

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
AREA BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA
DEL CRECIMIENTO DE ENTEROPATÓGENOS POR
METABOLITOS EXCRETADOS EN CULTIVOS DE
PROPIONIBACTERIAS Y MUESTRAS AMBIENTALES.
I.I.F.B. LA PAZ –BOLIVIA”**

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE :
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**POSTULANTE : UNIV. CARLA BEGONIA CHAMBILLA
MAMANI**

ASESORES: Dra. MARIA TERESA ALVAREZ ALIAGA
BIOQUÍMICA Ph.D
Dr. LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES
BIOQUÍMICO Ph.D

LA PAZ - BOLIVIA

2012

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
AREA BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA**



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE
ENTEROPATÓGENOS POR METABOLITOS
EXCRETADOS EN CULTIVOS DE
PROPIONIBACTERIAS Y MUESTRAS
AMBIENTALES.
I.I.F.B. LA PAZ – BOLIVIA”**

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE :
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**POSTULANTE : UNIV. CARLA BEGONIA CHAMBILLA
MAMANI**

**LA PAZ - BOLIVIA
2012**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
AREA BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA**



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE
ENTEROPATÓGENOS POR METABOLITOS
EXCRETADOS EN CULTIVOS DE
PROPIONIBACTERIAS Y MUESTRAS
AMBIENTALES.
I.I.F.B. LA PAZ –BOLIVIA”**

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE :
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**POSTULANTE : UNIV. CARLA BEGONIA CHAMBILLA
MAMANI**

ASESORES: Dra. MARIA TERESA ALVAREZ ALIAGA
BIOQUÍMICA Ph.D
Dr. LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES
BIOQUÍMICO Ph.D

**LA PAZ - BOLIVIA
2012**

DEDICATORIA :

A Dios

Quién me ha dado la fuerza y valentía para afrontar retos de la vida, así mismo guiando y protegiendo mi camino, que lo lleno de mucho amor.

A mis papas y hermanos

Que con mucho esfuerzo han contribuido en mi formación profesional, depositando toda su confianza en mí, siempre

transmitiendome su amor , lealtad y valores que han guiado mi caminar.

Muchas Gracias por mantener la unidad , aún en las adversidades.

AGRADECIMIENTOS :

Siempre resulta complicado agradecer a cada una de las personas que me han brindado su apoyo incondicional, no solo para la realización del presente trabajo como el Dr. Luis Enrique Terrazas, sino tambien aquellas que han sido un pilar fundamental en todo el periodo de mis estudios, gracias Pao.

Por tanto son tantas las personas que estan implicadas y puedo cometer el error de omitir alguna de ellas , a cada

uno mil gracias y que Dios siempre cuide y proteja a su familia.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. OBJETIVOS	3
III.A. OBJETIVO GENERAL	3
III.B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
IV.A. LA MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	4
.....	
..... IV.A.1. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	
.....	6
IV.A.2. INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA MICROBIOTA INTESTINAL	7
IV.A.3. PAPEL FISIOLÓGICO Y CAPACIDAD METABÓLICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	9
IV.B. IMPLICACIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD	10
IV.B.1. INFECCIONES GASTROINTESTINALES	11
IV.B.1.a. Infecciones por microorganismos enteropatógenos	11
IV.B.1.b. Infecciones por Helicobacter pylori	11
IV.B.2. ENFERMEDADES DE BASE INMUNOLÓGICA	12
IV.B.2.a. Síndrome del intestino irritable	12
IV.B.2.b. Enfermedad inflamatoria intestinal	12

IV.B.2.c. Alergias o enfermedades atópicas.....	13
IV.B.3. CÁNCER DE COLON	13
IV.C. PROBIÓTICOS	14
IV.C.1. PROBIÓTICOS Y ALIMENTACIÓN FUNCIONAL	14
IV.C.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS	15
IV.C.3. MECANISMO DE ACCIÓN	16
IV.C.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS	17
IV.C.5. EL GÉNERO PROPIONIBACTERIAS	18
IV.C.5.a. Hábitat natural	19
IV.C.5.b. Actividades como probiótico.....	19
IV.C.5.c. Investigaciones actuales y futuras	21
IV.C.6. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS	22
IV.C.6.a. Efectos nutricionales	22
IV.C.6.b. Inmunomodulación	23
IV.C.6.c. Efectos terapéuticos	23
IV.C.6.d. Acción antagonista hacia microorganismos patógenos. .	24
IV.C.6.e. Estimulación de la inmunidad.....	25
IV.C.6.f. Neutralización de los productos tóxicos.....	26
IV.C.6.g. Lucha contra el estrés	26
IV.C.6.h. Protección contra las infecciones intestinales.....	27
IV.C.6.i. Protección del aparato urogenital	27
IV.C.7. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS	28
IV.D. BACTERIOCINAS	29
IV.D.1. BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS	29
IV.D.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN	29
IV.D.3. GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE BACTERIOCINAS	31
IV.D.4. SECRECIÓN Y MECANISMO DE AUTOPROTECCIÓN	33
IV.D.5. ESPECTRO Y MECANISMO DE ACCIÓN	34
IV.D.6. APLICACIONES ACTUALES Y POTENCIALES	37
IV.D.6.a. Industria alimentaria.....	37
IV.D.6.b. Biomédicas.....	38
V. MATERIALES Y MÉTODOS	41
V.A. MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
V.A.1. MICROORGANISMO	41

V.B. MEDIOS DE CULTIVO	41
V.B.1. ACTIVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	41
V.C. MÉTODOS	41
V.C.1. PROCESO FERMENTATIVO – CULTIVO BATCH	41
V.C.1.a. Determinación de la cinética de crecimiento.....	41
V.C.1.b. Determinación de la actividad antimicrobiana.....	42
V.C.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES	43
V.C.2.a. Medio Definido con relación a Oligoelementos , selenito y urea	43
V.C.2.B. Medio Definido con relación a Glucosa-urea y Lactosa-urea	43
V.C.3. CAPACIDAD DE COAGULACIÓN DE LA LECHE.....	44
VI. RESULTADOS	46
VII. DISCUSIÓN	59
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN :

El presente trabajo fue realizado en el instituto de Investigaciones FármacoBioquímicas (I.I.F.B.) área de Biotecnología microbiana de la ciudad de La Paz, periodo entre enero 2009 y enero del 2010. El objetivo fue determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de enteropatógenos, por metabolitos excretados en cultivos de propionibacterias y muestras ambientales (neonatos y de animales).

