ocells i els insectes. El menjar dels pollastres és format per material ric en proteïna, midó i altres aliments en quantitats menors. El component proteic sol provenir de restes de carn i de la indústria alimentària i de subproductes de la indústria oleica. Aquests productes poden venir infectats per patògens malgrat els tractaments tèrmics aplicats (Zecha i col., 1977). Alguns estudis afirmen que quan la humitat dels encenalls de fusta supera el 25% es detecta un elevat nombre d'animals infectats per *Salmonella* (Jones, 1990).

El procés de transport dels animals fins a la planta de processament és un punt altament crític. Jones i col. (1991) han observat que la contaminació cecal augmenta més de 10 vegades després del transport. Cal tenir molta cura en el procediment utilitzat per carregar els animals, el tipus de transport, el període d'espera, les condicions de sacrifici i el procés de sacrifici en sí mateix (Mulder, 1996). Durant el processament dels pollastres hi ha un elevat risc de que es produeixi una contaminació creuada, ja que la carn dels animals entra en contacte amb el contingut intestinal i les femtes.

A més de la carn de pollastre, els ous són un vehicle comú de transmissió de patògens als humans. *S.enteritidis* pot créixer en els ous a 4°C (Kim i col., 1989) i *S.typhimurium* a 10°C (Humphrey, 1990). A la Unió Europea els ous solen conservar-se entre 8°C i 16°C, de manera que amb el temps adequat el patògen s'hi pot multiplicar fins a nivells

elevats. S'ha vist que en 24 hores es poden arribar a nivells superiors a 10^9 ufc per ou (Fehlhaber i col., 1993). Tenint en compte que els mètodes estàndard de cocció no poden eliminar nivells de 10^8 ufc/g en el rovell (Humphrey i col., 1989), la temperatura de conservació dels ous és molt important. En aquest aspecte és convenient recollir-los diversos cops al dia i refrigerar-los ràpidament (Miles i Butcher, 1993).

La majoria dels casos de malalties degudes als aliments (77%) són conseqüència de pràctiques impròpies i d'una manca d'higiene personal en les operacions de servei de menjar. En altres casos aquestes són conseqüència d'una incorrecta manipulació dels productes a casa (20%) o a les plantes de processament dels productes d'alimentació (3%) (Zeidler, 1996).

1.4-ELS PROBIÒTICS EN AUS

Per aconseguir un bon rendiment econòmic els pollastres es crien en un sistema de producció intensiu, en què estan sotmesos a un estrès constant per les condicions de transport a les granges de cria i la manca d'espai. En aquestes condicions no es pot garantir que els animals acabats de néixer, així com els més joves, puguin adquirir la microbiota intestinal normal ja que aquesta situació trenca l'equilibri de la microbiota intestinal i provoca una davallada en el nivell de defenses.

Des de la seva aparició, els antibiòtics s'han utilitzat com a terapèutics ja que eliminen la presència dels patògens i milloren el creixement, però el seu posterior ús continuat com a promotors de creixement ha donat lloc a la presència de residus a la carn i a l'aparició de microorganismes resistents. L'ús massiu d'uns pocs antibiòtics amb escasses rotacions i la poca informació sobre els nivells de resistència han contribuït al problema. Moltes vegades els antibiòtics s'han utilitzat de manera inapropiada per solucionar problemes que, sovint, són conseqüència d'una mala gestió de les explotacions animals. Una bona higiene, un programa de medicina preventiva i una òptima nutrició i producció animal permetrien limitar el risc de brots infecciosos. Cal fer un ús prudent dels agents antimicrobians terapèutics que assegurin al màxim l'efecte curatiu i minimitzi el desenvolupament de resistències.

En aquest sentit la Comissió Europea ha prohibit a partir del juliol de 1999 l'ús de determinats antibiòtics com l'avoparcina (des del 1997), la bacitracina de zinc, l'espíramicina i la virginamicina, inclosos sovint com a promotors de creixement.

(Reglament 2821/98, DOCE nº L351, 29/12/1998). Des d'aleshores només és permès l'ús de flavofosfolipol i avilamicina en explotacions avícoles. El sector avícola consumeix menys medicaments que altres sectors productius degut a l'elevat nivell sanitari d'unes explotacions on hi ha hagut una constant innovació tecnològica de les instal·lacions, selecció genètica i avanços en la fabricació de pinsos compostos (Toro, 1999). Així mateix s'han establert molts programes d'eradicació de *Salmonella* en el marc de la Directiva 92/117/CEE.

Els probiòtics es presenten com una alternativa per mantenir l'equilibri de la microbiota intestinal en els animals adults i facilitar-ne l'adquisició en els més joves, i contribueixen a una millor productivitat augmentant el pes dels animals i la producció d'ous, millorant la taxa de conversió del menjar i disminuint la taxa de mortalitat (Mohan i col., 1996; Jin i col., 1996a, 1998a).

L'administració del probiòtic de forma continuada a través de l'aliment durant el període de creixement, és el millor sistema per assegurar-ne una taxa elevada al tub digestiu (Guillot, 1997). Els microorganismes que el composin hauran de recórrer el mateix camí que l'aliment al llarg del tracte digestiu i resistir-ne les condicions adverses fins arribar a l'intestí.

L'aliment ingerit pel pollastre és deglutit i enviat a través de l'esòfag al pap on roman durant més de 6 hores. El pap és un eixamplament de l'esòfag recobert per un epitelí esquamós estratificat on es troben moltes glàndules mucoses.

La ingesta passa del pap al proventricle o estómac glandular, de paret més gruixuda que l'esòfag i recoberta d'epitelí columnar simple, que conté glàndules multilobulars encarregades de produir àcid clorhídric i suc gàstric proteolític (pepsina).

Sempre en condicions de pH baix, la ingesta passa del proventricle al ventricle o estómac muscular que és format pel sac craneodorsal, el cos i el sac caudoventral. Les parets són extremadament gruixudes i recobertes per un epitelí columnar simple. Aquí el menjar és fragmentat gràcies a petits trossos de minerals ingerits per l'animal (Bolton, 1967).

Del ventricle passa a l'intestí prim on té lloc la digestió química i l'absorció. L'intestí prim consta de duodè, on es buida el contingut del pàncreas, jejú i ileo. L'intestí prim continua a l'intestí gruixut format per dos cecs, dret i esquerra, que buiden al recte i per la cloaca. Només els fluids poden entrar als cecs a través d'una vàlvula. A continuació tornen a ser expulsats cap al recte a través de contraccions retroperistàltiques. Aquest procés colon-cec-colon permet que els microorganismes patògens ingerits amb

l'aliment, que han sobreviscut a la digestió, puguin ser transferits al cec i mantenir-s'hi (Sarrazin i Badini, 1997). L'àcid úric és descompost anaeròbicament en el cec on hi ha una microbiota de 10^9 - 10^{10} cèl·lules/g produint amoníac, àcid acètic i CO_2 . El cec és un lloc d'absorció d'aigua i nitrogen no proteic així com sucres senzills i àcids grassos volàtils que no han estat absorbits anteriorment en el colon.

Sembla ser que el pap és la zona del tub digestiu on es troba la població làctica més estable i nombrosa, mentre que al cec i a les femtes el nivell de colonització està en funció de la disponibilitat dels sucres (Sarrazin i Badini, 1997). *L.acidophilus*, *L.salivarius* i *L.fermentum* són les espècies més comuns a l'intestí de pollastres (Morishita i col., 1982).

La microbiota intestinal assoleix la màxima activitat en els pollets a les 3-5 setmanes de vida (Barnes i col., 1972) i sembla que el contingut del lumen cecal i l'intestí gruixut són els més adequats per a ser utilitzats com a cultius indefinits protectors en els animals més joves (Sarrazin i Badini, 1997).

1.4.1- Mitjans d'administració

Els microorganismes probiòtics es poden administrar a les aus en forma de material cecal fresc o bé com a cultius congelats o liofilitzats. Alguns autors suggereixen que el primer és més efectiu perquè els cultius derivats de pollastres madurs perden la capacitat de colonització durant l'emmagatzematge (Hinton i col., 1991; Stavric i col., 1991b).

S'han utilitzat diverses tècniques per a l'administració de cultius. L'administració oral o directa al pap va ser una de les primeres vies d'inoculació que es va utilitzar. En aquest cas el microorganisme es dissol en una solució fisiològica i s'introdueix directament al tub digestiu de l'animal a través d'una cànula (Nurmi i Rantala, 1973).

L'aigua que es subministra als animals és un altre vehicle d'administració. Cal tenir en compte que si l'aigua és potabilitzada amb clor o conté metalls pesants, pot afectar negativament a la viabilitat dels microorganismes. En aquests casos s'aconsella afegir un 0'25% de llet en pols com a protector (Sarrazin i Badini, 1997).

La inclusió del probiòtic en el pinso seria un recurs adequat, ja que permet una administració fàcil i continuada del microorganisme. Els cultius liofilitzats de lactobacils poden sobreviure durant 2 setmanes quan són barrejats amb el pinso (Sarrazin i Badini, 1997), no obstant l'administració dels probiòtics a través del menjar presenta alguns problemes, ja que els animals acabats de sortir de l'ou estan exposats a una

ràpida colonització per part d'alguns patògens com *Salmonella*, abans de poder arribar al menjar (Cox i col., 1990). En aus el fet d'utilitzar aliment granulat afegeix problemes tecnològics a l'hora d'incorporar-hi soques bacterianes no esporulades, susceptibles d'ésser destruïdes per la temperatura del procés (Guillot, 1993; Tournut, 1989, 1993).

La distribució del probiòtic en forma d'aerosol és un altre dels mètodes utilitzats, de manera que el microorganisme és pulveritzat sobre els animals acabats de sortir de l'ou. Els encenalls de fusta utilitzats a les gàbies d'aus són un altre dels mitjans que pot ser útil per a l'administració de probiòtics. La microbiota protectora dels animals adults sans que es troba present a les femtes, també es troba als encenalls utilitzats per ells. Això suggereix que l'ús continuat d'encenalls que contenen la microbiota protectora inhibeix el creixement de *Salmonella* i disminueix la contaminació per part del patògen en els encenalls (Turnbull i Snoeyenbos, 1973). Aquesta seria una manera d'assegurar l'exposició i colonització dels animals acabats de sortir de l'ou. L'experiència de Corrier i col. (1992) mostra, a més, que aquesta microbiota anaeròbia és capaç de mantenir la seva viabilitat i capacitat protectora en els encenalls després d'un període de 50 dies d'emmagatzematge i desús.

En els darrers anys s'han anat desenvolupant formes alternatives per a l'administració dels cultius probiòtics com la inoculació cloacal (Corrier i col., 1991), la inoculació directe en l'ou (Cox i col., 1992) i l'encapsulació en boles d'alginat afegides al menjar (Hollister i col., 1994).

1.4.2-Valoració de l'aplicació dels probiòtics en aus

Els estudis fets en aus mostren que, en general, l'ús de probiòtics provoca augment del pes i de la taxa de conversió del menjar i disminució de la mortalitat i del nombre de bacteris patògens (Mohan i col., 1996; Jin i col., 1996a, 1998a), així com augment en la producció, mida, massa i pes dels ous (Nahashon i col., 1992, 1993, 1996 a i b). Els resultats, però, difereixen d'unes espècies a les altres i d'uns experiments als altres.

Els probiòtics poden tenir efectes beneficiosos sobre la salut dels pollastres, però amb els estudis que s'han dut a terme fins ara s'ha vist que té més possibilitats d'èxit l'ús d'una microbiota normal procedent de pollastres adults. Inoculant el tub digestiu dels pollets acabats de néixer amb aquest cultiu es transmet una microbiota apropiada que inicia la primera colonització del tub digestiu (Sarra i Trovatelli, 1990).

Stavric i col. (1985) i Gleeson i col. (1989) van aconseguir resultats positius amb cultius purs derivats de femtes d'aus adultes que contenien de 28 a 50 soques diferents de 10

gèneres diferents. L'administració del contingut cecal de gallines de 8 setmanes va impedir la colonització del tub digestiu de pollets per part de *S.kedougou* (Impey i Mead, 1989). Quan els pollets van ser tractats amb contingut cecal, acompanyat o no de lactosa, es va detectar una reducció en la presència de *S.typhimurium* (Ziprin i Deloach, 1993). Blankenship i col. (1993) van inocular 10^4 o 10^6 ufc de *S.typhimurium* en pollets que havien rebut contingut cecal, i hi va haver una reducció significativa en el nombre de carcasses processades infectades. Diversos autors han observat que l'administració d'un cultiu cecal dona com a resultat un augment de la concentració d'àcids grassos volàtils i una disminució en la capacitat de colonització per part dels patògens (Corrier i col., 1994, 1995; Nisbet i col., 1994, 1996; Jin i col. 1998b), de manera que l'augment d'un està relacionat amb la disminució de l'altre. Els àcids grassos volàtils de cadena curta que es produeixen en major concentració són l'acetat, el propionat i el butirat (Hume i col., 1995). Sembla que l'activitat antimicrobiana és deguda principalment al propionat ja que l'acetat és poc actiu i el butirat es troba present en concentracions molt inferiors (Kwon i col., 1997).

En oposició a aquests bons resultats també hi ha indicis que mostren que aquests cultius indefinits no sempre són efectius contra la colonització per part de *Salmonella* (Stavric i col., 1991a). En general sembla que quan s'utilitzen cultius no definits sota condicions controlades de laboratori s'obtenen bons resultats, mentre que en condicions de camp els resultats són més variables (Stavric i D'Aoust, 1993).

El problema d'aquests cultius indefinits és que no es poden utilitzar de manera comercial perquè es desconeix la seva composició exacta i, per tant, no es pot assegurar que no continguin bacteris patògens ni tampoc que hi hagi una repetitivitat en la seva composició. Per això s'han fet esforços per intentar desenvolupar un cultiu definit de composició coneguda que sigui eficaç contra les infeccions dels patògens.

Ja a la dècada dels 80, Impey i col. (1982) van desenvolupar una barreja definida de 48 organismes que tenia una eficàcia comparable a la dels cultius indefinits contra 10^3 ufc de *S.typhimurium* i *S.kedougou*. Un any més tard Watkins i Miller (1983) van alimentar pollastres amb un cultiu de *L.acidophilus*. Com a resultat d'això va augmentar la quantitat de *L.acidophilus* present a l'intestí mentre que va disminuir la presència d'*E.coli*, *S.aureus* i *S.typhimurium*. També es va aconseguir reduir la taxa de mortalitat causada per *S.aureus* (que va passar del 32'6 al 11'1%) i per *S.typhimurium* (que va passar del 36'7 al 8'8%). L'ús d'un cultiu definit de 50 soques va tenir efecte protector contra 10^4 ufc d'un cultiu patògen. Aquest efecte va ser més gran quan les soques van

créixer per separat i després es van barrejar i es van fer créixer juntes abans d'administrar-les, possiblement perquè s'intensificava la formació de glicocàlix (Costerton i col., 1978). També va augmentar quan es van administrar directament al pap. Les 50 soques no són necessàries per dur a terme la protecció, però sí per mantenir el balanç ecològic de la microbiota intestinal. La protecció va disminuir en disminuir el nombre de soques que composaven la barreja (Stavric i col., 1985).

Als anys 90, l'aplicació d'un cultiu definit format per 11 soques bacterianes, incloent 2 *Lactobacillus*, va augmentar significativament la resistència dels pollets a la colonització de *Salmonella* quan era administrat juntament amb lactosa (Nisbet i col., 1993; Corrier i col., 1994). L'administració d'una barreja de diversos *Lactobacillus* a pollets va donar lloc a un augment del pes corporal i a una disminució del nombre de coliforms respecte als animals control (Jin i col., 1996a). Quan *L.acidophilus* es va administrar a gallines, hi va haver un augment de la producció d'ous i va disminuir la concentració de colesterol en el rovell dels ous, tot i que per aconseguir aquests resultats calia un inòcul superior a 10^6 ufc/g de menjar (Abdulrahim i col., 1996).

Alguns estudis semblen indicar, no obstant, que aquests cultius no són tant efectius com els indefinits i que són molt més inestables durant la manipulació al laboratori i l'emmagatzematge.

Barnes i col. (1980a) van desenvolupar diversos cultius definits però només un d'ells, format per 23 soques diferents, oferia protecció. No obstant aquesta era menor que la oferta pels cultius fecals no definits. Resultats més decebedors es van observar quan els broilers van ser suplementats amb *Lactobacillus*, ja que no creixien tant bé com els animals control o els que havien estat tractats amb antibiòtics (Buenrostro i Kratzer, 1983) i no s'observava cap efecte en el creixement o el consum diari dels animals (Watkins i Kratzer, 1983, 1984).

Goren i col. (1984) van demostrar que la presència de microorganismes anaerobis facultatius era necessària per assegurar l'èxit de les barreges indefinides, ja que un cultiu mixta de fins a 259 espècies no identificades, totes elles anaeròbies obligades, no va ser efectiu sense la seva presència. Tampoc va tenir èxit a l'hora de reduir el nivell del patògen a les femtes un probiòtic compost per *Bacillus*, *Lactobacillus* o *Enterococcus* administrat a pollets d'un dia que van ser infectats amb *S.kedougou* a nivells de 7-9 cèl·lules/g de menjar (Hinton i Mead, 1991). La presència de *S.typhimurium* no es va aconseguir reduir amb l'ús d'un cultiu mixta de bacteris làctics aïllat de les femtes; ni amb iogurt fermentat per *L.acidophilus* i *Bifidobacterium* sp.; ni

amb aigua suplementada amb fructo-oligosacàrids o iogurt; ni amb un probiòtic comercial que contenia *L.acidophilus*, *B.bifidum* i una barreja d'altres soques del gènere *Bifidobacterium* provinents de pollastres i humans (Stavric i col., 1991b). Tampoc s'ha trobat que l'administració de *L.acidophilus* i *E.faecium* dels 8 als 60 dies donés cap diferència significativa en el pes dels animals (Maiolino i col., 1992). Més recentment una soca de *L.casei* va ser capaç d'augmentar el guany de pes diari durant les 3 primeres setmanes, però no a partir de la quarta (Yeo i Kim, 1997). Jin i col. (1998b) van observar que l'administració d'una barreja de 12 soques liofilitzades a través del menjar no comportava diferències en els recomptes de lactobacils ni de coliforms, tot i que donava lloc a un augment del pes corporal.

Un dels productes comercials més provats en pollastres és el Broilact[®] (Orion Corporation Farnos), un cultiu preparat a partir de 30 soques diferents provinents del cec de pollastres. El producte va reduir el nombre de pollastres infectats per *S.enteritidis* PT4 així com la gravetat de les infeccions (Bolder i col., 1991). En un estudi dut a terme durant 3 anys la taxa d'infecció per *Salmonella* es va reduir del 21% al 6'5% de pollastres infectats i del 49% al 11% en un altre seguiment d'un any (Hirn i col., 1992). L'administració de Broilact[®] tenia un efecte protector molt ràpid en animals infectats artificialment amb *Salmonella* (Salvat i col., 1992).

Primalac és un altre compost comercial format per una mescla de *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *Bifidobacterium bifidum* i *Streptococcus faecium*. En ser administrat a través del menjar a pollets infectats amb 10^5 ufc de *S.typhimurium*, provoca un major augment de pes durant la tercera setmana i disminueix ràpidament el recompte de *Salmonella* (Jones, 1990).

Lactiferm conté la soca *Enterococcus faecium* M74. És capaç de prevenir la transmissió de *Salmonella* entre els pollastres amb una baixa taxa d'infecció. Hejlícek i col. (1995) van observar que el producte era capaç de proporcionar protecció als animals no infectats pel patògen.

En els darrers anys ha augmentat l'interès en l'ús de prebiòtics o substrats de creixement que estimulen el desenvolupament de bacteris intestinals beneficiosos i potencien la seva activitat probiòtica. Els oligosacàrids basats en fructosa, galactosa i mannososa són resistents a la digestió per part de α -amilasa, sucraza i maltasa (Fishbein i col., 1988) de manera que arriben a la part baixa de l'intestí sense haver estat hidrolitzats, i allà serveixen com a substrat pel creixement de bacteris làctics que els poden utilitzar com a

font d'energia (Mitsuoka i col., 1987). Els àcids produïts provoquen una baixada del nivell de pH. *Salmonella*, *E.coli* i altres bacteris Gram negatius no poden utilitzar els oligosacàrids i per tant el seu creixement es veu inhibit (Mulder, 1991; Oyarzabal i Connor, 1995).

Diversos autors han aconseguit reduir la colonització de *Salmonella* en broilers gràcies a la utilització d'una dieta que contenia un suplement de lactosa o mannososa, segurament a causa dels canvis del pH del contingut intestinal (Hinton i col., 1990; Corrier i col., 1990).

Allen i col. (1997) van detectar que la inclusió de mannososa en el menjar feia disminuir la colonització de *S.enteritidis* en pollastres, de manera que el recompte del patògen es reduïa unes 10 vegades per cada 1% de mannososa.

Edens i col. (1997) van observar que manipulant la concentració de lactosa en la dieta de pollastres es podia proporcionar un avantatge selectiu per *L.reuteri*.

Per contra s'ha vist que l'addició d'oligosacàrids en el menjar o l'aigua no redueix la colonització de *Salmonella* en pollets (Bailey i col., 1991), i que la seva addició al menjar no té efecte en la prevalència de *Salmonella* en el sacrifici (Waldroup i col., 1993).

1.5-LEGISLACIÓ DELS PROBIÒTICS

Els probiòtics no poden ser considerats antibiòtics, ni per la seva naturalesa ni per la seva forma d'actuació. Per tant, la legislació que regeix la seva comercialització ha de ser pròpia i diferent.

Fins el 1992 els probiòtics que formaven part de la composició dels aliments dels animals podien ser comercialitzats com a matèria primera, sempre que no presentessin cap caràcter nociu pels animals. Quan es va prohibir aquesta pràctica excessivament tolerant, els probiòtics es van voler comercialitzar com a aliments dietètics, però no hi havia cap legislació per a productes d'aquest tipus destinats a l'alimentació animal. Actualment la Unió Europea prohibeix que cap substància activa utilitzada com a additiu alimentari pugui ser comercialitzada com a matèria primera o com a aliment dietètic.

La normativa actual permet la utilització dels probiòtics com a additius alimentaris. Des de 1970 l'ús d'additius en alimentació animal estava regulat per una directiva europea

(Directiva 70/524/CEE, DOCE nº L270-14/12/70) que establia els principis relatius a l'admissió i utilització d'additius. Fins l'any 1993 no es va proposar la inclusió dels enzims, microorganismes i derivats com a additius en alimentació animal (Directiva 93/113/CE, DOCE nº L334-31/12/93). En aquestes línies directrius el terme additiu fa referència a les substàncies actives i als preparats que contenen substàncies actives en la forma utilitzada per incorporar a les premescles i als pinsos. Substàncies actives poden ser les substàncies químicament definides, els microorganismes o els preparats enzimàtics. Aquesta Directiva establia que, de forma temporal, tots els estats membre havien d'admetre la utilització d'aquests productes incorporats en pinso sempre que, segons les dades disponibles, no suposessin cap perill per a la salut humana o animal. Mentre tant els estats membres havien de trametre una llista dels enzims, microorganismes i derivats utilitzats en el seu territori amb un expedient descriptiu de cada producte, per tal que la Comissió pogués estudiar-los i posteriorment publicar la llista dels que haguessin sigut autoritzats en cada estat.

La Directiva 94/40/CE (DOCE nº L208-11/8/94) va establir les directrius que s'havien de seguir per a la confecció dels expedients relatius a les substàncies i preparats per als quals se sol·licités una autorització per utilitzar com a additius en pinsos. Aquests expedients s'havien de depositar en un país de la Unió Europea i havien d'incloure:

- Identificació, característiques i condicions d'utilització. S'han d'identificar totes les soques que formen part del probiòtic, segons els codis internacionals de nomenclatura, incloent els números de dipòsit de les soques. També cal una descripció detallada de totes les seves característiques i propietats, així com les condicions en què s'han d'utilitzar i les possibles contraindicacions.

- Estudis sobre l'eficàcia. S'ha de provar documentalment l'eficàcia del probiòtic en l'espècie animal a què va destinat, indicant com s'han dut a terme els experiments en animals. També s'han de fer estudis de les característiques organolèptiques, nutricionals, higièniques i tecnològiques dels productes obtinguts a partir d'animals que hagin rebut aquest probiòtic.

- Estudis sobre la seguretat del seu ús. Els estudis han d'assegurar que el probiòtic no és patògen ni per l'animal, ni per l'home que consumeix els productes procedents d'aquest animal, ni pel que manipula qualsevol producte que contingui aquesta substància activa, ni pel medi ambient.

La Directiva 70/524/CEE fou modificada per la Directiva 96/51/CE, que a l'Estat espanyol es troba transposta en el Real Decret 2599/1998 (BOE nº 301-17/12/98), i que

és la que actualment es manté en vigor. La principal innovació d'aquesta nova directiva fou la distinció entre els additius utilitzats normalment i sense riscos especials com auxiliars en la fabricació de pinsos, i els additius d'alta tecnologia que tenen una composició molt precisa i que han de ser objecte d'una autorització de posta en circulació vinculada al seu responsable. Els nous additius s'autoritzen durant períodes renovables de 10 anys de durada.

1.6-OBJECTIUS

1-Aïllar lactobacils del tracte gastrointestinal de pollets de diversos orígens i seleccionar les soques que presentin *in vitro* les característiques més adients per a ser utilitzades com a probiòtics.

2-Characteritzar bioquímicament i molecular les soques probiòtiques escollides.

3-Obtenir emprentes dactilars específiques de soca mitjançant perfils de RAPD.

4-Characteritzar bioquímicament i genètica la capacitat d'adhesió.

5-Subministrar les soques probiòtiques seleccionades a través del pinso per provar la seva capacitat de colonitzar *in vivo* el tracte gastrointestinal dels pollets i reduir-hi la presència de *Salmonella enteritidis*.

2-MATERIAL I MÈTODES

2.1-MEDIS DE CULTIU

2.1.1-Medi MRS (Lactobacilli MRS Broth. Difco)

Medi de cultiu utilitzat per al creixement de bacteris làctics.

Composició (g/l):

Peptona proteosa n°3	10'0
Extracte de carn	10'0
Extracte de llevat	5'0
Dextrosa	20'0
Tween 80	1'0
Citrat amònic	2'0
Acetat sòdic	5'0
Sulfat de magnesi	0'1
Sulfat de manganès	0'05
Fosfat dipotàssic	2'0

S'ajusta el pH a $6'5 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C . Quan es vol utilitzar com a medi sòlid s'afegeixen 15'0 g/l de Bacto agar (Difco).

El medi MRS 1% (p/v) dextrosa es prepara amb 10'0 g/l de dextrosa i s'utilitza per a l'estudi de l'activitat antagonista.

2.1.2-Agar Rogosa (Rogosa SL agar. Difco)

Medi de cultiu selectiu utilitzat per al creixement de lactobacils intestinals.

Composició (g/l):

Peptona proteosa n°3	10'0
Extracte de llevat	5'0
Dextrosa	20'0
Citrat amònic	2'0
Dihidrogenfosfat de potassi	6'0
Tween 80	1'0
Acetat sòdic	15'0
Sulfat de magnesi	0'575
Sulfat de manganès	0'12
Sulfat ferrós	0'034
Agar-agar	15'0

S'ajusta el pH a $5'4 \pm 0'2$ i es fa bullir. No s'esterilitza a l'autoclau.

Per a l'aïllament i recompte de soques resistents a la rifampicina s'afegeixen 100 µg/ml de rifampicina (Sigma) a partir d'una solució mare preparada en metanol i conservada a -20°C .

2.1.3-Brou infusió de cervell i cor (BHI-Brain heart infusion. Difco)

Medi de cultiu utilitzat per al creixement d'una gran varietat de microorganismes. En aquest estudi s'utilitza per al creixement de *Campylobacter jejuni* i s'hi afegeix un 5% (v/v) de sang de cavall (Oxoid).

Composició (g/l):

Extracte de cervell	200'0
Extracte de cor	250'0
Peptona proteosa nº3	10'0
Dextrosa	2'0
Clorur sòdic	5'0
Fosfat disòdic	2'5

S'ajusta el pH a $7'4 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

Per al creixement de les soques de *Campylobacter jejuni* resistents a l'àcid nalidíxic, s'hi afegeixen 200 µg/ml d'àcid nalidíxic (Sigma) a partir d'una solució mare preparada en aigua destil·lada, esterilitzada amb filtres de 0'22 µm de diàmetre de porus (Sterile Acrodisc, Gelman Sciences) i conservada a -20°C.

2.1.4-Brou amb soja triptica (TSB-Tryptic soy broth. Difco)

Medi de cultiu utilitzat per al creixement d'una gran varietat de microorganismes. En aquest estudi s'utilitza per al creixement de *Salmonella*, *Escherichia coli* i *Campylobacter jejuni*.

Composició (g/l):

Bacto Triptona	17'0
Bacto Soitona	3'0
Clorur sòdic	5'0
Fosfat potàssic dibàsic	2'5
Bacto Dextrosa	2'5

S'ajusta el pH a $7'3 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C. Quan es vol utilitzar com a medi sòlid s'afegeixen 15'0 g/l d'agar i per al medi tou per a les gesses de soques indicadores s'afegeixen 7'0 g/l de Bacto agar (Difco).

Per al creixement de *Campylobacter jejuni* s'hi afegeix un 5% (v/v) de sang de cavall (Oxoid) i per al de les soques indicadores resistents a l'àcid nalidíxic s'hi afegeixen 200 µg/ml d'àcid nalidíxic (Sigma).

2.1.5-Medi LB (Luria-Bertani Broth)

Medi de cultiu utilitzat per al creixement de la soca d'*Escherichia coli* portadora del plàsmid pUC18.

Composició (g/l):

Na Cl	10'0
Triptona	10'0
Extracte de llevat	5'0

S'ajusta el pH a 7.2 ± 0.2 i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

Per al creixement de la soca d'*Escherichia coli* pUC18 s'hi afegixen 100 µg/ml d'ampicilina (Sigma) a partir d'una solució stock preparada en aigua destil·lada, esterilitzada per filtració i conservada a -20°C.

2.1.6-Medi basal per a la fermentació de carbohidrats

Medi utilitzat en la preparació de microplaques per a les proves de fermentació de carbohidrats i d'hidròlisi de l'arginina.

Composició (g/l):

Peptona proteosa n°3	10'0
Extracte de llevat	5'0
Tween 80	1'0
Citrat sòdic	2'0
Acetat sòdic	5'0
Sulfat de magnesi	0'1
Sulfat de manganès	0'05
Fosfat dipotàssic	2'0
Roig de clorofenol	0'04
Bacto agar	1'0

S'ajusta el pH a 6.5 ± 0.2 i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

2.1.7-Medi de Niven

Medi utilitzat per assajar la capacitat dels bacteris làctics d'hidrolitzar l'arginina.

Composició (g/l):

Bacto Triptona	5'0
Extracte de llevat	5'0
Fosfat dipotàssic	2'0
Tween 80	1'0
Sulfat de manganès	0'05
Arginina	3

S'ajusta el pH a $7'0 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C .

Al medi estèril s'hi afegeix una solució de glucosa al 0'03% (p/v) esterilitzada per filtració.

El reactiu de Nessler es prepara barrejant a parts iguals una solució de tetraiodomercuriat (II) de potassi (Merck) amb una solució d'hidròxid potàssic al 20% (p/v).

2.1.8-Solució salina

Solució utilitzada per homogeneïtzar les mostres (paps, cecs i continguts intestinals) i per fer les dilucions decimals.

Composició (g/l):

Bacto Peptona	1'0
Clorur sòdic	8'5

S'ajusta el pH a $7'0 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C .

2.1.9-Suero fisiològic

Solució utilitzada per a la suspensió i rentat de cultius bacterians.

Composició (g/l):

Na Cl	8'5
-------	-----

S'ajusta el pH a $7'0 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C .

2.1.10-Solució salina tamponada (SST)

Solució utilitzada per a la suspensió i rentat de cultius bacterians així com per als assaigs d'adhesió, hidrofobicitat, agregació i coagregació cel·lular.

Composició (g/l):

Na Cl	8'5
KH_2PO_4	0'34
K_2HPO_4	1'21

S'ajusta el pH a $6'0 \pm 0'2$ i s'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C .

2.2-AÏLLAMENT DE SOQUES LàCTIQUES PROCEDENTS DEL TRACTE GASTROINTESTINAL

Per l'aïllament de lactobacils s'utilitzen 50 pollets de 15-42 dies procedents de tres orígens diferents. Els animals es sacrifiquen per dislocació cervical i se'ls extreu el pap i/o el contingut intestinal.

Les mostres s'esmicolen amb l'ajut d'unes tisores estèrils, es barregen amb solució salina (2.1.8) a una proporció de 1:9 i s'homogeneïtzen durant 30 segons al vòrtex.

A continuació es fa un banc de dilucions decimals utilitzant el mateix diluent i es sembren, en profunditat, en plaques d'agar Rogosa (2.1.2) que s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

De cada una de les mostres es seleccionen 8 colònies a l'atzar i es sembren per estria en plaques d'agar MRS (2.1.1). Les plaques s'incuben 24 hores a 37°C en anaerobiosi.

A partir de cada estria es realitza un subcultiu en brou MRS (2.1.1), que s'incuba durant 24 hores a 37°C en anaerobiosi, per tal de congelar cada una de les soques aïllades prèvia visualització al microscopi òptic i realització de la tinció de Gram i de la prova de la catalasa.

Per a la congelació de les soques a -80°C, el cultiu es reparteix en al·lòtotes de 800 µl i s'hi afegeixen 200 µl de glicerol estèril que actua com a crioprotector.

Per obtenir un cultiu de nit de les soques s'inoculen 50 µl de cultiu en 5 ml de MRS (2.1.1) i s'incuba a 37°C en anaerobiosi durant 18-20 hores.

2.3-RECOMPTE DE MICROORGANISMES

El nombre de viables d'un cultiu es determina amb la tècnica de les dilucions decimals en solució salina (2.1.8), sembrant en superfície 100 µl d'una dilució determinada en plaques que contenen el medi sòlid apropiat segons el tipus de microorganisme. Aquestes plaques s'incuben a la temperatura i atmosfera adequada per al creixement de cada microorganisme durant 48 hores.

El recompte de les plaques es fa manualment o de forma automàtica amb un comptador de colònies (Protos Colony Counter, Synoptics Ltd). El recompte manual es fa segons la fórmula:

$$\frac{\sum c}{(n + 0'1n + 0'01n + \dots)d}$$

c-nombre de colònies

n-nombre de plaques per cada dilució

d-dilució més petita emprada en el recompte

El recompte de viables també es determina amb el sistema de sembra en espiral (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific Limited). La mostra és distribuïda de forma automàtica i en rotació sobre la placa, que conté el medi sòlid apropiat, de manera que el volum dipositat és decreixent a mesura que l'estilet es va desplaçant des del centre de la placa cap a l'exterior. Les plaques s'incuben a la temperatura i atmosfera adequada per a cada microorganisme durant 48 hores.

En aquest cas el recompte de les plaques es fa manualment utilitzant una plantilla de recompte de sembra en espiral o de forma automàtica amb el Protos Colony Counter (Synoptics Ltd).

2.4-MÈTODES PER A LA CONSERVACIÓ DE LACTOBACILS

2.4.1-Liofilització

Es centrifuga un cultiu de nit de la soca que es vol liofilitzar durant 10 minuts a 5.000 rpm i es renta amb el mateix volum de solució salina tamponada (2.1.10). El sediment resultant es resuspèn amb un 10% del volum total de llet descremada 10% (p/v) i glucosa 7'5% (p/v) i es pre-congela a -40°C.

S'utilitza un liofilitzador Christ alpha 1-4 amb controlador LDC-1M durant 24 hores a 0'050 mbars i -50°C. La soca liofilitzada es guarda a 4°C.

Periòdicament se'n fa un recompte en agar Rogosa (2.1.2) per estudiar la seva supervivència al llarg del temps.

2.4.2-Congelació

S'assagen dos medis de resuspensió diferents per a la congelació de les soques.

En ambdós casos es centrifuga un cultiu de nit de la soca que es vol congelar durant 10 minuts a 5.000 rpm. El sediment resultant es resuspèn en brou MRS (2.1.1), s'hi afegeix un 20% de glicerol estèril i es congela a -40°C.

Així mateix el sediment es renta en suero fisiològic (2.1.9), es resuspèn en llet descremada 10% (p/v) i glucosa 7'5% (p/v) i es congela a -40°C.

Periòdicament es fa el recompte de viables en agar Rogosa (2.1.2).

2.5-ESTUDI DE L'ACTIVITAT INHIBIDORA

2.5.1-Soques bacterianes utilitzades

Les soques utilitzades com a soques indicadores són:

Soca	Serotip	Origen	Altres característiques
<i>Escherichia coli</i> CTC1028	O1	*	Soca tipus
<i>Salmonella typhimurium</i> CTC1037	1,19,12: i: 1,2	Conill	Nal ^R , Mot ⁺
<i>Salmonella typhimurium</i> CTC1038	1,19,12:i:1,2	Conill	Nal ^R , Mot ⁺
<i>Salmonella enteritidis</i> CTC1026	9,12: gm:-	Llitera de granja	Nal ^S , Mot ⁺
<i>Salmonella enteritidis</i> CTC1039	-: gm: -	Ous abortats	Nal ^R , Mot ⁻
<i>Salmonella enteritidis</i> CTC1040	9,12:-:-	Gallines ponedores	Nal ^R , Mot ⁻
<i>Salmonella enteritidis</i> CTC1041	9,12: gm: -	Llitera de granja	Nal ^R , Mot ⁺
<i>Campylobacter jejuni</i> CTC1042		Femtes humanes	Nal ^R , Mot ⁺
<i>Campylobacter jejuni</i> CTC1043		Femtes humanes	Nal ^R , Mot ⁺

*National Institute of Public Health and Environment (Holanda)

Totes les soques indicadores han estat subministrades per la Unitat de Sanitat Animal de l'IRTA (Barcelona).

Les soques es conserven congelades amb glicerol 20% (v/v) a -80°C.

2.5.2-Multiplicació de les soques

En tots els casos es fan dos subcultius en MRS de les soques a investigar abans d'utilitzar-les per als assaigs d'activitat inhibidora.

Per obtenir un cultiu de nit de les soques indicadores s'inoculen 50 µl de cultiu en 5 ml de TSB (2.1.4) i s'incuba a 37°C durant 18-20 hores.

En el cas de *Campylobacter jejuni* s'utilitza BHI (2.1.3) amb un 5% de sang de cavall per revifar la soca del congelador i TSB (2.1.4) per als següents subcultius.

2.5.3-Mètode de la gota en agar (Schillinger i Lücke, 1989)

Es depositen 4 µl d'un cultiu de nit de la soca làctica que es vol estudiar en plaques d'agar MRS 1% (p/v) de dextrosa (2.1.1) i s'incuba tota la nit a 37°C en anaerobiosi.

S'inoculen 150 µl d'un cultiu de nit de la soca indicadora en 7 ml d'agar tou de TSB (2.1.4) i s'aboca sobre les plaques on han crescut les soques làctiques. Les plaques es tornen a incubar tota la nit a 37°C en condicions aeròbiques o de microaerofília quan *Campylobacter* és la soca indicadora (Gas Generating Kit *Campylobacter* System, Oxoid).

La presència d'un halus d'inhibició superior a 0,5 mm es considera indicativa de l'activitat inhibidora de la soca estudiada enfront la soca indicadora.

2.5.4-Mètode de la difusió en pou del sobrenedant (Schillinger i Lücke, 1989)

Es centrifuga un cultiu de nit de la soca làctica inhibidora segons el mètode anterior i se'n separa el sobrenedant.

Els sobrenedants són sotmesos als següents tractaments:

1-Neutralització-el sobrenedant es neutralitza a pH 6,5 amb NaOH 10M.

2-Pasteurització-el sobrenedant es manté 10 minuts en un bany d'aigua regulat a 80°C.

3-Addició de catalasa-el sobrenedant es tracta amb catalasa (Sigma) a una concentració final de 0,5 mg/ml.

S'inoculen 150 µl d'un cultiu de nit de la soca indicadora en 7 ml d'agar tou de TSB (2.1.4), s'aboquen sobre una placa d'agar MRS (2.1.1) i es deixa solidificar. Amb una pipeta estèril es perfora l'agar i s'inoculen 100 µl de cada un dels sobrenedants. Les plaques s'incuben 24 hores a 37°C.

La presència d'un halus d'inhibició es considera indicativa de l'activitat inhibidora secretada al sobrenedant de la soca estudiada enfront la soca indicadora.

2.6- AVALUACIÓ DE LA RESISTÈNCIA DE LES SOQUES LÀCTIQUES A LES CONDICIONS INTESTINALS

2.6.1-pH àcid

Es centrifuga un cultiu de nit durant 10 minuts a 5.000 rpm i es resuspèn el sediment en el mateix volum de suero fisiològic (2.1.9). Aquesta suspensió es dilueix a una proporció de 1:9 en aigua destil·lada a pH 3 i en aigua destil·lada a pH 6,7, ambdues esterilitzades per filtració amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus (Sterile Acrodisc, Gelman Sciences), i s'incuba a 37°C durant 3 hores. A continuació es fa un banc de dilucions decimals utilitzant solució salina (2.1.8) com a diluint i es sembren en plaques d'agar Rogosa (2.1.2) que s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

La comparació dels recomptes de viables en els dos ambients de pH ens permet determinar si la soca és resistent a pH 3.

2.6.2-Sals biliars

Es sembren per estria 20 µl d'un cultiu de nit en plaques d'agar MRS (2.1.1) que contenen bilis (Ox-bile, Oxoid) a una concentració final de l'1 i 4% (p/v). El cultiu també es sembla en agar MRS (2.1.1) per controlar el creixement de la soca en absència de bilis. Les plaques s'incuben durant 2 dies a 37°C en anaerobiosi.

La presència de creixement es considera indicativa de la resistència de la soca a aquella concentració de sals biliars.

2.6.3-Antibiòtics

Es sembren per estria 10 µl d'un cultiu en fase exponencial en plaques d'agar MRS (2.1.1) que contenen els següents antibiòtics a les concentracions indicades:

Àcid nalidixic	32 µg/ml
Ampicilina	4 µg/ml
Cloramfenicol	32 µg/ml
Eritromicina	8 µg/ml
Estreptomicina	1 mg/ml

Totes les solucions d'antibiòtics (Sigma) es preparen amb aigua destil·lada i s'esterilitzen per filtració, excepte el cloramfenicol que es prepara en etanol.

El mateix cultiu bacterià s'inocula al 2% (v/v) en tubs de brou MRS (2.1.1) que contenen els antibiòtics esmentats a les concentracions indicades.

En ambdós casos els cultius es sembren també en MRS (2.1.1) per controlar el creixement de la soca en absència dels antibiòtics. Els tubs i plaques control contenen la mateixa quantitat del dissolvent emprat per a la preparació de cada antibiòtic. S'incuben durant 2 dies a 37°C en anaerobiosi.

La presència de creixement en les plaques i de turbidesa visible en els tubs es considera indicativa de la resistència de la soca a aquell antibiòtic.

2.6.4-Coccidiostàtics

Es sembren per estria 10 µl d'un cultiu en fase exponencial en plaques d'agar MRS (2.1.1) que conté monensina (Sigma) a les següents concentracions: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 i 3 µg/ml. La solució de monensina es prepara en etanol.

Els mateixos cultius s'inoculen al 2% (v/v) en tubs de brou MRS (2.1.1) que contenen monensina a les mateixes concentracions.

En ambdós casos els cultius es sembren també en MRS (2.1.1), que conté la mateixa quantitat del dissolvent emprat per a la preparació del coccidiostàtic, per controlar el creixement de la soca en absència de monensina. S'incuben durant 2 dies a 37°C en anaerobiosi.

Els mateixos cultius s'inoculen a l'1% (v/v) en tubs que contenen pinso comercial sense coccidiostàtics ni promotors de creixement, diluït amb aigua destil·lada a una proporció de 1:9, on s'afegeix monensina a 3, 6 i 9 µg/ml de concentració final. Així mateix els cultius s'inoculen en tubs que contenen el pinso diluït sense monensina, per controlar el seu creixement.

Els tubs s'incuben durant 2 dies a 37°C en anaerobiosi, i es fa el recompte de viables en plaques d'agar MRS (2.1.1) incubant 2 dies a 37°C en anaerobiosi. Posteriorment la presència de la soca inoculada es confirma per determinació dels perfils plasmídics (2.9.1.3) de les colònies aïllades.

2.7-CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA PER A LA IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES

2.7.1-Creixement a diferents temperatures

El creixement a 15 i 45°C es determina inoculant un cultiu de nit a l'1% (v/v) en tubs de brou MRS (2.1.1) preincubats a les temperatures esmentades. La incubació té lloc durant 2 dies a 15 i 45°C.

La presència de turbidesa en el tub es considera indicativa de la capacitat de la soca per créixer a aquella temperatura.

2.7.2-Producció de gas

S'inocula un cultiu de nit a l'1% (v/v) en brou MRS (2.1.1), que conté sulfat amònic en lloc de citrat amònic. Els tubs (amb campana de Durham) s'incuben 72 hores a 37°C en anaerobiosi.

La presència de gas a l'interior de la campana es considera indicativa de la capacitat de la soca per produir gas.

2.7.3-Producció d'àcid làctic. Isòmers i quantificació

Es centrifuga un cultiu de nit a 5.000 rpm durant 10 minuts i es guarda el sobrenedant. Per aturar les possibles reaccions enzimàtiques, es pasteuritza durant 15 minuts a 80°C i es dilueix amb aigua destil·lada per assegurar una concentració màxima d'1 g d'àcid làctic/ litre de sobrenedant.

A partir d'aquí la quantificació i valoració dels isòmers L- i D- de l'àcid làctic es fa enzimàticament amb el kit de detecció ultraviolat de Boehringer Mannheim.

Amb aquest mètode la quantitat de NADH que es forma està directament relacionada amb la quantitat de D- o L- lactat produït i es mesura llegint en un espectrofotòmetre Shimadzu UV-240 a una longitud d'ona de 340 nm. Els valors es comparen amb patrons de concentració coneguda d'àcid L-làctic i D-làctic disponibles en el kit.

2.7.4-Fermentació de carbohidrats i hidròlisi de l'esculina

El patró de fermentació de carbohidrats es determina segons Sharpe (1962), mitjançant un sistema miniaturitzat descrit per Jayne-Williams (1975, 1976) i adaptat per Schillinger i Lücke (1987).

S'estudien els següents sucres: celobiosa, glucosa, manitol, mannososa, ribosa, salicina, sorbitol i trehalosa, així com la hidròlisi de l'esculina. Tots els sucres es preparen en solució aquosa al 2'5% (p/v) i s'esterilitzen per filtració.

Es centrifuga un cultiu de nit durant 8 minuts a 5.600 rpm i es renta dues vegades amb suero fisiològic (2.1.9). A continuació es resuspèn el volum necessari en el medi basal (2.1.6) per tal d'aconseguir que la lectura a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 650 nm sigui aproximadament de 0'4.

A cada pouet d'una placa microtiter estèril es depositen 25 µl de les solucions dels sucres i 100 µl del medi inoculat amb la soca que es vol estudiar. Així mateix s'inclou un control d'esterilitat per a cada sucre i pel medi. Es tapen tots els pouets amb glicerina estèril i la placa s'incuba durant 3 dies a 37°C en anaerobiosi.

El procés de fermentació es considera positiu quan la producció d'àcid fa virar el colorant de violeta a groc, mentre que es considera positiu dèbil quan aquest vira a taronjat.

La hidròlisi de l'esculina es considera positiva en absència de fluorescència a la llum ultraviolada.

2.7.5-Hidròlisi de l'arginina

La hidròlisi de l'arginina es determina segons Schillinger i Lücke (1987) a través de la detecció de l'amoníac, que és el producte final del catabolisme de l'arginina.

L'arginina es prepara en solució aquosa a l'1'2% (p/v) i s'esterilitza amb filtres de 0'22 µm.

L'assaig es realitza en les mateixes plaques de microtiter utilitzades per a la fermentació de carbohidrats, dipositant 25 µl de la solució d'arginina i 100 µl del medi basal (2.1.6) inoculat amb la soca que es vol estudiar. Es tapen els pous amb glicerina estèril i la placa s'incuba durant 3 dies a 37°C en anaerobiosi.

La presència d'amoníac es considera positiva quan al afegir el reactiu de Nessler es detecta una coloració marró-vermellosa i apareix un precipitat.

La hidròlisi de l'arginina també es detecta segons Niven i col. (1942), modificat per Hitchener i col. (1982). Es centrifuga un cultiu de nit a 5.000 rpm i el sediment es renta dues vegades amb suero fisiològic (2.1.9). S'inoculen 0'2 ml d'aquest cultiu en un tub de 10 ml de medi de Niven (2.1.7) i es deixa incubar durant 3 dies a 37°C en anaerobiosi.

La presència d'amoniac es considera positiva quan al afegir 0'1 ml del reactiu de Nessler a 1 ml del sobrenedant del cultiu apareix un precipitat taronja.

A partir dels resultats obtinguts en les diferents proves de caracterització bioquímica es fa la identificació de les soques segons el manual de classificació Bergey's.

2.8-ESTUDI DE L'ADHESIÓ, HIDROFOBICITAT, AGREGACIÓ I COAGREGACIÓ CEL·LULAR

2.8.1-Determinació de la capacitat d'adhesió (Fuller, 1973)

1-Suspensió de cèl·lules epitelials.

Per obtenir les cèl·lules epitelials s'utilitzen pollets d'una o dues setmanes que es mantenen en dejú els 2 dies abans del sacrifici. Aquest té lloc per dislocació cervical i a continuació s'extreu el pap que s'obre asèpticament i es renta 2 vegades amb 100 ml de solució salina tamponada (2.1.10).

Amb un portaobjectes estèril es rasca la part interior del pap per tal d'extreure'n les cèl·lules epitelials que es resuspenen en 10 ml de la mateixa solució. S'introdueix una gota d'aquesta suspensió en una Càmera de Neubauer de 0'1 mm de profunditat i 0'0025 mm² de superfície (Brand W-Germany Blaubrand[®]) i es fa el recompte de cèl·lules epitelials al microscopi òptic per tal d'assegurar la presència de $8'75 \times 10^5$ cèl·lules/ml.

2-Preparació de la suspensió bacteriana.

Es centrifuguen 10 ml d'un cultiu de nit de la soca làctica a 5.000 rpm durant 10 minuts. El sediment es resuspèn en 10 ml de solució salina tamponada (2.1.10) i la concentració cel·lular s'ajusta a $1'5 \times 10^8$ cèl·lules/ml utilitzant la mateixa solució com a diluent.

3-Prova d'adhesió.

Es barregen 0'1 ml de la suspensió bacteriana amb 0'4 ml de la suspensió de cèl·lules epitelials i s'incuben en un bany d'aigua a 37°C durant 30 minuts a 20 revolucions per minut.

A continuació, a través d'un microscopi de contrast de fases (Olympus BH-2), es determina l'eficiència o nombre de cèl·lules bacterianes adherides per cèl·lula epitelial.

S'examinen una mitjana de 10 cèl·lules epitelials per assaig. Es considera que l'eficiència és positiva quan s'adhereixen un mínim de 10 cèl·lules bacterianes per cèl·lula epitelial.

2.8.1.1-Observació al microscopi electrònic de rastreig

Aquest estudi s'ha dut a terme al Departament de Microscopia Electrònica de la Universitat de Girona.

A partir d'un cultiu de nit en brou MRS (2.1.1) les mostres es fixen en una solució que conté glutaraldehid 2'5% (p/v) dissolt en un tampó cacodilat 0'1 M per tal d'unir covalentment totes les molècules proteiques. A continuació la mostra es fixa amb tetraòxid d'osmi (OsO₄) 1% (p/v) dissolt en el mateix tampó, que uneix i estabilitza les bicapes lipídiques així com les proteïnes.

La mostra és deshidratada a través d'una seqüència de solucions d'etanol (50, 70, 90 i 100%) fins arribar a acetona i és assecada per la tècnica del punt crític. Finalment es bombardeja amb or i es visualitza al microscopi electrònic de rastreig (Zeis DSM960A).

2.8.2-Assaig d'hidrofobicitat

El percentatge d'hidrofobicitat es pot correlacionar amb el percentatge d'agregació dels bacteris entre si.

L'assaig es realitza per triplicat a partir d'un cultiu de nit que es centrifuga a 5.000 rpm durant 10 minuts i es renta tres vegades en el mateix volum de solució salina tamponada (2.1.10). El sediment es resuspèn en el volum necessari de la mateixa solució per aconseguir que la lectura de la densitat òptica a l'espectrofotòmetre (Shimadzu UV-240), a una longitud d'ona de 540 nm, sigui de $0'6 \pm 0'02$.

Es barregen 3 ml de la soca que es vol estudiar amb 0'25 ml de xilè, i s'agita durant 1 minut amb el vòrtex a màxima potència. A continuació es deixa reposar durant 30 minuts a temperatura ambient per tal de permetre la separació de les dues fases. Finalment es mesura l'absorbància de la fase aquosa a 540 nm utilitzant l'espectrofotòmetre. El percentatge d'hidrofobicitat es mesura segons la fórmula (Rosenberg i col., 1980):

$$\text{Percentatge d'hidrofobicitat} = 1 - \frac{\text{Absorbància final}}{\text{Absorbància inicial}} \times 100$$

2.8.3-Test d'agregació cel·lular

El test d'agregació es fa segons Reniero i col. (1992) per determinar la capacitat que tenen les cèl·lules bacterianes d'una soca determinada per interaccionar entre si.

Es centrifuga un cultiu de nit a 5.000 rpm durant 10 minuts i es guarda el sobrenedant. El sediment es renta 3 vegades en el mateix volum d'aigua destil·lada estèril i es resuspèn en el mateix volum de solució salina tamponada (2.1.10).

Es barregen 900 µl de cada suspensió amb 100 µl del sobrenedant propi esterilitzat amb filtres de 0'45 µm de diàmetre de porus (Sterile Acrodisc, Gelman Sciences) i es deixa reposar fins a 2 hores a temperatura ambient.

L'agregació es considera positiva quan es detecta visualment la presència de partícules en el fons del tub, formades per les cèl·lules agregades, deixant un sobrenedant ben nítid.

2.8.3.1-Characterització de la naturalesa del factor d'agregació

Per determinar la naturalesa del factor implicats en l'agregació bacteriana, les cèl·lules es tracten amb proteïnasa K i lipasa a una concentració final d'1 mg/ml, tripsina a 2'5 mg/ml i metaperiodat a 10 mg/ml. Totes les solucions es preparen en solució salina tamponada (2.1.10) i s'esterilitzen per filtració.

L'assaig es realitza per duplicat a partir d'un cultiu de nit que es centrifuga a 5.000 rpm durant 10 minuts. Es guarda el sobrenedant i el sediment es renta 3 vegades en el mateix volum d'aigua destil·lada estèril. A continuació tant les cèl·lules com el sobrenedant es tracten amb proteïnasa K, tripsina, lipasa i metaperiodat incubant-les durant 1 hora a 37°C. Així mateix es tracten per calor exposant-les durant 30 minuts a 100°C. Les cèl·lules es tornen a rentar 2 vegades en aigua destil·lada estèril i es resuspenen en el mateix volum de solució salina tamponada (2.1.10).

Seguidament es torna a realitzar l'assaig d'agregació (2.8.3) barrejant les cèl·lules no tractades amb el sobrenedant control i tractat, així com les cèl·lules tractades amb els dos tipus de sobrenedants.

2.8.4-Prova de coagregació cel·lular

La prova de coagregació es fa segons Vandevoorde i col. (1992) per determinar la capacitat que tenen les cèl·lules bacterianes de dues soques determinades per interaccionar entre si.

Es centrifuga un cultiu de nit a 5.000 rpm durant 10 minuts i es renta dues vegades en el mateix volum de solució salina tamponada (2.1.10). El sediment es resuspèn en el volum necessari de la mateixa solució per aconseguir que la lectura de la densitat òptica a l'espectrofotòmetre, a una longitud d'ona de 600 nm, sigui de $0'6 \pm 0'02$.

Es barregen en un tub 2 ml de cada una de les dues soques que es volen estudiar i es deixen en agitació en un bany a temperatura ambient durant 30 minuts a 150 rpm. A continuació es deixa reposar una hora a temperatura ambient i es llegeix la densitat òptica en un espectrofotòmetre Spectronic 20D a una longitud d'ona de 600 nm. Així mateix s'han d'incloure tubs control que continguin 4 ml de cada una de les soques estudiades per separat.

El percentatge de coagregació es determina segons l'equació de Handley (Handley i col., 1987):

$$\text{Percentatge de coagregació} = \frac{(\text{DO1} + \text{DO2}) - 2 \times \text{DO12}}{\text{DO1} + \text{DO2}} \times 100$$

DO1-densitat òptica de la soca 1

DO2-densitat òptica de la soca 2

DO12-densitat òptica de les soques 1 i 2 barrejades.

Si el percentatge de coagregació és un valor positiu es considera que les soques són capaces de coagregar-se.

2.9-AÏLLAMENT, VISUALITZACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ADN

2.9.1-Aïllament d'ADN plasmídic i cromosòmic

2.9.1.1-Solucions per a l'aïllament d'ADN

Tampó STE

Composició:

Sacarosa	6'7% (p/v)
Tris-HCl	50 mM
EDTA	1 mM
pH	8

S'esterilitza per filtració.

Tampó ET

Composició:

EDTA	250 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	8

S'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

Solució de SDS

Composició:

SDS	20% (p/v)
Tris-HCl	50 mM
EDTA	20 mM
pH	8

S'esterilitza per filtració.

Solució de lisozima

Composició:

Lisozima	20 mg/ml
Tris-HCl	25 mM
pH	8

Aquesta solució s'ha de preparar instants abans d'utilitzar-la.

Tampó TE

Composició:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8

S'esterilitza durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

Solució de fenol

El fenol redestilat (Aldrich) es liqua en un bany de 70°C i es satura amb tampó TE. Per retardar l'oxidació s'hi afegeix hidroxiquinoleïna al 0'1% (p/v). Es barreja i es deixa reposar per separar la fase polar i apolar.

La solució es conserva en refrigeració en un envàs opac fins a un període màxim d'un mes, i s'ha de manipular amb guants i dins una campana d'aspiració d'aire per protegir a l'operador.

2.9.1.2-Mètode per a l'aïllament d'ADN plasmídic d'*Escherichia coli* pUC18

Aquesta soca *Escherichia coli* porta el plàsmid pUC18 que conté clonat el gen responsable de l'adhesió de *Lactobacillus gasseri* 4B2 (cedit pel Dr. Morelli, Istituto Microbiologia, Università Cattolica Sacro Cuore, Piacenza, Itàlia). Per a l'aïllament d'aquest plàsmid a partir d'un cultiu de nit en medi LB (2.1.5), s'utilitza el kit de purificació de plàsmids Qiagen.

2.9.1.3-Mètode per a l'aïllament d'ADN plasmídic de bacteris làctics (Anderson i McKay, 1983 modificat)

1-Centrifugar 1'5 ml d'un cultiu en fase exponencial durant 2 minuts a 12.000 rpm.

2-Resuspendre el sediment amb 1 ml de tampó STE i centrifugar durant 2 minuts a 12.000 rpm.

3-Resuspendre el sediment amb 380 µl de tampó STE.

4-Afegir 96 µl de solució de lisozima i barrejar durant uns segons.

5-Incubar 30 minuts a 37°C per deixar actuar la solució de lisozima que trenca la paret de mureïna.

6-Afegir 48 µl de tampó ET.

7-Afegir 28 µl de solució SDS i barrejar immediatament. El SDS actua dissolent els lípids i per tant trencant la membrana cel·lular. Si la solució queda clara vol dir que s'ha produït la lisi cel·lular. En cas contrari, reincubar durant 10 minuts a 37°C.

8-Afegir 28 µl de NaOH 3M preparada en el mateix moment i barrejar de forma suau durant 10 minuts. Amb aquesta solució es fa augmentar el pH de la preparació provocant la desnaturalització de l'ADN cromosòmic mentre que l'ADN plasmídic es manté intacte degut a la seva naturalesa ccc (circular i tancat covalentment).

9-Afegir 50 µl de Tris-HCl 2M i barrejar de forma suau durant 3 minuts. Amb aquesta solució es torna a fer disminuir el pH de la preparació, de manera que l'ADN cromosòmic desnaturalitzat coagula i precipita mentre que l'ADN plasmídic es manté intacte.

10-Afegir 72 µl de NaCl 5M que afavoreix la precipitació de tots els components cel·lulars no plasmídics.

11-Afegir 800 µl de fenol saturat amb TE que provoca la desproteïnitació i ajuda a eliminar tots aquests components cel·lulars. Barrejar i centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

12-Recollir la fase superior i barrejar amb 400 µl de fenol i 400 µl de cloroform-alcohol isoamílic (24:1). Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

13-Recollir la fase superior i barrejar amb 800 µl de cloroform-alcohol isoamílic. Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

14-Recollir la fase superior i barrejar amb 2'5 volums d'etanol que fa precipitar l'ADN. Deixar refredar a -40°C durant un mínim de 30 minuts.

15-Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

16-Secar al buit durant 10 minuts.

17-Afegir al sediment 10 µl de TE amb ribonucleasa (0'1 mg/ml) i incubar durant 20 minuts a 37°C o durant 30 minuts a temperatura ambient per eliminar totes les restes d'ARN.

18-La mostra ja està preparada per aplicar a l'electroforesi.

2.9.1.4-Mètode per a l'aïllament d'ADN cromosòmic de bacteris làctics (Anderson i McKay, 1983)

Es procedeix igual que en el protocol anterior des del punt 1 fins al punt 7 i a continuació es fan els següents passos:

8-Afegir 10 µl de ribonucleasa (0'1 mg/ml) i incubar durant 20 minuts a 37°C o durant 30 minuts a temperatura ambient per eliminar totes les restes d'ARN.

9-Afegir 600 µl de fenol saturat amb TE que provoca la desproteïnitació. Barrejar i centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

10-Recollir la fase superior i barrejar amb 300 µl de fenol i 300 µl de cloroform-alcohol isoamílic (24:1). Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

11-Recollir la fase superior i barrejar amb 600 µl de cloroform-alcohol isoamílic. Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

12-Recollir la fase superior i afegir 1 µl de NaCl 5M per cada 10 µl de solució.

13-Barrejar amb 2'5 volums d'etanol que fa precipitar l'ADN. Deixar refredar a -40°C durant un mínim de 30 minuts.

14-Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

15-Rentar el sediment amb 1 ml d'etanol 70% (v/v).

16-Centrifugar durant 5 minuts a 12.000 rpm.

17-Secar al buit durant 10 minuts.

18-Resuspendre el sediment en 25 µl d'aigua destil·lada i deixar reposar a 4°C perquè s'acabi de dissoldre l'ADN.

19-La mostra es dilueix 1:10 en aigua destil·lada i ja està preparada per aplicar a l'electroforesi.

2.9.2-Visualització de l'ADN plasmídic i cromosòmic

Solucions:

Tampó Tris Acetat (TAE)

Composició:

Tris-Acetata	242 g
EDTA	0'5 M
Àcid acètic glacial	57'1 ml
pH	8

Solució transportadora

Composició:

Sacarosa	40% (p/v)
EDTA	50 mM
Tris-HCl	20 mM
Blau de bromofenol	0'25% (p/v)

Mètode:

Es prepara un gel d'agarosa al 0'7% (p/v) en tampó TAE_{x1}. L'agarosa es dissol per ebullició, es deixa atemperar en un bany a 50°C i s'aboca a una cubeta d'electroforesi. Quan el gel ha solidificat es cobreix totalment amb tampó TAE_{x1} i es carreguen 10 µl de la mostra juntament amb 2 µl de solució transportadora en els pous del gel. S'apliquen 100 V durant 2 hores amb un alimentador d'electroforesi LKB Macrodrive.

Per a la visualització de l'ADN plasmídic el gel es tenyeix amb el colorant de fluorescència bromur d'etidi (1 µg/ml) i es visualitza mitjançant llum ultraviolada en un transiluminador (LKB 2011).

El gel es fotografia amb una càmera Polaroid MP-4 i pel·lícula Polaroid tipus 667 a través d'un filtre Kodak 22-A Wratten per llum ultraviolada.

2.9.3-Quantificació de l'ADN cromosòmic

La concentració d'ADN d'una mostra es mesura a través de l'absorbància a 260 nm i la seva puresa per la relació A_{260}/A_{280} (Maniatis i col., 1989).

La mostra d'ADN es dilueix 100 vegades en aigua destil·lada i se'n mesura l'absorbància a 260 nm (absorció dels àcids nucleics) i 280 nm (absorció de les proteïnes) utilitzant un espectrofotòmetre Shimadzu UV-240. Sabent que una densitat òptica (DO) de 1 correspon a 50 µg/ml d'ADN de doble cadena, es pot calcular la concentració.

Les preparacions pures d'ADN i ARN tenen un coeficient $DO_{260/280}$ de 1'8 i 2'0, respectivament. Coeficients inferiors indiquen una contaminació per fenol o proteïnes.

2.10-AMPLIFICACIÓ ESPECÍFICA I A L'ATZAR MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa permet amplificar *in vitro* una sola molècula d'ADN més d'un milió de vegades en 20 o 30 cicles, utilitzant encebadors i ADN polimerasa. Aquesta amplificació permet l'anàlisi directe del fragment per visualització en gels d'agarosa o per seqüenciació. La reacció es pot fer utilitzant encebadors a l'atzar (RAPD) o encebadors específics per a un determinat gen, en aquest estudi per al 16S ARN i el gen responsable de l'adhesió.

La tècnica de RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) es basa en l'amplificació d'una molècula d'ADN utilitzant encebadors a l'atzar. Es tracta d'un mètode ràpid i simple amb un gran poder discriminatori per mesurar la diversitat existent entre diverses soques que pertanyen a una mateixa espècie, de manera que permet distingir una soca d'una altra a través de l'obtenció d'empremtes específiques (Giraffa i col., 1998).

En aquest estudi es pretén obtenir un perfil de RAPD que permeti diferenciar la soca probiòtica inoculada de la població natural de lactobacils del tracte gastrointestinal dels pollets, durant els assaigs *in vivo*.

2.10.1-Descripció dels encebadors utilitzats

Encebadors utilitzats per a l'amplificació del 16S ARN ribosòmic

Nom	Seqüència
616V	5'-AGA GTT TGA T(CT)(AC) TGG CTC AG-3'
630R	5'-CA(GT) AAA GGA GGT GAT CC-3'

Els encebadors són comercialitzats per MWG-Biotech (Alemanya).

Encebadors utilitzats per a l'amplificació del gen responsable de l'adhesió de *L.gasseri* 4B2

Per aquest estudi es va disposar d'una soca d'*Escherichia coli* que contenia un plàsmid pUC18, on hi havia clonat el gen responsable de la capacitat adhesiva de *L.gasseri* 4B2. Aquest gen codifica la síntesis d'una proteïna de 32 KDa anomenada Factor Promotor de l'Agregació (APF). Coneixent la seqüència d'aquest gen es van dissenyar dos encebadors que limitaven un fragment del gen de 630 parells de bases: un encebador directe anomenat All4 situat a la posició 631-645 ($T_m=50,6^\circ\text{C}$) i un encebador invers anomenat All3 situat a la posició 1244-1261 ($T_m=49,1^\circ\text{C}$).

Nom	Seqüència
All 3	5'-AGT GTA GCT AGT AGT TGT-3'
All 4	5'-GTC ACT TGC AGC AGC-3'

Els encebadors són sintetitzats per MWG-Biotech (Alemanya).

Encebadors utilitzats per als perfils de RAPD

Nom	Seqüència	Nom	Seqüència
OPJ-01	5'-CCCGGCATAA-3'	OPX-01	5'-CTGGGCACGA-3'
OPJ-02	5'-CCCGTTGGGA-3'	OPX-02	5'-TTCCGCCACC-3'
OPJ-03	5'-TCTCCGCTTG-3'	OPX-03	5'-TGGCGCAGTG-3'
OPJ-04	5'-CCGAACACGG-3'	OPX-04	5'-CCGCTACCGA-3'
OPJ-05	5'-CTCCATGGGG-3'	OPX-05	5'-CCTTTCCCTC-3'
OPJ-06	5'-TCGTTCCGCA-3'	OPX-06	5'-ACGCCAGAGG-3'
OPJ-07	5'-CCTCTCGACA-3'	OPX-07	5'-GAGCGAGGCT-3'
OPJ-08	5'-CATACCGTGG-3'	OPX-08	5'-CAGGGGTGGA-3'
OPJ-09	5'-TGAGCCTCAC-3'	OPX-09	5'-GGTCTGGTTG-3'
OPJ-10	5'-AAGCCCGAGG-3'	OPX-10	5'-CCCTAGACTG-3'
OPJ-11	5'-ACTCCTGCGA-3'	OPX-11	5'-GGAGCCTCAG-3'
OPJ-12	5'-GTCCCCTGGT-3'	OPX-12	5'-TCGCCAGCCA-3'
OPJ-13	5'-CCACACTACC-3'	OPX-13	5'-ACGGGAGCAA-3'
OPJ-14	5'-CACCCGGATG-3'	OPX-14	5'-ACAGGTGCTG-3'
OPJ-15	5'-TGTAGCAGGG-3'	OPX-15	5'-CAGACAAGCC-3'
OPJ-16	5'-CTGCTTAGGG-3'	OPX-16	5'-CTCTGTTCGG-3'
OPJ-17	5'-ACGCCAGTTC-3'	OPX-17	5'-GACACGGACC-3'
OPJ-18	5'-TGGTCGCAGA-3'	OPX-18	5'-GACTAGGTGG-3'
OPJ-19	5'-GGACACCACT-3'	OPX-19	5'-TGGCAAGGCA-3'
OPJ-20	5'-AAGCGGCCTC-3'	OPX-20	5'-CCCAGCTAGA-3'
OPK-01	5'-CATTCGAGCC-3'	OPZ-01	5'-TCTGTGCCAC-3'
OPK-02	5'-GTCTCCGCAA-3'	OPZ-02	5'-CCTACGGGGA-3'
OPK-03	5'-CCAGCTTAGG-3'	OPZ-03	5'-CAGCACCGCA-3'
OPK-04	5'-CCGCCCAAAC-3'	OPZ-04	5'-AGGCTGTGCT-3'
OPK-05	5'-TCTGTGAGG-3'	OPZ-05	5'-TCCCATGCTG-3'
OPK-06	5'-CACTTTCCC-3'	OPZ-06	5'-GTGCCGTTCA-3'
OPK-07	5'-AGCGAGCAAG-3'	OPZ-07	5'-CCAGGAGGAC-3'
OPK-08	5'-GAACACTGGG-3'	OPZ-08	5'-GGGTGGGTAA-3'
OPK-09	5'-CCCTACCGAC-3'	OPZ-09	5'-CACCCCAGTC-3'
OPK-10	5'-GTGCAACGTG-3'	OPZ-10	5'-CCGACGGGCC-3'
OPK-11	5'-AATGCCCCAG-3'	OPZ-11	5'-CTCAGTCGCA-3'
OPK-12	5'-TGGCCCTCAC-3'	OPZ-12	5'-TCAACGGGAC-3'
OPK-13	5'-GGTTGTACCC-3'	OPZ-13	5'-GACTAAGCCC-3'
OPK-14	5'-CCCGCTACAC-3'	OPZ-14	5'-TCGGAGGTTC-3'
OPK-15	5'-CTCCTGCCAA-3'	OPZ-15	5'-CAGGGCTTTC-3'
OPK-16	5'-GAGCGTCGAA-3'	OPZ-16	5'-TCCCCATCAC-3'
OPK-17	5'-CCCAGCTGTG-3'	OPZ-17	5'-CCTTCCCCTC-3'
OPK-18	5'-CCTAGTCGAG-3'	OPZ-18	5'-AGCGTCTGTG-3'
OPK-19	5'-CACAGGCGGA-3'	OPZ-19	5'-GTGCGAGCAA-3'
OPK-20	5'-GTGTCGCGAG-3'	OPZ-20	5'-ACTTTGGCGG-3'
M 13	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'		

Tots els encebadors són comercialitzats per Operon Technologies excepte l'encebador M 13 comercialitzat per MWG-Biotech (Alemanya).

2.10.2-Reacció d'amplificació de l'ADN

En aquest estudi les reaccions d'amplificació es realitzen en un volum total de 25 µl amb una concentració final de 8 mM de cada un dels oligonucleòtids, el tampó de reacció (20 mM TrisHCl (pH 8'4), 50 mM KCl, 1'5 mM MgCl₂) (Gibco BRL), 1 pmol/µl de cada encebador, 0'2 µg d'ADN i 0'5 unitats de l'enzim Ampli Taq polimerasa (Perkin Elmer).

Per a l'amplificació del gen responsable de la síntesis del 16S ARN ribosòmic es fa una desnaturalització inicial de 2 minuts a 94°C seguida de 30 cicles amb una desnaturalització durant 45 segons a 94°C, una hibridació a 51°C durant 2 minuts i una polimerització a 72°C durant 2 minuts i 30 segons.

Per a l'amplificació del gen presumptament responsable de l'adhesió es fa una primera desnaturalització a 94°C durant 2 minuts seguida de 30 cicles de 45 segons a 94°C, 30 segons a una temperatura d'hibridació de 50-52°C i 30 segons de polimerització a 72°C.

Per a la determinació de patrons de RAPD utilitzant diversos encebadors a l'atzar es fa una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C seguida de 45 cicles de 30 segons a 94°C, 30 segons d'hibridació a 36'5°C, 30 segons més de polimerització a 72°C i una etapa final de 7 minuts a 72°C.

Les reaccions de PCR es duen a terme en un model GeneAmp PCR System 2.400 de Perkin Elmer.

2.10.3-Anàlisi de les bandes amplificades

La visualització dels fragments amplificats es realitza en gels d'agarosa a l'1% (p/v) tal com es descriu en l'apartat 2.9.2.

Per a l'elaboració del dendograma que permet quantificar el grau de relació entre les diferents soques, s'ha utilitzat el sistema de fotodocumentació de gels i anàlisi d'imatges Gel Printer M900X i Lane manager versió 2.1 (TDI, Tecnologia para diagnóstico e investigación, S.A.).

2.11-IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES PER HIBRIDACIÓ

La hibridació es basa en l'aparellament de seqüències homòlogues d'ADN: l'ADN cromosòmic que està immobilitzat en una membrana de niló i la sonda. És molt important establir les condicions òptimes perquè no hi hagin aparellaments inespecífics.

Per això cal fixar les condicions de prehibridació, hibridació i rentats posteriors que permetin la major especificitat possible.

2.11.1-Descripció de les sondes utilitzades per a la hibridació

S'utilitzen dues sondes per a la confirmació de *Lactobacillus salivarius*.

Nom	Seqüència
Lb. sal 2	5'-CTT CTT ACG GTG AAT GC-3'
Lb. sal 3	5'-CAT TCG GTG TAA GAA AGT T-3'

Les dues sondes són sintetitzades per MWG-Biotech (Alemanya).

2.11.2-Soques bacterianes utilitzades

Les soques bacterianes utilitzades com a controls positius i negatius en la hibridació amb les sondes específiques per a *L.salivarius* són:

L.agilis DSM20509

L.salivarius salicinius DSM20555

L.salivarius salivarius DSM20554

L.animalis DSM20602

L.aviarius aviarius DSM20655

L.ruminis DSM20511

2.11.3-Solucions per a l'assaig d'hibridació

Solució base 20xSSC

Composició:

Na Cl	3 M
Citrat sòdic	0'3 M
pH	7

S'ajusta el pH amb NaOH 10N.

Solució d'hibridació

Composició:

SSC	5x
Agent de bloqueig de Boehringer Mannheim	1% (p/v)
Sal sòdica	0'1% (p/v)
SDS	0'02% (p/v)

Deixar dissoldre 1 hora a 50-70°C.

Tampó 1

Composició:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM
pH	7'5

Tampó 2

Composició:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM
pH	7'5
Agent de bloqueig de Boehringer Mannheim	2% (p/v)

Tampó 3

Composició:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl	50 mM
pH	9'5

Tampó 4

Composició:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8

Les solucions i tampons s'esterilitzen durant 20 minuts a l'autoclau a 121°C.

2.11.4-Marcatge de la sonda amb digoxigenina

L'ADN de la sonda es marca per incorporació aleatòria del deoxiuracil trifosfat unit a l'heptà digoxigenina (Dig-dUTP). Per fer això s'utilitza el kit de marcatge i detecció de Boehringer Mannheim.

El procediment a seguir és el següent:

1-Es barregen en una cubeta amb gel 1 μ l de la sonda (100 pmols/ μ l), 4 μ l de tampó de marcatge, 4 μ l de solució CoCl_2 , 1 μ l de solució DIG-dUTP, 1 μ l de terminal transferasa (50 U/ μ l) i 9 μ l d'aigua destil·lada a pH 7.

2-S'incuba a 37°C durant 15 minuts i ràpidament es posa en gel.

3-La reacció s'atura amb 2 μ l d'una solució formada per 1 μ l de glicògen i 200 μ l de solució d'EDTA (200 mM, pH 8).

4-La sonda marcada es precipita amb 2,5 μ l de LiCl 4M i 75 μ l d'etanol absolut fred, deixant-ho reposar durant 30 minuts a -70°C.

5-La sonda es centrifuga a 12.000 rpm durant 30 minuts a 4°C, el sediment es renta amb 50 μ l d'etanol 70% (v/v) fred i es deixa assecar al buit.

6-La sonda es dissol en 10 μ l d'aigua destil·lada a pH 7 per aconseguir una concentració de 10 pmols/ μ l. La sonda ja està preparada per hibridar i es guarda a -20°C.

2.11.5-Transferència de l'ADN del gel a la membrana de niló

L'ADN cromosòmic que es vol hibridar amb la sonda marcada s'ha de transferir des del gel d'agarosa, on s'ha visualitzat després del seu aïllament, fins a una membrana de niló on té lloc la hibridació pròpiament dita. Per fer això s'utilitzen les tècniques descrites per Southern (1975) en què l'ADN és desnaturalitzat en el gel i posteriorment és transferit a la membrana, tot mantenint la posició relativa dels fragments durant la transferència.

En aquest cas es realitza una transferència al buit, en què el tampó elueix els àcids nucleics del gel i els diposita en la membrana impulsat per la força del buit.

El procediment a seguir és el següent:

1-Finalitzada l'electroforesi el gel es depurina amb HCl 0,25N durant 15 minuts a temperatura ambient i agitació.

2-El gel es renta 2 vegades amb aigua desionitzada estèril durant 3 minuts a temperatura ambient i agitació.

3-El gel es desnaturalitza amb NaOH 0'5N durant 30 minuts a temperatura ambient i agitació.

4-Es prepara l'equip de transferència al buit (Bio Rad model 785 vacum blotter) a 3inHg humitejant la goma per evitar pèrdues i col·locant la placa porosa humitejada en 10xSSC.

5-Es talla una peça de paper Whatman 3MM de la mateixa mida que el gel, es mulla en aigua desionitzada i posteriorment en solució 10xSSC i es col·loca sobre la placa porosa de manera que no quedin bombolles.

6-Es talla una membrana de niló de la mateixa mida que el gel, es mulla en solució 10xSSC i es col·loca sobre el paper vigilant que no quedin bombolles.

7-Es retalla un finestra lleugerament més petita que el gel en una làmina de plàstic i es col·loca sobre la membrana.

8-El gel es superposa a la finestra en la seva posició normal i es segellen les butxaques amb agarosa.

9-L'aparell es connecta a la bomba de buit i un cop aquest s'ha produït es submergeix el conjunt en 1-1'5 litres de solució 10xSSC.

10-Finalitzada la transferència la membrana es renta durant 5 minuts en 2xSSC i després es deixa eixugar durant tota la nit.

11-L'ADN es fixa a la membrana per exposició a la llum ultraviolada durant 3 minuts.