Se hizo uso de las bacterias: *Propionibacterium freudenreichii subs. shermanii* (DSM 4902) y *P. acidipropionici*. (DSM 4900) obtenidas comercialmente, cultivadas en tres medios a 37 °C a condiciones de anaerobiosis: medio definido, medio anaeróbico fluido y medio industrial. Para el estudio de la inhibición de cepas Propionibacterias (4900-4902) contra microorganismos enteropatógenos, se utilizó un ensayo de inhibición en placa con oradaciones. Una vez seleccionado el medio de cultivo, se

optimizaron las condiciones, modificando Oligoelementos, selenito y urea y otra Glucosa – urea y Lactosa – urea. Finalmente seseleccionó los microorganismos provenientes de las muestras ambientales con capacidad de coagulación de la leche.

Al variar los componentes del medio definido: Urea con 0.5 g/100 mL; Oligoelementos (Sol 2) 0.5 g/L y 1 g/L; finalmente Selenito (Sol. 3) 1.5 g/L y 1 g/L respectivamente para cada cepa, presentó crecimiento y actividad de inhibición mayor contra enteropatógenos. En la optimización del medio definido Glucosa- urea, el experimento 6 para la cepa *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y el experimento 5 de la cepa *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902) son las que presentaron un halo de inhibición frente los patógenos. Con relación a la optimización Lactosa- urea la actividad biológica se observó en el experimento 5 de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y experimento 1 de *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902). Finalmente las heces de bebe y leche materna presentaron actividad en los tres medios; las heces de burro, oveja y llama presentaron coagulación de la leche en medio anaeróbico fluido.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por el estudio de la microbiota intestinal humana, esto se debe a la existencia de una relación cada vez más clara entre los microorganismos del intestino y la salud, y por otro, por la posibilidad de modular o modificar esta microbiota mediante el consumo de probióticos, los cuales podrían prevenir las enfermedades gastrointestinales producida por el incremento de microorganismos patógenos. Por tal hecho se busca a partir de una bacteria generar un producto como lo es un probiótico, que mejora el equilibrio

microbiano intestinal, tienen efectos beneficiosos para el huésped y mejora las propiedades de la microflora en el tracto gastrointestinal.

Por tanto un microorganismo con la capacidad de probiótico tiene acción preponderante en conservar condiciones de permeabilidad, en interferir en la colonización de bacterias patógenas; que es atribuida a los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, proteínas bacteriales (bacteriocinas). Es así que son una buena alternativa natural y sin efectos secundarios para mejorar sensiblemente el funcionamiento intestinal y, por extensión, optimizar nuestra salud, la cual se ve afectada por el estrés, los malos hábitos alimentarios y el abuso de antibióticos, sólo algunos de los factores que pueden afectar negativamente el equilibrio de nuestra flora intestinal; los probióticos deben logrando llegar vivos al intestino delgado donde interaccionan con las bacterias de la microflora endógena, coloniza el intestino grueso y estabilizan la flora intestinal al adherirse a la mucosa del intestino para impedir la actividad de los microorganismos dañinos, tienen también propiedades inmunomoduladoras en la medida en que estimulan la producción de anticuerpos y refuerzan el sistema inmune.

En el presente trabajo se pretende determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de enteropatógenos por fermentos realizados en cultivos en Batch de cepas *Propionibacterium freudenreichii subs. shermanii* y *P. acidipropionici* con capacidad probiótica, y optimizar las condiciones de cultivo.

II. JUSTIFICACIÓN

La creciente necesidad de crear nuevas formas de prevenir las enfermedades gastrointestinales producidas por el incremento desmesurados de microorganismos patógenos que aquejan al ser humano, llevó a crear productos que contrarresten dicho problema, a partir de ciertos microorganismos como las cepas propionibacterias, que generan

un producto como lo es un probiótico o antimicrobianos que permiten inhibirlos.

El presente trabajo tiene como meta determinar la actividad controladora de cepas *Propionibacterium* sobre cepas de bacterias patógenas y de esta manera verificar el potencial probiótico de estas cepas.

En este sentido se harán pruebas de actividad biológica iniciando la fermentación de las cepas *Propionibacterium freudenreichii subs. shermanii* y *P. acidipropionici* que serán cultivadas a 37 °C a condiciones de anaerobiosis en medio definido, medio anaeróbico fluido y medio industrial de las cuales se medirán la cinética de crecimiento; posteriormente se realizará la optimización de condiciones de cultivo del medio definido con relación a la fuente de carbono: Glucosa – urea y Lactosa – urea (diseño Factorial) y, por último se medirá la actividad antimicrobiana.

Por otra parte se tomarán muestras ambientales para determinar la actividad probiótica contra patógenos, mediante la medición de la actividad antimicrobiana.

Finalmente el trabajo pretende dar luces a la búsqueda de nuevas moléculas que estuvieran involucradas en la producción de los antimicrobianos.

III. OBJETIVOS

III.A. OBJETIVO GENERAL.

Determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento de enteropatógenos por metabolitos excretados en cultivos de propionibacterias y muestras ambientales.

III.B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ❖ Determinar la actividad biológica de cepas *Propionibacterium*.
- ❖ Optimizar las condiciones de cultivo para la producción de moléculas involucradas en la actividad biológica.
- ❖ Aislar bacterias anaerobias con capacidad probiótica a partir de muestras ambientales.