2.11.6-Hibridació i detecció

Per a la hibridació s'utilitza un forn d'hibridació GATC-HYBE amb tubs rodons de vidre que es mouen per rotació.

1-La membrana seca procedent de la transferència es prehibrida durant 1-3 hores amb la solució d'hibridació (2.11.3) a 60°C, tenint en compte que hi hagi uns 20 ml de solució per cada 100 cm² de membrana.

2-La membrana s'hibrida amb 2'5 ml de solució d'hibridació (2.11.3) per cada 100 cm² de membrana que conté 50 pmols/ml de sonda. Es deixa a la temperatura seleccionada d'hibridació durant el temps adequat.

3-Les restes de sonda s'eliminen rentant la membrana 2 vegades durant 5 minuts amb 2xSSC-0'1% (p/v) SDS a la mateixa temperatura d'hibridació.

4-Es repeteix el rentat 2 vegades durant 5 minuts amb 0'1xSSC-0'1% (p/v) SDS a una temperatura 2-4°C superior a la d'hibridació per augmentar-ne l'especificitat.

La membrana es pot deixar assecat a l'aire i guardar o bé passar directament a la reacció de detecció.

Per a la detecció de la sonda hibridada s'utilitza el kit de marcatge i detecció de Boehringer Mannheim. Aquesta etapa té lloc a temperatura ambient i amb agitació.

1-La membrana es renta durant 1 minut amb tampó 1 (2.11.3), a continuació durant 90 minuts amb tampó 2 (2.11.3) i s'acaba amb un rentat durant 1 minut amb tampó 1 (2.11.3).

2-El complexa anticòs conjugat es dilueix en tampó 1 (2.11.3) (1:5.000) i la membrana s'incuba en aquesta solució durant 30 minuts.

3- Es renta la membrana 2 vegades amb tampó 1 (2.11.3) durant 15 minuts per tal d'eliminar les restes d'anticòs que no s'hagin unit a la sonda.

4-La membrana s'equilibra durant 2 minuts amb tampó 3 (2.11.3) i es deixa tenyir durant 2 hores amb una solució cromàtica (45 µl de NBT i 35 µl de solució X-fosfat en 10 ml de tampó 3) sense agitar i en la foscor.

5-Un cop s'ha completat la reacció es renta durant 5 minuts amb el tampó 4 (2.11.3).

6-La membrana es deixa assecat de manera que es pot guardar a temperatura ambient. El color es pot reactivar humitejant la membrana amb tampó 4 (2.11.3).

2.12-SEQÜENCIACIÓ DEL GEN QUE CODIFICA EL 16S ARN RIBOSÒMIC

La seqüenciació del gen que codifica el 16S ARN ribosòmic s'ha dut a terme al Departament de Microbiologia de la Universitat Tècnica de Munich (Freising, Alemanya), per tal d'identificar aquelles soques que no han pogut ser classificades en base a les característiques bioquímiques i a la hibridació. La seqüenciació directa del gen amplificat per PCR es fa amb un Seqüenciador Alfa Express (Pharmacia).

El gen que codifica el 16S ARN ribosòmic s'amplifica per PCR amb els encebadors universals 616V i 630R donant lloc a un fragment de 1.578 parells de bases. Per a la seqüenciació d'aquest fragment s'utilitza un kit de seqüenciació que conté l'encebador Thermo Sequenasa marcat fluorescentment amb 7-dGTP (Amersham Life Science), i posteriorment s'afegeix l'encebador invers 97KCy5 (5'-CTG CTG CCT CCC GTA-3') amb una modificació fluorescent a l'extrem 5'.

2.13-RESISTÈNCIA A LA RIFAMPICINA

2.13.1-Presència de soques resistents a la rifampicina en la microbiota natural dels pollets

Per poder recuperar les soques probiòtiques inoculades i diferenciar-les de la població natural de lactobacils del tracte gastrointestinal dels pollets durant els assaigs *in vivo*, es pretén utilitzar la resistència a la rifampicina, que s'ha descrit com una propietat atípica entre els lactobacils (Rada i col., 1995).

Per comprovar que, efectivament, la presència de soques de lactobacils resistents a la rifampicina és poc freqüent entre la microbiota natural dels pollastres, s'escullen 10 pollets d'entre 5 i 21 dies d'edat procedents de tres orígens diferents. Els animals es sacrifiquen per dislocació cervical i se'ls extreuen els cecs.

Les mostres s'esmicolen amb l'ajut d'unes tisores estèrils, es barregen amb solució salina (2.1.8) a una proporció de 1:9 i s'homogeneïtzen durant 30 segons amb el vòrtex a màxima potència.

A continuació es fa un banc de dilucions decimals utilitzant el mateix diluent i es sembren en plaques d'agar Rogosa (2.1.2) i agar Rogosa amb 100 µg/ml de rifampicina (Sigma)(en endavant Rogosa-rif), que s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

2.13.2-Selecció de soques resistents

La solució de rifampicina es prepara amb metanol a una concentració de 5 mg/ml i es manté al congelador a -20°C.

Es sembren per estria 10 µl d'un cultiu de nit de cada una de les soques làctiques que es volen estudiar, en plaques d'agar MRS (2.1.1) amb 100 µg/ml de rifampicina (en endavant MRS-rif). Les plaques s'incuben durant 2 dies a 37°C en anaerobiosi.

De cada una de les soques es seleccionen dues colònies a l'atzar i es cultiven en tubs de brou MRS-rif. Els tubs s'incuben tota la nit a 37°C en anaerobiosi.

Les colònies es congelen a -80°C amb un 20% de glicerol.

Els següents subcultius i recomptes es realitzen en MRS-rif o agar Rogosa-rif. S'incuben a 37°C en anaerobiosi durant 18-20 hores.

2.14-SUPERVIVÈNCIA DELS LACTOBACILS EN EL PINSO

El pinso és un mitjà potencial per a l'administració als pollets d'una soca probiòtica a gran escala. Això implica que els bacteris làctics que s'hi vulguin incloure han de ser capaços de sobreviure en aquest medi així com a les temperatures a què es troben els magatzems i les incubadores dels animals. Per això s'estudia la viabilitat de la soca seleccionada en aquestes condicions al llarg del temps.

2.14.1-Inoculació de lactobacils en el pinso

Els lactobacils es poden inocular en el pinso a partir d'un cultiu liofilitzat o bé a partir d'un cultiu líquid abans o després del procés de granulació.

En el cas del cultiu liofilitzat, aquest es barreja amb la quantitat adient de pinso per aconseguir la concentració desitjada (10^5 , 10^6 i 10^8 ufc/g de pinso).

En el cas del cultiu líquid, es centrifuga un cultiu de nit de la soca que es vol inocular durant 10 minuts a 5.000 rpm. El sediment es resuspèn en una vintena part del volum inicial de solució salina tamponada (2.1.10), es dilueix en solució salina (2.1.8) per obtenir la concentració desitjada i es barreja 1:20 amb pinso. Les barreges es deixen a 30°C o temperatura ambient durant diversos dies.

Quan el cultiu líquid s'inclou en el pinso abans del procés de granulació, aquest s'inocula directament a la farina de pinso a l'1% (v/p) i se'n fa un únic recompte immediatament després de la finalització del procés.

En els diferents temps de mostreig es pesen 3 g de pinso, que es barregen amb solució salina (2.1.8) a una proporció de 1:9 i s'homogeneïtzen durant 1 minut amb el vòrtex a màxima potència. A continuació es fa un banc de dilucions decimals, utilitzant el mateix diluent, i es sembren plaques d'agar Rogosa (2.1.2) i/o Rogosa-rif, que s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

2.14.2-Supervivència de lactobacils en pinso acidificat a temperatura ambient

La inclusió de diversos productes acidificants en pinsos és una pràctica habitual entre els fabricants com a mesura per prevenir la contaminació per part de patògens. Si es vol utilitzar el pinso com a mitjà per administrar la soca probiòtica, cal assegurar la seva supervivència en presència d'aquests productes.

Per això *L.salivarius* CTC2197^{R1} s'inocula, a partir d'un cultiu liofilitzat, en 7 mostres de pinso a base de blat de moro i soja que contenen diverses substàncies acidificants per obtenir una concentració de 10⁸ ufc/g. Els pinsos utilitzats són els següents:

Mostra pinso	Acidificants inclosos	pH	Dosificació (Kg/Tm)
1	Control	6'00	-
2	46% àcid fòrmic, 5% àcid propiònic, 23% formiat amònic	5'87	2.52
3	61% àcid fòrmic, 29% àcid propiònic	5'86	2.60
4	68% àcid fòrmic, 20% àcid propiònic	5'52	2.50
5	80% àcid làctic	5'97	1.30
6	53% àcid fosfòric, 1% àcid cítric, 1% àcid fumàric	5'92	2.00
7	32% àcid fosfòric, 0.6% àcid cítric, 15.6% àcid fumàric	5'91	2.00

El pinso es manté a temperatura ambient i als 0, 3 i 12 dies se'n fa el recompte de viables en plaques d'agar Rogosa (2.1.2) per estudiar la supervivència de la soca làctica. A partir de les soques recuperades d'una mostra de pinso de 3 dies, es seleccionen 10 colònies a l'atzar i es fan créixer en brou MRS (2.1.1). A través de l'estudi del perfil plasmídic (2.9.1.3) es comprova que les colònies seleccionades corresponguin a la soca probiòtica inoculada inicialment.

S'inocula un brou de MRS (2.1.1) a l'1% amb les 10 colònies seleccionades. El cultiu de nit es centrifuga durant 10 minuts a 5.000 rpm, i el sediment resultant es resuspèn en una vintena part de suero fisiològic (2.1.9), que s'utilitza per reinocular el pinso (1:20).

A partir de les soques recuperades d'una mostra de 3 dies es torna a repetir el procés fins a 3 vegades i a més, en cada cas, es fan recomptes periòdics per estudiar la supervivència de les soques reinoculades al llarg del temps en plaques d'agar Rogosa (2.1.2) i Rogosa-rif.

2.15-PRE-ASSAIG *IN VIVO*

2.15.1-Preparació dels cultius

Es centrifuguen 10 ml d'un cultiu de nit de la soca làctica que es vol inocular a 5.000 rpm durant 10 minuts. El sediment es resuspèn en 2 ml de suero fisiològic (2.1.9) per obtenir una concentració de 1×10^9 ufc/ml.

2.15.2-Inoculació dels animals

Per al pre-assaig es disposa de 12 pollets tipus Label d'un dia d'edat als quals s'administra, via oral, 100 μ l d'una suspensió bacteriana de les soques *Lactobacillus salivarius* CTC2183^{R1} (10^8 ufc) i *Lactobacillus salivarius* CTC2197^{R1} (10^8 ufc).

Els pollets es disposen en una caixa de cartró amb una làmpada de raigs infraroigs que ajuden a mantenir la temperatura, i tenen accés lliure a l'aigua i al menjar que correspon a una barreja comercial.

2.15.3-Sacrifici dels animals

A cada temps de mostreig, 15, 22, 41, 65 i 86 hores després de la inoculació, es sacrifiquen dos animals per dislocació cervical i se'ls extreu el pap i els cecs per fer el recompte de viables.

Les mostres s'esmicolen amb l'ajut d'unes tisores estèrils, es barregen amb solució salina (2.1.8) a una proporció de 1:9 i s'homogeneïtzen durant 1 minut amb el vòrtex a màxima potència.

Es fa un banc de dilucions decimals utilitzant el mateix diluent i es sembren en plaques d'agar Rogosa-rif, que s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

De cada una de les mostres es selecciona un nombre determinat de colònies resistents a la rifampicina ($\alpha=0'05\%$ i $\beta=0'05\%$), d'acord amb un pla de mostreig progressiu basat en la distribució binomial acumulada (Malegeant, 1991). S'estudia el perfil plasmídic (2.9.1.3) de cada una d'aquestes colònies, per determinar el percentatge amb què les soques CTC2183^{R1} i CTC2197^{R1} han estat capaces de colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets.

2.16-ASSAIGS *IN VIVO*

2.16.1-Preparació dels cultius

Es centrifuga un cultiu de nit de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} a 5.000 rpm durant 10 minuts. El sediment es resuspèn 1:10 en solució salina tamponada (2.1.10) per obtenir una concentració de 1×10^9 ufc/ml. Aquesta solució s'utilitza per inocular els animals directament al proventricle (Primer i segon assaig).

En el tercer assaig, en què es pretén conèixer quina és la concentració més baixa que cal administrar als pollets a través del pinso per assegurar la colonització del tracte intestinal per part de la soca probiòtica, es centrifuga un cultiu de nit format per una barreja de 14 colònies de *L.salivarius* CTC2197^{R1}, que s'han seleccionat per la seva bona supervivència en pinso (2.14). El sediment es resuspèn 1:20 en llet descremada 10% (p/v) i glucosa 7'5% (p/v) per obtenir una concentració de 1×10^9 ufc/ml. Aquesta solució es barreja amb el pinso per obtenir les diferents concentracions bacterianes que es volen assajar.

Salmonella enteritidis C-114 es cultiva en agar amb soja triptica (2.1.4) suplementat amb 200 µg/ml d'àcid nalidíxic i 12 mg/ml de clorur de mercuri durant 18 hores a 37°C. Les cèl·lules es suspenen en General Purpose Medium Plus (GPM+, BioMérieux) fins a obtenir una densitat òptica de 0'15 mesurada a 450 nm. La suspensió es dilueix 1:100 en GPM+ i s'utilitza per inocular els animals directament al proventricle.

2.16.2-Distribució dels animals

Els assaigs *in vivo* es realitzen al Departament de Nutrició Animal de Mas Bové (IRTA) a Reus.

En tots els casos s'utilitzen pollets mascles d'un dia tipus Leghorn que es disposen en gàbies Petersime. Aquestes gàbies consten de 6 pisos amb 4 compartiments a cadascun. Cada tractament experimental es col·loca en un nivell de la gàbia, disposant així de 4 rèpliques per a cada un d'ells.

Els animals tenen en tots els casos accés lliure a l'aigua i al pinso i s'alimenten amb un pinso a base de blat de moro i soja que no conté ni òxid de crom, ni coccidiostàtics, ni promotors de creixement.

Per evitar les possibles contaminacions creuades, els animals que no són inoculats amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} es disposen en unes gàbies diferents a les que allotgen els animals que reben la soca probiòtica.

Durant tots els assaigs es tindrà en compte la col·locació dels abeuradors i els receptacles del menjar, per tal de tornar-los a col·locar en el mateix lloc després de cada neteja i evitar així la contaminació creuada a través de l'aigua i el pinso.

2.16.3-Inoculació dels animals

2.16.3.1-Primer assaig

S'utilitzen 128 pollets que es divideixen en 4 grups, 32 pollets cada un, corresponents als tractaments: A) control, B) inoculació amb *S.enteritidis* C-114 (10^6 ufc), C) inoculació amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} (10^8 ufc), D) inoculació amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} (10^8 ufc) i *S.enteritidis* C-114 (10^6 ufc). Les dues soques s'inoculen directament al proventricle dels pollets mitjançant una xeringa amb una cànula semirígida de 12 cm de llargada i 3 mm de diàmetre.

2.16.3.2-Segon assaig

S'utilitzen 96 pollets que es divideixen en 3 grups, 32 pollets cada un, corresponents als tractaments B', C' i D' segons el primer assaig (B, C, D). Les soques s'inoculen directament al proventricle i la soca probiòtica també s'administra, durant el primer dia, barrejada amb el pinso (10^8 ufc/g) i l'aigua (10^7 ufc/ml) utilitzant un cultiu liofilitzat.

2.16.3.3-Tercer assaig

S'utilitzen 120 pollets que es divideixen en 4 grups, 30 pollets cada un. La soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} es barreja amb el pinso que s'utilitza per alimentar als animals durant el primer dia fins a obtenir les següents concentracions: 10^5 ufc/g (tractament E), 10^7 ufc/g (tractament F) i 10^8 ufc/g (tractament G). Els animals del tractament T corresponen als controls que no reben la soca probiòtica.

2.16.4-Determinació de lactobacils i *Salmonella*

A cada temps de mostreig, 14 i 21 dies després de la inoculació inicial en el primer i segon assaig i 7, 14, 21 i 28 dies en el tercer, es sacrifiquen els animals per dislocació cervical i se'ls extreuen els dos cecs. Un s'utilitza per a la determinació de *S.enteritidis* C-114 i l'altre per al recompte de lactobacils. En el primer assaig es mostregen 4 animals per cada tractament i en el segon i tercer se'n sacrifiquen 6.

Per a la determinació de lactobacils, les mostres s'esmicolen amb l'ajut d'unes tisores estèrils, es barregen amb solució salina (2.1.8) a una proporció de 1:9 i s'homogeneïtzen durant 1 minut amb el vòrtex a màxima potència.

A continuació es fa un banc de dilucions decimals, utilitzant el mateix diluent, i es sembren en plaques d'agar Rogosa (2.12), per al recompte de lactobacils, i agar Rogosa-rif, per al recompte de la soca probiòtica. En el primer assaig les mostres corresponents als tractaments C i D només es van sembrar en agar Rog-rif. Les plaques s'incuben durant 2 dies a 37°C en condicions anaeròbies.

De cada una de les mostres es selecciona un nombre determinat de colònies ($\alpha=0'05\%$ i $\beta=0'05\%$), d'acord amb un pla de mostreig basat en la distribució binomial acumulada (Malegeant, 1991), i s'estudia el seu perfil plasmídic (2.9.1.3) per comprovar que es tracta de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}, en els tractaments en què aquesta s'ha inoculat, i per assegurar-ne l'absència en els tractaments control.

La presència o absència de *S.enteritidis* C-114 es va determinar als 14 i 21 dies en el primer i segon assaig al departament de Sanitat Animal de l'IRTA a Barcelona mitjançant mètodes impedimètrics en un Bactometer (BioMérieux). Els cecs es pre-enriqueixen durant 18 hores a 37°C en aigua de peptona tamponada suplementada amb ribosa 0'1% (p/v) i òxid de trimetilanina (TMAO, Sigma) 0'1 % (p/v).

Passat el temps de pre-enriquiment es fan dilucions decimals abans de procedir a inocular els mòduls del Bactometer. Amb aquest sistema es poden seguir els canvis en la conductivitat del medi de cultiu, canvis que són significatius per *Salmonella* utilitzant els medis descrits per Saco (1993). Els pouets dels mòduls impedimètrics van subcultivar-se en agar verd brillant modificat (Oxoid) i en agar XLT4 (Difco) durant 24 hores a 37°C. Es varen seleccionar colònies aïllades per confirmar per creixement en TSA suplementat amb àcid nalidixic (200 mg/ml) (p/v) i clorur de mercuri (12 mg/ml)(p/v).

2.16.5-Anàlisi estadístic

La significació de les diferències en el recompte de lactobacils entre el primer i el darrer temps de mostreig s'avalua amb un test-t, que també s'utilitza per comparar els valors mitjos entre tractaments (Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, Redmond, Washington).

3-RESULTATS

3.1-AÏLLAMENT I DETECCIÓ D'ACTIVITAT INHIBIDORA DE LACTOBACILS INTESTINALS DE POLLETS

Per aquest estudi es van utilitzar 50 pollets d'entre 15 i 42 dies d'edat procedents de tres orígens diferents. A partir del pap i/o el contingut intestinal d'aquests animals es va fer el recompte de lactobacils en agar Rogosa. Les dades obtingudes van mostrar que el nombre de lactobacils present a les mostres de pap va ser inferior al de les de contingut intestinal. Mentre que en el primer cas es van mantenir a una mitjana de 10^6 ufc/g en el segon es va arribar a 10^8 ufc/g. A partir dels clons recuperats en plaques es van escollir a l'atzar 8 colònies de cada una de les mostres. Totes aquelles soques que van presentar un creixement clar en les condicions de cultiu utilitzades, amb forma bacilar, Gram positives i catalasa negatives foren retingudes pels estudis posteriors, obtenint-se així un total de 296 soques. A partir del cultiu pur de cada soca es va congelar una al·lòtota a -80°C amb un 20% de glicerol i la resta es va mantenir a 4°C .

Amb el mètode de la gota en agar s'estudià la capacitat de totes les soques aïllades per inhibir el creixement de dues soques indicadores, *Salmonella enteritidis* CTC1026 i *Escherichia coli* CTC1028. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.1.

El 26% de les soques van ser capaces de produir zones d'inhibició superiors als 10 mm davant els dos patògens utilitzats. El 28,7% van inhibir una soca indicadora amb aquesta intensitat però en canvi només van poder produir zones d'inhibició superiors als 5 mm davant l'altra. Així mateix se'n va trobar un 10,5% que van impedir per igual el creixement dels dos patògens amb zones d'inhibició superiors als 5 mm. A més hi va haver un 7,4% de les soques que només van ser capaces d'inhibir una de les indicadores però no l'altra i un 26% que no van exercir cap activitat antagonista enfront cap dels patògens assajats.

De les 296 soques es van triar les 77 que van ser capaces de produir una zona d'inhibició superior a 10 mm enfront ambdues indicadores per aprofundir en la seva caracterització.

Taula 3.1-Activitat inhibidora dels lactobacils aïllats de pollets enfront *Salmonella enteritidis* CTC1026 i *Escherichia coli* CTC1028.

Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026
2000	++	++	2042	-	+	2084	-	-
2001	++	++	2043	++	++	2085	-	-
2002	-	-	2044	++	++	2086	-	++
2003	-	-	2045	++	++	2087	-	-
2004	+	++	2046	+	+	2088	-	-
2005	-	-	2047	+	++	2089	++	++
2006	-	-	2048	++	++	2090	++	++
2007	-	±	2049	++	++	2091	+	++
2008	+	++	2050	+	++	2092	+	++
2009	-	-	2051	++	++	2093	-	-
2010	++	++	2052	-	+	2094	-	-
2011	-	-	2053	++	++	2095	-	-
2012	+	+	2054	++	++	2096	-	-
2013	-	+	2055	++	++	2097	+	++
2014	+	++	2056	+	++	2098	++	++
2015	++	++	2057	++	++	2099	+	++
2016	-	-	2058	++	++	2100	-	-
2017	++	++	2059	+	-	2101	+	++
2018	++	++	2060	+	++	2102	++	++
2019	-	-	2061	+	++	2103	-	++
2020	+	+	2062	+	++	2104	+	++
2021	+	++	2063	+	++	2105	+	++
2022	+	++	2064	+	++	2106	-	-
2023	++	++	2065	-	-	2107	++	++
2024	*	*	2066	++	++	2108	++	++
2025	+	++	2067	-	-	2109	+	++
2026	++	++	2068	+	++	2110	+	++
2027	*	*	2069	+	++	2111	+	++
2028	-	+	2070	-	-	2112	++	++
2029	+	-	2071	++	++	2113	++	++
2030	-	-	2072	-	±	2114	++	++
2031	*	*	2073	+	++	2115	++	++
2032	-	-	2074	-	+	2116	+	++
2033	+	++	2075	-	±	2117	-	-
2034	+	±	2076	-	-	2118	+	++
2035	-	±	2077	+	++	2119	-	-
2036	+	++	2078	+	++	2120	-	-
2037	-	±	2079	+	++	2121	++	++
2038	++	++	2080	+	+	2122	+	++
2039	++	++	2081	++	++	2123	++	++
2040	-	-	2082	-	-	2124	+	+
2041	-	-	2083	++	++	2125	++	++

...continua de Taula 3.1

Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026
2126	++	++	2172	-	-	2218	-	-
2127	++	++	2173	-	+	2219	-	-
2128	+	++	2174	-	-	2220	-	-
2129	+	-	2175	+	++	2221	-	-
2130	+	+	2176	++	++	2222	-	-
2131	++	++	2177	+	++	2223	+	++
2132	+	++	2178	++	++	2224	+	++
2133	++	++	2179	+	++	2225	+	++
2134	+	++	2180	-	-	2226	+	+
2135	++	++	2181	-	-	2227	+	+
2136	++	++	2182	++	+++	2228	+	++
2137	+	++	2183	++	+++	2229	+	++
2138	-	-	2184	+	++	2230	+	+
2139	+	++	2185	++	+++	2231	++	++
2140	+	+	2186	++	++	2232	+	++
2141	-	-	2187	-	-	2233	++	++
2142	-	+	2188	++	+++	2234	+	++
2143	++	++	2189	+	++	2235	-	-
2144	-	-	2190	++	++	2236	*	*
2145	+	+	2191	++	+	2237	+	++
2146	++	++	2192	-	-	2238	-	++
2147	-	-	2193	++	++	2239	+	++
2148	-	-	2194	+	+	2240	+	+
2149	-	-	2195	-	-	2241	+	+
2150	-	-	2196	+	++	2242	+	++
2151	-	-	2197	++	++	2243	++	++
2152	±	+	2198	+	++	2244	++	++
2153	±	±	2199	-	-	2245	+	++
2154	++	+++	2200	-	-	2246	+	++
2155	+	++	2201	+	++	2247	+	++
2156	-	-	2202	-	-	2248	+	++
2157	+	++	2203	-	-	2249	+	+
2158	+	++	2204	-	-	2250	+	++
2159	+	++	2205	-	-	2251	+	++
2160	+	++	2206	-	-	2252	+	++
2161	++	++	2207	+	+	2253	++	++
2162	+	++	2208	+	+	2254	-	-
2163	++	++	2209	++	++	2255	++	++
2164	+	++	2210	+	+	2256	+	++
2165	+	++	2211	+	++	2257	+	++
2166	++	++	2212	-	-	2258	-	-
2167	-	+	2213	++	++	2259	±	±
2168	+	++	2214	+	++	2260	++	++
2169	-	-	2215	-	±	2261	+	++
2170	-	-	2216	-	-	2262	++	++
2171	-	-	2217	-	-	2263	-	-

...continua de Taula 3.1

Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026	Soca CTC	<i>E.coli</i> CTC1028	<i>S.enteritidis</i> CTC1026
2264	-	-	2275	±	±	2286	+	+
2265	-	-	2276	+	-	2287	++	+
2266	-	-	2277	+	+	2288	++	++
2267	-	-	2278	±	+	2289	+	++
2268	-	-	2279	-	+	2290	++	++
2269	++	++	2280	+	++	2291	++	++
2270	-	-	2281	±	+	2292	++	++
2271	-	-	2282	±	±	2293	++	++
2272	-	-	2283	++	++	2294	+	++
2273	-	-	2284	±	+	2295	+	++
2274	±	+	2285	±	±			

- Llegenda:
- no hi ha inhibició
 - ± zona d'inhibició <5mm
 - +
 - ++ zona d'inhibició >10mm i <15mm
 - +++ zona d'inhibició >15mm
 - * soca no viable

3.2-CAPACITAT D'ADHESIÓ DE LES SOQUES

Es determinà la capacitat de les 77 soques escollides per adherir-se a cèl·lules epitelials del pap de pollets, segons el test de Fuller. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.2.

Es van detectar 42 soques que no es van adherir a les cèl·lules epitelials del pap o bé ho van fer en un nombre inferior a 10 bacteris/cèl·lula epitelial (b/c.e. en endavant), 21 que es van adherir en un nombre superior als 10 b/c.e., 12 que ho van fer en més de 30 b/c.e. i 2 que van ser capaces d'adherir-se en quantitats superiors als 70 b/c.e.

Per als estudis posteriors es van triar un total de 14 soques corresponents a les 12 mitjanament adherents: CTC2049, CTC2051, CTC2055, CTC2112, CTC2146, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2231, CTC2233 i CTC2260 i les 2 altament adherents: CTC2197 i CTC2244.

Les fotografies obtingudes amb el microscopi electrònic de rastreig després dels assaigs d'adhesió amb la soca CTC2197 es presenten a la figura 3.1. En aquestes es pot apreciar amb tota claredat la presència d'unes fibres de lligament que permeten no només la unió de les cèl·lules bacterianes entre si, sinó també a les cèl·lules epitelials del pap, corroborant visualment els resultats obtinguts amb el test de Fuller.

3.3-RESISTÈNCIA A LES CONDICIONS GASTROINTESTINALS

3.3.1-pH àcid

Es comprovà la capacitat de les soques seleccionades per resistir un ambient àcid mantenint-les durant 3 hores en aigua destil·lada a pH 3 i comparant la seva supervivència durant el mateix temps a pH 6'7.

En general es va poder veure que totes les soques van tolerar bé l'acidesa, ja que la majoria van presentar recomptes semblants en els dos ambients, de l'ordre de 10^5 - 10^7 ufc/ml (dades no mostrades). Sense poder ser considerades significatives, les principals diferències es van trobar en les soques CTC2112, CTC2176 i CTC2244 que van arribar a reduir 10 vegades la seva població després de 3 hores en condicions àcides. La soca que va tolerar pitjor un pH de 3 va ser la CTC2233 que va reduir la seva població en un factor de 10^3 .

Taula 3.2-Capacitat d'adhesió dels lactobacils seleccionats a les cèl·lules epitelials del pap de pollets.

Soca CTC	Capacitat adhesió	Soca CTC	Capacitat adhesió	Soca CTC	Capacitat adhesió
2000	0	2090	0	2182	1
2001	0	2098	0	2183	2
2010	0	2102	1	2185	1
2015	0	2107	0	2186	2
2017	0	2108	0	2188	1
2018	0	2112	2	2190	0
2023	1	2113	0	2193	1
2026	0	2114	0	2197	3
2038	0	2115	0	2209	0
2039	0	2121	0	2213	1
2043	0	2123	0	2231	2
2044	0	2125	0	2233	2
2045	0	2126	0	2243	1
2048	0	2127	0	2244	3
2049	2	2131	0	2253	1
2051	2	2133	0	2255	1
2053	1	2135	0	2260	2
2054	0	2136	0	2262	1
2055	2	2143	0	2269	1
2057	1	2146	2	2283	1
2058	0	2154	0	2288	1
2066	0	2161	0	2290	1
2071	1	2163	0	2291	1
2081	0	2166	2	2292	0
2083	0	2176	2	2293	1
2089	0	2178	1		

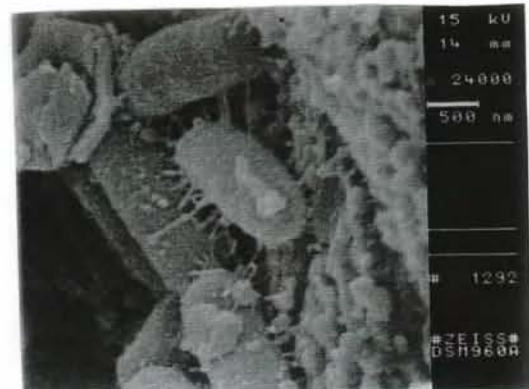
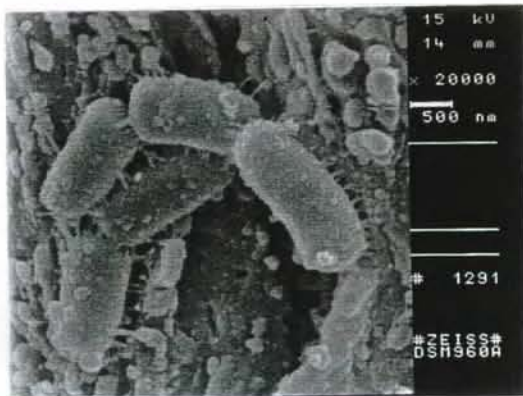
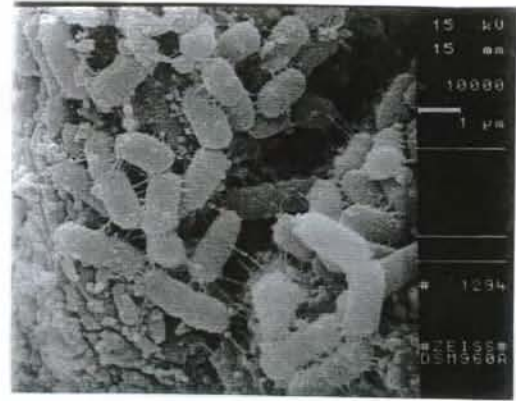
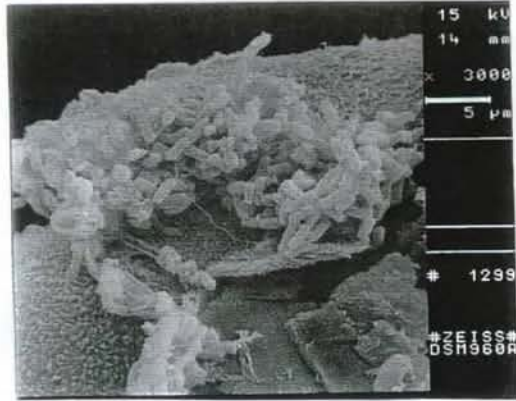
Llegenda: 0 no hi ha adhesió o és inferior a 10 bacteris/cèl·lula epitelial

1 adhesió d'entre 10 i 30 bacteris/cèl·lula epitelial

2 adhesió d'entre 30 i 70 bacteris/cèl·lula epitelial

3 adhesió de més de 70 bacteris/cèl·lula epitelial

Figura 3.1- Observació al microscopi electrònic de rastreig de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 adherida a cèl·lules epitelials de pap.



3.3.2-Sals biliars

Es determinà la capacitat de les soques escollides per créixer en presència de sals biliars, 1 i 4% (p/v). La totalitat va créixer en ambdues concentracions, excepte la CTC2233 que ho va poder fer amb un 1% de sals biliars però no quan la concentració va ser del 4%.

Com que la soca CTC2233 no va ser capaç de resistir l'acidesa ni una concentració del 4% de sals biliars, es va decidir descartar-la pels estudis posteriors.

3.3.3-Antibiòtics

Es va determinar la resistència de les soques escollides davant cinc antibiòtics, a les concentracions que s'utilitzen amb finalitats terapèutiques en producció avícola.

Les 13 soques es van mostrar resistents a l'àcid nalidíxic 32 µg/ml, l'eritromicina 8 µg/ml, l'estreptomicina 1 mg/ml i el cloramfenicol 32 µg/ml, excepte la CTC2183 i la CTC2244 que van ser sensibles a aquest últim. Per contra totes les soques van ser sensibles a l'ampicilina 4 µg/ml. Els resultats van coincidir quan l'estudi es va realitzar en medi sòlid o en medi líquid.

3.3.4-Coccidiostàtics

La monensina és un coccidiostàtic que s'utilitza de forma habitual en la producció avícola on s'inclou en el menjar, per això se'n va determinar la concentració mínima inhibidora (CMI) per a les 13 soques seleccionades.

En aquest cas els resultats van ser diferents segons si l'estudi es va fer en medi sòlid o en medi líquid. En medi sòlid la CMI per a totes les soques va ser de 1 µg/ml tot i que per a CTC2112, CTC2146, CTC2166 i CTC2244 el creixement en presència d'aquesta concentració no va ser tant abundant. En medi líquid la CMI de la majoria es va situar en 1'5 µg/ml malgrat que per a CTC2112, CTC2146 i CTC2166 va disminuir fins a 1 µg/ml i per a CTC2183 va arribar als 2 µg/ml.

Quan es va comprovar la resistència de les soques CTC2183 i CTC2197 inoculades en pinso amb monensina, es va observar que la CMI va ser més elevada. Així CTC2183, que va créixer fins a $3'34 \times 10^9$ ufc/g de pinso en absència del coccidiostàtic, es va mantenir a un nivell de creixement semblant quan la concentració final de monensina va ser de 3 µg/ml ($1'50 \times 10^9$ ufc/g) i només va disminuir en un logaritme quan aquesta va

augmentar fins a 6 µg/ml ($1,28 \times 10^8$ ufc/g). La presència de 9 µg/ml de monensina va permetre encara el creixement de la soca fins a $3,60 \times 10^6$ ufc/g de pinso.

De manera semblant CTC2197, que va arribar a $1,90 \times 10^9$ ufc/g de pinso, va mantenir el un nivell de creixement semblant quan la concentració final de monensina va ser de 3 µg/ml ($1,38 \times 10^9$ ufc/g). Quan la concentració del coccidiostàtic va augmentar fins a 6 µg/ml el creixement de la soca es va reduir en un logaritme ($1,17 \times 10^8$ ufc/g) i va arribar fins a $4,16 \times 10^6$ ufc/g en presència de 9 µg/ml.

3.4-IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES A TRAVÉS DE LA CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA

Les soques seleccionades van mostrar una morfologia bacil·lar, molt semblant en totes elles, i es van trobar agrupades formant cadenes curtes de 2 a 4 cèl·lules. A la figura 3.2 es pot veure una imatge de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 al microscopi òptic de contrast de fase a 1.000 augments.

3.4.1-Creixement a diferents temperatures

Cap de les soques assajades va créixer a 15°C mentre que totes elles ho van fer a 45°C. Això va fer pensar que totes les soques seleccionades pertanyien al grup dels *Thermobacterium*.

3.4.2-Producció de gas

Per comprovar si els bacteris làctics seleccionats eren homofermentadors o heterofermentadors es va estudiar la producció de CO₂ a partir de la fermentació de la glucosa.

Cap de les soques assajades va produir gas, indicant que en tots els casos es tractava de soques homofermentadores estrictes. Aquests resultats també indicaven que es tractava d'un conjunt de soques pertanyents al grup dels *Thermobacterium* que són, efectivament, homofermentadors estrictes.

Figura 3.2-Observació al microscopi òptic a 1.000 augments de *Lactobacillus salivarius* CTC2197.



3.4.3-Quantificació i configuració de l'àcid làctic

Totes les soques assajades van produir àcid làctic després de 20 hores a 37°C com a resultat de la fermentació de la glucosa. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.3. En tots els casos les soques van produir únicament l'isòmer L. La quantitat total d'àcid làctic va oscil·lar entre els 12'20 g/l de la soca CTC2146 i els 18'48 g/l de la CTC2049.

3.4.4-Fermentació de carbohidrats i hidròlisi d'esculina

Per conèixer el perfil de fermentació de carbohidrats de les soques assajades se'n van estudiar 8 de diferents així com la capacitat d'hidrolitzar l'esculina.

En general el perfil de fermentació va ser similar per a totes elles. La fermentació va ser positiva per a la glucosa, el manitol, la manosa, el sorbitol i la trehalosa i en canvi va ser negativa per a la celobiosa, la ribosa i la salicina. La hidròlisi de l'esculina també va ser negativa.

La única diferència es va trobar en la soca CTC2183 que no va fermentar ni el sorbitol ni la trehalosa.

3.4.5-Hidròlisi de l'arginina

La capacitat per part dels lactobacils d'hidrolitzar l'arginina pot representar una font d'energia suplementària quan els carbohidrats no estan disponibles com a substrats principals.

La capacitat d'hidrolitzar l'arginina es va assajar amb dos mètodes diferents, coincidint en tots els casos els resultats obtinguts amb les dues metodologies. De les soques assajades només la CTC2166 va poder hidrolitzar l'arginina.

Amb els resultats obtinguts en les diferents proves d'identificació es va poder determinar que totes les soques assajades pertanyien a l'espècie *Lactobacillus salivarius* segons el manual de classificació Bergey's. Aquesta espècie es caracteritza per ser homofermentadora estricta, produir únicament L-àcid làctic, créixer a 45°C i no a 15°C, no utilitzar l'arginina com a font d'energia, fermentar la glucosa, el manitol, la manosa, el sorbitol i la trehalosa però no la celobiosa i la ribosa. El comportament davant l'esculina i la salicina és variable de manera que si les fermenten pertanyen a l'espècie *L.salivarius* subsp. *salicinius* i si no les fermenten a l'espècie *L.salivarius* subsp. *salivarius*. Com que cap de les soques assajades va fermentar ni l'esculina ni la salicina es pot dir que la totalitat corresponen a l'espècie *L.salivarius* subsp. *salivarius*.

Taula 3.3-Àcid làctic produït pels lactobacils seleccionats en brou MRS.

SOCA CTC	D-LÀCTIC*	L-LÀCTIC*	TOTAL*
2049	1'65	16'83	18'48
2051	0'00	14'97	14'97
2055	0'99	13'76	14'75
2112	0'00	14'29	14'29
2146	0'00	12'20	12'20
2166	0'00	13'44	13'44
2176	0'00	14'71	14'71
2183	0'00	13'29	13'29
2186	0'50	13'41	13'91
2197	0'00	12'88	12'88
2231	0'00	13'35	13'35
2244	0'00	14'26	14'26
2260	0'00	13'76	13'76

*Resultats expressats en g/l, utilitzant un cultiu de 20 hores en brou MRS a 37°C.

Les soques CTC2183 i CTC2166 van requerir estudis posteriors per assegurar que pertanyien a l'espècie mencionada, ja que el perfil de fermentació d'alguns sucres en el cas de la CTC2183 i la hidròlisi de l'arginina en el cas de la CTC2166, no van coincidir amb el patró característic segons el manual de Bergey's.

3.5-IDENTIFICACIÓ DE LES SOQUES A TRAVÉS DELS MÈTODES MOLECULARS

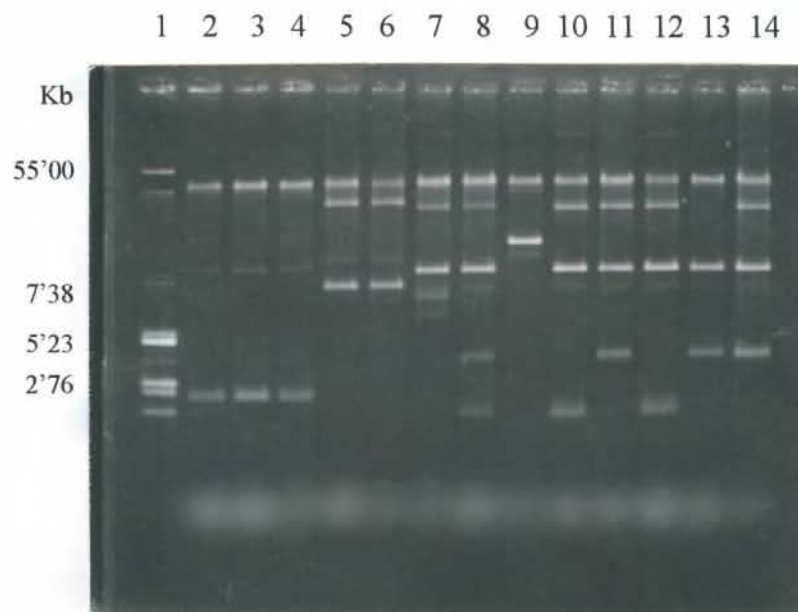
3.5.1-Determinació del perfil plasmídic

El perfil plasmídic de les soques seleccionades es pot veure a la figura 3.3. La major o menor intensitat de les bandes és deguda al nombre de còpies de cada plàsmid, i no a la presència de formes obertes que no apareixen amb el mètode utilitzat d'Anderson i McKay (1983). El que sí és habitual amb l'esmentada tècnica és l'aparició de restes d'ADN cromosòmic, que se situa en la banda de les 55 Kb i és comuna per a totes les soques. En general es va observar la presència d'una mitjana de 3 ó 4 plàsmids per soca. La CTC2183 en va presentar 2 mentre que la CTC2176 va mostrar 5 plàsmids.

El pes molecular d'aquests plàsmids, calculat segons la recta de regressió obtinguda amb els pesos moleculars del patró *Escherichia coli* V517 (Macrina i col., 1978), va oscil·lar entre 31'6 i 2'0 Kb. Hi va haver una sèrie de plàsmids que van aparèixer de forma regular en diverses soques. Així es va trobar un plàsmid d'aproximadament 28'7 Kb que va estar present en 6 de les soques estudiades, un altre d'unes 12'4 Kb que es va trobar en 7 de les soques, un plàsmid de 10'2 Kb que es va observar en un total de 8 soques i finalment un plàsmid de 4'2 Kb que va aparèixer en 4 de les soques assajades.

Si s'observen els perfils plasmídics de les 13 soques es pot veure que n'hi ha algunes que van presentar perfils idèntics. Així les soques CTC2049, CTC2051 i CTC2055 van ser iguals entre sí, de la mateixa manera que les parelles CTC2112-CTC2146, CTC2186-CTC2231 i CTC2197-CTC2260.

Tenint en compte aquestes identitats es va poder reduir el nombre de soques seleccionades a vuit, de manera que els estudis posteriors es van realitzar amb les soques que van ser diferents entre sí: CTC2049, CTC2112, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197 i CTC 2244.

Figura 3.3-Perfil plasmídic de les soques de *Lactobacillus salivarius* aïllades.

Llegenda: **Columna 1:** *Escherichia coli* V517 (Macrina i col., 1978) com a marcador, **Columnes 2 a 14:** *L.salivarius* CTC2049, CTC2051, CTC2055, CTC2112, CTC2146, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197, CTC2231, CTC2244, CTC2260.

3.5.2-Perfils de RAPD

Es va determinar el perfil de RAPD de les 8 soques seleccionades amb l'encebador universal M13 ($T_m=46.6^\circ\text{C}$), incloent-hi soques de col·lecció pertanyents a *L.salivarius* o altres espècies relacionades: *L.agilis* DSM20509, *L.salivarius salicinius* DSM20555, *L.salivarius salivarius* DSM20554, *L.animalis* DSM20602, *L.aviarius aviarius* DSM20655, *L.ruminis* DSM20511. El perfil obtingut es mostra a la figura 3.4.

Amb el patró de bandes obtingut es va poder observar que la majoria de les soques estudiades estaven molt relacionades entre si. Les soques CTC2176, CTC2186, CTC2197 i CTC2244 van presentar el mateix perfil, força semblant al de la parella de soques CTC2112 i CTC2183. Les soques CTC2049 i CTC2166 van presentar perfils diferents als anteriors. La comparació de les imatges obtingudes en el gel no va permetre establir cap paral·lelisme entre el perfil de les soques seleccionades i el de les altres soques de col·lecció.

Per tal d'obtenir una mesura quantitativa del grau de relació existent entre les diferents soques es va procedir a l'elaboració d'un dendograma. El resultat obtingut es mostra a la figura 3.5.

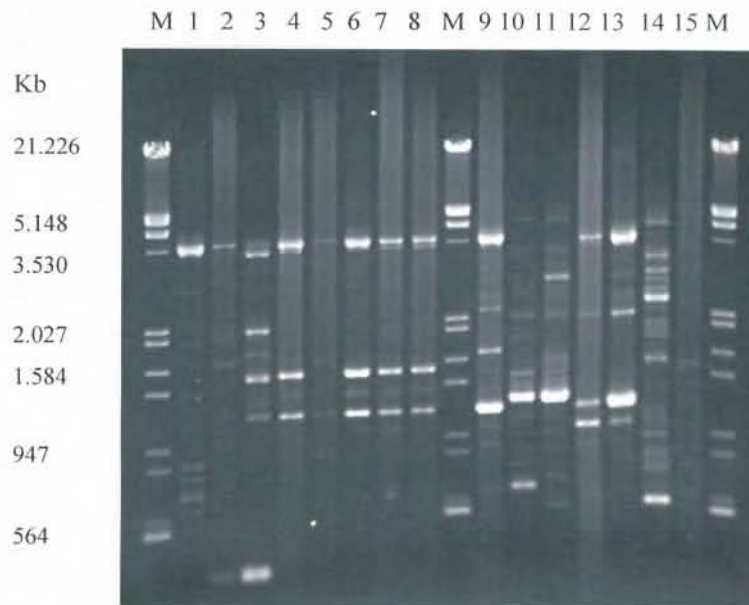
Es pot observar l'existència de dos grups clarament diferenciats, un format per les soques seleccionades i un altre format per les soques de col·lecció. Només les dues soques CTC2049 i CTC2166 es trobarien allunyades de la resta de soques seleccionades com ja s'havia pogut observar a través de la comparativa del patró de bandes. De tota manera aquests resultats tampoc ens permetrien assignar les diferents soques seleccionades a cap espècie en concret ja que no s'observa cap grau de similitud prou significatiu.

3.5.3-Hibridació

La hibridació d'una sonda específica amb l'ADN bacterià permet el reconeixement d'organismes estretament relacionats fins al nivell d'espècie i subespècie. En els últims anys la seqüenciació completa dels gens que codifiquen el 16S ARN ribosòmic d'espècies noves o ben conegudes de bacteris làctics, ha permès el disseny de sondes específiques d'espècie (Ehrmann i col., 1994; Vogel i col., 1994). En aquest estudi es va voler dissenyar una sonda específica per a *L.salivarius*, per verificar la identificació feta en base a les característiques bioquímiques de les soques seleccionades.

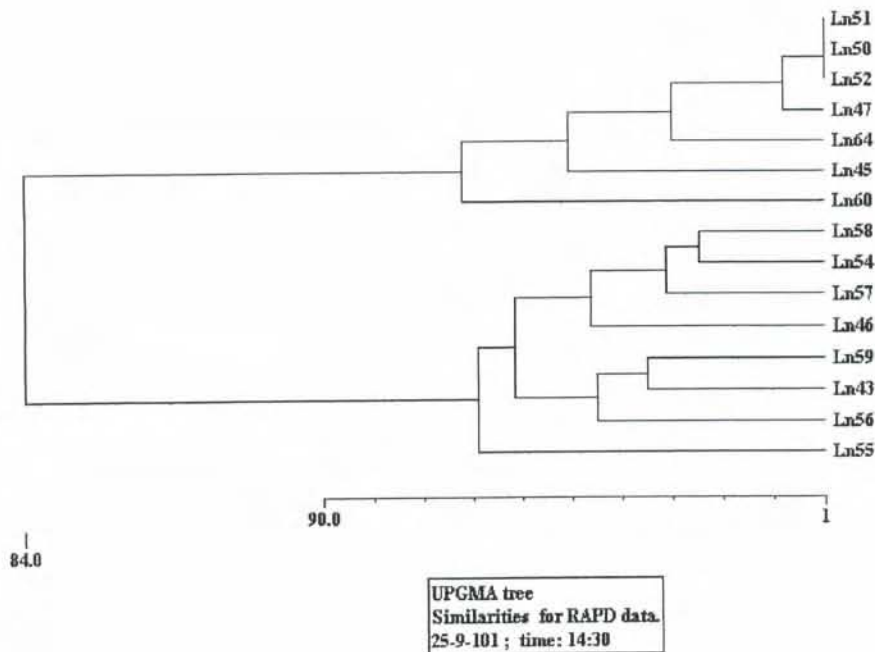
Són diverses les bases de dades que contenen les seqüències corresponents als gens que codifiquen el 16S ARN ribosòmic de varies espècies de bacteris làctics. L'estudi

Figura 3.4-Perfil de RAPD obtingut amb l'encebador M13 de les soques de *Lactobacillus salivarius* aïllades i les soques de col·lecció.



Llegenda: **M:** BioSizer[™] III (angewandte Gentechnologie Systeme) com a marcador, **1 a 8:** *L.salivarius* CTC2049, CTC2112, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197, CTC2244, **9:** *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20.492, **10:** *L.agilis* DSM20.509, **11:** *L.ruminis* DSM20.511, **12:** *L.salivarius* subsp.*salicinius* DSM20.554, **13:** *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20.555, **14:** *L.animalis* DSM20.602, **15:** *L.aviarius* subsp. *aviarius* DSM20.655.

Figura 3.5-Dendograma comparatiu dels perfils de RAPD obtinguts amb l'encebador M13 de les soques de *Lactobacillus salivarius* aïllades i les soques de col·lecció.



Llegenda: **Ln51:** *L.salivarius* CTC2197, **Ln50:** *L.salivarius* CTC2186, **Ln52:** *L.salivarius* CTC2244, **Ln47:** *L.salivarius* CTC2176, **Ln64:** *L.salivarius* CTC2183, **Ln45:** *L.salivarius* CTC2112, **Ln60:** *L.aviarius* subsp. *aviarius* DSM20.655, **Ln58:** *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20.555, **Ln54:** *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20.492, **Ln57:** *L.salivarius* subsp. *salicinius* DSM20.554, **Ln46:** *L.salivarius* CTC2166, **Ln59:** *L.animalis* DSM20.602, **Ln43:** *L.salivarius* CTC2049, **Ln56:** *L.ruminis* DSM20.511, **Ln55:** *L. agilis* DSM20.509.

comparatiu d'aquestes seqüències va permetre determinar que les espècies més estretament relacionades amb *L.salivarius* són *L.agilis* (93% d'homologia), *L.animalis* (93%), *L.aviarius* (95%) i *L.ruminis* (93%), espècies que es van incloure en l'estudi d'hibridació com a controls negatius. La comparació de les seqüències es mostra a la figura 3.6.

A partir de les comparacions per alineació de les diverses seqüències de 16S ARN més relacionades, es va delimitar la zona on hi havia la màxima variabilitat entre espècies, que es va situar entre les posicions 71 i 115. En base a aquestes diferències es van dissenyar dues sondes per a *L.salivarius*, Lb. sal 2 ($T_m=50'4^{\circ}\text{C}$) i Lb. sal 3 ($T_m=50'2^{\circ}\text{C}$), que havien de permetre distingir les soques corresponents a *L.salivarius* d'aquelles que corresponguessin a les altres espècies bacterianes.

El gen que codifica el 16S ARN ribosòmic de les soques seleccionades en aquest treball i de les soques de col·lecció utilitzades com a controls positius i negatius, es va amplificar utilitzant els encebadors universals per a eubacteris 616V, com a encebador directe, i 630R, com a encebador invers, i es va transferir a una membrana de niló. La hibridació es va provar amb les dues sondes durant 2 hores a 40, 44 i 46°C. En tots els casos es van obtenir aparellaments inespecífics, ja que la sonda va hibridar amb totes les soques assajades (CTC2049, CTC2112, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197 i CTC2244), inclosos els controls negatius. Els mateixos resultats es van obtenir quan la temperatura d'hibridació va augmentar fins a 60 i 65°C, fins i tot quan es va provar la hibridació durant només 1 minut a aquesta darrera temperatura. La membrana d'hibridació obtinguda amb la sonda Lb. sal 2 es mostra a la figura 3.7 i és idèntica a la obtinguda amb la sonda Lb. sal 3. Aquests resultats van indicar que les sondes dissenyades no eren específiques per a *L.salivarius* i no permetien, de moment, confirmar la identificació feta en base a les característiques bioquímiques.

3.5.4-Seqüenciació del 16S ARN ribosòmic

Es va determinar la seqüència del 16S ARN ribosòmic de les soques CTC2166 i CTC2183, que havien presentat característiques atípiques a l'hora de ser identificades com a *L.salivarius* subsp. *salivarius* en funció de les seves característiques bioquímiques i la identitat de les quals no s'havia pogut confirmar per hibridació amb una sonda específica. També es va seqüenciar el 16S ARN ribosòmic de la soca CTC2197^{R1} utilitzada en els assaigs *in vivo*.

Figura 3.6-Comparació dels gens que codifiquen per al 16S ARN ribosòmic de *L.animalis*, *L.aviarius* subsp. *aviarius*, *L.agilis*, *L.salivarius* subsp. *salivarius* i *L.ruminis*.

	1				50
<i>L.animalis</i>	NTTNAATTGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ATNAACGCTG	GCGGCGTGCC
<i>L.aviarius</i>	NNTAAATTGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
<i>L.agilis</i>	NCTAAAATGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
<i>L.salivarius</i>	~TTAAAATGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
<i>L.ruminis</i>	NATAAATTGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
	51				100
<i>L.animalis</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTTT	ATCACCGAGT	GCTTGCACTC
<i>L.aviarius</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AGAATTTCTT	A. CACCGAGT	GCTTGCACTC
<i>L.agilis</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	...CTTTTTT	CAATCATCGT	AGCTTGCTAC
<i>L.salivarius</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTT	A. CACCGAAT	GCTTGCACTC
<i>L.ruminis</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAGCTTTCTT	T. CACCGAAT	GCTTGCACTC
	101				150
<i>L.animalis</i>	ACCGATAAAG	AGTTGAGTGG	CGAACGGGTG	AGTAACACGT	GGGCAACCTG
<i>L.aviarius</i>	ACCGTAAGNN	ATTCGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACNCGT	GGGTAACCTG
<i>L.agilis</i>	ACCGATTGAA	AATTGAGTGG	CGAACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
<i>L.salivarius</i>	ACTCGTAAGA	AGTTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
<i>L.ruminis</i>	AC. CGAAAGA	AGCTTAGTGG	CGAACGGGTG	AGTAACACGT	AGGCAACCTG
	151				200
<i>L.animalis</i>	CCYAAAAGAG	GGGGATAACA	CTTGGAACA	GGTGCTAATA	CCGCATAACC
<i>L.aviarius</i>	CCCAAAAAGAA	GGGGATAACA	TTTGGAACA	AATGCTAATA	CCGTATAACC
<i>L.agilis</i>	CCYAAAAGAG	GGGGATAACA	CTTGGAACA	GGTGCTAATA	CCGCATAACC
<i>L.salivarius</i>	CCTAAAAGAA	GGGGATAACA	CTTGGAACA	GGTGCTAATA	CCGTATATCT
<i>L.ruminis</i>	CCCAAAAAGAG	GGGGATAACA	CTTGGAACA	GGTGCTAATA	CCGCATAACC
	201				250
<i>L.animalis</i>	ATAGTTACCG	CATGGTAACT	ATGTAAAAGG	TGGCTA. TGC	TACCNCTTTT
<i>L.aviarius</i>	ATGATGACCG	CATGGTCATT	ATGTAAAAGG	TNGTTT. TGC	TATCGCTTTT
<i>L.agilis</i>	ATRATGACCG	CATNGTCATT	ATGTAAAAGA	TGGTTTCGGC	TATCACTTTT
<i>L.salivarius</i>	CTAAGGATCG	CATGATCCTT	AGATGAAAGA	TGGTTCTNGC	TATCGCTTTT
<i>L.ruminis</i>	ATGAACACCG	CATGATGTTT	ATGTAAAAGA	CGGCTTTTGC	TGTCACCTTTT
	251				300
<i>L.animalis</i>	GGATGGGCC	NCGGCGCATT	AGCTAGTTGG	TGAGGTAAAG	GCTTACCAAG
<i>L.aviarius</i>	GGATGGACCC	NCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TAGGGTAACG	GCCTACNAAG
<i>L.agilis</i>	GGATGGACCC	NCGGCGTATT	AACTTGTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
<i>L.salivarius</i>	AGATGGACCC	GCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
<i>L.ruminis</i>	GGATGGCNNT	GCGGCGTATT	AACTTGTGG	TGGGGTAATG	GCCTACCAAG
	301				350
<i>L.animalis</i>	GCARTGATGC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
<i>L.aviarius</i>	GTGATGATAC	GTAGCCGAGT	TGAGAGACTG	ATCGGCCACA	ATGGGACTGA
<i>L.agilis</i>	GTAATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
<i>L.salivarius</i>	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
<i>L.ruminis</i>	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
	351				400
<i>L.animalis</i>	GACACGGCCN	NNNCTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGNAT	CTTCCNCAAT
<i>L.aviarius</i>	GACACGGCCN	NACTCCTAC	GGGAGNNAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
<i>L.agilis</i>	GACACGGCCN	NAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
<i>L.salivarius</i>	GACACGGCCC	NAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
<i>L.ruminis</i>	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT

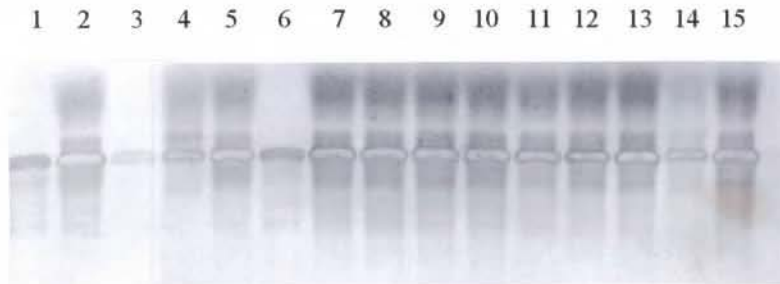
	401				450
<i>L. animalis</i>	GGGCGAAAGC	CTNATGGAGC	AACGCCNCCT	GGGTGAAGAA	GGTCTTCGGA
<i>L. aviarius</i>	GGGCGCAAGC	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAATGAAGAA	GGTCTTCGGA
<i>L. agilis</i>	GGGCGCAAGC	CTNATGGAGC	AACGCCNCGT	GAGTGAAGAA	GGTCTTCGGA
<i>L. salivarius</i>	GGACGCAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAGTGAAGAA	GGTCTTCGGA
<i>L. ruminis</i>	GGACGAAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAATGAAGAA	GGCCTTCGGG
	451				500
<i>L. animalis</i>	TCGTAAAACC	CNGTTGTTAG	AGAAGAAAGT	GCGTGAGAGT	AACTGTTCCAC
<i>L. aviarius</i>	TCGTAAAATT	CTGTTGTTAG	AGAAGAATAT	GAGTAATAGT	AACTGATTAT
<i>L. agilis</i>	TCGTAAAACT	CNGTTGTTAG	AGAAGAACAT	GCARGAGAGT	AACTGTTCTT
<i>L. salivarius</i>	TCGTAAAACT	CNGTTGTTAG	AGAAGAACTC	GAGTGAGAGT	AACTGTTCCAT
<i>L. ruminis</i>	TCGTAAAATT	CTGTTGTCAG	AGAAGAACGT	GCGTGAGAGT	AACTGTTCCAC
	501				550
<i>L. animalis</i>	TTTCGACGG	TATCTAACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
<i>L. aviarius</i>	CACTGACGG	TATCTAACCA	GCAAGTCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
<i>L. agilis</i>	TATTGACGG	TATCTAACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
<i>L. salivarius</i>	CGATGACGG	TATCTAACCA	GCAAGTCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
<i>L. ruminis</i>	GTATTGACGG	TATCTGACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
	551				600
<i>L. animalis</i>	CGCGGTNATA	CGTAGGTGGC	NAGCGTTATC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
<i>L. aviarius</i>	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	NAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
<i>L. agilis</i>	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	NAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
<i>L. salivarius</i>	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
<i>L. ruminis</i>	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	NAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
	601				650
<i>L. animalis</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAACCNNNC	GGCTTAACCG
<i>L. aviarius</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCNTTC	GGCTTAACCG
<i>L. agilis</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTTAACCG
<i>L. salivarius</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTTAACCG
<i>L. ruminis</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTTAACCG
	651				700
<i>L. animalis</i>	GAGTAGTGCA	TTGGAAACTG	GGAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
<i>L. aviarius</i>	GAGATGTGCA	TTGGAAACTG	GAAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
<i>L. agilis</i>	AAGNATTGCA	TTGGAAACTG	GAGGCCTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
<i>L. salivarius</i>	GAGTAGTGCA	TTGGAAACTG	GAAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
<i>L. ruminis</i>	AAGTAGTGCA	TTGGAAACTG	GAAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
	701				750
<i>L. animalis</i>	ACTCNATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCACTGG
<i>L. aviarius</i>	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCACTGG
<i>L. agilis</i>	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCACTGG
<i>L. salivarius</i>	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCACTGG
<i>L. ruminis</i>	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCACTGG
	751				800
<i>L. animalis</i>	CGAAAGCGGC	TCTCTNGTCT	GTAAGTACG	CTGAGGTTTCG	AAAGCGTGGG
<i>L. aviarius</i>	CGAAAGCGGC	TCTCTGGTCT	GTAAGTACG	CTGAGGTTTCG	AAAGCATGGG
<i>L. agilis</i>	CGAAAGCGGC	TCTCTGGTCT	GTAAGTACG	CTGAGGTTTCG	AAAGTGTGGG
<i>L. salivarius</i>	CGAAAGCGGC	TCTCTGGTCT	GTAAGTACG	CTGAGGTTTCG	AAAGCGTGGG
<i>L. ruminis</i>	CGAAAGCGGC	TCTCTGGTCT	GTAAGTACG	CTGAGGTTTCG	AAAGCGTGGG

	801				850
<i>L. animalis</i>	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAATG
<i>L. aviarius</i>	TAGCGAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CATGCCGTAA	ACGATGAATG
<i>L. agilis</i>	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACACCGTAA	ACGATGAATG
<i>L. salivarius</i>	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAATG
<i>L. ruminis</i>	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAGTG
	851				900
<i>L. animalis</i>	CTAAGTGTTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCTGCAGCTA	ACGCAATAAG
<i>L. aviarius</i>	CTAAGTGTTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCCGCAGCTA	ACGCAATAAG
<i>L. agilis</i>	CTAAGTGTTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCTGCAGCTA	ACGCAATAAG
<i>L. salivarius</i>	CTAAGTGTTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCCGCAGCTA	ACGCAATAAG
<i>L. ruminis</i>	CTAAGTGTTG	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCTGCAGCTA	ACGCATTAAG
	901				950
<i>L. animalis</i>	CATTCCGCCT	GGGGAGTACG	ACCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
<i>L. aviarius</i>	CATTCCGCCT	GGGGAGTACG	ACCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
<i>L. agilis</i>	CATTCCGCCT	GGGGAGTACG	ACCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
<i>L. salivarius</i>	CATTCCGCCT	GGGGAGTACG	ACCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
<i>L. ruminis</i>	CACTCCGCCT	GGGGAGTACG	GTCGCAAGAC	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC
	951				1000
<i>L. animalis</i>	GGGNGCCNGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTTCGA	ANNAACGCGA
<i>L. aviarius</i>	GGGNCCNGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTTCGA	ANNAACGCGA
<i>L. agilis</i>	GGGGGCCNGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTTCGA	ANNAACGCGA
<i>L. salivarius</i>	GGGGGCNNGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTTCGA	ANNAACGCGA
<i>L. ruminis</i>	GGNNGCCNGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTTCGA	AGCAACGCGA
	1001				1050
<i>L. animalis</i>	AGAACCCTTAC	CAGGNCTTGA	CATCTTCTGA	CAATCCTAGA	GATAGGACTT
<i>L. aviarius</i>	AGAACCCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCTTTTGA	CCACCTAAGA	GATTAGGNNT
<i>L. agilis</i>	AGAACCCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCTTTTGA	CCATCTTAGA	GATAAGATTT
<i>L. salivarius</i>	AGAACCCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCCTTTGA	CCACCTAAGA	GATTAGGCTT
<i>L. ruminis</i>	AGAACCCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCTTCTGA	CAATTCCAGA	GATGGAACGT
	1051				1100
<i>L. animalis</i>	TCCNTTCGGG	GACAGAATGA	CAGGTGGNGC	ATGGTTGTCTG	TCAGCTCGTG
<i>L. aviarius</i>	TCCCTTCGGG	GACAAAATGA	CAGGTGGNGC	ATGGCTGTCTG	TCAGCTCGTG
<i>L. agilis</i>	TCCCTTCGGG	GNCAAAATGA	CAGGTGGNGC	ATGGCTGTCTG	TCAGCTCGTG
<i>L. salivarius</i>	TCCCTTCGGG	GACAAAGTGA	CAGGTGGNGC	ATGGCTGTCTG	TCAGCTCGTG
<i>L. ruminis</i>	TCCCTTCGGG	GACAGAATGA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTCTG	TCAGCTCGTG
	1101				1150
<i>L. animalis</i>	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTATTGTTAG
<i>L. aviarius</i>	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTGTTGTCAG
<i>L. agilis</i>	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTGTTGTCAG
<i>L. salivarius</i>	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTGTTGTCAG
<i>L. ruminis</i>	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTATTGTCAG
	1151				1200
<i>L. animalis</i>	TTGCCAGCAT	TAAGTTGGGC	ACTCTAGCAA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
<i>L. aviarius</i>	TTGCCATCAT	TCAGTTGGGC	NCTCTGGCGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
<i>L. agilis</i>	TTGCCAGCAT	TAAGTTGGGC	ACTCTGGCGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
<i>L. salivarius</i>	TTGCCAGCAT	TAAGTTGGGC	ACTCTGGCGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG
<i>L. ruminis</i>	TTGCCATCAT	TAAGTTGGGC	ACTCTGGCGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG

	1201				1250
<i>L. animalis</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
<i>L. aviarius</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
<i>L. agilis</i>	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
<i>L. salivarius</i>	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAGTCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
<i>L. ruminis</i>	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	AAATCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA
	1251				1300
<i>L. animalis</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACG	GTACAACGAG	TCGCAAGAYC	GCGAGGTTTA
<i>L. aviarius</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACG	ATACAACGAG	TCGCGARACC	GCGAGGTTAA
<i>L. agilis</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACG	GTACAACGAG	TYGCAAACCTC	GCGAGGGCAA
<i>L. salivarius</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACG	GTACAACGAG	TCGCGAGACC	GCGAGGTTTA
<i>L. ruminis</i>	CACACGTGCT	ACAATGGACG	GTACAACGAG	TCGCTAACTC	GCGAGGGCAA
	1301				1350
<i>L. animalis</i>	GCAAATCTCT	TAAAGCCGTT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGGCT	GCAACTCGCC
<i>L. aviarius</i>	GCTAATCTCT	TAAAGTCGTT	CTCAGTTCGG	ATTGCAGGCT	GCAACTCGCC
<i>L. agilis</i>	GCTAATCTCT	TAAAGCCGTT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGGCT	GCAACTCGCC
<i>L. salivarius</i>	GCTAATCTCT	TAAAGCCGTT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGGCT	GCAACTCGCC
<i>L. ruminis</i>	GCTAATCTCT	TAAAGCCGTT	CTCAGTTCGG	ATTGCAGGCT	GCAACTCGCC
	1351				1400
<i>L. animalis</i>	TNCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCGGTGAA
<i>L. aviarius</i>	TGCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCGGTGAA
<i>L. agilis</i>	TNCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	AATCAGCATG	TCGCGGTGAA
<i>L. salivarius</i>	TACATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	AATCAGCATG	TCGCGGTGAA
<i>L. ruminis</i>	TGCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	AATCAGCATG	TCGCGGTGAA
	1401				1450
<i>L. animalis</i>	TACGTTCCCN	GGC NNTGTAC	ACACCGCCC	TCACACCATG	AGAGTTTGTGTA
<i>L. aviarius</i>	TACGTTCCCN	GGC NNTGTAC	ACACCGCCC	TCACACCATG	AGAGTTTGTGTA
<i>L. agilis</i>	TACGTTCCCN	GGC NNTGTAC	ACACCGCCC	TCACACCATG	AGAGTTTGTGTA
<i>L. salivarius</i>	TACGTTCCCG	GGC CTTGTAC	ACACCGCCC	TCACACCATG	AGAGTTTGTGTA
<i>L. ruminis</i>	TACGTTCCCG	GGC CTTGTAC	ACACCGCCC	TCACACCATG	AGAGTTTGTGTA
	1451				1500
<i>L. animalis</i>	ACACCCAAAG	CCGGTGGGGT	AACCTTTT.G	GAGCCAGCCG	TCTAAGGTGG
<i>L. aviarius</i>	ACACCCAAAG	CCGGTGGAGT	AACCATTT.G	GAGCTAGCCG	TCTAAGGTGG
<i>L. agilis</i>	ACACCCAAAG	CCGGTGGGGT	AACCTTTTAG	GAGCTAGCCG	TCTAAGGTGG
<i>L. salivarius</i>	ACACCCAAAG	CCGGTGGGGT	AACCGCAA.G	GAGCCAGCCG	TCTAAGGTGG
<i>L. ruminis</i>	ACACCCAAAG	TCGGTGGGGT	AACCTTTT.G	GAGCCAGCCG	CCTAAGGTGG
	1501				1550
<i>L. animalis</i>	GACAGATGA~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>L. aviarius</i>	GACAGANGA~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>L. agilis</i>	GACAGATGAT	NGGGG~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>L. salivarius</i>	GACAGATGAT	TGGGG~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>L. ruminis</i>	GACAGATGAC	NGGGGNNNNN	NNGTAAACAAG	NNNNNNNNNN	NNGAACCTGN
	1551		1570		
<i>L. animalis</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>L. aviarius</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>L. agilis</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>L. salivarius</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>L. ruminis</i>	NNNNNGATCA	CCTCCTTTCT			

La zona marcada amb negreta correspon a la de màxima variació entre seqüències.

Figura 3.7-Membrana d'hibridació obtinguda amb la sonda Lb.sal 2.



Llegenda: **1 a 9:** *L.salivarius* CTC2049, CTC2112, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197, CTC2197^{R1}, CTC2244, **10:** *L.agilis* DSM20.509, **11:** *L.salivarius* subsp.*salicinius* DSM20.554, **12:** *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20.555, **13:** *L.animalis* DSM20.602, **14:** *L.aviarius* subsp. *aviarius* DSM20.655. **15:** *L.ruminis* DSM20.511,

Les seqüències obtingudes per a les diverses soques es mostren a la figura 3.8. En comparar la seva seqüència amb la del 16S ARN ribosòmic de la soca tipus *L.salivarius* subsp. *salivarius* DSM20555, s'observa un elevat percentatge de coincidència, proper al 100%, en la zona seqüenciada situada aproximadament entre les bases 50 i 350. Aquesta zona coincideix amb la de màxima variació dins del 16S ARN ribosòmic, mostrant que en tots els casos es tracta de l'espècie *L.salivarius* subsp. *salivarius*.

3.6-IDENTIFICACIÓ DE *L.salivarius* CTC2197^{R1} A TRAVÉS DE PERFILS DE RAPD

La tècnica de RAPD-PCR es basa en l'amplificació d'una molècula d'ADN utilitzant encebadors a l'atzar, de manera que es pot distingir una soca d'una altra a través de l'obtenció d'empremtes específiques. Això permetria detectar a través de PCR la presència d'una soca determinada en una població mixta, evitant l'ambigüitat i llarga durada dels mètodes tradicionals. Així mateix obre la possibilitat de treballar directament a partir d'una colònia sense necessitat d'haver d'extreure i aïllar l'ADN.

Per obtenir un perfil de RAPD que permetés diferenciar *L.salivarius* CTC2197^{R1} de la població natural de lactobacils del tracte gastrointestinal dels pollets, durant els assaigs *in vivo*, es van provar un total de 80 encebadors que es van assajar sobre les soques CTC2197, CTC2197^{R1} i altres soques d'origen intestinal conservades a -80°C. Amb 10 dels encebadors provats: OPJ17, OPJ18, OPK8, OPK13, OPK18, OPZ5, OPZ6, OPZ9, OPZ10 i OPZ15 es va aconseguir obtenir un perfil repetitiu que permetia distingir la soca probiòtica d'altres soques estretament relacionades. Posteriorment aquests encebadors es van assajar sobre un ventall més ampli de soques làctiques procedents de l'intestí de pollets, per tal d'assegurar la seva eficàcia a l'hora de distingir la soca probiòtica de les altres. D'aquesta manera es va determinar que els encebadors OPK8, OPK18 i OPZ15 eren els únics capaços de distingir aquesta soca d'altres lactobacils, incloent la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}. Els perfils obtinguts amb aquests encebadors es mostren a les figures 3.9, 3.10 i 3.11, respectivament.

Figura 3.8-Comparació de les seqüències del 16S ARN ribosòmic de *L.salivarius* supsp. *salivarius* DSM20555 i les soques CTC2166, CTC2183 i CTC2197^{R1}.

	1				50
<i>L.salivarius</i>	~TTAAATGA	GAGTTTGATC	CTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
CTC2166	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~GTGCC
CTC2183	~~~~~	~~AGTTGATY	MTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~GTTGATY	MTGGCTCAGG	ACGAACGCTG	GCGGCGTGCC
	51				100
<i>L.salivarius</i>	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTT	A.CACCGAAT	GCTTGCAATC
CTC2166	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTT	A.CACCGAAT	GCTTGCAATC
CTC2183	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTT	A.CACCGAAT	GCTTGCAATC
CTC2197 ^{R1}	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AAACTTTCTT	A.CACCGAAT	GCTTYCATTC
	101				150
<i>L.salivarius</i>	ACTCGTAAGA	AGTTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
CTC2166	AC.CGTAAGA	AGTTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
CTC2183	AC.CGTAAGA	AGTTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
CTC2197 ^{R1}	AC.CGTAAGA	AGTTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GGGTAACCTG
	151				200
<i>L.salivarius</i>	CCTAAAAGAA	GGGGATAACA	CTTGGAAACA	GGTGCTAATA	CCGTATATCT
CTC2166	CCTAAAAGAA	GGGGATAACA	CTTGGAAACA	GGTGCTAATA	CCGTATATCT
CTC2183	CCTAAAAGAA	GGGGATAACA	CTTGGAAACA	GGTGCTAATA	CCGTATATCT
CTC2197 ^{R1}	CCTAAAAGAA	GGGGATAACA	CTTGGAAACA	GGTGCTAATA	CCGTATATCT
	201				250
<i>L.salivarius</i>	CTAAGGATCG	CATGATCCTT	AGATGAAAGA	TGGTTC.TGC	TATCGCTTTT
CTC2166	CTAAGGATCG	CATGATCCTT	AGATGAAAGA	TGGTTC.TGC	TATCGCTTTT
CTC2183	CTAAGGATCG	CATGATCCTT	AGATGAAAGA	TGGTTC.TGC	TATCGCTTTT
CTC2197 ^{R1}	CTAAGGATCG	CATGATCCTT	AGATGAAAGA	TGGTTC.TGC	TATCGCTTTT
	251				300
<i>L.salivarius</i>	AGATGGACCC	GCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
CTC2166	AGATGGACCC	GCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
CTC2183	AGATGGACCC	GCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
CTC2197 ^{R1}	AGATGGACCC	GCGGCGTATT	AACTAGTTGG	TGGGGTAACG	GCCTACCAAG
	301				350
<i>L.salivarius</i>	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
CTC2166	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
CTC2183	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
CTC2197 ^{R1}	GTGATGATAC	GTAGCCGAAC	TGAGAGGTTG	ATCGGCCACA	TTGGGACTGA
	351				400
<i>L.salivarius</i>	GACACGGCCC	NAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
CTC2166	GACACGGCCC	AAACTCCTAC	GGGAGGCAGC	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT
CTC2183	GACACGGCCC	AAATC~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	GACACGGCCC	AAACTC~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	401				450
<i>L.salivarius</i>	GGACGCAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAGTGAAGAA	GGTCTTCGGA
CTC2166	GGACGCAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAGTGAAGAA	GGTCTTCGGA
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	451				500
<i>L. salivarius</i>	TCGTAAAAC	CNGTTGTTAG	AGAAGAACTC	GAGTGAGAGT	AACTGTTTCAT
CTC2166	TCGTAAAAC	CTGTTGTTAG	AGAAGAACAC	GAGTGAGAGT	AACTGTTTCAT
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	501				550
<i>L. salivarius</i>	TCGATGACGG	TATCTAACCA	GCAAGTCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
CTC2166	TCGATGACGG	TATCTAACCA	GCAAGTCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	551				600
<i>L. salivarius</i>	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
CTC2166	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	601				650
<i>L. salivarius</i>	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTTAACCG
CTC2166	GGAACGCAGG	CGGTCTTTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTTAACCG
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	651				700
<i>L. salivarius</i>	GAGTAGTGCA	TTGGAAACTG	GAAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAGAGTGGA
CTC2166	GAGTAGTGCA	TTGGAAACTG	GAAGACTTGA	GTG~~~~~	~~~~~
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	701				750
<i>L. salivarius</i>	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAT	ATATGGAAGA	ACACCAGTGG
CTC2166	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2183	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CTC2197 ^{R1}	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

Figura 3.9-Perfils de RAPD de diversos lactobacils d'origen intestinal amb l'encebador OPK8.



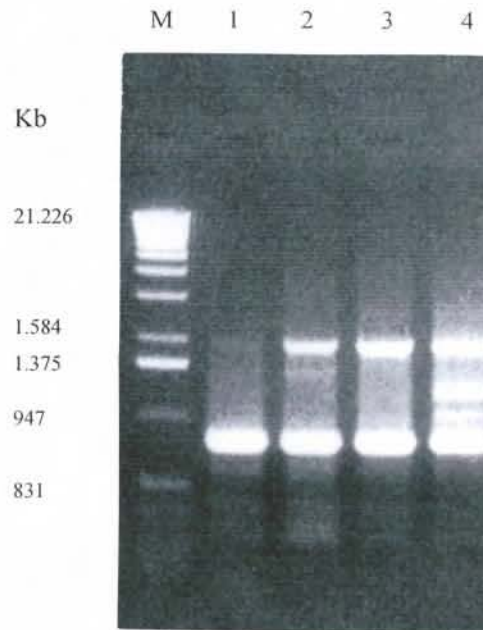
Llegenda: M: BioSizerTm III (angewandte Gentechnologie Systeme) com a marcador, 1 a 11: *L. salivarius* CTC2049, CTC2049^{R1}, CTC2112, CTC2166, CTC2166^{R1}, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197, CTC2197^{R1}, CTC2244.