IV. MARCO TEORICO

IV.A. LA MICROBIOTA DEL TRACTO GASTRO INTESTINAL (TGI).

La “flora normal” ha sido el término más comúnmente usado en la literatura médica durante décadas para referirse a las comunidades microbianas que habitan en el cuerpo del animal sano. Otros términos utilizados han sido el de “microflora autóctona” y más recientemente “microbiota normal”. Este último es el término más correcto ya que los términos “flora” y “microflora” tienen una desafortunada connotación botánica.

En el cuerpo humano se estima que hay más células microbianas que células eucariotas (10^{14} : 10^{13}) (Luckey, 1972). De entre las más de 400 especies descritas en el TGI, unas 30 o 40 representan el 99% de los microorganismos (Drasar y Barrow, 1985) y constituyen la **microbiota normal**, compuesta mayoritariamente por bacterias. La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI. Así, en el estómago, debido a la secreción de ácido gástrico, únicamente se desarrollan especies resistentes a pH ácido como estreptococos y lactobacilos (Macy y cols., 1978).

En el intestino delgado los niveles aumentan progresivamente, desde 10^4 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de contenido en la parte superior (duodeno), donde son mayoritarios nuevamente los lactobacilos y los estreptococos (Simon y Gorbach, 1982), hasta 10^8 ufc/g en la región distal del íleon. Las especies cultivables más numerosas en esta región son las bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides y fusobacterias (Croucher y cols., 1983; Nord y Kager, 1984).

Los principales factores limitantes para el establecimiento de los microorganismos en el intestino delgado son los movimientos peristálticos y la secreción de jugos pancreáticos y biliares. El mayor número de bacterias en el TGI humano reside en el intestino grueso, donde constituyen entre el 35 y el 50% del volumen del contenido sólido (Stephen y Cummings, 1980). En el colon existe un ambiente muy reductor y desprovisto de oxígeno por lo

que la mayoría de las poblaciones son **anaerobias estrictas** y constituyen lo que se denomina la **microbiota dominante**, caracterizada por concentraciones del orden de 10^9 - 10^{12} ufc/g.

Dentro de esta microbiota, el género *Bacteroides* (constituido por bacilos Gram-negativos no esporulados) es uno de los más abundantes (Tannock, 1995). También son dominantes otros microorganismos Gram-positivos no esporulados pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (Conway, 1995). Los bacilos Gram-positivos esporulados están representados esencialmente por los clostridios.

En concentraciones inferiores aparecen poblaciones de bacterias anaerobias facultativas como enterobacterias, enterococos, lactobacilos y estreptococos que constituyen la **microbiota subdominante**, con tasas comprendidas entre 10^5 y 10^8 ufc/g (Hagiage, 1994; Holzapfel y cols., 1998). En la Tabla 1 se representan los grupos microbianos habituales en heces humanas, los cuales se consideran un reflejo de la microbiota del colon.

Tabla 1. Microorganismos detectados comúnmente en heces humanas y su concentración.

Grupo microbiano	Número (ufc/g)
<i>Bacteroides</i>	10^9 - 10^{12}
<i>Bifidobacterias</i>	10^9 - 10^{11}
<i>Eubacterias</i>	10^9 - 10^{11}
<i>Peptoestreptococos</i>	10^9 - 10^{11}
<i>Peptococos</i>	10^9 - 10^{11}
<i>Ruminococos</i>	10^5 - 10^{11}
<i>Fusobacterias</i>	10^6 - 10^{10}
<i>Clostridios</i>	10^6 - 10^9
<i>Lactobacilos</i>	10^5 - 10^8
<i>Enterobacterias</i>	10^5 - 10^8
<i>Enterococos</i>	10^5 - 10^7

	10^3-10^5
	10^2-10^5
Estreptococos	$0-10^4$
Levaduras	
Estafilococos	

Compilado de Hagiage (1994), Cummings (1997), Holzapfel y cols. (1998) y Salminen y cols. (1998c).

IV.A.1. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La composición inicial de la microbiota del TGI se determina desde el nacimiento y depende fundamentalmente de dos factores: el tipo de parto y la alimentación (Fanaro y cols., 2003).

Si el parto se produce de forma natural, el TGI del recién nacido es colonizado por la microbiota vaginal y/o intestinal de la madre y por los microorganismos del ambiente (Ross y Needham, 1980; Rotimi y Duerden, 1981). Así, la microbiota intestinal inicial está formada por bacterias anaerobias facultativas; coliformes y estreptococos principalmente. Estas bacterias crean un ambiente reductor favorable para el desarrollo de los microorganismos anaerobios, de manera que las bifidobacterias pueden alcanzar al cabo de la primera semana de vida niveles de 10^8-10^{11} ufc/g de heces. Cuando el parto se produce por cesárea, el establecimiento de la microbiota normal se retrasa, ya que la colonización microbiana depende exclusivamente del medio externo. En este caso las poblaciones microbianas son diferentes a las que se desarrollan cuando el parto es natural, con un menor desarrollo de microorganismos anaerobios estrictos, sobre todo del grupo de los bacteroides (Grönlund y cols., 1999).