Figura 3.10- Perfils de RAPD de diversos lactobacils d'origen intestinal amb l'encebador OPK18.



Llegenda: M: BioSizer[™] III (angewandte Gentechnologie Systeme) com a marcador,
1 a 11: *L. salivarius* CTC2049, CTC2049^{R1}, CTC2112, CTC2166, CTC2166^{R1},
 CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197, CTC2197^{R1}, CTC2244.

Figura 3.11-Perfils de RAPD de diversos lactobacils d'origen intestinal amb l'encebador OPZ15.



Llegenda: M: BioSizer[™] III (angewandte Gentechnologie Systeme) com a marcador, 1 a 4: *L.salivarius* CTC2166, CTC2183, CTC2197, CTC2197^{R1}.

3.7-CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTAGONISTA DE LES SOQUES SELECCIONADES

Per ampliar l'estudi sobre l'espectre d'inhibició de les 8 soques seleccionades, inhibidores d'*E.coli* CTC1028 i *S.enteritidis* CTC1026, es va assajar l'activitat antagonista amb el mètode de la gota en agar enfront *Salmonella typhimurium* CTC1037, *S.typhimurium* CTC1038, *S.enteritidis* CTC1039, *S.enteritidis* CTC1040, *S.enteritidis* CTC1041, *Campylobacter jejuni* CTC1042 i *C.jejuni* CTC1043. En tots els casos les soques van demostrar capacitat per produir zones d'inhibició superiors als 5 mm enfront les 7 soques indicadores.

Per determinar si la substància responsable de l'activitat inhibidora era excretada al sobrenedant, aquesta es va assajar amb el mètode de la difusió en pou enfront *E.coli* CTC1028 i *S enteritidis* CTC1026. Quan els sobrenedants van ser pasteuritzats, totes les soques assajades van seguir mantenint la seva capacitat inhibidora. Quan a més de ser pasteuritzats van ser neutralitzats a pH 6'5, tots ells van perdre l'activitat inhibidora enfront les dues soques indicadores. L'addició de catalasa al sobrenedant, a una concentració final de 0'5 mg/ml, no va afectar en res la seva capacitat inhibidora.

Alguns dels resultats obtinguts amb la soca CTC2197 es poden veure a les figures 3.12 i 3.13.

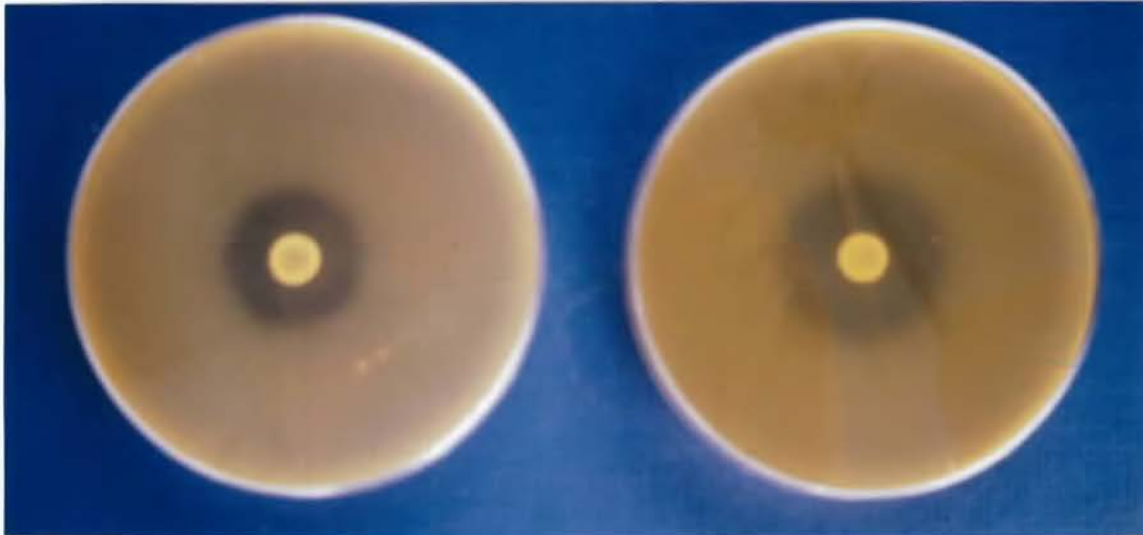
3.8-HIDROFOBICITAT, AGREGACIÓ I COAGREGACIÓ CEL·LULAR

3.8.1-Hidrofobicitat

S'han descrit correlacions entre l'adherència dels bacteris als hidrocarburs i la seva adhesió a altres superfícies, incloent les cèl·lules epitelials. D'aquesta manera la capacitat d'adherir-se als hidrocarburs proporciona un mètode senzill per mesurar la hidrofobicitat o capacitat d'establir interaccions hidrofòbiques de les superfícies cel·lulars amb altres superfícies.

Les 8 soques estudiades van presentar un elevat percentatge d'hidrofobicitat que va coincidir amb la seva capacitat adhesiva segons la prova de Fuller (3.2). Així mateix es van afegir com a control positiu la soca *L.gasseri* 2459 (cedida per la Dra. C. Barbés. Universitat de Oviedo) de provada capacitat hidrofòbica (Boris, 1997) i com a control negatiu la soca *L.sakei* CTC494.

Figura 3.12- Assaig de l'activitat antagonista, amb el mètode de la gota en agar, de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 enfront *Escherichia coli* CTC1028 (A) i *Salmonella enteritidis* CTC1026 (B).



A

B

Figura 3.13- Assaig de l'activitat antagonista, mitjançant la difusió en pou del sobrenedant, de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 enfront *Salmonella enteritidis* CTC1026.



Sobrenedant no neutralitzat

Sobrenedant neutralitzat

<i>L.salivarius</i> CTC2049	92'96%	<i>L.salivarius</i> CTC2197	94'97%
<i>L.salivarius</i> CTC2112	93'70%	<i>L.salivarius</i> CTC2231	90'38%
<i>L.salivarius</i> CTC2166	90'44%	<i>L.salivarius</i> CTC2244	87'15%
<i>L.salivarius</i> CTC2176	93'81%	<i>L.sakei</i> CTC494	0%
<i>L.salivarius</i> CTC2183	88'76%	<i>L.gasseri</i> 2459	93'70%

3.8.2-Agregació cel·lular

L'agregació cel·lular és la capacitat que tenen les cèl·lules bacterianes per interaccionar entre sí. La prova d'agregació ens permet saber no només si les soques tenen aquesta propietat, sinó també el temps que triguen en manifestar-la quan es troben en contacte en un medi líquid. Totes les soques assajades van presentar capacitat d'agregar-se entre si i a més d'una forma ràpida, ja que amb 15 minuts es va poder observar la presència de partícules al fons del tub i un sobrenedant perfectament clar. Només la soca CTC2049 va trigar 60 minuts en presentar el mateix aspecte, indicant que l'agregació entre les seves cèl·lules havia tingut lloc d'una forma més lenta.

La soca *L.salivarius* CTC2197 va ser seleccionada per estudiar la naturalesa de la substància responsable de l'agregació perquè es tractava d'una de les dues soques autoagregants que va presentar un major índex d'adhesió bacteriana i la que va mostrar un major percentatge d'hidrofobicitat.

Quan els diferents tractaments (proteïnasa K, metaperiodat, tripsina, lipasa i calor) es van aplicar en el sobrenedant, la capacitat agregant de la soca no es va veure alterada en cap dels casos, de manera que no es va poder determinar la naturalesa del factor promotor de l'agregació excretat al sobrenedant.

Quan les cèl·lules van ser tractades amb proteïnasa K i metaperiodat, *L.salivarius* CTC2197 va perdre la seva capacitat d'agregació. La tripsina, la lipasa i l'exposició a 100°C no van tenir cap efecte en la capacitat agregant de la cèl·lula. Aquests resultats indicaven que la substància de la superfície cel·lular responsable de l'agregació era un factor de naturalesa glicoproteica.

3.8.3-Coagregació cel·lular

La coagregació cel·lular és la capacitat que tenen les cèl·lules bacterianes de dues soques determinades per interaccionar entre sí. Els percentatges de coagregació

calculats segons Handley i col. (1987) van oscil·lar entre 1'2 i 14'4, tal i com es pot veure a la taula 3.4.

Totes les soques assajades van ser capaces d'interaccionar amb alguna de les altres, però no se'n va trobar cap que fos capaç de coagregar amb totes elles. La soca que va presentar un menor nombre de coagregacions va ser la CTC2244 que només ho va fer amb dues soques. Per altra banda n'hi van haver dues capaces de coagregar amb tres de les soques assajades, la CTC2112 i la CTC2176, i tres que van poder coagregar amb quatre de diferents, la CTC2166, CTC2183 i CTC2231. Les soques que van presentar un major nombre d'aparellaments van ser la CTC2049 i la CTC2197 que van tenir capacitat per coagregar amb cinc de les soques assajades.

De les cinc soques que van presentar un major nombre d'aparellaments es va assajar la seva capacitat de coagregació amb *Salmonella enteritidis* CTC1026. Les soques CTC2183 i CTC2197 van donar resultats positius mentre que les soques CTC2049, CTC2166 i CTC2231 no van ser capaces de coagregar amb el patògen.

La bona capacitat de coagregació, tant amb altres lactobacils com amb *Salmonella*, l'elevat percentatge d'hidrofobicitat i la bona capacitat d'adhesió, així com l'ampli espectre antagonista i la resistència a les condicions intestinals, van determinar la selecció de les soques *L.salivarius* CTC2183 i *L.salivarius* CTC2197 per a ser utilitzades com a probiòtics en els posteriors assaigs *in vivo*.

3.9-GEN RESPONSABLE DE L'ADHESIÓ

Els dos encebadors All3 i All 4 es van utilitzar per amplificar a través de PCR el fragment del gen de l'adhesió de *L.gasseri* 4B2. clonat en el plàsmid pUC18, en una soca d'*Escherichia coli*, a través de PCR. Després d'assajar diverses temperatures d'hibridació (46, 50, 52 i 54°C) es va determinar que la màxima especificitat s'obtenia a una temperatura d'hibridació de 50-52°C, en què l'amplificació del plàsmid donava una única banda corresponent al fragment de 630 parells de bases esperat.

Un cop fixades les condicions, aquestes es van aplicar per amplificar l'ADN de *L.salivarius* CTC2049, CTC2166, CTC2183, CTC2197 i CTC2197^{R1}. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 3.14. Es va poder observar la presència de diverses bandes, inclosa una de 500 parells de bases en les soques *L.salivarius* CTC2049, CTC2166, CTC2197 i CTC2197^{R1}.

Taula 3.4-Coagregació cel·lular entre les diferents soques de *Lactobacillus salivarius* seleccionades.

CTC	2049	2112	2166	2176	2183	2197	2231	2244
2049	- / 0	+ / 1'7	+ / 5'7	- / 0	+ / 14'4	+ / 3'1	- / 0	+ / 3'3
2112		- / 0	- / 0	- / 0	- / 0	+ / 1'9	+ / 1'5	- / 0
2166			- / 0	+ / 6'1	- / 0	- / 0	+ / 4'4	+ / 11'2
2176				- / 0	+ / 1'2	+ / 2'6	- / 0	- / 0
2183					- / 0	+ / 1'9	+ / 5'6	- / 0
2197						- / 0	+ / 3'9	- / 0
2231							- / 0	- / 0
2244								- / 0

Els símbols + i - indiquen l'apreciació visual.

Els nombres indiquen el percentatge.

Figura 3.14-Amplificació del gen responsable de l'adhesió de *Lactobacillus gasseri* 4B2 clonat en el plàsmid pUC18 i de l'ADN de *Lactobacillus salivarius* CTC2049, CTC2166, CTC2183, CTC2197 i CTC2197^{R1} amb els encebadors All3 i All4.



Llegenda: **M:** marcador, **1 a 5:** *L.salivarius* CTC2049, CTC2166, CTC2183, CTC2197, CTC2197^{R1}, **6 a 8:** plàsmid pUC18.

3.10-RESISTÈNCIA A LA RIFAMPICINA

3.10.1-Presència de lactobacils resistents a la rifampicina en la microbiota natural dels pollets

Per comprovar que la presència de soques resistents a la rifampicina és una propietat poc comú entre els lactobacils de la microbiota dels pollastres, es van estudiar 10 pollets d'entre 5 i 21 dies d'edat procedents de tres orígens diferents. A partir dels cecs d'aquests animals es va fer el recompte de lactobacils en agar Rogosa i de lactobacils resistents a la rifampicina en agar Rogosa-rif. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.5.

La població de lactobacils als cecs dels animals estudiats va oscil·lar entre 10^5 i 10^9 ufc/g. El nombre de lactobacils resistents a la rifampicina va estar per sota del nivell de detecció ($<10^2$ ufc/g), indicant la possibilitat d'utilitzar la resistència a l'antibiòtic com una propietat per contraseleccionar les soques probiòtiques de la resta de població indígena en els assaigs *in vivo*.

3.10.2-Selecció de soques resistents a la rifampicina

Es va determinar la presència de població resistent a la rifampicina en les dues soques seleccionades per als posteriors assaigs *in vivo*, *L.salivarius* CTC2183 i *L.salivarius* CTC2197.

Amb aquest objectiu es va fer el recompte d'un cultiu de nit de cada soca en MRS en presència i absència de l'antibiòtic. Per a la soca *L.salivarius* CTC2183 es va observar que en un cultiu de $1'26 \times 10^{10}$ ufc/ml, $1'54 \times 10^2$ ufc/ml eren resistents a la rifampicina. En el cas de la soca *L.salivarius* CTC2197, de $8'33 \times 10^9$ ufc/ml hi havia $7'54 \times 10^2$ ufc/ml resistents a l'antibiòtic. Es van seleccionar 2 colònies per a cada una d'elles anomenades amb els superíndex R1 i R2.

El perfil plasmídic de les 4 colònies aïllades es va comparar amb el de les dues soques mares i els resultats obtinguts es poden veure a la figura 3.15. Es va observar que tant CTC2183^{R1} com CTC2183^{R2} i CTC2197^{R1} presentaven el mateix perfil que la soca mare respectiva. En el cas de la soca CTC2197^{R2} s'observà la pèrdua d'un plàsmid. Davant aquests resultats es van seleccionar les soques CTC2183^{R1} i CTC2197^{R1} per als posteriors assaigs.

Per comprovar si tota la població de les noves soques seleccionades era resistent a l'antibiòtic, es va fer el recompte d'un cultiu de nit de cadascuna en agar Rogosa en presència i absència de rifampicina. En els dos casos els recomptes es van mantenir

Taula 3.5-Recompte de lactobacils intestinals en pollets de 5-21 dies.

Mostra	Bacteris làctics	Bacteris làctics Rif ^R
1	5'08	< 2
2	8'19	< 2
3	9'32	< 2
4	8'32	< 2
5	7'12	< 2
6	7'60	< 2
7	6'94	< 2
8	6'54	< 2
9	7'00	< 2
10	6'92	< 2

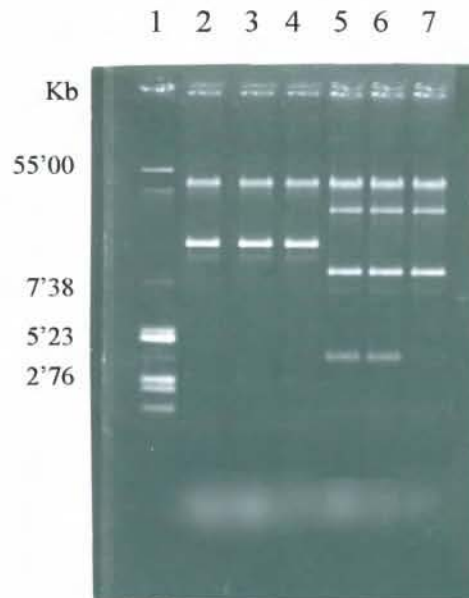
Els resultats estan expressats en log ufc/g de contingut cecal.

Taula 3.6-Recompte de *Lactobacillus salivarius* resistents a la rifampicina després de subcultius en absència d'antibiòtic.

Nº de subcultius en MRS	CTC2183 ^{R1}	CTC2197 ^{R1}
0	9'15	8'60
3	8'89	8'45
7	8'80	8'57
10	9'27	8'57

Els resultats estan expressats en log ufc/ml.

Figura 3.15-Perfil plasmídic de les soques *Lactobacillus salivarius* CTC2183 i *Lactobacillus salivarius* CTC2197 i els clons resistents a la rifampicina.



Llegenda: 1: *Escherichia coli* V517 (Macrina i col., 1978) com a marcador, 2: *L.salivarius* CTC2183, 3: *L.salivarius* CTC2183^{R1}, 4: *L.salivarius* CTC2183^{R2}, 5: *L.salivarius* CTC2197, 6: *L.salivarius* CTC2197^{R1}, 7: *L.salivarius* CTC2197^{R2}.

similars, 1×10^9 ufc/ml per a la soca CTC2183^{R1} i 4×10^8 ufc/ml per a la CTC2197^{R1}, mostrant que totes les cèl·lules d'un cultiu de nit mantenien la resistència a la rifampicina.

3.10.3-Manteniment de la resistència a la rifampicina

Per comprovar si les soques làctiques conservaven la resistència a la rifampicina en absència de pressió selectiva, es van fer créixer fins a un total de 10 subcultius successius en brou MRS sense l'antibiòtic. A intervals regulars es van fer recomptes dels cultius de nit en MRS-rif. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.6.

Es va poder observar com les dues soques mantenien un recompte estable de la població resistent a l'antibiòtic, després de 10 subcultius successius en medi de cultiu lliure de rifampicina.

3.10.4-Manteniment de les propietats antagonistes, d'agregació i de coagregació de les soques resistents a la rifampicina

Amb el mètode de la gota en agar (2.5.3) es va recomprovar la capacitat de *L.salivarius* CTC2183^{R1} i *L.salivarius* CTC2197^{R1} per inhibir el creixement dels patògens *Escherichia coli* CTC1028 i *Salmonella enteritidis* CTC1026. Ambdues soques van demostrar capacitat per produir zones d'inhibició superiors als 5 mm, de la mateixa manera que les soques làctiques originàries.

L'assaig de Reniero i col. (1992) (2.8.3) va permetre estudiar si les soques seleccionades mantenien la capacitat d'agregació de les originàries. Ambdues soques van presentar capacitat d'agregar-se entre sí i d'una forma ràpida, ja que amb 15 minuts es va poder observar la presència de partícules al fons del tub i un sobrenedant perfectament clar.

També es va estudiar la seva capacitat de coagregació amb el test de Vandevoorde i col. (1992) (2.8.4). El percentatge de coagregació segons l'equació de Handley i col. (1987) va ser de 1'68, indicant que mantenien la capacitat d'interaccionar entre sí de les soques originàries (1'90%). Així mateix es va poder observar que ambdues eren capaces de coagregar amb *Salmonella enteritidis* CTC1026 (0'17% i 2'42% per a *L.salivarius* CTC2183^{R1} i CTC2197^{R1}, respectivament).

3.11-CONSERVACIÓ DE LACTOBACILS AL LLARG DEL TEMPS

3.11.1-Supervivència d'un cultiu liofilitzat

Es van liofilitzar 4 cultius de nit de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}, que es van mantenir a 4°C, i periòdicament se'n va fer un recompte per estudiar la seva supervivència al llarg del temps.

Els cultius liofilitzats van presentar un recompte mitjà inicial de $6'03 \times 10^9$ ufc/g. La viabilitat va disminuir fins a $7'59 \times 10^8$ ufc/g als 7 mesos, $9'56 \times 10^7$ ufc/g als 10 mesos i $7'59 \times 10^7$ ufc/g als 12 mesos, de manera que, després d'un any a 4°C, es va perdre una mitjana de 1'9 logaritmes de cèl·lules viables per gram de liofilitzat, o el que és el mateix un 98'74% de viabilitat.

3.11.2-Supervivència d'un cultiu congelat

Per estudiar la supervivència a la congelació es van utilitzar 2 cultius de nit de *L.salivarius* CTC2197^{R1}. Un dels cultius es va resuspendre, per duplicat, amb MRS i un 20% de glicerol i l'altre, també per duplicat, amb llet descremada 10% i glucosa 7'5%, i es van congelar a -40°C. Periòdicament es van fer recomptes de la soca per estudiar la seva supervivència al llarg del temps. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.7.

Els resultats indiquen que l'efectivitat dels dos sistemes de congelació va ser força semblant. En els dos cultius que es van mantenir a -40°C amb llet descremada i glucosa, es va observar una pèrdua de viabilitat d'aproximadament 1'5 logaritmes en un any i mig. La pèrdua mitja va ser lleugerament inferior quan els cultius es van congelar en MRS i glicerol.

La principal diferència entre els 2 mètodes de conservació es va observar durant el primer mes. Els cultius en MRS i glicerol van mantenir la població constant durant aquest període, i posteriorment va anar disminuint gradualment al llarg del temps. En el cas dels cultius conservats en llet i glucosa, la pèrdua més important de població va tenir lloc durant el primer mes de congelació, ja que el nombre de cèl·lules viables per ml es va reduir en 1 logaritme.

Taula 3.7-Recompte dels cultius congelats (-40°C) de *L.salivarius* CTC2197^{R1} al llarg del temps.

Temps (mesos)	Cultiu 1		Cultiu 2	
	llet + glucosa	MRS + glicerol	llet + glucosa	MRS + glicerol
0	8'63	9'05	8'20	7'55
1	7'93	9'05	7'10	7'64
2	nd	nd	7'11	7'32
18	7'22	7'30	6'58	7'21
Pèrdua viabilitat	1'41	1'75	1'62	0'34

Els resultats estan expressats en log ufc/ml i són la mitjana de 2 rèpliques.

nd-no determinat.

Taula 3.8-Supervivència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en pinso emmagatzemat a 30°C.

Temps (hores)	Forma d'inoculació del cultiu	<i>L.salivarius</i> CTC2197 ^{R1} (ufc/g)		
		0	Líquid	5'11
	Liofilitzat	5'78	6'39	8'08
6	Líquid	4'47	5'42	7'98
	Liofilitzat	3'38	5'86	6'90
24	Líquid	2'00	2'30	5'83
	Liofilitzat	4'21	3'80	4'25
Pèrdua viabilitat	Líquid	3'11	4'30	2'75
	Liofilitzat	1'57	2'59	3'83

Els resultats estan expressats en log ufc/g de pinso i són la mitjana de 2 rèpliques.

3.12-INCLUSIÓ DELS LACTOBACILS EN EL PINSO

3.12.1-Resistència bacteriana al procés de granulació del pinso

El pinso que s'administra a l'aviram es comercialitza en forma de farina o bé en forma granulada. Durant el procés de granulació, que dura uns 20 minuts, la farina és sotmesa a una temperatura d'aproximadament 80°C. Si es vol utilitzar el pinso com a vehicle de subministrament de la soca probiòtica, cal veure si aquesta és capaç de resistir el procés de granulació.

Per això un cultiu de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} ($3,9 \times 10^8$ ufc/ml), es va barrejar amb farina de pinso a l'1% (10^6 ufc/g de pinso) i es va sotmetre a continuació al procés de granulació.

A través del posterior recompte en agar Rogosa es van recuperar menys de 10^2 ufc de *L.salivarius* CTC2197^{R1}/g de pinso granulad, quatre ordres de magnitud inferior al que s'esperava.

Veient que la soca no era capaç de resistir suficientment el procés de granulació, els estudis posteriors es van dur a terme afegint la soca al pinso ja granulad.

3.12.2-Supervivència en el pinso a 30°C

La possibilitat d'utilitzar el pinso per administrar la soca probiòtica als pollets, implica la necessitat d'estudiar la seva capacitat de sobreviure en aquest medi a les temperatures d'incubació utilitzades en la cria. Durant les primeres setmanes de vida dels animals, les incubadores es mantenen al voltant dels 30°C, i cal assegurar la supervivència de la soca a aquesta temperatura un mínim de 24 hores, que és la periodicitat amb què es repon el pinso dels animals.

Per estudiar la seva viabilitat, la soca probiòtica es va inocular en pinso a partir d'un cultiu líquid i un cultiu liofilitzat. Es van provar diverses concentracions inicials (10^5 , 10^6 i 10^8 ufc/g de pinso) de la soca làctica i es va comprovar la seva supervivència després de 6 i 24 hores a 30°C. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.8.

Partint del cultiu líquid, la major supervivència es va aconseguir quan la soca probiòtica s'havia inocular a nivells de 10^8 ufc/g de pinso, amb una pèrdua mitjana de població de 2,75 logaritmes en 24 hores. En els altres casos la pèrdua de cèl·lules viables per gram es va situar en nivells superiors als 3 logaritmes.

Pel que fa al cultiu liofilitzat de *L.salivarius* CTC2197^{R1}, es va observar que després de 24 hores a 30°C, el recompte disminuïa en 1,7 log.

Quan es va inocular en pinso el cultiu liofilitzat de *L.salivarius* CTC2197^{R1}, els resultats van ser diversos segons la concentració bacteriana inicial, de manera que es va apreciar un augment en la pèrdua de viabilitat (1'57, 2'59 i 3'83 de mitjana) a mesura que augmentava l'inòcul (10^5 , 10^6 i 10^8 ufc/g, respectivament).

Si es comparen els resultats obtinguts en inocular els dos tipus de cultiu en pinso es pot veure com, a les concentracions inicials més baixes de la soca probiòtica (10^5 i 10^6 ufc/g), la pèrdua de viabilitat partint d'un cultiu líquid va ser lleugerament superior a la obtinguda amb el cultiu liofilitzat, aproximadament 1'6 logaritmes. Per contra, a la concentració més elevada de la soca làctica (10^8 ufc/g), va ser el cultiu liofilitzat el que va experimentar una major pèrdua de cèl·lules viables per gram de pinso.

3.12.3-Supervivència en el pinso a temperatura ambient

3.12.3.1-Diferències en la viabilitat d'un cultiu líquid i liofilitzat

Si es vol utilitzar el pinso com a medi per administrar la soca probiòtica als pollets cal assegurar, no només que aquesta és capaç de resistir a curt termini la temperatura de les incubadores, sinó també la dels llocs d'emmagatzematge, que solen trobar-se a temperatura ambient.

Es va fer un estudi previ per determinar si s'observaven diferències en la viabilitat d'un cultiu líquid i un cultiu liofilitzat en pinso després de diversos dies a temperatura ambient. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.9.

Es va poder observar com, a aquesta temperatura, la viabilitat del cultiu va ser independent de si s'havia inoculat en la seva forma líquida o en pols liofilitzada, podent-se utilitzar, *a priori*, qualsevol dels dos. Per qüestions de comoditat en la manipulació es va decidir fer els posteriors assaigs amb el cultiu en la seva forma liofilitzada i conservada a 4°C.

3.12.3.2-Supervivència d'un cultiu liofilitzat en pinso acidificat

Per administrar la soca làctica als pollets a través del pinso, cal assegurar la seva supervivència a mig termini en presència dels productes acidificants inclosos normalment pels fabricants, i a temperatura ambient que és la temperatura a la que s'emmagatzemen.

Es va avaluar la supervivència a temperatura ambient d'un cultiu liofilitzat de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en 7 pinsos als que s'havien addicionat diversos productes acidificants. La pèrdua de viabilitat va ser molt homogènia, de manera que no es van

Taula 3.9-Supervivència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en pinso emmagatzemat a temperatura ambient.

Temps (dies)	Forma d'inoculació del cultiu	
	Líquid	Liofilitzat
0	7'54	6'65
2	7'76	4'62
3	6'72	4'15
6	5'57	3'71
7	5'00	4'06
Pèrdua viabilitat	2'54	2'59

Els resultats estan expressats en log ufc/g de pinso.

observar diferències substancials entre el pinso control (pinso 1) i els pinsos acidificats provats. La reducció més important es va produir durant els 3 primers dies en què hi va haver una davallada mitjana de 3'34 logaritmes. En els següents 8 dies la disminució mitja del nombre de viables per gram de pinso va ser de 0'74 logaritmes, arribant a una pèrdua total de 4'08 logaritmes de mitjana en 12 dies. Als 30 dies la supervivència va ser nul·la en tots els casos, obtenint-se recomptes inferiors a 10^2 ufc/g de pinso.

Paral·lelament es va comparar la supervivència d'un cultiu liofilitzat pur a temperatura ambient i refrigerat a 4°C per comprovar si, les pèrdues de viabilitat, eren degudes a l'efecte de la temperatura o a la presència d'alguna substància inhibidora en el pinso. Quan el cultiu es va mantenir a temperatura ambient es van obtenir resultats força semblants als obtinguts en pinso, arribant-se a una pèrdua total de població de 4'49 logaritmes als 12 dies. En canvi, quan el liofilitzat es va conservar a 4°C la població es va mantenir estable després de 12 dies: $7'76 \times 10^9$ ufc/g al principi i $5'37 \times 10^9$ ufc/g al final.

3.12.3.3-Millora de la viabilitat de la soca probiòtica en pinso

Els resultats obtinguts fins al moment mostraven que la supervivència de la soca probiòtica en pinso acidificat a temperatura ambient i a mig termini, era pobre. En un intent de millorar la seva viabilitat, es van seleccionar aquelles colònies que eren capaces de sobreviure un temps determinat en pinso i s'hi van reinocular repetides vegades. Amb això es pretenia sotmetre aquests organismes a una situació d'estrès per seleccionar, posteriorment, aquells clons que haguessin estat capaços de desenvolupar mecanismes de supervivència.

Com que no s'havien observat diferències en la viabilitat de la soca en els diferents pinsos acidificats provats, es va decidir triar-ne un a l'atzar per dur a terme els estudis de millora de la viabilitat. El pinso seleccionat fou el número 7.

Després de comprovar pel perfil plasmídic, que totes les colònies recuperades del pinso emmagatzemat 3 dies corresponien a la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}, aquestes es van reinocular de nou en pinso fins a 3 vegades consecutives i es va fer un seguiment de la seva viabilitat en el pinso al llarg del temps.

Quan la soca probiòtica s'havia inoculat inicialment en pinso 7, s'havia observat que en els 3 primers dies el recompte s'havia reduït en 2'98 logaritmes. Després de 2 reinòculs consecutius es va aconseguir un increment en la supervivència de la soca, que va

presentar una pèrdua de viabilitat de 2'46 logaritmes després de 7 dies. Les reinoculacions posteriors no van aconseguir millors resultats.

Aquests resultats indiquen la possibilitat de millorar la viabilitat de la soca probiòtica, de manera que es puguin seleccionar clons que mostrin una major capacitat de sobreviure en el pinso a temperatura ambient.

3.13-ASSAIGS *IN VIVO*

3.13.1-Pre-assaig

Per determinar si les dues soques seleccionades *in vitro* per les seves característiques adients com a potencials probiòtics, *L.salivarius* CTC2183^{R1} i *L. salivarius* CTC2197^{R1}, eren capaces de colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets *in vivo*, es va dur a terme un pre-assaig amb un reduït nombre d'animals. Els resultats obtinguts en el pre-assaig es mostren a la taula 3.10.

Es va poder observar que la presència de lactobacils resistents a la rifampicina va ser significativament més important als cecs (10^8 ufc/g) on la població va ser, de mitjana, 2'54 logaritmes superior a la del pap (10^5 ufc/g) ($P<0'001$). A les 41 hores no es van apreciar diferències significatives entre la població de làctiques a les 2 zones degut a l'elevada desviació típica de les dades del pap.

En el tram final del tracte gastrointestinal la població es va mantenir força constant al llarg del temps. En el pap hi va haver un lleuger augment de la microbiota, que no va ser significatiu, de 1'51 logaritmes a les 86 hores de la inoculació dels animals.

A través del perfil plasmídic de les diferents colònies resistents a la rifampicina aïllades de cada una de les mostres, es va fer un seguiment de les 2 soques administrades als pollets. D'aquesta manera es va poder calcular en quin percentatge va ser capaç, cada una d'elles, de colonitzar el tracte gastrointestinal dels animals.

Al principi de l'assaig, la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} es va mostrar dominant a les dues zones mostrejades. En els temps intermedis la colonització va ser més igualada. En el cas dels cecs es va arribar a una colonització del 50% per a cada una de les dues soques a les 41 hores. En el pap, les dues soques es van mostrar alternativament dominants a les 22 i 41 hores. Al final de l'assaig, la soca CTC2197^{R1} es va tornar a mostrar com la més competitiva en les dues zones estudiades, especialment en el pap on va acabar desplaçant totalment a la soca *L.salivarius* CTC2183^{R1}.

Taula 3.10-Recompte de *L.salivarius* CTC2183^{RI} i CTC2197^{RI} en pap i cecs dels pollets del pre-assaig *in vivo*.

Temps (hores)	Pap			Cecs			Nivell de significació
	log ufc/g	CTC2183 ^{RI} (%)	CTC2197 ^{RI} (%)	log ufc/g	CTC2183 ^{RI} (%)	CTC2197 ^{RI} (%)	
15	5'16 ± 0'08	0	100	7'84 ± 0'24	25	75	**
22	5'57 ± 0'10	75	25	7'50 ± 0'14	25	75	**
41	5'94 ± 0'72	25	75	8'50 ± 0'24	50	50	NS
65	4'76 ± 0'82	0	100	8'92 ± 0'10	0	100	*
86	6'67 ± 0'55	0	100	8'05 ± 0'31	17	83	*
Mitjana	5'62 ± 0'66	20	80	8'16 ± 0'50	23'4	76'6	***

Els resultats estan expressats com a mitjana (log ufc/g) ± desviació típica i són la mitjana de 2 rèpliques.

Significació de les diferències entre els recomptes de pap i cecs dins del mateix temps de mostreig: ***, (P<0'001); **, (P<0'01); *, (P<0'05); NS, no significatiu.

Davant les evidències de la major capacitat de colonització de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}, aquesta es va escollir per als posteriors assaigs *in vivo* en pollets en condicions de cria de granja (21 dies).

3.13.2-Primer assaig

3.13.2.1-Recompte de lactobacils

El recompte de lactobacils obtingut en el primer assaig *in vivo* es mostra a la taula 3.11. El recompte dels lactobacils totals només es va fer en els cecs dels animals que no havien rebut la soca probiòtica, tractaments A i B. La població de lactobacils entre aquests animals es va situar al voltant de 10^8 - 10^9 ufc/g de cec, sense que es trobessin diferències significatives als 14 dies. Als 21 dies els animals inoculats amb *S.enteritidis* C-114 (tractament B) van presentar una reducció ($P<0'001$) en el recompte de lactobacils, que va ser significativament menor ($P<0'05$) que l'obtingut en els animals control, no inoculats amb cap soca, en aquest mateix temps.

El recompte de lactobacils resistents a la rifampicina es va fer en tots els tractaments per tal de determinar-ne la població en els animals que havien rebut *L.salivarius* CTC2197^{R1} (tractaments C i D) i assegurar-ne l'absència en els animals control (tractaments A i B). Entre els pollets que no van rebre la soca probiòtica aquest recompte va ser, en els dos temps estudiats, inferior a 10^2 ufc/g i significativament diferent ($P<0'05$) al dels animals inoculats en el primer dia de vida amb ella, on va arribar a nivells de 10^6 ufc/g tant als 14 com als 21 dies. En cap cas no es van detectar diferències significatives entre els dos temps de mostreig dins de cada tractament.

3.13.2.2-Estudi dels perfils plasmídics

A través de la comparació dels perfils plasmídics es va constatar que les colònies resistents a la rifampicina que s'havien recuperat dels cecs dels animals tractats (C i D) corresponien a la soca inoculada *L.salivarius* CTC2197^{R1}.

3.13.2.3-Infeció per *Salmonella*

Pel que fa a la presència de *Salmonella enteritidis* C-114, els animals que van ser inoculats amb el patògen van mostrar un grau de colonització als 14 dies d'entre el 90%, en els casos en què no es va administrar la soca probiòtica (tractament B), i del 100%, en els casos en què sí (tractament D). Respecte als dos grups que no van ser inoculats

Taula 3.11-Recompte de lactobacils i lactobacils resistents a la rifampicina (Rif^R) en el cec i percentatge de pollets colonitzats amb *Salmonella* en el primer assaig *in vivo*.

	Dies després de la inoculació	Control (A)	Inoculació <i>S. enteritidis</i> C-114 (B)	Inoculació <i>L. salivarius</i> CTC2197 ^{R1} (C)	Inoculació <i>L. salivarius</i> CTC2197 ^{R1} i <i>S. enteritidis</i> C-114 (D)
Lactobacils	14	8'76±0'28 ^a	9'04±0'12 ^a	nd	nd
	21	8'60±0'12 ^a	7'76±0'24 ^b	nd	nd
	Significació #	NS	***	-	-
Lactobacils Rif ^R	14	< 2'00±0'00 ^b	2'21±0'31 ^b	6'75±0'72 ^a	6'29±0'74 ^a
	21	< 2'00±0'00 ^b	< 2'00±0'00 ^b	6'10±0'71 ^a	6'15±0'54 ^a
	Significació #	NS	NS	NS	NS
% animals colonitzats per <i>Salmonella</i>	14	0	90	50	100
	21	0	70	0	0

Els resultats estan expressats com a mitjana (log ufc/g) ± desviació típica i són la mitjana de 4 rèpliques.

^{a-b} Les mitjanes dins d'una mateixa fila amb superíndex diferents difereixen significativament (P<0'05).

Significació de les diferències entre les mitjanes de 14 i 21 dies dins de cada tractament (columna): ***, (P<0'001); NS, no significatiu.

nd- no determinat

amb *Salmonella*, els pollets del tractament A es van veure lliures del patògen mentre que en el tractament C hi va haver un 50% dels animals que el van presentar.

Al final de l'assaig, als 21 dies, la presència del patògen va ser nul·la en tots els grups, excepte entre els animals del tractament B en què hi va haver un 70% de positius per *Salmonella*.

3.13.3-Segon assaig

Es va dur a terme un segon assaig on es van repetir els tractaments B', C' i D' per tal de disposar d'una repetició del primer assaig.

3.13.3.1-Recompte de lactobacils

El recompte de lactobacils obtingut en el segon assaig *in vivo* es mostra a la taula 3.12.

En tots els animals estudiats es va fer el recompte tant de lactobacils totals com de lactobacils resistents a la rifampicina. D'aquesta manera s'esperava conèixer el grau de colonització de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} en els animals tractats (tractaments C' i D'), i corroborar-ne la seva absència en els controls (tractament B').

Pel que fa als nivells de població total de lactobacils, en tots els animals tractats amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} es van apreciar diferències significatives ($P < 0'05$ en el tractament C' i $P < 0'01$ en el tractament D') entre els dos temps de mostreig, de manera que es va notar un lleuger augment en la població al final de l'assaig, que va passar de nivells de 10^6 ufc/g als 14 dies a nivells de 10^7 - 10^8 ufc/g als 21 dies. Entre els animals del tractament B' el recompte de lactobacils totals es va mantenir estable durant tot l'assaig a nivells de 10^8 ufc/g de cec.

Als 14 dies la presència de lactobacils totals va ser significativament ($P < 0'05$) superior entre els animals del tractament B', que no van rebre la soca probiòtica, que entre els pollets que sí van ser inoculats. Als 21 dies l'augment de població observat entre els animals tractats amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} i inoculats amb *Salmonella* (tractament D') va fer desaparèixer aquestes diferències amb els del tractament B'.

Pel que fa a la presència de microbiota làctica resistent a la rifampicina, aquesta només es va detectar entre els pollets que van ser inoculats amb la soca probiòtica, on la població es va mantenir estable al llarg de tot l'assaig, situant-se a nivells de 10^5 - 10^6 ufc/g. Entre els animals que no van ser inoculats amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} (tractament B') els recomptes van ser inferiors a 10^2 ufc/g.

Taula 3.12- Recompte de lactobacils i lactobacils resistents a la rifampicina en el cec i percentatge de pollets colonitzats amb *Salmonella* en el segon assaig *in vivo*.

	Dies després de la inoculació	Inoculació <i>S. enteritidis</i> C-114 (B')	Inoculació <i>L. salivarius</i> CTC2197 ^{R1} (C')	Inoculació <i>L. salivarius</i> CTC2197 ^{R1} i <i>S. enteritidis</i> C-114 (D')
Lactobacils	14	8'54±0'29 ^a	6'00±1'31 ^b	6'62±0'51 ^b
	21	8'90±0'31 ^a	7'81±0'32 ^b	8'36±0'82 ^{a,b}
	Significació #	NS	*	**
Lactobacils Rif ^R	14	< 2'00±0'00 ^b	4'18±1'23 ^a	5'51±1'11 ^a
	21	< 2'00±0'00 ^b	5'64±1'56 ^a	6'25±1'02 ^a
	Significació #	NS	NS	NS
% animals colonitzats per <i>Salmonella</i>	14	100	0	100
	21	100	0	0

Els resultats estan expressats com a mitjana (log ufc/g) ± desviació típica i són la mitjana de 6 rèpliques.

^{a-b} Les mitjanes dins d'una mateixa fila amb superíndex diferents difereixen significativament (P<0'05).

Significació de les diferències entre les mitjanes de 14 i 21 dies dins de cada tractament (columna): *, (P<0'05); **, (P<0'01); NS, no significatiu.

nd- no determinat

3.13.3.2-Estudi dels perfils plasmídics

L'estudi del perfil plasmídic de les colònies resistents a l'antibiòtic aïllades entre els animals dels tractaments C' i D' als 14 i 21 dies, va confirmar que es tractava de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} en la totalitat dels casos. El perfil plasmídic de les soques aïllades als 14 dies es pot veure a la figura 3.16.

Segons aquests resultats, *L.salivarius* CTC2197^{R1} era la soca dominant entre la població de bacteris làctics resistents a la rifampicina aïllada durant tot l'assaig. Si es comparen els recomptes en presència i absència de l'antibiòtic (taula 3.12), les soques resistents a la rifampicina representen un petit percentatge de la població total de bacteris làctics al final de l'assaig, de manera que ens trobaríem davant un nivell de colonització molt baix per part de la soca probiòtica.

Hi hauria la possibilitat que *L.salivarius* CTC2197^{R1} hagués perdut *in vivo* la resistència a la rifampicina, de manera que no pogués ser detectada per contraselecció en Rog-rif i, per tant, els recomptes així obtinguts no fossin els reals.

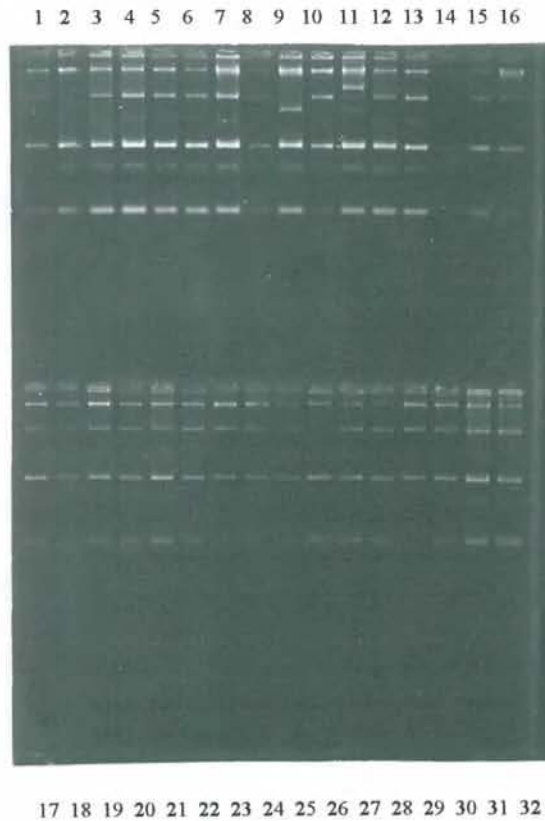
Per esbrinar-ho es van seleccionar totes les colònies aïllades en plaques d'agar Rogosa de 3 mostres diferents del tractament C' al final de l'assaig. Aquestes colònies es van sembrar simultàniament en plaques d'agar Rogosa i Rogosa-rif per calcular quin percentatge era resistent a l'antibiòtic. Segons aquests resultats, un 20% de les colònies eren resistents.

Paral·lelament es va estudiar el perfil plasmídic d'aquestes mateixes colònies i es va veure que el 43'8% corresponia a la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1}. Aquests resultats van demostrar que, efectivament, *in vivo* i als 21 dies d'haver sigut administrada, es produïa una pèrdua de la resistència que es traduïa en una aparent disminució dels nivells de colonització de la soca probiòtica, al no poder ser recuperada per contraselecció en les plaques de Rog-rif.

3.13.3.3-Colonització per *Salmonella*

Pel que fa a la presència del patògen es va poder observar que, als 14 dies, només els animals que van ser inoculats el primer dia de vida amb *S.enteritidis* C-114 van ser colonitzats en el 100% dels casos. Al final de l'assaig no es van detectar animals amb *Salmonella* entre tots els animals (tractaments C' i D') que havien rebut la soca probiòtica.

Figura 3.16-Perfil plasmídic dels lactobacils resistents a la rifampicina aïllats a partir dels pollets dels tractaments C' (inoculats únicament amb *L.salivarius* CTC2197^{R1}) i D' (inoculats amb *L.salivarius* CTC2197^{R1} i *S.enteritidis* C-114) als 14 dies en el segon assaig *in vivo*.



Llegenda: 1: *L.salivarius* CTC2197^{R1}, 2 a 16: soques aïllades a partir de pollets del tractament C', 17: *L.salivarius* CTC2197^{R1}, 18 a 32: soques aïllades a partir de pollets del tractament D'

3.13.4-Tercer assaig

Es va estudiar quina era la dosi mínima de la soca probiòtica que calia administrar a través del pinso als pollets per aconseguir la colonització del seu tracte gastrointestinal. Es van assajar tres concentracions diferents de *L.salivarius* CTC2197^{R1} (10^5 , 10^7 i 10^8 ufc/g de pinso) que es van administrar durant el primer dia de vida a través del pinso i a continuació es va determinar la seva presència en els cecs dels animals. En aquest cas es van utilitzar els clons de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} que s'havien recuperat a partir d'un segon reinòcul en pinso (3.12.3.3) i que havien mostrat una major capacitat de sobreviure-hi.

3.13.4.1-Recompte de lactobacils

El recompte de lactobacils del tercer assaig es mostra a la taula 3.13.

No es van observar diferències significatives en el nivell de colonització aconseguït pels lactobacils totals en els animals dels 3 tractaments (E, F i G), en cap dels temps estudiats. Als 7 i 21 dies els recomptes de lactobacils dels animals tractats van ser significativament inferiors ($P < 0.05$) als del grup control, excepte entre els del tractament E als 7 dies. En els altres temps estudiats aquesta davallada no va ser significativa.

L'evolució de la microbiota làctica al llarg del temps va mostrar una disminució significativa en el recompte de lactobacils totals tant en els animals control ($P < 0.001$) com en els dels tractaments E (inòcul de 10^5 ufc/g) ($P < 0.05$) i F (inòcul de 10^7 ufc/g) ($P < 0.01$). Només els pollets del tractament G (inòcul de 10^8 ufc/g) no van mostrar diferències significatives en la presència de lactobacils totals als cecs.

En general no es van observar diferències significatives en el recompte de microbiota resistent a la rifampicina dels 3 tractaments assajats, excepte als 21 dies en què la població del tractament G (inòcul de 10^8 ufc/g) va ser significativament inferior ($P < 0.05$) a la del tractament E (inòcul de 10^5 ufc/g).

La comparació dels animals tractats amb els controls va mostrar diferències significatives ($P < 0.05$) en tots els temps assajats, excepte als 28 dies en què el tractament E (inòcul de 10^5 ufc/g) no va ser significativament diferent.

La microbiota resistent a la rifampicina va disminuir significativament ($P < 0.05$) al llarg del temps en els animals dels tractaments E (inòcul de 10^5 ufc/g) i F (inòcul de 10^7 ufc/g), mentre que es va mantenir estable en els tractaments control ($< 10^2$ ufc/g) i G (inòcul de 10^8 ufc/g).

Taula 3.13-Recompte de lactobacilis i lactobacilis resistent a la rifampicina en el cec dels animals del tercer assaig *in vivo*.

	Tractament	Inòcul <i>L. salivarius</i> CTC2197 ^{R1} en pinso (ufc/g)	Temps (dies)				Significació#
			7	14	21	28	
Lactobacilis totals	T	0	8 ³⁰ ± 0 ⁵⁹ ^a	8 ⁵⁴ ± 0 ²⁹ ^a	8 ⁹⁰ ± 0 ³¹ ^a	6 ⁶⁹ ± 0 ⁴⁵ ^a	***
	E	10 ⁵	7 ⁵⁵ ± 0 ⁸⁶ ^{a,b}	7 ⁹⁵ ± 0 ⁸² ^a	6 ⁷⁸ ± 1 ¹⁸ ^b	6 ¹² ± 0 ⁷² ^a	*
	F	10 ⁷	7 ⁴⁷ ± 0 ⁵⁰ ^b	7 ⁴³ ± 1 ⁵³ ^a	6 ²⁹ ± 1 ¹⁶ ^b	5 ⁶⁷ ± 1 ⁰⁰ ^a	**
	G	10 ⁸	6 ⁷⁵ ± 1 ²⁹ ^b	8 ¹⁹ ± 0 ⁷⁸ ^a	6 ³³ ± 0 ⁷² ^b	5 ⁷⁷ ± 1 ²⁸ ^a	NS
Lactobacilis Rif ^R	T	0	2 ⁰⁰ ± 0 ⁰⁰ ^b	2 ⁰⁰ ± 0 ⁰⁰ ^b	2 ⁰⁰ ± 0 ⁰⁰ ^c	2 ⁰⁰ ± 0 ⁰⁰ ^b	NS
	E	10 ⁵	5 ⁷¹ ± 1 ¹⁶ ^a	6 ⁷⁶ ± 0 ⁸⁹ ^a	5 ⁸⁸ ± 1 ¹⁹ ^a	3 ⁵⁷ ± 1 ⁵⁸ ^{a,b}	*
	F	10 ⁷	5 ⁸⁵ ± 1 ²⁴ ^a	6 ⁴⁹ ± 1 ⁴⁸ ^a	5 ⁶⁶ ± 1 ⁶⁹ ^{a,b}	3 ⁷¹ ± 1 ⁵⁵ ^a	*
	G	10 ⁸	5 ⁴⁹ ± 1 ²² ^a	7 ⁹⁵ ± 1 ⁰⁵ ^a	3 ⁹⁵ ± 1 ⁰⁰ ^b	3 ⁹² ± 1 ⁵⁰ ^a	NS

Els resultats estan expressats en mitjana (log ufc/g) ± desviació típica i són la mitjana de 6 rèpliques.

Significació de les diferències entre els recomptes de temps 7 i 28 dins de cada tractament (fila): ***, (P<0'001); **, (P<0'01); *, (P<0'05); NS, no significatiu.

^{a-i} Les mitjanes dins d'una mateixa columna amb superíndex diferent difereixen significativament (P<0'05).

3.13.4.2-Estudi dels perfils plasmídics

L'estudi del perfil plasmídic de les colònies resistents a la rifampicina va revelar que es tractava de la soca *L.salivarius* CTC2197^{R1} en la totalitat dels casos.

4-DISCUSSION

El coneixement de les propietats probiòtiques dels bacteris làctics adicionats als aliments és molt antic, ja l'any 76 a.C., l'historiador romà Plini defensava l'ús de llet fermentada en el tractament de varies formes patològiques d'infeccions gastrointestinals (Bottazzi, 1983). La primera explicació científica dels efectes beneficiosos dels bacteris làctics fou proposada per Metchnikoff el 1907. Segons aquest autor, el consum de grans quantitats de iogurt que contingués *Lactobacillus* spp. suposaria l'eliminació de bacteris productors de toxines, que es troben presents a l'intestí, donant com a resultat un retard en l'envelliment i un augment de la salut i de l'esperança de vida. Aquesta va ésser la primera vegada que es va proposar que la manipulació de la microbiota gastrointestinal estava connectada amb la salut.

En el camp de la nutrició animal, Nurmi i Rantala (1973) van ser els primers en veure que l'administració de la microbiota nativa de pollastres adults sans a pollets també era útil per reduir el nombre d'animals colonitzats per *Salmonella*. Però aquesta microbiota nativa no es pot utilitzar de forma indiscriminada ja que se'n desconeix la composició exacta i, per tant, no es pot assegurar que estigui lliure de microorganismes no desitjables. A més els cultius indefinits no són aptes per ser comercialitzats ja que es podrien convertir en un focus de propagació de patògens entre els organismes sans. Per això és necessari desenvolupar cultius definits innocus i de composició coneguda que puguin actuar com a probiòtics amb igual o major eficàcia.

Els bacteris làctics només són capaços d'adherir-se i colonitzar el tracte gastrointestinal de l'espècie animal a partir de la qual han sigut aïllats (Tannock i col., 1982). Aquesta especificitat respecte a l'hoste implica que les soques que es vulguin seleccionar per a ser utilitzades com a probiòtics en una espècie animal determinada s'hauran d'aïllar del tracte gastrointestinal d'aquests mateixos animals, ja que d'altra manera no serien capaces de colonitzar-ne l'intestí.

Com que l'objectiu final d'aquest treball era provar la capacitat probiòtica dels bacteris làctics en aus, es van aïllar 296 soques a partir del pap o el contingut intestinal de 50 pollets de diversos orígens. D'aquesta manera es va assegurar una àmplia representació dels lactobacils que formen part de la microbiota natural d'aquests animals. El pap es va seleccionar per a l'aïllament de bacteris làctics perquè la seva microbiota, formada principalment per lactobacils (Sarra i col., 1992), proporciona una barrera efectiva contra la colonització per patògens.

Les soques que es vulguin utilitzar com a probiòtics han de complir amb una sèrie de característiques i propietats entre les que destaca la capacitat d'inhibir el creixement de bacteris patògens com *Salmonella*, *Escherichia coli* i *Campylobacter jejuni*. No es coneix exactament el mètode d'actuació dels probiòtics però sembla ser que, *in vivo*, actuen a través d'una combinació de mecanismes entre els que caldria destacar la competició amb els patògens pels receptors d'adhesió, la producció de substàncies antibacterianes i l'estimulació de la microbiota indígena en detriment dels bacteris patògens.

Un percentatge força important (65'2%) dels lactobacils aïllats en aquest treball van ser capaços d'inhibir *in vitro* el creixement dels dos patògens estudiats, però de les 193 soques que van actuar enfront *Salmonella* i *Escherichia coli*, no totes ho van fer amb la mateixa intensitat. Això va permetre escollir per als estudis posteriors les 77 soques, un 26% de la població total, que van ser capaces d'inhibir el creixement dels dos patògens amb la màxima intensitat, suggerint *a priori* que es tractava de bones candidates per exercir aquesta acció *in vivo* a l'intestí dels pollets.

L'adhesió a les cèl·lules epitelials del tracte gastrointestinal, principalment a les cèl·lules epitelials del pap que és la font o reservori principal de lactobacils en les aus, és una altra de les característiques desitjables per a un probiòtic, tot i que les propietats adhesives no són un caràcter universal dels lactobacils (Chauvière i col., 1992). Aquesta propietat permet assegurar que encara que els lactobacils creixin a poc a poc, quedin immobilitzats a la paret i no siguin arrastrats pel flux de la peristalsi (Fuller, 1992). No obstant, la capacitat d'un bacteri per adherir-se a les cèl·lules epitelials no és garantia suficient de que sigui capaç de colonitzar la superfície intestinal. Altres factors com els requeriments nutricionals i la resistència a la pressió física i química poden jugar un paper crucial en la colonització bacteriana (Rosenberg i col., 1981). Alguns autors consideren que si el bacteri té un temps de generació curt no fa falta que s'adhereixi a la superfície epitelial ja que la velocitat de reproducció és superior a la velocitat amb què són eliminats pels moviments peristàltics (Vanbelle i col., 1990; Fuller, 1992). Rada i col. (1995) van observar que *L.salivarius* 51R era capaç de colonitzar el tracte intestinal de pollets d'un dia, malgrat que l'adhesió *in vitro* d'aquesta soca a les cèl·lules epitelials fou negligible. La colonització fou efectiva fins als 6 dies de vida dels animals, però en l'estudi no es va determinar quin era el seu comportament després d'un període més llarg de temps i no se sap si aquesta colonització persistiria després de varies setmanes.

És molt important començar a administrar els probiòtics quan els animals acaben de néixer ja que encara no tenen una microbiota gastrointestinal ben adaptada i el perill d'infecció és molt elevat, però aquesta administració s'ha de fer de forma continuada per assegurar que la colonització dels microorganismes es manté durant varies setmanes, si pot ser fins que són duts a l'escorxador per al seu sacrifici, per mantenir-los lliures de patògens fins al darrer moment. Qualsevol contaminació externa dels animals vius quan són joves pot portar a problemes de contaminació en el processament de les carcasses (Miles i Butcher, 1993).

En aquest estudi l'adhesió va ser el segon criteri que es va tenir en compte a l'hora de seleccionar els millors candidats com a probiòtics. Més de la meitat (54'5%) dels lactobacils seleccionats en base a la seva capacitat d'inhibir els dos patògens no van mostrar adhesió a les cèl·lules epitelials del pap. De les soques que sí ho van fer es van escollir les 14 que es van adherir amb major intensitat, 12 que ho van fer a raó de més de 30 bacteris/cèl·lula epitelial i 2 que es van adherir en un nombre superior als 70 bacteris/cèl·lula epitelial. La seguretat que les soques seleccionades presentaran una bona capacitat d'adhesió ha de donar majors garanties de la seva capacitat probiòtica *in vivo*.

No es coneixen totalment els mecanismes pels quals els lactobacils s'adhereixen a les cèl·lules epitelials gastrointestinals, però sembla ser que aquesta adhesió està mediada de forma no específica per factors físico-químics, com les interaccions electrostàtiques o hidrofòbiques, o de forma específica per molècules superficials adhesives situades al bacteri i molècules receptores situades a l'epiteli (Holzapfel i col., 1998).

Diversos autors han observat una correlació entre la hidrofobicitat de la superfície bacteriana i la capacitat d'adhesió a altres estructures (Wadstrom i col., 1987; Puzova i col., 1994) així com amb la capacitat autoagregant (Kmet i Luchini, 1997). En aquest estudi la hidrofobicitat es va mesurar en base a la capacitat dels bacteris per adherir-se als hidrocarburs (Rosenberg i col., 1980), ja que es tracta d'un mètode senzill que ofereix resultats quantitius en poc temps. Amb aquesta tècnica, totes les soques seleccionades en base a les seves propietats adhesives van mostrar també un elevat percentatge d'hidrofobicitat, que va oscil·lar entre el 87'15% de *L.salivarius* CTC2244 i el 94'97% de *L.salivarius* CTC2197. *L.gasseri* 2459 (Boris, 1997), d'origen humà, es va utilitzar com a control positiu mentre que *L.sakei* CTC494, d'origen càrnic es va utilitzar com a control negatiu. Correlacions semblants entre la capacitat d'adherir-se a cèl·lules animals i la hidrofobicitat superficial s'han descrit amb la utilització d'altres

tècniques (Van Oss, 1978; Smyth i col., 1978; Tylewska i col., 1979). Això suggereix la possibilitat d'utilitzar la mesura de la hidrofobicitat com un indicador de la capacitat adhesiva dels bacteris estudiats, malgrat que en alguns estudis s'han detectat soques que, a pesar de manifestar propietats hidrofíliques, s'han mostrat adhesives, suggerint que els mecanismes involucrats en el procés d'adhesió són múltiples (Del Re i col., 1998).

Així mateix es va observar que les soques que mostraven una bona capacitat d'adhesió a les cèl·lules epitelials del pap segons el test de Fuller (1973) també van ser capaces d'agregar-se ràpidament segons el mètode de Reniero i col. (1992). En canvi, les que no van mostrar adherència tampoc van ser capaces d'agregar-se entre sí (dades no mostrades). Pérez i col., (1998) van observar que a *Bifidobacterium bifidum* i a *Bi.suis* BSu 895 l'agregació estava relacionada amb la presència d'adhesivitat cel·lular. Això demostra que l'assaig d'agregació pot ser tant bon indicador de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules bacterianes com el test de Fuller. Tenint en compte que el test d'adhesió és més lent, laboriós i agressiu per als animals, ja que n'implica el sacrifici per obtenir cèl·lules epitelials de pap, es pot considerar l'assaig d'agregació segons Reniero i col. (1992) com una excel·lent alternativa. Aquestes observacions suggereixen que, probablement, els mecanismes implicats en els dos processos estan relacionats.

Observant les imatges obtingudes amb el microscopi electrònic es va poder veure que els bacteris havien establert estructures per unir-se tant els uns als altres com a les cèl·lules epitelials, mostrant l'estreta relació existent entre la capacitat d'agregar-se entre sí i adherir-se a altres superfícies. Les cèl·lules van presentar un elevat nombre de fibres de lligament de les que es desconeix la composició, els mecanismes pels quals s'estimula la seva síntesi així com el mecanisme d'actuació.

Normalment la superfície hidrofòbica d'una soca implica la presència de material proteic o glicoproteic a la superfície cel·lular, mentre que en les superfícies hidrofíliques és habitual la presència de polisacàrids (Pelletier i col., 1997). En aquest estudi es va observar que l'agregació era deguda a la presència en superfície d'un factor de naturalesa glicoproteica, ja que aquesta capacitat es va perdre quan les cèl·lules es van tractar amb proteïnasa K, que afecta a les proteïnes, i amb metaperiodat, que afecta als carbohidrats, corroborant l'habitual relació entre la hidrofobicitat de la superfície cel·lular i la capacitat d'agregació.

L'especificitat observada en l'adhesió dels lactobacils a les cèl·lules epitelials s'atribueix a les unions específiques que s'estableixen entre les lectines, situades a la superfície bacteriana o epitelial, i els carbohidrats de les glicoproteïnes o glicolípidis de la

superfície bacteriana o cel·lular (Tannock, 1990; McGroarty, 1993). La presència d'una estructura superficial de naturalesa glicoproteica en *L.salivarius* CTC2197 fa pensar que aquesta soca podria seguir un mecanisme semblant al descrit en la seva adhesió a les cèl·lules epitelials de pollastre, ja que s'ha detectat la presència de lectines en la capa mucosa de l'intestí de pollastre (Beyer i Barondes, 1982). Mukai i Arihara (1994) van detectar la presència de glicoproteïnes a la superfície de *L.acidophilus* JCM1132^T que actuaven com a receptors de les lectines de l'epiteli intestinal de pollastre. Aquest model d'adhesió podria explicar el mecanisme d'especificitat que mostren alguns lactobacils per un determinat hoste, ja que la distribució de glicoproteïnes fou diferent per a totes les soques de *L.acidophilus* estudiades.

En aquest sentit caldria fer estudis complementaris per, en primer lloc, confirmar per electroforesis la presència de glicoproteïnes a la superfície de *L.salivarius* CTC2197 i, posteriorment, determinar la seva capacitat per interaccionar amb les lectines de la superfície epitelial de l'intestí del pollastre.

S'han descrit diversos casos de soques bacterianes que secreten al medi factors inductors, de naturalesa peptídica, capaços de promoure la capacitat agregant al actuar com a proteïna pont. Aquest és el cas de *L.gasseri* 4B2 que secreta una proteïna de 32 KDa (Reniero i col., 1992), *Enterococcus faecalis* que secreta petits pèptids hidrofòbics anomenats feromones (Mori i col., 1985, 1986; Ehrenfeld i col., 1986) i *L.gasseri* 2459 que secreta un pèptid hidrofílic de 2 KDa (Boris i col., 1997).

En aquest estudi es va determinar la capacitat del sobrenedant de la soca CTC2197 per induir aquesta propietat en altres soques que s'havien mostrat com a no agregants, ja que s'ha observat que una soca pot sintetitzar un factor promotor de l'agregació amb capacitat per induir l'agregació en unes soques determinades però no en altres del mateix gènere o espècie (Reniero i col., 1992; Boris i col., 1997). Les soques CTC2015, CTC2038 i de forma més dèbil la CTC2048 i CTC2154, van ser capaces de manifestar propietats agregants quan es va afegir el sobrenedant de la soca CTC2197. Aquests resultats van suggerir que possiblement *L.salivarius* CTC2197 era capaç d'alliberar al medi algun factor promotor de l'agregació que podia induir la capacitat agregant en algunes soques. En altres, o bé el factor no era capaç d'exercir el mateix efecte o bé aquestes no disposaven del receptors adequats.

Continuant amb l'estudi de la capacitat d'adhesió i agregació de *L.salivarius*, es va buscar una possible homologia entre el material genètic de la soca CTC2197 i el gen responsable del factor promotor de l'agregació de *L.gasseri* 4B2, clonat en el plàsmid

pUC18 en una soca d'*E.coli*. A més d'altres soques d'origen intestinal que havien mostrat una bona capacitat adhesiva i agregant, en l'estudi es va incloure la soca resistent a la rifampicina *L.salivarius* CTC2197^{R1} que es va utilitzar en els posteriors assaigs *in vivo*. Els dos encebadors dissenyats en base a la seqüència del gen de *L.gasseri* 4B2, All3 i All4, van permetre l'amplificació d'un fragment de 630 parells de bases en el plàsmid pUC18. Una banda d'aproximadament 500 parells de bases es va poder observar en les soques *L.salivarius* CTC2049, CTC2166, CTC2197 i CTC2197^{R1}, indicant que els responsables de l'adhesió en aquestes soques podrien estar relacionats amb els de la soca *L.gasseri* 4B2. L'absència d'aquesta banda en la soca *L.salivarius* CTC2183, indicaria la intervenció d'uns mecanismes d'adhesió diferents. Malgrat que aquesta banda no va presentar el mateix tamany que el fragment clonat en el plàsmid pUC18, podria tractar-se d'un gen homòleg i les diferències ser degudes a la presència d'insercions o delecions en un gen o altre. La possible homologia amb el gen de l'adhesió de *L.gasseri* 4B2 s'hauria de confirmar per seqüenciació del fragment amplificat.

Per tal que les soques seleccionades puguin expressar, *in vivo*, la seva capacitat d'inhibir els patògens i adherir-se a les cèl·lules epitelials, cal que siguin capaces d'arribar i persistir al tracte intestinal on hauran d'exercir la seva funció. Això vol dir que han de ser resistents a un seguit de condicions extremes que trobaran en aquest ambient com són la presència dels enzims de la boca, principalment la lisozima, dels enzims digestius i dels àcids biliars, el pH gàstric... (Wolter i Henry, 1988; Raibaud i Raynaud, 1989).

L'origen intestinal dels bacteris utilitzats en aquest estudi va fer pensar que es tractaria d'organismes resistents a totes aquestes condicions, però l'anàlisi de les 14 soques adherents i antagonistes, havia de permetre comprovar que això era així i seleccionar aquelles que presentessin una major resistència.

Totes les soques estudiades van mostrar una marcada resistència a la lisozima, ja que la lisi de les cèl·lules en la seva fase estacionària per obtenir ADN va ser molt problemàtica, situació semblant a la que va descriure Marmur (1961) en intentar lisar lactobacils a través dels mètodes clàssics que inclouen l'ús d'aquest enzim. Per solventar aquesta dificultat els cultius es van haver de lisar quan les cèl·lules es trobaven en l'inici de la seva fase exponencial, etapa del creixement en què les cèl·lules són més sensibles a l'actuació d'agents físics i químics adversos com la lisozima.

Així mateix es va veure que eren resistents a un ambient àcid de pH 3 i a la presència d'un 4% de sals biliars, quantitat superior a la que van detectar Rada i col. (1995)

segons els quals el creixement de *L.salivarius* 51R era inhibit en presència d'un 0'5% de bilis. Sembla ser que hi ha una extrema variabilitat en la resistència a les sals biliars (Bateup i col., 1995; Chateau i col., 1994) indicant que aquesta està més relacionada amb l'origen de les soques que amb l'espècie (Canganella i col., 1996). Aquesta elevada resistència no va ser compartida per la soca CTC2233 que va ser sensible tant a l'àcid com a les sals biliars, fet que va portar a descartar-la com a possible probiòtic i a eliminar-la dels estudis posteriors.

Els antibiòtics són substàncies no selectives, que afecten tant als bacteris patògens com als no patògens, que són utilitzats com a agents terapèutics en pollastres per tractar les malalties infeccioses. És en aquestes situacions quan és més important i necessària l'actuació dels probiòtics per estimular la presència de la microbiota natural en detriment dels bacteris patògens. Per això és preferible utilitzar com a tals bacteris que, *in vitro*, presentin resistència als antibiòtics més utilitzats en les explotacions avícoles.

En general les soques d'aquest estudi es van mostrar resistents a l'àcid nalidixic, l'eritromicina, l'estreptomina i el cloramfenicol però sensibles a l'ampicilina que, de fet, és poc utilitzada en aus com a tractament terapèutic. El nivell de resistència a alguns antibiòtics com l'estreptomina (1 mg/ml) i l'eritromicina (8 µg/ml), va ser molt superior al que van trobar Rada i col. (1991) per a lactobacils aïllats de pollastre que eren resistents a 0'01 mg/ml d'estreptomina i sensibles a l'eritromicina. Caldria fer estudis complementaris per assegurar que aquesta resistència ve codificada pel cromosoma i no per algun plàsmid que, en el cas de subministrar aquestes soques com a probiòtics, pogués ser transmès *in vivo* a bacteris patògens amb el consegüent risc de desenvolupament de bacteris resistents.

Els ionòfors, com la monensina, s'utilitzen àmpliament en la indústria avícola perquè són excel·lents coccidiostàtics i permeten controlar la presència de paràsits com els coccidis. Però per altra banda també són capaços d'inhibir el creixement dels bacteris Gram positius, i per tant dels bacteris làctics, ja que dissipen els gradients transmembrana de cations i protons i interfereixen en els seus sistemes de transport primari i en la síntesi d'ATP (Pressman i Fahim, 1982). La seva àmplia utilització en la cria d'aus fa que sigui important determinar-ne la resistència de les soques que es vulguin seleccionar com a probiòtics. Els resultats obtinguts van diferir àmpliament segons si aquestes s'havien fet créixer en un medi de cultiu com el MRS o en un medi natural com el pinso. Així quan les soques van créixer en MRS, ja fos líquid o sòlid, la concentració mínima inhibidora (CMI) va oscil·lar entre 1 µg/ml i un màxim de 2 µg/ml

per a la CTC2183. Aquests resultats van coincidir amb els obtinguts per Marounek i Rada (1995) amb tres soques de *L.salivarius* aïllades de pollets i van entrar dins el rang de valors trobats per Dutta i Devriese (1984), segons els quals el nivell de susceptibilitat dels lactobacils de pollastre a la monensina variava de 0'25 a 8 µg/ml.

Quan es va comprovar el seu nivell de resistència utilitzant pinso com a medi de cultiu es va observar que va augmentar, permetent el creixement de les dues soques assajades en aquestes condicions (CTC2183 i CTC2197) en presència de fins a 9 µg/ml del coccidiostàtic, fenomen que també van observar Marounek i Rada (1995) per a tres soques de *L.salivarius*. Aquestes diferències en la susceptibilitat dels lactobacils a la monensina es podrien explicar per la pèrdua del glicocàlix que té lloc quan són cultivats en un medi de laboratori, ja que aquesta estructura és sintetitzada principalment en un ambient natural en presència de partícules sòlides (Costerton i col., 1981). Aquest glicocàlix protegeix a la cèl·lula dels agents antimicrobians, de manera que la CMI obtinguda al laboratori en medi líquid no es pot extrapolar al que realment té lloc *in vivo* (Marounek i Rada, 1995).

El fet que les dues soques provades es mostressin capaces de créixer en pinso obria la possibilitat d'administrar aquests cultius probiòtics a través del pinso en els posteriors assaigs *in vivo*.

Les proves bioquímiques que es van dur a terme per caracteritzar i identificar les 13 soques seleccionades van indicar que totes elles pertanyien a l'espècie *L.salivarius* que és l'espècie predominant entre els lactobacils del pap de pollastre (Sarra i col., 1985 a i b). Es tracta de bacils que medeixen 0'6-0'9 x 1'5-5 µm i que es troben sols o formant cadenes de longitud variable. El seu contingut en guanina i citosina (G+C) oscil·la entre el 34 i el 36% (Rogosa i col., 1953). Pel que fa al seu metabolisme, *L.salivarius* es caracteritza per créixer bé a 45°C però no a 15°C ja que pertany a l'antic subgènere dels *Thermobacterium*, això explica que aquesta espècie es trobi àmpliament representada dins de la microbiota natural dels pollastres que tenen una temperatura corporal d'aproximadament 42°C.

Es tracta d'una espècie homofermentadora estricta, és a dir, que només produeix àcid làctic a partir de la fermentació de la glucosa. Per això en cap de les soques estudiades es va detectar la producció de CO₂. Aquest anàlisi es va realitzar substituint el citrat amònic del MRS per sulfat amònic ja que s'ha vist que alguns lactobacils

homofermentadors poden produir gas a partir del citrat en presència de glucosa (Gasser, 1964).

L.salivarius també es caracteritza per produir principalment l'isòmer L de l'àcid làctic i només quantitats inferiors al 10% de l'isòmer D, en el cas de que en produeixi. Només tres de les soques assajades van produir petites quantitats de l'isòmer D, en tots els casos inferiors al 10% de la quantitat total.

Pel que fa al patró de fermentació de carbohidrats, 12 de les 13 soques estudiades van seguir el patró característic de *L.salivarius*, és a dir, van ser capaces de fermentar la glucosa, el manitol, la manosa, el sorbitol i la trehalosa però no van fermentar ni la celobiosa ni la ribosa. A més, 12 d'aquestes soques no van ser capaces de desaminar l'arginina, una altra de les característiques que poden ajudar a identificar una soca com a *L.salivarius*. Les úniques diferències es van trobar en les soques CTC2166, que a diferència de les altres va ser capaç d'hidrolitzar l'arginina i produir amoníac, i CTC2183 que no va ser capaç de fermentar ni el sorbitol ni la trehalosa.

Malgrat aquesta diferència, la soca CTC2166 va ser provisionalment identificada com a *L.salivarius* ja que no hi ha cap altra espècie de bacteri làctic homofermentador estricte amb el mateix perfil de fermentació de sucres, productor únicament de l'isòmer L de l'àcid làctic, que no sigui capaç de créixer a 15 °C i que a més hidrolitzi l'arginina. Això va fer pensar que encara que aquest darrer caràcter no s'ajustés a l'esperat, la soca es podia identificar com a *L. salivarius*.

Pel que fa a la soca CTC2183 la identificació va ser més difícil ja que segons les característiques d'homofermentadora estricte, productora de l'isòmer L de l'àcid làctic i incapacitat de créixer a 15°C i hidrolitzar l'arginina es podia tractar de tres espècies diferents: *L.animalis*, *L.ruminis* o *L.salivarius*. En principi es podia descartar que es tractés de *L.ruminis* ja que aquesta espècie no sol créixer bé a 45°C i no es troba formant part de la microbiota natural dels pollets. Per determinar si es tractava de *L.animalis* o *L.salivarius*, ambdues capaces de créixer a 45°C i presents al tracte digestiu dels pollets, es va observar el seu patró de fermentació de carbohidrats. Això no va permetre donar un diagnòstic definitiu ja que va presentar algunes característiques pròpies de *L.animalis* (fermentació de manosa i no fermentació de trehalosa) i d'altres pròpies de *L.salivarius* (fermentació de manitol i no fermentació de celobiosa). Tenint en compte que l'origen d'aquesta soca era el pap es va decidir classificar-la provisionalment com a *L.salivarius*, ja que s'ha vist que aquesta és l'espècie predominant entre les del pap de pollastre (Sarra i col., 1985a i b).

No obstant, es van dur a terme proves complementàries que permetessin adscriure les soques CTC2166 i CTC2183 a l'espècie *L.salivarius*.

L.salivarius presenta dues subespècies que es diferencien entre si per la capacitat d'hidrolitzar l'esculina i la salicina. *L.salivarius* subsp. *salicinius* és capaç d'hidrolitzar-les totes dues i es troba a la cavitat bucal i al tracte gastrointestinal dels humans. *L.salivarius* subsp. *salivarius* no n'hidrolitza cap i es troba a la cavitat bucal i el tracte gastrointestinal dels pollastres. Les característiques bioquímiques i l'origen de les soques estudiades va permetre identificar-les com a *L.salivarius* subsp. *salivarius*.

Ja s'ha descrit àmpliament en la bibliografia que el patró de fermentació de sucres no es pot considerar determinant per arribar a una identificació fins al nivell d'espècie, degut a la gran variació que s'hi observa (Schillinger i Lücke, 1987; Montel i col., 1989). Les tècniques moleculars havien de permetre confirmar la classificació feta en base a les característiques bioquímiques i identificar les dues soques que van presentar dubtes, CTC2166 i CTC2183.

La determinació del perfil plasmídic permet distingir entre soques d'una mateixa espècie. Els plàsmids són elements genètics extracromosòmics que generalment es troben lliures al citoplasma. Estan formats per una molècula d'ADN circular de doble cadena de petit tamany, que pot anar des de 1 Kb fins a varies centenes de Kb. Els plàsmids que tenen un elevat nombre de còpies estan dotats d'un complexa sistema de replicació independent del cromosòmic (Novel, 1994). Tot i la presumible inestabilitat dels plàsmids, el perfil plasmídic d'una soca, excepte algunes variacions mínimes, en general és prou estable com per permetre caracteritzar-la i ser utilitzat com un important element per determinar-ne la identitat (Davies i col., 1981).

La presència de plàsmids en el gènere *Lactobacillus* fou demostrada per Chassy i col. (1976). El perfil plasmídic varia segons les espècies i les soques. Moltes soques no incorporen cap plàsmid en el seu genoma, mentre que d'altres en poden portar de 1 a 4 i a vegades fins i tot 6. Segons Hugas (1993) la presència de plàsmids és molt extesa entre els lactobacils aïllats de productes carnis fermentats, on el 93'3% de les soques estudiades van presentar plàsmids, amb una mitja de 2 o 3 per soca, i una distribució àmplia de tamany, des de 1'8 Kb fins a 82'3 Kb. La presència d'elements extracromosomals també s'ha detectat en espècies originàries del tracte gastrointestinal humà i animal com *L.acidophilus* (Klaenhammer i Sutherland, 1980).

Totes les soques que es van analitzar en aquest estudi van presentar algun plàsmid formant part del seu genoma, amb un mínim de 2 a la soca CTC2183 i un màxim de 5 a

la CTC2176, tot i que la majoria en tenien entre 3 i 4. Alguns d'aquests plàsmids es van trobar a la vegada en diverses soques. Així se'n van trobar tres de 10'2 Kb, 12'4 Kb i 28'7 Kb que eren presents en 8, 7 i 6 soques respectivament. No se sap quina funció realitzen aquests plàsmids.

El que sí es va poder observar és que hi havia alguns perfils plasmídics que coincidien. Així, *L.salivarius* CTC2049-CTC2051-CTC2055 van mostrar el mateix perfil entre ells, de la mateixa manera que les parelles de soques CTC2112-CTC2146, CTC2186-CTC2231 i CTC2197-CTC2260. Tenint en compte que totes elles tenien el mateix origen, la coincidència en el perfil plasmídic es va considerar indicatiu suficient com per pensar que es tractava de la mateixa soca. Per això el nombre de soques seleccionades per als estudis posteriors va quedar reduït a les 8 que van presentar diferents perfils plasmídics: CTC2049, CTC2112, CTC2166, CTC2176, CTC2183, CTC2186, CTC2197 i CTC2244.