La alimentación es determinante también en la evolución de esta microbiota, tal y como se ha demostrado en estudios comparativos entre niños con alimentación materna y niños alimentados con leche de fórmula (Harmsen y cols., 2000a). En la microbiota de los primeros dominan las poblaciones de bifidobacterias, mientras que la presencia de clostridios y coliformes es mas baja. Por el contrario, los bebés alimentados con leche de

fórmula presentan una microbiota más compleja con presencia de bacteroides, bifidobacterias, clostridios, estreptococos y coliformes en proporciones similares (Kleessen y cols., 1995; Harmsen y cols., 2000a). Tras el destete, coincidiendo con la introducción de los suplementos alimenticios, se empieza a desarrollar una microbiota mucho más diversa. A

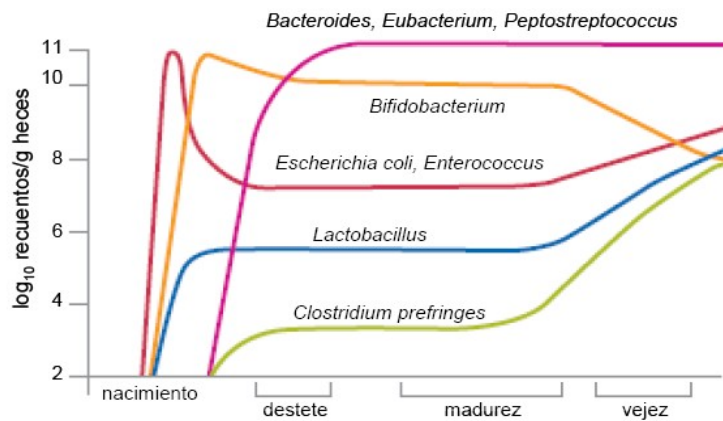
partir de los dos años, la microbiota del niño va evolucionando hacia la que será la microbiota del adulto. El número de bacteroides y cocos Gram-positivos anaerobios aumenta hasta incluso superar a las bifidobacterias, mientras que los coliformes y estreptococos disminuyen (Mackie y cols., 1999; Favier y cols., 2002).

Aunque la mayoría de los autores sostienen que el feto en el útero es estéril y la colonización del recién nacido se produce fundamentalmente por la microbiota del canal del parto, estudios recientes parecen apuntar a que la leche materna podría ser también una fuente de microorganismos (Martín y cols., 2004). Estos autores especulan sobre el posible paso de bacterias a través del epitelio intestinal de la madre hacia otras localizaciones como las glándulas mamarias, desde donde alcanzarían el intestino de los lactantes.

IV.A.2. INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La microbiota del TGI en el adulto constituye un equilibrio dinámico que puede variar entre los grupos humanos e incluso de persona a persona debido a diferencias específicas del hospedador como la edad, el estado de salud, la dieta, el estrés o la administración de antibióticos u otros medicamentos (Tannock, 1983; Miksuoka, 1992a).

La microbiota intestinal cambia con la edad, siendo distinta en la infancia y en la edad adulta. En la Figura 2 se muestra la evolución de los principales grupos microbianos intestinales desde el nacimiento a la vejez.



Tomado de Mitsuoka (1992a).

Figura 1. Evolución de la microbiota intestinal con la edad.

A lo largo de la vida el número de clostridios va aumentando mientras que la proporción de bifidobacterias disminuye. En la senectud es frecuente el aislamiento de *Clostridium difficile* y aparecen mayores niveles de mohos y enterobacterias en comparación con la microbiota de individuos jóvenes (Gorbach y cols., 1967; Mitsuoka, 1992a; Hopkins y cols., 2001).

La microbiota intestinal depende también de los substratos o nutrientes aportados por la dieta y están descritas grandes diferencias en la composición de la microbiota del TGI entre grupos humanos con hábitos alimenticios diferentes (Finegold y cols., 1977). Aunque la asociación entre el tipo de dieta y los distintos grupos microbianos aún no está clara, se han observado mayores niveles de bacteroides y clostridios y una menor presencia de bacterias lácticas en comunidades occidentales (con una ingesta alta en grasa y proteínas de origen animal y un bajo contenido en

fibra), en comparación con la microbiota de otras comunidades con dietas ricas en fibra como la orientales (Benno y cols., 1986).

Aunque los conocimientos actuales aún son escasos, existen evidencias de que el genoma del hospedador puede ser un factor modulador de la composición de la microbiota gastrointestinal (Zoetendal y cols 2001; Toivanen y cols., 2001).

IV.A.3. PAPEL FISIOLÓGICO Y CAPACIDAD METABÓLICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

Muchas de las características bioquímicas y fisiológicas del hospedador están influenciadas por la presencia de microorganismos en el TGI (Guarner y Malagelada, 2003). La microbiota normal afecta a la estructura anatómica y fisiológica del intestino, aumentando la superficie de absorción y promoviendo la renovación de las células de las vellosidades. Además los microorganismos del TGI aumentan el contenido intraluminal y aceleran el tránsito intestinal. Se ha postulado incluso que los microorganismos interactúan con el hospedador modulando la expresión de genes relacionados con diversas funciones intestinales (Hooper y cols., 2001).

Los microorganismos constituyen un enorme potencial enzimático en el intestino, desempeñando una amplia variedad de funciones metabólicas. Una de las más importantes es la hidrólisis o degradación de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas, lípidos). A través de este proceso se obtiene energía y nutrientes, tanto para los propios microorganismos intestinales como para el hospedador. La fermentación de los carbohidratos resulta en una disminución del pH y la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).

Los SCFAs más abundantes en el intestino son el acético, el butírico y el propiónico y tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del TGI (Cummings, 1997). La mayor parte de los SCFAs producidos en el colon se absorben en la mucosa. El epitelio del colon consume casi por completo el

butirato formado, constituyendo la principal fuente de energía para los colonocitos. El butirato se ha relacionado también con la reversión de células neoplásicas, pudiendo participar en la prevención de procesos cancerígenos (Gibson y cols., 1992). El acetato y el propionato, por su parte, pasan a la circulación portal y se consumen en el hígado o en los tejidos periféricos. La degradación de las proteínas por la microbiota (putrefacción) también genera SCFAs, pero produce al mismo tiempo una serie de compuestos secundarios potencialmente tóxicos como aminas, amonio, fenoles, tioles e indoles (Rowland, 1995).