L'obtenció de perfils de RAPD amb l'encebador M13 i el posterior estudi comparatiu a partir del dendograma, va permetre fer una primera aproximació a la caracterització molecular de les 8 soques seleccionades. Es va observar que totes les soques estaven molt relacionades entre si ja que totes elles presentaven perfils molt semblants. Així les soques CTC2176, CTC2186, CTC2197 i CTC2244 van presentar el mateix perfil. Les soques CTC2112 i CTC2183 també van presentar el mateix patró i no massa diferent al de les anteriors, mentre que les soques CTC2049 i CTC2166 el van presentar diferent. Cap d'aquests patrons va coincidir amb l'obtingut per a les soques tipus incloses en l'estudi que tal com es pot observar en el dendograma formen un grup diferenciats. Entre aquestes soques tipus es trobaven, a més de *L.salivarius* subsp. *salivarius* i *L.salivarius* subsp. *salicinius*, *L.agilis*, *L.ruminis*, *L.animalis* i *L.aviarius* subsp. *aviarius*. Totes aquestes espècies estan estretament relacionades filogenèticament i s'emmarquen en el grup de *L.salivarius* inclòs al segon grup de la classificació de Collins i col. (1991).

Davant aquesta falta de coincidència entre els patrons de bandes de les soques aïllades i els de les soques tipus, no es va poder confirmar l'adscripció a espècie que s'havia fet en base a les característiques bioquímiques. No obstant tampoc es va rebutjar la classificació feta fins al moment, ja que el fet que no presentessin el mateix perfil amb l'encebador M13 no era motiu suficient per assegurar que es tractés d'espècies diferents. La hibridació del material genètic de les soques aïllades amb una sonda específica per a *L.salivarius* fou la tècnica seleccionada per determinar la identitat de les soques CTC2166 i CTC2183 i confirmar la identificació de les altres soques.

La selecció de la seqüència que servirà de sonda és primordial. Es recomana utilitzar sondes dirigides al 16S o 23S ARN ribosòmic, ja que es tracta d'una porció del genoma present a tots els organismes que té una funció essencial en la cèl·lula viva i que manté unes regions conservades que permeten detectar similaritat entre microorganismes molt allunyats i unes regions variables que permeten identificar aquells microorganismes més propers (Fowler i col., 1985; Woese, 1987; Curk i col., 1994). La sensibilitat de la prova augmenta espectacularment quan s'utilitzen sondes específiques per a l'ARN ribosòmic, ja que durant la fase exponencial del creixement el nombre de molècules d'ARN ribosòmic present és 10.000 vegades superior al de molècules d'ADN (Schleifer i col., 1992).

Per dissenyar una sonda específica es van comparar les seqüències del 16S ARN ribosòmic de lactobacils disponibles a les bases de dades (Genebank i EMBL) i es van seleccionar aquelles espècies que presentaven un percentatge d'homologia amb *L.salivarius* superior al 90%. La màxima similitud es va observar amb *L.agilis* (93%), *L.animalis* (93%), *L.aviarius* (95%) i *L.ruminis* (93%), totes elles situades filogenèticament molt a prop segons la classificació de Collins i col., (1991). La comparació d'aquestes seqüències va permetre delimitar una zona de 44 parells de bases, la zona més extensa on es concentrava la màxima variabilitat, a partir de la qual es van dissenyar dues sondes per a *L.salivarius*. Cap de les sondes assajades es va mostrar específica per aquesta espècie ja que ambdues hibridaven tant amb la soca problema com amb les soques tipus estretament relacionades utilitzades com a controls negatius. L'augment de la temperatura d'hibridació i la disminució del temps en què aquesta té lloc, són paràmetres que permeten augmentar l'especificitat d'una sonda. Ni l'augment de la temperatura fins a 65°C ni la disminució del temps d'hibridació fins a 1 minut, van permetre aconseguir un senyal específic per a cap de les dues sondes assajades. Probablement es tractava de sondes massa curtes (17 nucleòtids a la sonda Lbsal2 i 19 nucleòtids a Lbsal3) que dificultaven la seva especificitat. El disseny d'una sonda més llarga (25-30 parells de bases) podria funcionar com a una sonda específica per a *L.salivarius*.

La hibridació d'una sonda amb l'ARN ribosòmic només utilitza una part del potencial d'aquest material genètic. La seqüenciació d'una part del 16S ARN ribosòmic pot aportar molta més informació i establir relacions molt més precises (Curk i col., 1994). Quan es va fer la seqüenciació parcial d'aquest material genètic i es va comparar amb el d'una soca tipus de *L.salivarius*, es va trobar un 99% d'homologia entre les zones

comparades. Això va permetre determinar que les dues soques (CTC2166 i CTC2183) que no s'havien pogut identificar amb seguretat segons els mètodes utilitzats fins al moment corresponien, efectivament, a *L.salivarius* subsp. *salivarius*.

Per què una soca bacteriana sigui una bona candidata a probiòtic, no només ha de superar les condicions adverses del tracte gastrointestinal i establir-s'hi, sinó que també ha de contribuir a l'antagonisme de la microbiota natural contra tots els microorganismes patògens que hi puguin arribar. Aquest antagonisme pot ser degut a la producció d'àcids orgànics (làctic i acètic), alcohols, CO₂, peròxid d'hidrogen, bacteriocines, reuterina, sideròfors...(Mattila-Sandholm i col., 1996). Això vol dir que interessa escollir soques que tinguin un ampli espectre d'inhibició, principalment enfront *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. i *E.coli* que són els principals patògens que colonitzen el tracte gastrointestinal de les aus.

L'espectre d'inhibició de les 8 soques de *L.salivarius* escollides va ser força ampli ja que van ser capaces d'impedir el creixement de totes les soques indicadores provades: 8 *Salmonella* spp., 2 *Campylobacter jejuni* i 1 *E.coli*. Aquesta sembla ser una característica força estesa entre les diferents espècies de lactobacils ja que diversos autors han observat aquest fenomen. S'ha vist que *L.acidophilus* (Gilliland i Speck, 1977), *L.bifidus* (Poupard i col., 1973), *L.casei* (Yakult Honsha Co., Ltd, 1971), *L.plantarum*, *L.fermentum* i *L.cellobiosus* (Simonetti i col., 1982) exerceixen una acció antagonista sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. A més, *L.acidophilus* és actiu enfront *Clostridium perfringens*, *L.bifidus* enfront *Shigella* spp. i *L.casei* enfront *Vibrio* spp.

Pel que fa a la identitat de la substància responsable d'aquesta activitat antagonista, es va poder afirmar que es tractava d'un compost secretat al sobrenedant, ja que la inhibició es va mantenir quan els sobrenedants van ser pasteuritzats a 80°C, procés que elimina la possible presència cel·lular, i que no es tractava de peròxid d'hidrogen perquè l'activitat es va conservar quan els sobrenedants van ser tractats amb catalasa, enzim que hidrolitza la molècula en H₂O i O₂. Quan el sobrenedant pasteuritzat va ser neutralitzat a pH 6'5 es va perdre la capacitat d'inhibició, indicant que el factor acidesa hi estava implicat. Aquests resultats van coincidir amb els obtinguts per Jin i col. (1996b) que van observar 12 soques de *Lactobacillus* capaces d'inhibir el creixement de 3 serotips d'*E.coli* i 5 soques de *Salmonella* en diversos graus només amb la producció d'àcids orgànics.

Si l'assaig es realitzava afegint al medi la mateixa quantitat d'àcid làctic que cada soca secretava al sobrenedant s'observava un menor grau d'inhibició (dades no mostrades). Això va suggerir que l'àcid làctic no era l'única substància responsable d'aquesta activitat i que n'hi havia alguna altra que hi actuava conjuntament i complementant el seu efecte.

Aquesta substància podia ser algun altre àcid o un producte de naturalesa diferent que fos activat com a conseqüència del pH baix del medi. Tenint en compte el caràcter homofermentador estricte de les soques assajades, semblava prendre més força la idea d'una substància activada pel pH àcid que no pas la producció d'algun altre àcid orgànic diferent del làctic. Això és el que van observar Baribo i Foster (1951) en veure que *Streptococcus lactis* no inhibia a *L.casei* fins que el pH no baixava a 5'4. El pH no era la causa directa de la inhibició sinó que era la responsable de l'alliberació de la substància antagonista que es mantenia associada a les cèl·lules productores.

El criteri principal per seleccionar les soques estudiades en aquest treball va ser la capacitat d'adherir-se a les cèl·lules epitelials del pap de pollets, ja que això els donava un major avantatge a l'hora de mantenir-se *in vivo* al tracte gastrointestinal. Vandevoorde i col. (1992) suggereixen que les soques també poden utilitzar la seva capacitat de coagregació per evitar ser eliminades i que, per tant, les que presentin aquesta propietat tindran més oportunitats d'establir-se en temps de residència curts. A més diversos autors consideren que la coagregació entre la flora nativa i els patògens és un bon mecanisme per excloure aquests últims de l'hoste (Reid i col., 1988; Spencer i Chesson, 1994).

La coagregació és una estreta associació interactiva entre cèl·lules microbianes que correspon a un mecanisme de defensa i que permet colonitzar un hàbitat específic, afavorir la transferència de plàsmids conjugatius, facilitar l'acció de les bacteriocines, limitar la difusió de compostos tòxics o afavorir la de compostos sinèrgics (Atkinson, 1984; Clewell i col., 1987; Reid i col., 1988). La prevalència de la capacitat de coagregar entre els lactobacils de pollastres dona suport a la idea de que les interaccions intragenèriques poden tenir una gran importància ecològica (Vandevoorde i col., 1992). Les soques d'aquest estudi també van mostrar aquesta capacitat de coagregació, amb almenys dues de les altres soques, ja que prèviament s'havien seleccionat per la seva adherència i, com ja s'ha vist, aquesta propietat sembla estar relacionada amb la de la hidrofobicitat, l'agregació i la coagregació. En aquest cas, però, la capacitat de coagregació no va ser uniforme entre tots els bacteris ja que algunes soques van

presentar un nombre d'interaccions superior al d'altres. Les que van presentar uns millors resultats es van poder agrupar en dos grups: la CTC2166, CTC2183 i CTC2231 que van coagregar amb 4 de diferents i la CTC2049 i CTC2197 que ho van fer amb 5.

Només una soca de cada un d'aquests grups, la CTC2183 i la CTC2197, van ser capaces d'interaccionar a la vegada amb el patògen *Salmonella enteritidis* CTC1026. Es pot observar com la soca CTC2197 fou també una de les dues que presentà una major capacitat d'adhesió, d'entre les 77 que es van assajar, arribant a més de 70 cèl·lules bacterianes per cèl·lula epitelial de pap de pollets. Així mateix la CTC2183 fou també una de les 12 soques que van arribar a un nivell d'adhesió de 30 bacteris per cèl·lula epitelial i va ser la més resistent a la monensina.

Aquesta coincidència entre la capacitat de coagregació, tant amb altres lactobacils com amb *Salmonella*, i la bona capacitat d'adhesió, així com l'ampli espectre antagonista i la resistència a les condicions intestinals, van fer apuntar que les soques *L.salivarius* CTC2183 i *L.salivarius* CTC2197 eren les millors candidates per a ser utilitzades com a probiòtics en els posteriors assaigs *in vivo* en pollets.

En aquest punt s'imposava la necessitat de desenvolupar un mètode que permetés diferenciar les dues soques seleccionades entre la microbiota nativa dels pollastres quan fossin inoculades en els animals. Una primera possibilitat era determinar la resistència natural de les soques seleccionades a algun antibiòtic. La resistència a la rifampicina s'ha descrit com una propietat atípica entre els lactobacils (Rada i col., 1995) de manera que es va avaluar la possibilitat d'utilitzar aquesta propietat com a element diferenciador. En els 10 animals estudiats en aquest treball, provinents de 3 orígens diferents, la població de lactobacils als cecs va oscil·lar entre 10^5 i 10^9 ufc/g. En tots els casos el recompte de lactobacils resistents a la rifampicina dins d'aquesta població va ser inferior a 10^2 ufc/g. Les dues soques seleccionades, CTC2197 i CTC2183, van presentar colònies resistents a l'antibiòtic i, després de comprovar que el perfil plasmídic coincidia amb el de les soques originàries, la resistència a la rifampicina es mantenia en absència de pressió selectiva i es mantenien la capacitat d'agregació, coagregació i inhibició dels microorganismes patògens per les quals van ser seleccionades, es van escollir les soques *L.salivarius* CTC2183^{R1} i *L.salivarius* CTC2197^{R1} per a els assaigs *in vivo*.

Abans d'utilitzar les dues soques seleccionades en un assaig *in vivo*, amb el sacrifici d'un elevat nombre d'animals que això comporta, es va voler assegurar la seva competitivitat en un pre-assaig realitzat amb pocs animals. *L.salivarius* CTC2197^{R1} es va

mostrar com la més competitiva, essent capaç de colonitzar el tracte digestiu de tots els animals en només 15 hores (10^5 ufc/g al pap i 10^7 ufc/g al cec), després d'una sola dosis d'inoculació, i desplaçant a *L.salivarius* CTC2183^{R1} tant en el pap (100% d'implantació) com en el cec (83% d'implantació). Veient l'enorme poder colonitzador de *L.salivarius* CTC2197^{R1} es va decidir utilitzar únicament aquesta soca per als posteriors estudis.

La possibilitat d'incloure una soca bacteriana com a probiòtic en la producció animal implica la necessitat de disposar d'un mètode d'emmagatzematge que permeti mantenir la soca viable durant un llarg període de temps. La congelació i la liofilització van ser els dos mètodes assajats. La soca va mostrar una bona viabilitat a -40°C després de 18 mesos, utilitzant llet descremada o glicerol com a agents protectors. En aquest cas els dos sistemes van donar resultats molt semblants, a diferència de Coppola i col. (1996) que van observar que la llet descremada tenia un major efecte protector que el glicerol. Quan el cultiu es va liofilitzar també es va detectar una bona supervivència després d'un any a 4°C . Aquests resultats estaven d'acord amb els obtinguts per To i Etzel (1997) en comparar la supervivència de tres espècies de bacteris làctics abans i després de la liofilització.

L'ús comercial d'una soca probiòtica en la indústria avícola només pot ser possible si hi ha un mètode que permeti administrar-la. La seva inclusió en el pinso s'apunta com a una possible solució, tot i que *L.salivarius* CTC2197^{R1} va mostrar una gran sensibilitat a les elevades pressions i temperatures utilitzades durant el procés de granulació. Les pèrdues de viabilitat observades en la soca probiòtica a les temperatures utilitzades durant l'emmagatzematge (temperatura ambient) i a les incubadores (30°C) semblen ser degudes principalment a l'efecte de la mateixa temperatura. Quan un cultiu liofilitzat de la mateixa soca es va conservar a 4°C , la pèrdua de viabilitat va ser pràcticament zero mentre que quan el mateix cultiu es va mantenir a temperatura ambient, la pèrdua de viabilitat va ser semblant a la observada en el pinso. La inclusió d'una soca probiòtica en el pinso dels pollastres va ser utilitzada en diversos estudis (Costerton i col., 1978; Rada i col., 1995; Jin i col., 1998b), però cap d'ells havia controlat la seva supervivència a aquestes temperatures. Per contra Sarra i Badini (1997) van observar que els cultius liofilitzats de lactobacils eren capaçs de sobreviure durant dues setmanes en ser barrejats amb el pinso.

La incorporació al pinso de substàncies acidificants com l'àcid fòrmic, l'àcid làctic o l'àcid fosfòric no va tenir cap efecte en la supervivència de la soca probiòtica, ja que no

es van observar diferències en comparació amb el pinso control. La inclusió al pinso de determinats àcids orgànics s'utilitza com a mitjà per descontaminar el pinso i prevenir la infecció dels pollastres per aquesta via (Hinton i col., 1985; Hinton i Linton, 1988). Després de diverses reinoculacions de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en pinso acidificat a temperatura ambient, es va aconseguir millorar la seva viabilitat en aquest medi. La millor supervivència de la soca probiòtica es va aconseguir després d'una segona reinoculació, quan la població va disminuir 2'46 logaritmes després de 7 dies, obtenint-se recomptes de $7'05 \times 10^5$ ufc/g en pinso emmagatzemat 7 dies a temperatura ambient. Aquests resultats ofereixen la possibilitat d'utilitzar el pinso com una via per administrar el probiòtic a gran escala, i més si es tenen en compte els resultats obtinguts en el tercer assaig que indiquen que una dosi baixa és suficient per aconseguir la colonització gastrointestinal dels animals.

En aquest sentit, per tal de conèixer quina era la dosi mínima de *L.salivarius* CTC2197^{R1} que calia administrar als animals per aconseguir la colonització del seu tracte gastrointestinal, es van addicionar al pinso tres concentracions diferents. 10^5 ufc/g de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en el pinso del primer dia de vida, fou suficient per assegurar la presència de la soca probiòtica en el tub digestiu dels animals després d'una setmana. A les quatre setmanes hi va haver una davallada en els nivells de lactobacils, tant en el grup control com en els grups que van rebre 10^5 i 10^7 ufc/g de pinso, mentre que els nivells es van mantenir estables entre els animals que havien disposat de pinso amb la dosi de soca probiòtica més elevada. La mateixa reducció es va observar entre els recomptes de lactobacils resistents a la rifampicina suggerint que, entre els 21 i 28 dies, la soca probiòtica va ser eliminada del tracte digestiu d'alguns animals, de manera que faria falta més d'una dosi per assegurar la presència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} fins al final de l'etapa d'engreix. Als 28 dies la presència de diverses aus amb recomptes de *L.salivarius* CTC2197^{R1} inferiors a 10^2 ufc/g de cec va ser la responsable de les mitjanes tant baixes i de les elevades desviacions. Això també explicaria que no es detectessin diferències significatives en aquest temps entre el recompte de lactobacils resistents a la rifampicina del grup control i del que va rebre 10^5 ufc/g.

Rada i col. (1995) van aconseguir bons resultats en la colonització dels animals quan la soca *L.salivarius* 51R fou administrada com a cèl·lules liofilitzades a nivells de 10^6 ufc/g. També es va aconseguir protecció contra *E.coli* (Watkins i col., 1982) i els coliforms (Jin i col., 1996b, 1998b) quan els probiòtics es van administrar als pollastres a través del pinso.

Quan l'eficàcia probiòtica de *L.salivarius* CTC2197^{R1} es va provar *in vivo*, es van obtenir resultats molt prometedors. 21 dies després d'una única administració directa al proventricle, no es van detectar animals colonitzats amb *S.enteritidis* en cap dels dos assaigs realitzats, mentre que els animals que no la van rebre van resultar colonitzats pel patògen (70 i 100% en el primer i segon assaig, respectivament). La gran capacitat mostrada per *L.salivarius* CTC2197^{R1} per adherir-se a les cèl·lules epitelials i inhibir el creixement de *S. enteritidis in vitro*, pot explicar la seva capacitat d'excloure el patògen *in vivo*. Com ja s'ha descrit anteriorment, s'ha detectat una correlació positiva entre l'adhesivitat del bacteri i la seva capacitat d'agregació i coagregació, i alguns autors consideren que la capacitat de coagregació dels lactobacils amb els patògens és un bon mecanisme de defensa (Reid i col., 1988; Spencer i Chesson, 1994).

Mentre diversos estudis van mostrar que una sola soca de *Lactobacillus* no era capaç de protegir els pollastres de la colonització per *Salmonella* (Adler i DaMassa, 1980; Barnes i col., 1980b; Weinack i col., 1985), altres autors van observar que una soca probiòtica podia colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets i exercir el seu efecte beneficiós amb una sola inoculació després d'un curt període de temps (6 dies) (Rada i col., 1995; Rada i Marounek, 1997). Jin i col., (1998b) van observar l'eficàcia d'una soca de *L.acidophilus* i una barreja de diversos cultius de *Lactobacillus* fins i tot després de 40 dies d'haver començat l'assaig, però aquests pollastres van ser alimentats cada dia amb el probiòtic. Segons els resultats obtinguts en aquest estudi, la inoculació de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en pollets d'un dia d'edat donava resultats positius contra *S.enteritidis* C-114, comparables als obtinguts quan s'utilitzaven barreges de diverses soques (Stavric i col., 1985; Stavric, 1987; Gleeson i col. 1989; Corrier i col., 1995).

La resistència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} a la rifampicina, juntament amb la comparació dels perfils plasmídics, van permetre diferenciar la soca administrada als animals de la resta de lactobacils indígenes. Quan entre els animals del segon assaig es van detectar recomptes de lactobacils resistents a la rifampicina inferiors als esperats, es va avaluar la possibilitat de que la soca probiòtica hagués perdut la seva resistència a l'antibiòtic *in vivo*, malgrat que aquesta propietat va ser estable quan es va estudiar *in vitro*. Aquesta possibilitat va ser confirmada en observar que el 43'8% dels lactobacils totals de tres mostres diferents de 21 dies del tractament C' (inoculació de *L.salivarius* CTC2197^{R1}), corresponien a la soca inoculada segons el perfil plasmídic, mentre que només se'n detectava un 20% per contraselecció amb rifampicina. Aquests resultats indiquen que la contraselecció per resistència a l'antibiòtic és adequada per detectar la

presència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} en el tracte gastrointestinal dels animals, però no per quantificar-la.

Pedersen i Tannock (1989) van descriure la presència de lactobacils resistents a la rifampicina en el tracte digestiu de porcs i Salvat i col. (1992) van utilitzar *Salmonella* spp. resistent a la rifampicina en pollastres. Rada i Marounek (1997) també van estudiar l'efecte d'una soca de *L.salivarius* resistent a la rifampicina en pollets. Els autors no van descriure cap pèrdua de resistència a l'antibiòtic durant les seves experiències, tot i que només van fer el seguiment de la soca probiòtica durant 5 dies en lloc de diverses setmanes.

Davant la pèrdua de resistència a l'antibiòtic que es va observar que tenia lloc *in vivo*, es va contemplar la possibilitat de posar a punt un mètode alternatiu per fer el seguiment de *L.salivarius* CTC2197^{R1}. Es va intentar desenvolupar una empremta específica per a la soca probiòtica, de manera que la seva presència en una població mixta com és el contingut intestinal dels pollets podria ser detectada a través de PCR. Per al desenvolupament d'aquesta empremta es va estudiar el perfil de RAPD de la soca seleccionada amb un total de 80 encebadors. El RAPD és un mètode basat en la PCR que s'ha utilitzat àmpliament per comparar diferències intra i interespecífiques en bacteris (Welsh i McClelland, 1990). Reduint la rigurositat de les condicions d'hibridació de l'encebador, es pot aconseguir que un encebador que té una homologia no coneguda amb un genoma s'uneixi a llocs en què aquesta unió és imperfecte, permetent que certes regions del genoma siguin amplificades. D'aquesta manera s'obté per electroforesis un perfil de bandes característic en desplaçar-se per un gel d'agarosa.

Dels 80 encebadors provats, OPK8, OPK18 i OPZ15 van presentar un perfil de RAPD estable que donava una mitjana de 7 bandes amb l'OPK8, 5 bandes amb l'OPK18 i 2 bandes amb l'OPZ15. Aquests encebadors oferien la possibilitat de diferenciar la soca probiòtica *L.salivarius* CTC2197^{R1} d'altres soques del mateix origen que, ja en els estudis moleculars anteriors, s'havien mostrat estretament relacionades. La tècnica de RAPD-PCR s'ha mostrat indicada per diferenciar soques de bacteris làctics (Klein i col., 1998; Aymerich i col., 1998), *L.monocytogenes* (Lawrence i col., 1993; Jacobsen i col., 1998) i *Campylobacter* (Madden i col., 1998), malgrat que la seva reproductibilitat entre diferents laboratoris s'ha qüestionat en algunes ocasions (Wernars i col., 1996).

Els tres encebadors seleccionats, OPK8, OPK18 i OPZ15, es van considerar com a futurs candidats potencials per a ser utilitzats com a empremtes específiques, una

alternativa a la selecció per resistència a la rifampicina i monitorització per perfils plasmídics que s'havia fet fins al moment.

La gran capacitat de *L.salivarius* CTC2197^{R1} per colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets després d'una sola inclusió en el pinso, juntament amb la seva capacitat de superar *in vivo* la infecció per *S.enteritidis* C-114, l'assenyalen com a una soca adient per minimitzar la infecció per *Salmonella* en la indústria avícola. Aquest fet incidiria directament i de manera molt positiva en l'increment de la seguretat alimentaria, un fet que preocupa cada més tant a les autoritats sanitàries com als consumidors.

PROJECTES DE FUTUR

-Aprofundir en la caracterització bioquímica del factor o factors responsables de l'adhesió i de l'activitat antagonista.

-Validar l'eficàcia de la soca probiòtica en explotacions avícoles des d'un punt de vista global, és a dir, valorant paràmetres productius i de rendiment a més de la seva eficàcia enfront de la colonització per patògens.

-Desenvolupar un sistema poc agressiu per al seguiment de la traçabilitat de la soca probiòtica en viu, com per exemple el marcatge fluorescent.

5-CONCLUSIONS

1-El 65'2% dels 296 lactobacils intestinals aïllats de pollets han mostrat capacitat d'inhibir *in vitro* el creixement de *Salmonella enteritidis* CTC1026 i *Escherichia coli* CTC1028, suggerint la importància d'aquesta propietat per a colonitzar amb èxit el tracte gastrointestinal dels animals.

2-La substància responsable de l'activitat antagonista és secretada al sobrenedant. És de naturalesa àcida o bé és estimulada en presència d'àcid. L'àcid làctic és responsable, en part, de l'acció inhibidora.

3-Hi ha una estreta relació entre la capacitat d'adhesió, la hidrofobicitat i la capacitat d'agregació dels lactobacils seleccionats en aquest estudi. Això permet considerar la mesura de la hidrofobicitat de Rosenberg i col. (1980) i l'assaig d'agregació de Reniero i col. (1992) com alternatives menys agressives al test d'adhesió de Fuller (1973), per investigar l'adhesió.

4-La capacitat agregant de *L.salivarius* CTC2197 és deguda a la presència en superfície d'un factor de naturalesa glicoproteica. A més s'allibera al sobrenedant un compost amb capacitat per induir propietats agregants en determinades soques de lactobacils que no en manifesten.

5-El determinant genètic del promotor de l'adhesió detectat en el sobrenedant de *L.salivarius* CTC2197 i *L.salivarius* CTC2197^{R1} podria tenir certa homologia amb el determinant genètic del factor promotor de l'agregació (APF) de *L.gasseri* 4B2.

6- La liofilització i la congelació s'han mostrat com a mètodes adients per a la conservació a llarg termini de *L.salivarius* CTC2197^{R1}.

7-*L.salivarius* CTC2183 i *L.salivarius* CTC2197 s'han escollit com a les millors candidates per a ser utilitzades com a probiòtics en assaigs *in vivo* en pollets, en base a la seva capacitat d'adhesió i coagregació, tant amb els altres lactobacils com amb *Salmonella*, el seu ampli espectre d'inhibició i la seva resistència a les condicions intestinals.

8-*L.salivarius* CTC2197^{R1} ha mostrat un elevat poder colonitzador en el tracte gastrointestinal de pollets capaç de desplaçar a *L.salivarius* CTC2183^{R1} tant en el pap com en el cec. Després d'una única administració durant el primer dia de vida, *L.salivarius* CTC2197^{R1} ha estat capaç de colonitzar el tracte gastrointestinal dels pollets i minimitzar la colonització de les aus per *Salmonella enteritidis* C-114.

9-Malgrat que *L.salivarius* CTC2197^{R1} s'ha mostrat sensible al procés de granulació del pinso, aquest es pot utilitzar com a via per administrar la soca probiòtica. La inoculació de 10⁵ cèl·lules de *L.salivarius* CTC2197^{R1}/g de pinso durant el primer dia de vida dels pollets és suficient per aconseguir la colonització del tracte gastrointestinal dels animals durant 21 dies. Cal l'administració de més d'una dosi per assegurar la presència de la soca probiòtica fins al final de l'etapa d'engreix.

10-La resistència de *L.salivarius* CTC2197^{R1} a la rifampicina no es pot utilitzar per monitoritzar la soca perquè es perd *in vivo*. El perfil plasmídic així com els perfils de RAPD obtinguts mitjançant els encebadors OPK8 i OPK18 representen alternatives viables per al seguiment de la soca

11-Els perfils de RAPD amb l'encebador M13 no han permès assignar una soca determinada a una espècie en concret.

6-BIBLIOGRAFIA

- Abdulrahim, S.M.; Haddadin, M.S.Y.; Hashlamoun, E.A.R.; Robinson, R.K.** (1996) The influence of *Lactobacillus acidophilus* and bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. *British Poultry Sci.* **37**: 341-346.
- Adler, H.E.; DaMassa, A.J.** (1980) Effect of ingested lactobacilli on *Salmonella infantis* and *E.coli* and intestinal flora, pasted vents and chick growth. *Avian Dis.* **24**: 868-878.
- Aguirre, M.; Collins, M.D.** (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.
- Allen, V.M.; Fernandez, F.; Hinton, M.H.** (1997) Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on salmonella colonisation in poultry. *British Poultry Sci.* **38**: 485-488.
- Anadón, A.** (1999) Uso prudente de los antibióticos en profilaxis y terapéutica de enfermedades animales. Análisis de riesgo. A: *2ª Jornada nacional de alimentación animal sobre la nueva situación de los aditivos antimicrobianos: un reto para la ganadería*. Madrid.
- Anderson, D.G.; McKay, L.L.** (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 549-552.
- Anònim** (1991) Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157:H7-North Dakota, 1990. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **40**: 265-267.
- Arihara, K.; Luchansky, J.B.** (1994) Dairy lactobacilli. A: *Food Biotechnology: Microorganisms, Volume III, Manufacture of Fermented Foods*. Eds. Y.H. Hui & G.G. Khachatourians. VCH Publishers. 609-43.
- Atkinson, B.** (1984) A: *Microbial Adhesion and Aggregation*. Ed. K.C. Marsall. Springer-verlag. 351.
- Aymerich, T.; Monfort, J.M.; Hugas, M.** (1998) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for Rapid typing of lactic acid starter cultures applied in fermented sausages. A: *Congress Proceedings 44th ICoMST. Volume II*. 568-569.
- Bailey, J.S.** (1993) Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at the Russell Research Center. Symposium Proceedings on "Microbial Safety of Poultry Products". *Poultry Sci.* **72**: 1169-1173.
- Bailey, J.S.; Blankenship, L.C.; Cox, N.A.** (1991) Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Sci.* **70**: 2433-2438.
- Baribo, L.E.; Foster, E.M.** (1951) Some characteristics of the growth inhibitor produced by a lactic *Streptococcus*. *J. Dairy Sci.* **34**: 1128.

Barnes, E.M.; Mead, G.C.; Barnum, D.A.; Harry, E.G. (1972) The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British Poultry Sci.* **13**: 311-326.

Barnes, E.M. ; Impey, C.S.; Cooper, D.M. (1980a) Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chicks. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 2426-2433.

Barnes, E.M.; Impey, C.S.; Cooper, D.M. (1980b) Competitive exclusion of salmonellas from the newly hatched chick. *Vet. Rec.* **103**:61.

Barrow, P.A.; Brooker, B.E.; Fuller, R.; Newport, M.J. (1980) The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* **48**: 147-154.

Bateup, J.M.; McConnell, M.A.; Jenkinson, H.F.; Tannock, G.W. (1995) Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1147-1149.

Beachey, E.H.; Ofek, I. (1976) Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. *J. Exp. Med.* **143**: 759-771.

Benenson, A.S. (1990) Salmonellosis. A: *Control of Communicable diseases in Man.* Eds. A.S. Benenson. Public Health Assn. 381-385.

Berndtson, E.; Danielsson-Tham, M.L.; Engvall, A. (1996) *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* **32**: 35-47.

Besser, R.E.; Lett, S.M.; Weber, J.T. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. American Medical Association.* **269**: 2217-2220.

Beveridge, T.J. (1994) Bacterial S-layers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 204-212.

Beveridge, T.J.; Graham, L.L. (1991) Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705.

Beyer, E.C.; Barondes, S.H. (1982) Quantitation of two endogenous lactose-inhibitable lectins in embryonic and adult chicken tissues. *J. Cell. Biol.* **92**: 23-27.

Blankenship, L.C.; Bailey, J.S.; Cox, N.A.; Stern, N.J.; Brewer, R.; Williams, O. (1993) Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poultry Sci.* **72**: 1667-1672.

Bock, K.; Breimer, M.E.; Brignole, A.; Nansson, G.C.; Karlsson, K.A.; Larson, G.; Leffeler, H.; Samuelsson, B.E.; Stromberg, N.; Eden, C.S.; Thurin, J. (1985) Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal alpha 1-4Gal-containing glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **260**: 8545-8551.

Bolder, N.M.; Van Lith, L.A.J.T.; Mulder, R.W.A.W. (1991) Production of *Salmonella enteritidis* contaminated eggs after artificial inoculation of laying hens. A: *Proceedings 10th. Symposium on the quality of poultry meat: safety and marketing aspects*. Eds. R.W.A.W. Mulder and A.W. de Vries. Doorwerth. 12-17 May. The Netherlands. 27-34.

Bolton, W. (1967) Bulletin 174. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London: Her Majesty's Stationery Office.

Boot, H.J.; Kolen, C.P.A.M.; Van Noort, J.M.; Pouwels, P.H. (1993) S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **175(19)**: 6089-6096.

Boris, S. (1997) Caracterización de cepas de *Lactobacillus* de origen humano para su posible uso como probióticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Boris, S.; Suárez, J.E.; Barbés, C. (1997) Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 413-420.

Botazzi, V. (1983) A: *Biotechnology. Vol 5. Food and Feed Production with Microorganisms*. Ed. G. Reed. Verlag Chemie. 315-363.

Braun, P.; Fehlhaber, K. (1995) Migration of *Salmonella enteritidis* from the albumen into the egg yolk. *Int. J. Food Microbiol.* **25**: 95-99.

Brooker, B.E.; Fuller, R. (1975) Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium. *J. Ultrastruc. Res.* **52**: 21.

Buenrostro, J.L.; Kratzer, F.H. (1983) Effects of *Lactobacillus* inoculation and antibiotic feeding of chickens on availability of dietary biotin. *Poultry Sci.* **62**: 2022-2029.

Butzler, J.P.; Skirrow, M.B. (1979) *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.* **8**: 737-765.

Bygrave, A.C.; Gallagher, J. (1989) Transmission of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Vet. Rec.* **124**: 333.

Caetano-Anolles, G.; Bassam, G.J.; Gresshoff, P.M. (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology.* **9**: 553-557.

Canganella, F.; Gasbarri, M.; Massa, S.; Trovatelli, L.D. (1996) A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding. *Microbiol. Res.* **151**: 167-175.

Chan, R.C.Y.; Reid, G.; Irvin, R.T.; Bruce, A.W.; Costerton, J.W. (1985) Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect. Immun.* **47**: 84-89.

Chassy, B.M.; Gibson, E.; Giuffrida, A. (1976) Evidence for extrachromosomal elements in lactobacillus. *J. Bacteriol.* **127**: 1576-1578.

Chateau, N.; Deschamps, A.M.; Hadj Sassi, A. (1994) Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 42-44.

Chauvière, G.; Coconnier, M.H.; Kerneis, S.; Fourniat, S.; Servin, A.L. (1992) Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1689-1696.

Clewell, D.B. (1994) *Bacterial Conjugation*. Eds. D.B. Clewell. Plenum Press. New York.

Clewell, D.B.; Ehrenfeld, E.E.; An, F.; Kessler, R.E.; Wirth, R.; Mori, M.; Kitada, C.; Fujino, N.; Ike, Y.; Suzuki, A. (1987) A: *Streptococcal Genetics*. Eds. J.J. Ferretti & R. Curtis. Am. Soc. Microbiol. 2.

Clewell, D.B.; Flannagan, S.E.; Jaworsky, D.D. (1995) Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**: 229-236.

Coconnier, M.H.; Klaenhammer, T.R.; Kernéis, S.; Bernet, M.F.; Servin, A.L. (1992) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2034-2039.

Collins, M.D.; Rodrigues, U.M.; Ash, C.; Aguirre, M.; Farrow, J.A.E.; Martínez-Murcia, A.; Philips, B.A.; Williams, A.M.; Wallbanks, S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 5-12.

Collins, M.D.; Samelis, J.; Metaxopoulos, J.; Wallbanks, S. (1993) Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 595-603.

Coppola, R.; Iorizzo, M.; Sorrentino, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L. (1996) Resistenza al congelamento di lattobacilli mesofili isolati da insaccati e paste acide. *Industrie Alimentari.* **35**: 347, 349-351.

Corrier, D.E.; Hinton, A.; Ziprin, R.L.; DeLoach, J.R. (1990) Effect of dietary lactose on *Salmonella* colonization of market-age broiler chickens. *Avian Dis.* **34**: 668-676.

Corrier, D.E.; Hinton, A.; Kubena, L.F.; Ziprin, R.L.; DeLoach, J.R. (1991) Decreased *Salmonella* colonization in turkey poults inoculated with anaerobic cecal microflora and provided dietary lactose. *Poultry Sci.* **70**: 1345-1350.

- Corrier, D.E.; Hinton, A.; Hargis, B.; DeLoach, J.R.** (1992) Effect of used litter from floor pens of adult broilers on *Salmonella* colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* **36**: 897-902.
- Corrier, D.E.; Nisbet, D.J.; Scanlan, C.M.; Tellez, G.; Hargis, B.M.; DeLoach, J.R.** (1994) Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in Leghorn chicks by a defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. *J. Food Prot.* **56**: 377-381.
- Corrier, D.E.; Nisbet, D.J.; Scanlan, C.M.; Hollister, A.G.; DeLoach, J.R.** (1995) Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poultry Sci.* **74**: 916-924.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G.; Cheng, K.J.** (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86-95.
- Costerton, J.W.; Irwin, R.T.; Cheng, K.J.** (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- Cox, N.A.; Bailey, J.S.; Mauldin, J.M.; Blankenship, L.C.** (1990) Research note: Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Sci.* **69**: 1606-1609.
- Cox, N.A.; Bailey, J.S.; Blankenship, L.C.; Gildersleeve, R.P.** (1992) *In ovo* administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. *Poultry Sci.* **71**: 1781-1784.
- Cox, N.A.; Davis, A.B.; Colmer, A.R.** (1993) *Salmonella* recovery from viscera, feces and eggs following oral inoculation. *Poult. Sci.* **52**: 661-666.
- Curk, M.C.; Boeufgras, J.M.; Decaris, B.; Gavini, F.; Kersters, K.; Larpent, J.P.; Le Bourgeois, P.; Renault, P.; de Roissart, H.; Rouvier, C.** (1994) Méthodes d'identification des bactéries lactiques. A: *Bactéries Lactiques* I. Ed. H. de Roissart. & F.M. Luquet. 141-168.
- Dadrast, H.; Hesketh, R.; Taylor, D.J.** (1990) Egg yolk antibody detection in identification of salmonella infected poultry. *Vet. Rec.* **126**: 219.
- Davies, F.L.; Underwood, H.M.; Gasson, M.J.** (1981) The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML3 and C2. *J. Appl. Bacteriol.* **51**.
- Davies, J.E.** (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* **264**: 375-382.
- Delbecque, J.** (1991) Ecología microbiana intestinal, biorregulación y aplicaciones prácticas. *Anaporc.* **102**: 32-52.

Dellaglio, F.; De Roissart, H.; Torriani, S.; Curk, M.C.; Janssens, D. (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. A: *Bactéries Lactiques. Vol.1*. Ed. H. de Roissart & F.M. Luquet. 25-116.

Del Re, B.; Busetto, A.; Vignola, G.; Sgorbati, B.; Palenzona, D.L. (1998) Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 307-310.

De Roissart, H. (1986) A: *Laits et Produits Laitiers*. Eds. F. Luquet. Lavoisier Tec et Doc. 343.

Desmazeaud, M.J.; De Roissart, H. (1994) Métabolisme général des bactéries lactiques. A: *Bactéries Lactiques Vol. I*. Ed. H. de Roissart. & F.M. Luquet. 169-207.

Dicks, L.M.T.; Van Vuuren, H.J.J. (1987) Relatedness of heterofermentative lactobacillus species revealed by numerical analysis of total cell protein patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 437-440.

Dicks, L.M.T.; Dellaglio, F.; Collins, M.D. (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig.) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 395-397.

Doyle, M.P.; Schoeni, J.L. (1987) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2394-2396.

Ducluzeau, R. (1997) Composition et rôle de la flore du tube digestif de l'homme et des animaux domestiques. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France.* **83(1)**: 71-80.