La capacidad metabólica de estos microorganismos incluye también la degradación de determinados compuestos tóxicos, favoreciendo de esta manera la eliminación de sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas (Parodi, 1999). En otras ocasiones, el metabolismo bacteriano puede dar lugar a la formación de metabolitos más tóxicos que los compuestos originales (Macfarlane y Macfarlane, 1997).

Los microorganismos en el intestino pueden participar igualmente en la síntesis de vitaminas y favorecer la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro (Miyazawa y cols., 1996).

En el intestino delgado el ambiente es fundamentalmente oxigénico y la mayoría de las reacciones microbianas son hidrolíticas. Por el contrario, el intestino grueso es anóxico y las reacciones bioquímicas son normalmente reductoras, aunque existen grandes diferencias en función de la sección del colon. Los productos de la fermentación de carbohidratos (SCFAs, gases y etanol) están presentes en altas concentraciones en el ciego y colon ascendente, donde la disponibilidad de sustratos es mayor. Por el contrario, los productos de la degradación de proteínas (amonio, ácidos grasos de cadena ramificada, compuestos fenólicos y sulfurados volátiles) se producen fundamentalmente en el colon descendente (Macfarlane y cols., 1992).

IV.B. IMPLICACIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD.

La microbiota intestinal tiene gran importancia médica ya que las bacterias pueden influir de forma beneficiosa o dañina sobre la salud del hospedador. Entre los posibles efectos perjudiciales podemos incluir infecciones intestinales, infecciones extraintestinales y carcinogénesis.

En condiciones normales el ecosistema intestinal está en equilibrio y los microorganismos perjudiciales no ejercen su poder patógeno; sin embargo, en determinadas situaciones, éstos pueden dar lugar a infecciones y enfermedades nosocomiales si se establecen en regiones del cuerpo en las que no son residentes habituales, o cuando su número se incrementa de forma excesiva debido a perturbaciones del ecosistema intestinal. Entre los miembros de la microbiota anaerobia estricta, *Bacteroides fragilis* es el que con más frecuencia causa infecciones y sepsis a partir de contaminación fecal; mientras que *Escherichia coli*, la bacteria anaerobia facultativa cultivable más frecuente en heces, es la causa más habitual de infecciones del tracto urinario (Sobel y Kaye, 1995).

IV.B.1.INFECCIONES GASTROINTESTINALES.

IV.B.1.a.Infecciones por microorganismos enteropatógenos. Un porcentaje importante de los viajeros que visitan áreas geográficas de alto riesgo infeccioso desarrollan diarreas agudas, denominadas diarrea del viajero. La causa de la mayor parte de estas diarreas es una infección por *E. coli* o diversas especies de shigelas y salmonelas. Infecciones por rotavirus. Las infecciones por rotavirus son la mayor causa de las diarreas graves durante la infancia y la adolescencia. Desde el punto de vista clínico, la mucosa intestinal se ve afectada y se modifica la composición de la microbiota intestinal, lo que da lugar a un episodio de diarrea osmótica seguida de un crecimiento excesivo de alguna de las poblaciones bacterianas no dominantes.

Uno de los desórdenes intestinales más importantes y mejor documentados es la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos. La incidencia de esta diarrea se sitúa entre un 5 y un 25% de los casos de la

terapia antibiótica, siendo mucho más frecuente cuando se utilizan antimicrobianos de amplio espectro. El tratamiento con antibióticos perturba el balance de la microbiota intestinal normal permitiendo la proliferación de patógenos emergentes como *Clostridium difficile*, causante de la colitis pseudomembranosa que se produce entre el 10 y el 20% de estas diarreas (Bergogne-Bérézin, 2000).

IV.B.1.b. Infecciones por *Helicobacter pylori*. *H. pylori* es una bacteria espiral Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica humana. Este microorganismo se ha asociado con el desarrollo de gastritis crónicas, úlceras pépticas y cáncer gástrico. Uno de sus principales factores de patogenicidad es la presencia de la enzima ureasa que hidroliza la urea generando amonio, de forma que el pH local aumenta y se favorece la colonización y la proliferación del microorganismo (Malfertheiner y cols., 2002).

IV.B.2. ENFERMEDADES DE BASE INMUNOLÓGICA.

En las sociedades desarrolladas, la incidencia de alergias y de algunas enfermedades con componentes autoinmunes ha crecido de modo importante durante la segunda mitad del siglo XX. La hipótesis de la higiene excesiva sugiere que la falta de exposición a agentes bacterianos en las edades tempranas de la vida podría estar en la base de la creciente aparición de disfunciones del sistema inmunológico. En la actualidad numerosos estudios tratan de clarificar y establecer las posibles relaciones de los microorganismos o sus productos con los trastornos gastrointestinales no infecciosos.

IV.B.2.a. Síndrome del intestino irritable. Una de las causas más comunes de problemas gastrointestinales es el síndrome del intestino irritable. La enfermedad se caracteriza por una alteración de la actividad motora en todo el intestino, aunque gran parte de los síntomas se sitúan en el colon. La prevalencia de esta patología en países industrializados se ha estimado en torno a un 10% de la población (Camilleri,

2001). Su etiología es hasta el momento desconocida, pero aparece con frecuencia después de una gastroenteritis o tras el tratamiento con antibióticos, por lo que se ha asociado con alteraciones en la microbiota intestinal. La hipersensibilidad a alimentos, variables psicosociales como el estrés o defectos en neurotransmisores han sido propuestos también como posibles factores que favorecerían su desarrollo o su sintomatología (Horwitz y Fisher, 2001).

IV.B.2.b. Enfermedad inflamatoria intestinal:

enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una patología crónica que afecta al colon y/o al intestino delgado. Dentro de este término se engloban dos enfermedades comunes que afectan al 0,1% de la población en las sociedades occidentales y que presentan una incidencia en aumento: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

La etiología es todavía poco clara, aunque en ambos casos parece demostrado que el sistema inmune reacciona de manera anormal contra algunos componentes de la microbiota intestinal. Se ha comprobado en ratones que la colonización intestinal por bacterias anaerobias, especialmente del género *Bacteroides*, podría promover la producción de citoquinas proinflamatorias que median el desarrollo de una colitis crónica semejante a la humana (Hata y cols., 2001). Además, en algunos pacientes con EII se ha encontrado una significativa producción sistémica de anticuerpos contra *Bacteroides ovatus* (Horwitz y Fisher, 2001).

IV.B.2.c. Alergias o enfermedad atópica. La alergia o enfermedad atópica en sus distintas formas de presentación (eczema atópico, rinitis alérgica o asma) es una disfunción crónica de importancia creciente en los países desarrollados. La dermatitis atópica afecta en la actualidad al 15-20% de los niños. Estudios poblacionales recientes parecen indicar que una exposición adecuada a los microorganismos en las primeras etapas de la vida protege contra diversos episodios alérgicos (Kirjavainen y

Gibson 1999). Esto sería debido al papel crucial que las bacterias intestinales tienen en la maduración del sistema inmune.

IV.B.3. CÁNCER DE COLON.

En el desarrollo de cáncer de colon parecen estar implicados factores de interacción entre la microbiota colónica, la dieta y el epitelio del colon (Moore y Moore, 1995). Diversos estudios llevados a cabo con modelos animales han asociado algunos tipos de tumores con ciertas actividades enzimáticas de las bacterias intestinales. Algunas de las enzimas bacterianas implicadas en la generación de mutágenos, carcinógenos y promotores de tumores son: la β -glucuronidasa, la β -glucosidasa, la nitrorreductasa y la azorreductasa (Rowland, 1995). Por el contrario, se ha observado que el butirato producido por ciertas poblaciones intestinales es un inductor de la diferenciación celular y en varios estudios se ha relacionado con la reversión de células neoplásicas en el colon (Gibson y cols., 1992). De esta forma el efecto protector de la fibra dietaria en el cáncer de colon se asocia con una mayor producción de butirato

IV.C. PROBIÓTICOS

IV.C.1. PROBIÓTICOS Y ALIMENTACIÓN FUNCIONAL.

Hasta finales del siglo XX, la meta en la alimentación humana era asegurar un aporte adecuado de energía y de macro y micronutrientes en la dieta. Hoy en día está naciendo un nuevo concepto de nutrición, que procura, además de los objetivos tradicionales, la promoción de la salud y el bienestar y la prevención de las enfermedades. En este contexto, aparecen los **alimentos funcionales**, una de cuyas definiciones más aceptadas es la de aquel “alimento modificado o ingrediente alimentario que provee un beneficio para la salud además de satisfacer los requerimientos nutritivos tradicionales” (Sanders, 1998). El concepto de alimento funcional incluye que su ingesta se efectúe como componente habitual de la dieta y que éste ejerza sus efectos en las cantidades ingeridas normalmente en una dieta

equilibrada. Dentro de los alimentos funcionales tienen un papel destacado, y en general bien reconocido, los probióticos y los prebióticos.

Los **prebióticos** son ingredientes alimenticios no asimilables por nuestro organismo que promueven la proliferación selectiva de bacterias intestinales beneficiosas (Gibson y Roberfroid, 1995). Fructooligosacáridos, inulina, lactulosa y galactooligosacáridos son algunas de estas sustancias. Es decir son activos una vez que colonizan el intestino, esto a diferencia de los probióticos, los cuales estimulan la acción bacteriana, o los simbióticos (asociados a ambas categorías). El término *prebiótico* se refiere a los ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos beneficiosos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon. Esta definición se solapa en parte con la definición de fibra dietética, aunque añade la selectividad de los prebióticos sobre ciertos microorganismos en concreto (por ejemplo, la ingestión de fructooligosacáridos y la inulina favorecen a las bifidobacterias de forma selectiva) (Schrezenmeir, 2001).

Los **probióticos** son alimentos o suplementos alimenticios con bacterias vivas que contribuyen a mantener el equilibrio microbiano del TGI (Fuller, 1989). Una definición más precisa dice que éstos son “microorganismos vivos que, tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos beneficiosos en el hospedador más allá de los inherentes a la nutrición básica”. Recientemente Schrezenmeir y de Vrese (2001) han redefinido el concepto, puntualizando que un probiótico es “un preparado o producto que contiene microorganismos definidos, viables y en número suficiente para modificar la microbiota de un ecosistema del hospedador ejerciendo como consecuencia efectos beneficiosos sobre la salud”.

Actualmente el término *probiótico* hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para alterar la microflora en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización) y que produce efectos beneficiosos en dicho huésped. La definición incluye bien productos que contienen microorganismos (por ejemplo, leches fermentadas) o un preparado de microorganismos (por ejemplo, comprimidos o polvos). La OMS propone una definición más simple y se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO/WHO. 2007).

En la actualidad existe en el mercado una importante y variada oferta de productos suplementados con prebióticos y/o probióticos. El principal vehículo de administración de éstos son los productos lácteos, especialmente las leches fermentadas, aunque se pueden encontrar en muchos otros productos como helados, quesos, embutidos, zumos e incluso bizcochos, chocolate o cereales.

IV.C.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico tiene que poseer características tales como:

1. Ser habitante normal del tracto gastrointestinal humano.
2. No ser patógeno, ni tóxico.
3. Tener un tiempo corto de reproducción
4. Ser estables al contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno.
5. Tener habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
6. Mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal humano.
7. Producir sustancias antimicrobianas. (Isolauri E, Arvola T. 2001).

IV.C.3. MECANISMOS DE ACCIÓN

Se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos.

1. Producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Rolfe, 2000).

En la industria alimenticia las BAL son utilizadas como conservadores biológicos por la producción de bacteriocinas que ejercen acción antibacteriana y contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.