Ducluzeau, R.; Gedek; Raibaud; Savage; Tournut; Van der Waaif (1989) *Bull. de l'Office International des Epizooties.* Vol 8 n° 8.

Dutta, G.N., Devriese, L.A. (1984) Observations on the *in vitro* sensitivity and resistance of gram positive intestinal bacteria of farm animals to growth promoting agents. *J. Appl. Bacteriol.* **56**: 117-123.

Dyer, J.R. (1956) Use of periodate oxidations in biochemical analysis. *Methods of Biochemical Analysis.* **3**: 111-152.

Edens, F.W.; Parkhurst, C.R.; Casas, I.A.; Dobrogosz, W.J. (1997) Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poultry Sci.* **76**: 179-196.

Ehrenfeld, E.E.; Kessler, R.E.; Clewell, D.B. (1986) Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J. Bacteriol.* **168**: 6-12.

Ehrmann, M.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1994) Reverse dot blot: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 143-150.

Fehlhaber, K.; Lingstädt, H.; Krüger, G.; Braun, P. (1993) Characteristics of *Salmonella enteritidis* strains relevant to food safety. *15th Intern. Symposium of the ICMFH, Bingen*. 65.

Fernandes, C.F.; Shahani, K.M. (1989) Inhibitory effect of fermented milk cultures on the gastro-intestinal pathogens. A: *Les laits fermentés. Actualité de la recherche*. John Libbery Eurotext Ltd. 105-116.

Fishbein, L.; Kaplan, M.; Gough, M. (1988) Fructooligosaccharides: a review. *Veterinary and Human Toxicology*. **30**: 104-107.

Fondén, R. (1989) *Lactobacillus acidophilus*. A: *Les laits fermentés. Actualité de la recherche*. John Libbery Eurotext Ltd. 35-40.

Fox, S.M. (1988) Probiotics: intestinal inoculants for production animals. *Food-Animal Practice*. 806-830.

Fowler, V.J.; Ludwig, W.; Stackebrandt, E. (1985) A: *Ribosomal nucleic acid cataloging in bacterial systematic, the phylogeny of Actinomadura. Chemical methods in systematic*. Eds. M. Goodfellow & D.E. Minnikin. Academic Press. 17.

Fuller, R. (1973) Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. *J. Appl. Bact.* **36**: 131.

Fuller, R. (1975) Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. *J. Appl. Bact.* **37**: 245-250.

Fuller, R. (1977) The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Sci.* **18**: 85-94.

Fuller, R. (1989 a) Probiotics in man and animals: a review. *J. Appl. Bact.* **66**: 365-378.

Fuller, R. (1989 b) The effect of yoghurt and bacterial food supplements on the microecology of the gastrointestinal tract. A: *Les laits fermentés. Actualité de la recherche*. John Libbery Eurotext Ltd. 197-206.

Fuller, R. (1992) The effect of probiotics on the gut micro-ecology of farm animals. A: *The lactic acid bacteria. Vol 1: The lactic acid bacteria in health and disease*. Eds. Elsevier applied science. 171-192.

Fuller, R.; Turvey, A. (1971) Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). *J. Appl. Bact.* **34**: 617-622.

Gasser, F. (1964) Identification de *Lactobacillus fecaux*. *Ann. de l'Institut Pasteur*. **106**: 778-796.

Gast, R.K.; Beard, C.W. (1990) Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.* **34**: 438-446.

- Gilliland, S.E.; Speck, M.L.** (1977) Antagonist action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food. Prot.* **40**: 820-823.
- Gilliland, S.E.; Nelson, C.R.; Maxwell, C.** (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 377-381.
- Giraffa, G.; De Vecchi, P.; Rossi, P.; Nicastro, G.; Fortina, M.G.** (1998) Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *Journal of Applied Microbiol.* **85**: 411-416.
- Gleeson, T.M.; Stavric, S.; Blanchfield, B.** (1989) Protection of chicks against *Salmonella* infection with a mixture of pure cultures of intestinal bacteria. *Avian Dis.* **33**: 636-642.
- Goldin, B.R.** (1986) *In situ* bacterial metabolism and colon mutagens. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 367-393.
- Goren, E.; De Jong, W.A.; Doornebal, P.; Koopman, J.P.; Kennis, H.M.** (1984) Protection of chicks against *Salmonella infantis* infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. *Vet. Q.* **6**: 22-26.
- Griffin, P.; Tauxe, R.V.** (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**: 60-98.
- Guillot, J.F.** (1993) Practical use of probiotics in poultry and rabbits. A: *EC Report: Micro-organisms and enzyme preparations in animal nutrition*. Ed. J.R. Castanon. 67-75.
- Guillot, J.F.** (1997) Rôle des probiotiques utilisés en alimentation animale. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*. **Vol.83 n°1**.
- Hammes, W.P.; Vogel, R.F.** (1995) The genus *Lactobacillus*. A: *The Genera of Lactic Acid Bacteria.*, Vol 2. Eds. B.J.B. Wood & W.H. Holzapfel. Chapman and Hall. 19-54.
- Handley, P.S.; Harty, D.W.S.; Wyatt, J.E.; Brown, C.R.; Doran, J.P.; Gibbs, A.C.C.** (1987) A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3207-3217.
- Harvey, R.W.; Young, L.Y.** (1980) Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 156-160.
- Havenaar, R.; Huis in't veld, J.H.J.** (1992) Probiotics: a general view. A: *The lactic acid bacteria. Vol 1: The lactic acid bacteria in health and disease*. Eds. Elsevier applied science. 151-170.
- Hejlícek, K.; Soukupova, A.; Moltasova, M.** (1995) Salmonellosis in 1-day-old chicks caused by *Salmonella enteritidis*. *Veterinarstvi.* **45**: 16-18.

- Hensiek, R.; Krupp, G.; Stackebrandt, E.** (1992) Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 123-128.
- Hertel, C.; Ludwig, W.; Pot, B.; Kersters, K.; Schleifer, K.H.** (1993) Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *System. Appl. Microbiol.* **16**: 463-467.
- Hill, I.R.** (1970) The effect of dietary lactobacilli on in vitro catabolic activities of the small intestinal microflora of newly weaned pigs. *J. Med. Micro.* **3**: 593-605.
- Hinton, M.; Linton, A.H.** (1988) Control of salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *Vet. Rec.* **123**: 416-421.
- Hinton, M.; Mead, G.C.** (1991) *Salmonella* control in poultry: the need for the satisfactory evaluation of probiotics for this purpose. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**: 49-50.
- Hinton, M.; Linton, A.H.; Perry, F.G.** (1985) Control of salmonella by acid disinfection of chick's food. *Vet. Rec.* **116**: 502.
- Hinton, A.; Corrier, D.E.; Spates, G.E.; Norman, J.O.; Ziprin, R.L.; Beier, R.C.; DeLoach, J.R.** (1990) Biological control of *Salmonella typhimurium* colonisation in young chickens. *Avian Dis.* **34**: 626-633.
- Hinton, M.; Mead, G.C.; Impey, C.S.** (1991) Protection of chicks against environmental challenge with *Salmonella enteritidis* by competitive exclusion and acid-treated feed. *Lett. Appl. Microbiol.* **12(3)**: 69-71.
- Hirn, J.; Nurmi, E.; Johansson, T.; Nuotio, L.** (1992) Long-term experience with competitive exclusion and *Salmonella* in Finland. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 281-285.
- Hitchener, B.J.; Egan, A.F.; Rogers, P.J.** (1982) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 31-37.
- Holzappel, W.H.; Haberer, P.; Snel, J.; Schillinger, U.; Huis in't Veld, J.H.J.** (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85-101.
- Hollister, A.G.; Corrier, D.E.; Nisbet, D.J.; DeLoach, J.R.** (1994) Effect of cecal cultures encapsulated in alginate beads of lyophilized in skim milk and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Poultry Sci.* **73**: 99-105.
- Hood, S.K.; Zottola, E.A.** (1987) Electron microscopic study of the adherence properties of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* **52**: 791-805.
- Hugas, M.** (1993) *Caracterización bioquímica y genética de estirpes de lactobacilos de origen cárnico*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Humbert, F.** (1988) Les probiotiques: un sujet d'actualité. *Bul. d'Inf. Station Exp. d'Aviculture de Ploufragan.* **28**: 128-130.

- Hume, M.E.; Nisbet, D.J.; Scanlan, C.M.; Corrier, D.E.; DeLoach, J.R.** (1995) Fermentation of radiolabelled substrates by batch cultures of caecal microflora maintained in a continuous-flow culture. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 677-683.
- Humphrey, T.J.** (1990) Growth of salmonellas in intact shell eggs: influence of storage temperature. *Vet. Rec.* **126**: 292.
- Humphrey, T.J.** (1994) Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. *Int. J. of Food Microbiol.* **21**: 31-40.
- Humphrey, T.J.; Greenwood, M.; Gilbert, R.J.; Rowe, B.; Chapman, P.A.** (1989) The survival of salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. *Epidem. Infect.* **102**: 35-45.
- Humphrey, T.J.; Chart, H.; Baskerville, A.; Rowe, B.** (1991a) The influence of age on the response of SPD hens to infection with *S. enteritidis* PT4. *Epidemiol. Infect.* **106**: 33-4.
- Humphrey, T.J.; Whitehead, A.; Gawler, A.H.L.; Henley, A.; Rowe, B.** (1991b) Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Lancet i.* 281.
- Hutcheson, D.** (1987) Researcher lists characteristics of probiotics. *Feedstuffs*. Decembre 14.
- Impey, C.S.; Mead, G.C.** (1989) Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pre-treated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 469-475.
- Impey, C.S.; Mead, G.C.; George, S.M.** (1982) Competitive exclusion of *Salmonella* from chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. *J. Hyg. (Camb.)*. **89**: 479-490.
- Jacobs-Reitsma, W.F.; van de Giessen, A.W.; Bolder, N.M.; Mulder, R.W.A.W.** (1995) Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* **114**: 413-421.
- Jacobsen, T.; Hansen, F.; Larsen, A.G.; Gravesen, A.; Knöchel, S.** (1998) RAPD: A tool for typing of *Listeria monocytogenes*. A: *Congress Proceedings 44th ICoMST. Volume II.* 570-571.
- Jaho, K.; Hasbiba, H.; Hirota, T.** (1993) Rapid identification of *Lactobacillus acidophilus* complex isolated from human faeces by restriction pattern of enzymatically amplified 16S ribosomal gene. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:149.
- Janssen, P.H.; Evers, S.; Rainey, F.A.; Weiss, N.; Ludwig, W.; Harfoot, C.G.; Schink, B.** (1995) *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 565-571.

Jayne-Williams, D.J. (1975) Miniaturized methods for the characterization of bacterial isolates. *J. Appl. Bacteriol.* **38**: 305-309.

Jayne-Williams, D.J. (1976) The application of miniaturized method for the characterization of various organisms isolated from animal gut. *J. Appl. Bacteriol.* **40**: 189-200.

Jeffrey, W.H.; Paul, J.H. (1986) Activity measurements of planktonic microbial and microfouling communities in an eutrophic estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 200-209.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Jalaludin, S. (1996a). Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian-Australasian J. Animal Sci.* **9**:397-404.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Ali, M.A.; Jalaludin, S. (1996b) Antagonistic effects of intestinal Lactobacillus isolates on pathogens of chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 67-71.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Ali, A.M.; Abdullah, N.; Ong, B.K.; Jalaludin, S. (1996c) Adhesion of *Lactobacillus* isolates to intestinal epithelial cells of chicken. *Letters in Applied Microbiology.* **22**: 229-232.

Jin, L.Z., Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Jalaludin, S. (1998a) Growth performance, intestinal microflora populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures. *Poultry Sci.* **77**: 1259-1265.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Ali, A.M.; Jalaludin, S. (1998b) Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **70**: 197-209.

Jones, C.D.; Thomas, C.N. (1987) The maintenance of strain specificity and bile tolerance when producing stable bacteria. A: *Biotechnology in the feed industry*. Ed. T. P. Lyons, Altech Technical Publications. 157-166.

Jones, F.T. (1990) Microbial compound holds promise as *Salmonella* control. *Feedstuffs.* **62**:26, 13-14.

Jones, F.T.; Axtell, R.C.; Tarver, F.R.; Rives, D.V.; Scheideler, S.E.; Wineland, M.J. (1991) Environmental factors contributing to *Salmonella* colonization of chickens. A: *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*. Eds. L. Blankenship. Academic Press. 3-21.

Juven, B.J.; Meinersmann, R.J.; Stern, N.J. (1991) Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 95-103.

Kamata, S. (1992) Control de la salmonelosis. ¿Una cuestión de equilibrio?. *Poultry International.* **31**:3, 30-34.

- Kandler, O.; Weiss, N.** (1986) A: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2.* Eds. P.H.A. Sneath i col. Williams & Wilkins. 1209.
- Kashket, E.R.** (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbial Rev.* **46**: 233-244.
- Kim, C.J.; Emery, D.A.; Rinke, H.; Nagaraja, K.V.; Halvorson, D.A.** (1989) Effect of time and temperature on growth of *Salmonella enteritidis* in experimentally inoculated eggs. *Avian. Dis.* **33**: 735-742.
- King, A.S.** (1982) Sistema urogenital de las aves. A: *Anatomía de los animales domésticos. Vol. 2.* Ed. S. Sisson & J.D. Grossman. 2104-2155.
- Klaenhammer, T.R.** (1995) Genetics of intestinal lactobacilli. *Int. Dairy Journal.* **5**: 1019-1058.
- Klaenhammer, T.R.; Sutherland, S.M.** (1980) Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environm. Microb.* **39**: 671-674.
- Klaver, F.A.M.; Van der Meer, R.** (1993) The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1120-1124.
- Klein, G.; Pack, A.; Bonaparte, C.; Reuter, G.** (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* **41**: 103-125.
- Kmet, V.; Lucchini, F.** (1997) Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* **19**: 111-114.
- Kmet, V.; Callegari, M.L.; Bottazzi, V.; Morelli, L.** (1995) Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 351-353.
- Kolebrander, P.E.; London, J.** (1993) Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* **175**: 3247-3252.
- Konisky, J.** (1982) Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 125-144.
- Kullen, M.J.; Klaenhammer, T.R.** (1998) Genetic modification of intestinal *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. A: *Probiotics, a critical review.* Ed. Tannock GW. Horizon Scientific Press. Wymondham. 65-83.
- Kwon, Y.M.; Salinas, J.R.; Durant, J.A.; Nisbet, D.J.; Ricke, S.C.** (1997) Volatile fatty acid sensitivity of *Veillonella* CF3 from a continuous-flow probiotic culture. *J. Food Safety.* **17**: 59-67.

- Langlois, B.E.** (1993) Ensuring the absence of *Salmonella* by effective sanitation systems: The possible role of novel disinfectants such as chlorine dioxide. A: *Proceedings of the Alltech Biotechnology Center's Ninth Annual Symposium: Biotechnology in the Feed Industry*. Eds. T.P. Lyons. 11-122.
- Lawrence, L.M.; Harvey, J.; Gilmour, A.** (1993) Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(9)**: 3117-3119.
- Leblond-Bourget, N.; Philippe, H.; Mangin, I.; Decaris, B.** (1996) 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **56**: 102-111.
- Le Minor, L.** (1984) A: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1*. Eds. N.R. Krieg i col. Williams & Wilkins. 427.
- Lister, S.A.** (1988) *S. enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. *Vet. Res.* **123 (13)**: 350.
- Ljungh, A.; Österlind, M.; Wadström, T.** (1987) Cell surface hydrophobicity of group D and *Viridans streptococci* isolated from patients with septicaemia. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt A*. In Press.
- Lortal, S.** (1993) Crystalline surface-layers of the genus *Lactobacillus*. A: *Advances in Paracrystalline Bacterial Surface Layers*. Ed. T.J. Beveridge & S.F. Koval. 57-65.
- Lucchini, F.; Kmet, V.; Cesena, C.; Coppi, L.; Bottazzi, V.; Morelli, L.** (1998) Specific detection of a probiotic *Lactobacillus* strain in faecal samples by using multiplex PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 273-278.
- Luckey, T.D.; Floch, M.H.** (1972) Introduction to intestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1291-1295.
- Macrina, F.L.; Kopecko, D.J.; Jones, K.R.; Ayers, D.J.; McCowen, S.M.** (1978) A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid.* **1**: 417-420.
- Madden, R.H.; Moran, L.; Scates, P.** (1998) Genetic typing of *Campylobacter* spp. Isolated from retail packs of poultry in northern Ireland. *Congress Proceedings 44 th ICoMST. Volume II*. 572-573.
- Maiolino, R.; Fioretti, A.; Menna, L.F.; Meo, C.** (1992) Research on the efficiency of probiotics in diets for broiler chickens. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B.* **62**: 482.
- Malegeant, J.Y.** (1991) L'échantillonnage et le control statistique. A: *Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agroalimentaires. I. Le Contrôle de Qualité: Principes Généraux et Aspects Législatifs*. Ed. J.L. Multon. TEC and DOC.

- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. 468.
- March, B.E.** (1979) The host and its microbial ecological unit. *J. Animal. Sci.* **49**: 857-867.
- Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Marounek, M.; Rada, V.** (1995) Susceptibility of poultry lactobacilli to ionophore antibiotics. *J. Vet. Med. B.* **42**: 193-196.
- Mattila-Sandholm, T.; Laine, M.; Manninen, M.; Skyttä.** (1996) Production of antimicrobial compounds of starter cultures against molds and Gram negative bacteria. *Proceedings 42th ICOMST*. Lillehammer, Noruega.
- McGroarty, J.A.** (1993) Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6**: 251-264.
- McIlroy, S.G.; McCracken, R.M.; Neill, S.D.; O'Brien, J.J.** (1989) Control, prevention and eradication of *S. enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet. Res.* **125**: 545.
- Messner, P.; Sleytr, U.B.** (1992) Crystalline bacterial cell-surface layers. *Adv. Microb. Physiol.* **33**: 213-275.
- Metchnikoff, E.** (1907) *Prolongation of life*. G. Putnam's Sons, New York.
- Miles, R.D.; Butcher, G.D.** (1993) *Salmonella*. Controlling it in the broiler, egg industries. *Feedstuffs.* **65**.
- Mitchell, I. de G.; Kenworthy, R.** (1976) Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bact.* **41**: 163.
- Mitsuoka, T.** (1992) The human gastrointestinal tract. A: *The Lactic Acid Bacteria. Vol. 1. The Lactic Acid Bacteria in Health and Diseases*. Ed. B.J.B. Wood. Elsevier Applied Science. 49-114.
- Mitsuoka, T.; Hidaka, H.; Eida, T.** (1987) Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Die Nahrung.* **31**: 427-436.
- Mohan, B.; Kadirvel, R.; Natarajan, A.; Bhaskaran, M.** (1996) Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilisation and serum cholesterol in broilers. *Br. Poult. Sci.* **37**:395-401.
- Montel, M.C.; Talon, R.; Champomier, M.C.** (1989) Identification of some lactic acid bacteria from meat. A: *Proceedings 35th Internatinal Congress of Meat Science and Technology.* **II**. 299-301.

- Moore, W.E.; Holdeman, L.V.** (1974) Special problems associated with their isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am. J. Clin. Nutri.* **27**: 1450-1455.
- Morgan, D.; Newman, C.P.; Hutchinson, D.N.; Walker, A.M.; Rowe, B.; Majid, F.** (1993) Vero-toxin producing *E.coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection.* **111**: 181-187.
- Mori, M.; Sakagami, Y.; Narita, M.; Isogai, A.; Fujino, M.; Kitada, C.; Craig, R.A.; Clewell, D.B.; Suzuki, A.** (1985) Isolation and structure of the bacterial sex pheromone CAD1, that induces plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*. *FEBS. Lett.* **178**: 97-100.
- Mori, M.; Tanaka, H.; Sakagami, Y.; Isogai, A.; Fujino, M.; Kitada, C.; White, B.A.; An, F.Y.; Clewell, D.B.; Suzuki, A.** (1986) Isolation and structure of the *Streptococcus faecalis*. *FEBS. Lett.* **178**: 97-100.
- Morishita, Y.; Fuller, R.; Coates, M.E.** (1982) Influence of dietary lactose on the gut flora of chicks. *Brit. Poul. Sci.* **23**: 349-359.
- Mukai, T.; Arihara, K.** (1994) Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58 (10)**: 1851-1854.
- Mulder, R.W.A.W.** (1991) Probiotics as a tool against *Salmonella* contamination. *World Poultry-Misset.* **7**: 6-7.
- Mulder, R.W.A.W.** (1996) Impact of transport on the incidence of human pathogens in poultry. *World Poultry-Misset.* **12**: 18-19.
- Nadathur, S.R.; Gould, S.J.; Bakalinsky, A.T.** (1994) Antimutagenicity of fermented milk. *J. Dairy Sci.* **77**: 1779-1788.
- Nahashon, S.N.; Nakaue, H.S.; Mirosh, L.W.** (1992) Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Sci.* **71(1)**: 111.
- Nahashon, S.N.; Nakaue, H.S.; Mirosh, L.W.** (1993) Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Sci.* **71(2)**: 87.
- Nahashon, S.N.; Nakaue, H.S.; Mirosh, L.W.** (1996a) Nutrient retention and production parameters of Single Comb White Leghorn layers fed diets with varying crude protein levels and supplemented with direct-fed microbials. *Animal Feed Sci. and Tech.* **61**: 17-26.
- Nahashon, S.N.; Nakaue, H.S.; Mirosh, L.W.** (1996b) Performance of Single Comb White Leghorn layers fed a diet with a live microbial during the growth and egg laying phases. *Animal Feed Sci. and Tech.* **57**: 25-38.

- Neill, M.A.** (1989) *E.coli* O157:H7-current concepts and future prospects. *J.Food Saf.* **10**: 99-106.
- Nes, I.F.** (1984) Plasmid profiles of ten strains of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 359-361.
- Nisbet, D.J.; Corrier, D.E.; Scanlan, C.M.; Hollister, A.G.; Beier, R.C.; DeLoach, J.R.** (1993) Effect of a defined continuous-flow derived bacterial culture and dietary lactose on *Salmonella* colonization in broiler chicks. *Avian Dis.* **37**: 1017-1025.
- Nisbet, D.J.; Ricke, S.C.; Scanlan, C.M.; Corrier, D.E.; Hollister, A.G.; DeLoach, J.R.** (1994) Inoculation of broiler chicks with a continuous-flow derived bacterial culture facilitates early cecal bacterial colonization and increases resistance to *Salmonella typhimurium*. *J.Food. Prot.* **57**: 12-15.
- Nisbet, D.J.; Corrier, D.E.; Ricke, S.C.; Hume, M.E.; Byrd II, J.A.; DeLoach, J.R.** (1996) Cecal propionic acid as a biological indicator of the early establishment of a microbial ecosystem inhibitory to *Salmonella* in chicks. *Anaerobe.* **2**: 345-350.
- Niven, C.F.Jr.; Smiley, K.L.; Sherman, J.M.** (1942) The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bacteriol.* **43**: 651-660.
- Noordhuizen, J.P.; Frankena, K.** (1994) *Salmonella enteritidis*: clinical epidemiological approaches for prevention and control of *S.enteritidis* in poultry production. *Int. J. Food Microbiol.* **21**: 131-143.
- Novel, G.** (1994) Génétique moléculaire et génie génétique des bactéries lactiques. A: *Bactéries Lactiques. Vol. I.* Ed. H. de Roissart & F.M. Luquet. 403-428.
- Nurmi, E.; Rantala, M.** (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature.* 214-210.
- Orla-Jensen, S.** (1919) A: *The lactic acid bacteria.* Sect. Sci. Ser. **5**:81-197. Anhr. Fred. HØst and Son. Mem. Acad. Roy. Sci. Danemark.
- Ørskov, F.** (1984) Genus I. Escherichia. A: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I.* Eds. N.R. Krieg i col. Williams & Wilkins. 420-423.
- O'Sullivan, M.G.; Thornton, G.; O'Sullivan, G.C.; Collins, J.K.** (1992) Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends in Food Sci. & Tech.* **3**: 309-314.
- Oyarzabal, O.A.; Connor, D.E.** (1995) *In vitro* fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. *Poultry Sci.* **74**: 1418-1425.
- Parker, R.B.** (1974) Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutr. Health.* **29**: 4-8.
- Pearl, H.W.** (1985) Influence of attachment on microbial metabolism and growth in aquatic ecosystems. A: *Bacterial adhesion* Ed. D.C. Savage & M. Fletcher. Plenum Publishing Corpm. 363-400.

- Pearson, A.D.; Greenwood, M.H.; Feltham, R.K.A.; Healing, T.D.; Donaldson, J.; Jones, D.M.; Colwell, R.R.** (1996) Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:12**, 4614-4620.
- Pedersen, G.; Tannock, G.W.** (1989) Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 279-283.
- Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P.; Bellon-Fontaine, M.N.** (1997) Cell surface characteristic of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1725-1731.
- Perdigon, G.; Macias, M.E.N.; de Alvarez, S.; Oliver, G.; de Ruiz Holgado, A.A.P.** (1986) Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Research.* **57**: 255-264.
- Perdigon, G.; Alvarez, S.; Nader de Macias, M.E.; Roux, M.E.; de Ruiz Holgado, A.P.** (1990) The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J. Food. Protect.* **53**: 404-410.
- Pérez, P.F.; Minnaard, Y.; Disalvo, E.A.; De Antoni, G.L.** (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 21-26.
- Plummer, R.A.S.; Blisset, S.J.; Dodd, E.R.** (1995) *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the UK. *J. Food Prot.* **58**: 843-846.
- Pot, B.; Hertel, C.; Ludwig, W.; Descheemaeker, P.; Kersters, K.; Schleifer, K.H.** (1993) Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L.gasseri* and *L.johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 513-517.
- Poupard, J.A.; Husain, I.; Norris, R.F.** (1973) Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* **37**: 136-165.
- Prasso, J.R.K.; Sinha, P.R.; Sinha, R.N.** (1989) Probiotics and *Lactobacillus* fermented milks. *Indian dairyman.* **41**: 570-574.
- Pressman, B.C.; Fahim, M.** (1982) Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**: 465-490.
- Puzova, H.; Siegfried, L.; Kmetova, M.; Filka, J.; Takacova, V.; Durovicova, J.** (1994) Fimbriation, surface hydrophobicity and serum resistance in uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **9**: 223-230.

- Rada, V.; Marounek, M.** (1997) Effect of maduramicin and monensin on survival of *Lactobacillus salivarius* 51R administered in the crop and caeca of young chickens. *Arch. Anim. Nutr.* **50**: 25-29.
- Rada, V.; Janesova, J.; Marounek, M.; Vorisek, K.** (1991) Susceptibility of chicken intestinal lactobacilli to antimicrobial compounds. *Acta. Vet. Brno.* **60**: 339-343.
- Rada, V.; Marounek, M.; Rychlý, I.; Šantrucková, D.; Vorišek, K.** (1995) Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.* **4**:161-170.
- Raghubeer, E.V.; Ke, J.S.; Campbell, M.L.; Mayer, R.S.** (1994) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *J. Food Protection.* **58**: 13-18.
- Raibaud, P.; Raynaud, J.P.** (1989) 6ème. SIMAVIP. Eds: AFMVP. 9.
- Reid, G., McCroarty, J.A.; Angotti, R.; Cook, R.L.** (1988) *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.* **34**:344-351.
- Reid, G.; Servin, A.L.; Bruce, A.W.; Busscher, H.J.** (1993) Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and intestinal epithelial cells. *Microbios.* **75**: 57-65.
- Reniero, R.; Cocconcelli, P.; Bottazzi, V.; Morelli, L.** (1992) High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J. General Microbiol.* **138**: 763-768.
- Rodrigue, D.C.; Tauxe, R.V.; Rowe, B.** (1990) International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic?. *Epidemiol. Infect.* **105**: 21-27.
- Rodtong, S.; Tannock, G.W.** (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3480-3484.
- Rogosa, M.; Wiseman, R.F.; Mitchell, J.A.; Disraely, M.** (1953) Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. *J. Bacteriol.* **65**: 681-699.
- Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E.** (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33.
- Rosenberg, M.; Perry, A.; Bayer, E.A.; Gutnick, D.L.; Rosenberg, E.; Ofek, I.** (1981) Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infection and Immunity.* **33**: 29-33.
- Roussel, Y.; Colmin, C.; Simonet, J.M.; Decaris, B.** (1993) Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen & Moquot). *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 549-556.

- Saco, M.** (1993) Impedimetric detection of salmonella in poultry. Flair/Cost meeting. Bologna (Italia) 14-16 October. 33-37
- Salvat, G.; Lalande, F.; Humbert, F.; Lahellec, C.** (1992) Use of competitive exclusion product (Broilact) to prevent *Salmonella* colonization of newly hatched chicks. *Int. J. Food Microbiol.* **15**: 307-311.
- Sandine, W.E.** (1979) Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food. Prot.* **42**: 259- 262.
- Sandine, W.E.; Muralidhara, K.S.; Elliker, P.R.; England, D.C.** (1972) Lactic acid bacteria in food and health: a review with especial reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk and Food Tech.* **35**: 691-702.
- Sarra, P.J.; Trovatelli, L.D.** (1990) Probiótica y explotaciones ganaderas intensivas. *Mundo Ganadero.* **11**: 64-71.
- Sarra, P.G.; Badini, C.** (1997) Microflora ed esclusione competitiva nei volatili. *Rivista di avicoltura.* **6**: 29-36.
- Sarra, P.G.; Dellaglio, F; Bottazzi, V.** (1985 a) Taxonomy of lactobacilli isolated from the alimentary tract of chickens. *Systematic and Appl. Microbiol.* **6**: 86-89.
- Sarra, P.G.; Fulgoni, M; Bottazzi, V.** (1985 b) Caracteres de *Lactobacillus salivarius* capable de coloniser le jabot de poulet. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* **3**: 145-152.
- Sarra, P.G.; Morelli, L.; Bottazzi, V.** (1992) The lactic acid microflora of fowl. A: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* Ed. B.J.B. Wood. Elsevier Applied Science. 3-19.
- Savage, D.C.** (1983) Association of indigenous microorganisms with the gastrointestinal epithelial surfaces. A: *Humans intestinal microflora and disease.* Ed. D.J. Hentges. Ac. Press. 55-74.
- Savage, D.C.** (1986) Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* **6**: 155-178.
- Schillinger, U.; Lücke, F.K.** (1987) Identification of Lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* **4**: 199-208.
- Schillinger, U.; Lücke, F.K.** (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55 (8)**: 1901-1906.
- Schleifer, K.H.; Ludwig, W.** (1995) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Sppl. Microbiol.* **18**: 461-467.

Schleifer, K.H.; Ludwig, W.; Amann, R.; Hertel, C.; Ehrmann, M.; Köhler, W.; Krause, A. (1992) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria and their identification with nucleic acid probes. A: *Les bactéries lactiques. Actes du colloque LACTIC 91*. 23-32.

Schleifer, K.H.; Ehrmann, M.; Beimfohr, C.; Brockman, E.; Ludwig, W.; Amann, R. (1995) Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy. J.* **5**: 1081-1094.

Schmieger, H.; Schicklmaier, P. (1999) Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 251-256.

Schneitz, C.; Nuotio, L.; Lounatma, K. (1993) Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 290-294.

Severina, L.O. (1995) S-layers in bacteria. *Microbiology.* **64(6)**: 615-621.

Sharpe, M.E. (1962) Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Science Abstracts.* **24**: 109-118.

Sherman, L.A.; Savage, D.C. (1986) Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 302-304.

Shivaprasad, H.L.; Timoney, J.F.; Morales, S.; Lucio, B.; Baker, R.C. (1990) Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis.* **34**: 548-557.

Simonetti, P.; Mulas, N.; Cantoni, C. (1982) La inibizione di clostridi da lattobacilli spp. *Industrie Alimentaire.* **196**: 532.

Sleytr, U.B.; Messner, P. (1988) Crystalline surface layers in procaryotes. *J. Bacteriol.* **170**: 2891-2897.

Smith, H.W. (1965) Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Pathological Bacteriol.* **89**: 95-122.

Smyth, C.J.; Jonsson, P.; Olsson, E.; Söderlind, O.; Rosengren, J.; Hjertén, S.; Wadström, T. (1978) Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infect. Immun.* **22**: 462-472.

Sögaard, H.; Suhr-Jessen, T. (1990) Beyond lactic acid bacteria. *Feed International.* 32-37.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol. Biol.* **98**: 503-517.

- Spencer, R.J.; Chesson, A.** (1994) The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 215-220.
- Stackebrandt, E.; Teuber, M.** (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 317-324.
- Stahl, M.; Molin, G.; Persson, A.; Ahrne, S.; Stahl, S.** (1990) Restriction endonuclease patterns and multivariable analysis as a classification tool for *Lactobacillus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 189-193.
- Stavric, S.** (1987) Microbial colonization control of chicken intestine using defined cultures. *Food Technol.* **41**: 93-98.
- Stavric, S.** (1992) Defined cultures and prospects. *Int. J. Food Microbiol.* **15**:245-263.
- Stavric, S.; D'Aoust, J.Y.** (1993) Undefined and defined bacterial preparations for the competitive exclusion of *Salmonella* in poultry-a review. *J. Food Prot.* **56**: 173-180.
- Stavric, S.; Gleeson, T.M.; Blanchfield, B.; Pivnick, H.** (1985) Competitive exclusion of *Salmonella* from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from faecal and cecal contents of adult birds. *J. Food Prot.* **48**: 778-782.
- Stavric, S.; Gleeson, T.M.; Blanchfield, B.** (1991a) Efficacy of undefined and defined bacterial treatment in competitive exclusion of *Salmonella* from chicks. A: *Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry*. Ed. Blankenship: Academic Press. 323-330.
- Stavric, S.; Gleeson, T.M.; Blanchfield, B.** (1991b) Effect of avian intestinal microflora possessing adhering and hydrophobic properties on competitive exclusion of *Salmonella typhimurium* from chicks. *J. Appl. Bacteriol.* **70(5)**: 414-421.
- Stromberg, N.; Karlsson, K.A.** (1990) Characterization of the binding of *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104) and *Actinomyces viscosus* (ATCC 19246) to glycosphingolipids, using a solid-phase overlay approach. *J. Biol. Chem.* **265**: 11251-11258.
- Suegara, N.; Morotomi, M.; Watanabe, T.; Kawai, Y.; Mutai, M.** (1975) Behavior of microflora in the rat stomach: adhesion of lactobacilli to the keratinized epithelial cells of the rat stomach *in vitro*. *Infection and Immunity.* **12**: 173-179.
- Suzuki, S.** (1994) Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Int. J. Food Microbiol.* **21**: 89-105.
- Tannock, G.W.** (1990) The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract. A: *Advance in Microbial Ecology. Vol. II.* Ed. K.C. Marshall. Plenum Press.
- Tannock, G.W.; Szylit, O.; Duval, Y.; Raibaud, P.** (1982) Colonization of tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animals by lactobacillus strains. *Canadian J. Microbiol.* **28**: 1196-1198.

- Tannock, G.W.; Fuller, R.; Pedersen, K.** (1990) *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1310-1316.
- Teuber, M.** (1995) The genus *Lactococcus*. A: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Eds. Wood BJB and Holzapfel WH. Blackie Academic and Professional. London. 173-234.
- Teuber, M.; Meile, L.; Schwarz, F.** (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*. **76**: 115-137.
- Tilden, J.; Young, W.; McNamara, A.M.** (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American J. Public Health*. **86**: 1142-1145.
- Timoney, J.F.; Shivaprasad, H.L.; Baker, R.C.; Rowe, B.** (1989) Egg transmission after infection of hens with *S. enteritidis* PT4. *Vet. Rec.* **125**: 600-601.
- To, B.C.S.; Etzel, M.R.** (1997) Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J. Food Sci.* **62**:3, 576-578.
- Toro, C.** (1999) Problemática actual y futura derivada del nuevo escenario sobre el uso de antibióticos promotores en alimentación animal. A: *2ª Jornada nacional de alimentación animal sobre la nueva situación de los aditivos antimicrobianos: un reto para la ganadería*. Madrid.
- Tournut, J.** (1989) Applications of probiotics to animal husbandry. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **8**:2, 551-566.
- Tournut, J.** (1993) Practical use of probiotics in piglets and pigs. A: *EC Report: Microorganisms and enzyme preparations in animal nutrition*. Ed. J.R. Castanon. 77-86.
- Turnbull, P.C.B.; Snoeyenbos, G.H.** (1973) The roles of ammonia, water activity, and pH in the salmonellacidal effect of long used poultry litter. *Avian Dis.* **17**: 72-86.
- Tylewska, S.K.; Hjertén, S.; Wadström, T.** (1979) Contribution of M protein to the hydrophobic surface properties of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **6**: 249-253.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A.J.B.** (1987) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A.J.B.** (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**: 75-87.
- Vanbelle, M.; Teller, E.; Focant, M.** (1990) Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Anim. Nutr.* **40**: 543-567.

- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J.** (1996) Polyphasic approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.
- Vandevoorde, L.; Christiaens, H.; Verstraete, W.** (1992) Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 214-219.
- Van Oss, C.J.** (1978) Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 19-39.
- Vogel, R.F.; Böcker, G.; Stolz, P.; Ehrmann, M.; Fanta, D.; Ludwig, W.; Pot, B.; Kerster, K.; Schleifer, K.H.; Hammes, W.P.** (1994) Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 223-229.
- Wadstrom, T.; Anderson, K.; Sydow, M.; Axelsson, L.; Lindgren, S.** (1987) Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* **62**: 513-520.
- Waldroup, A.L.; Skinner, J.T.; Hierholzer, R.E.; Waldroup, P.W.** (1993) An evaluation of fructooligosaccharide in diets for broiler chickens and effects on salmonellae contamination of carcasses. *Poultry Sci.* **72**: 643-650.
- Watkins, B.A.; Kratzer, F.H.** (1983) Effect of oral dosing of *Lactobacillus* strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poultry Sci.* **62**:2088-2094.
- Watkins, B.A.; Kratzer, F.H.** (1984) Drinking water treatment with commercial preparation of a concentrated *Lactobacillus* culture for broiler chickens. *Poultry Sci.* **63**:1671-1673.
- Watkins, B.A.; Miller, B.F.** (1983) Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Sci.* **62**: 1772-1779.
- Watkins, B.A.; Miller, B.F.; Neil, D.H.** (1982) *In vivo* effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poultry Sci.* **61**: 1298-1308.
- Weinack, O.M.; Snoeyenbos, G.H.; Soerjadi-Liem, A.S.** (1985) Further studies on competitive exclusion of *Salmonella typhimurium* by lactobacilli in chickens. *Avian Dis.* **29**:1273-1276.
- Welsh, J.; McClelland, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.
- Wernars, K.; Boerlin, P.; Audurier, A.; Russell, E.G.; Curtis, G.D.W.; Herman, L.; van der Mee-Marquet, N.** (1996) The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Int. J. Food Microbiol.* **32**: 325-341.

Willshaw, G.A.; Thirwell, J.; Jones, A.P.; Parry, S.; Salmon, R.L.; Hickey, M. (1994) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef burgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 304-307.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

Wolter, R.; Henry, N. (1988) Bactéries lactiques et alimentation animale. *G.T.V.* **73**: 19-29.

Yakult Honsha Co. Ltd. (1971) A: *The summary of reports on Yakult*. Yakult Honsha Co., Ltd. Higashi-Shinbashi, Minato-ku. 1-19.

Yamamoto, K.; Miwa, T.; Taniguchi, H.; Nagano, T.; Shimamura, K.; Tanaka, T.; Kumagai, H. (1996) Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochemical and biophysical research communications.* **228**: 148-152.

Yeo, J.; Kim, K. (1997) Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Sci.* **76**: 381-385.

Zecha, B.C.; McCapes, R.H.; Dungan, W.M.; Holte, R.J.; Worcester, W.W.; Williams, J.E. (1977) The Dillon Beach Project- a five year epidemiological study of naturally occurring salmonella infection in turkeys and their environment. *Avian Dis.* **21**: 141.

Zeidler, G. (1996) How can food-borne microorganisms make you ill?. *World Poultry-Misset.* **12**: 10-11.

Ziprin, R.L.; DeLoach, J.R. (1993) Comparison of probiotics maintained by *in vivo* passage through laying hens and broilers. *Poultry Sci.* **72**: 628-635.