2. Disminuyen el pH intestinal favoreciendo el crecimiento de organismos beneficiosos.

3. Aumentan la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal. Algunas cepas han sido escogidas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus spp.*

4. Compiten por nutrientes. Las bacterias ácido lácticas pueden utilizar los nutrientes consumidos por organismos patógenos.

5. Estimulan la respuesta inmune. Evidencias recientes sugieren que la estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra la enfermedad intestinal.

Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando macrófagos e incrementando interferón gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias (Isolauri, 2000).

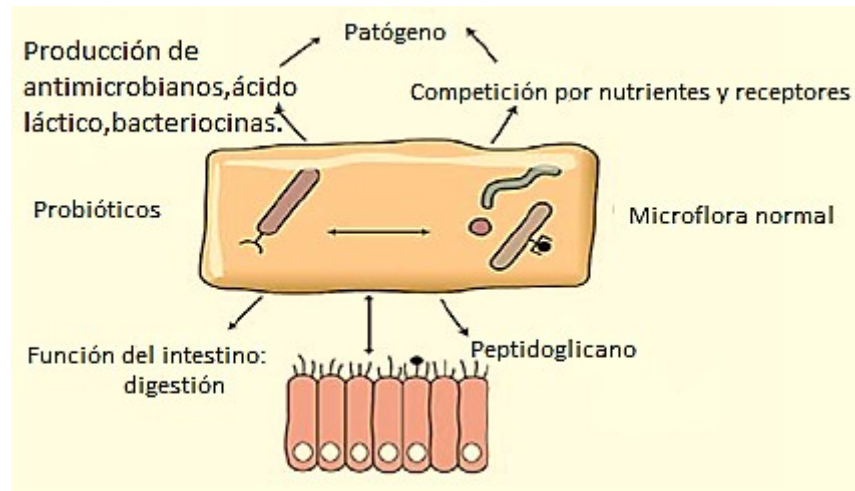


Figura 2. La flora (microbiota) normal y los probióticos interactúan con el huésped en actividades metabólicas y la función inmunológica e impide la colonización de microorganismos oportunistas y patógenos.

Es así que probiótico corresponde a un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped provocando efectos benéficos sobre la salud del mismo.

IV.C.4.MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS.

El espectro de microorganismos utilizados como probióticos en humanos es muy amplio e incluye especies de muchos géneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunas levaduras del género *Saccharomyces*. En la Tabla 2 se muestran algunos de los microorganismos empleados de forma habitual como probióticos.

IV.C.5.EL GÉNERO PROPIONIBACTERIAS

Las bacterias propiónicas se caracterizan por su capacidad de producir ácido propiónico, y por este motivo son muy utilizadas en el sector quesero.

El *Propionibacterium schermani* puede producir vitamina B12 y acumular prolina en el medio donde crece. Esta subespecie se caracteriza además por la capacidad de fermentar la lactosa. Por este motivo se recomienda su administración a los sujetos que presentan intolerancia hacia la lactosa (TuohyKM, Probert HM. 2003).

Las Propionibacterias son gram-positivas, no móviles, no formadores de esporas, anaeróbicas, aerotolerantes, pleomórficas (cocoides,ramificado) y mesófilos. Pertenecen a la clase de Actinobacteria, y el orden de Actinomycetales. El género *Propionibacterium* se divide en "Cutánea" y propionibacterias "productos lácteos". Esta cepa pertenece a los productos de bacterias lácteas, el crecimiento más rápido a 30 ° C en condiciones anaerobias y forma de la colonia en el extracto de levadura de un medio de agar lactato en 5-6 días.

El género *Propionibacterium* se divide en ocho especies. Cuatro han sido aisladas de piel humana y generalmente no se encuentra en la leche. Las otras cuatro especies, la llamada propionibacterias "industria láctea",y son *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* y *P. acidipropionici* (Tannock GW. 1999).

Las cepas de *P. acidipropionici* y *P. jensenii* aislados de las aceitunas en mal estado. En el rumen, *Propionibacterium sp.* son, junto con otras especies responsables de la descomposición de urea y la liberación de amoníaco(ShahNP. 2000).

Para la industria láctea la diferencia es importante: *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* no crece en la lactosa, mientras que *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* sí. La diferenciación de *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* y *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* sobre la base de reducción de nitratos y fermentación de la lactosa puede ser significativo para la industria láctea, pero cuestionables en el nivel genético, ya que Johnson y Cummins reportaron un ADN de alta homología entre las dos subespecies (Isolauri, 2000).

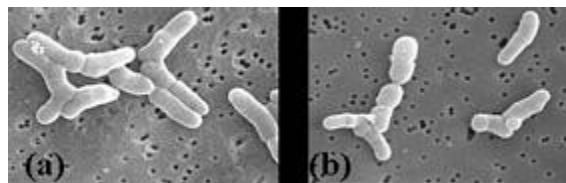


Figura 3. Morfología de *Propionibacterium freudenreichii* en condiciones normales (a), y el mismo en condiciones ácidas (b).

IV.C.5.a. HÁBITAT NATURAL



Figura 4. Producción de queso a través de *Propionibacterium freudenreichii*.

Propionibacterias lácteas son comúnmente encontradas en la leche y productos lácteos, pero también se han aislado del suelo, forraje ensilado, salmueras para la fermentación de oliva y las destilerías de ron (Cummins & Johnson, 1997).

IV.C.5.b. ACTIVIDADES COMO PROBIÓTICOS

El queso Emmental, que es el primero en Francia en términos de producción, alrededor de 250.000 toneladas se generan por año. Hay mil millones de células vivas de *Propionibacterium freudenreichii* en gramo de queso. La propionibacteria va creciendo durante la maduración en la "cálida" temperatura (24 ° C), lactato y la efervescencia de acetato, propionato y CO₂ con un metabolismo original. El Propionato y acetato contribuyen en el dulce sabor del queso, mientras que el CO₂ está en la formación de los ojos característico de este tipo de quesos. Su participación en la degradación de las proteínas es baja en comparación con la de las bacterias ácido lácticas utilizadas como cultivos iniciadores (GuarnerF, 1998).

La producción comercial es llevada a cabo por síntesis química de materias primas del petróleo (Fuller , 1989), pero la fermentación es una ruta alternativa atractiva para producir este ácido a partir de recursos renovables. Varias fuentes de carbono se han utilizado para este proceso de fermentación como la glucosa, xilosa, maltosa, sacarosa, el ácido láctico y el suero lactoso (GuarnerF,1998). No obstante, la competitividad en la producción de ácido propiónico a partir de carbohidratos puede ser limitada tanto por el bajo rendimiento de ácido propiónico y el alto nivel de co productos como el ácido acético.

Hay un interés reciente y creciente en el potencial de estas bacterias probióticas. Además de la producción de vitamina B12 y la inhibición de la microflora indeseable en alimentos fermentados mediante la liberación de ácidos orgánicos y bacteriocinas, se demostró que modulan la flora beneficiosa, tanto en el colon de animales (IshibashiN,2001) y humanos, principalmente mediante la mejora de la población de las bifidobacterias indígenas. En el ganado, que causan un mejor aprovechamiento de forrajes y estimulan el crecimiento (MarteauP, 2001). Curiosamente se adaptan eficientemente a tensiones digestivas y se adhieren a las células epiteliales intestinales y al moco intestinal. Los datos recientes sugieren que los productos lácteos con propionibacterias puede tener un papel en la

prevención del cáncer de colon. Esto es consistente con su capacidad para reducir la actividad enzimática, involucradas en la carcinogénesis y para inducir la apoptosis de las células de carcinoma colorrectal a través de ácidos grasos de cadena corta que actúan sobre las mitocondrias de células del cáncer.

En contraste, *P. freudenreichii* juega un papel importante en la formación de compuestos aromáticos: los ácidos grasos libres derivados de la lipólisis y los compuestos de cadena ramificada derivados de isoleucina y catabolismo de leucina.

La actividad lipolítica de propionibacterias es de unos 100 veces mayor que el de las bacterias del ácido láctico (IshibashiN, 2001). Propionibacteria lipasa (s) y esterasa (s) son un foco de la equipo microbiología.

IV.C.5.c.LAS INVESTIGACIONES ACTUALES Y FUTURAS

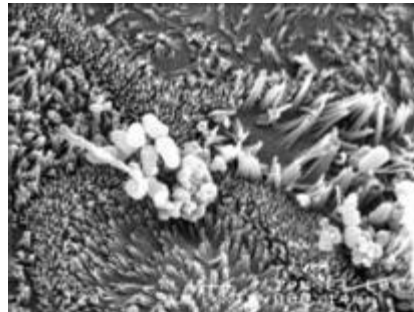


Figura 5. La interacción entre las células del colon humano en cultivo (Caco-2) y bacterias propiónico lácteos (*Propionibacterium freudenreichii*) observada con un microscopio electrónico de barrido.

- 1.- Organización del Genoma.
- 2.-La anotación completa del genoma.
- 3.- Comparación genómica con *Propionibacterium acnes* (especies patógenas cutáneo)

4.- Desarrollo demicroarrays de ADN

5.- Desarrollo de herramientas genéticas.

6.- Adaptación al estrés (bilis, ácido, sal, el hambre) por enfoques genómicos, proteómicos y transcriptómica.

IV.C.6. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS.

Son muchos los efectos beneficiosos sobre la salud de los microorganismosprobióticos que están bien documentados científicamente (Ouwehand y cols., 2002). Entre los principales podemos citar sucontribución metabólica, la inhibición de patógenos y la inmunomodulación. Se conocepoco, sin embargo, de los mecanismos moleculares a través de los cuales proveen lasacciones favorables (Hooper y Gordon, 2001).

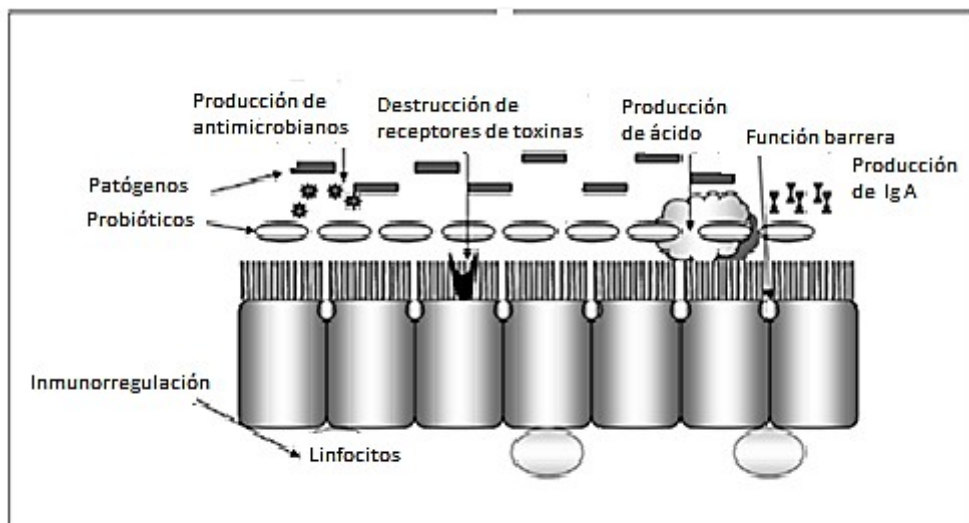


Figura 7. Mecanismos de actividad probiótica.

IV.C.6.a. EFECTOS NUTRICIONALES.

Entre los beneficios nutricionales imputados al consumo de probióticos en productos lácteos se incluye el aumento de la absorción de minerales como el calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo, debido a que la acidez del medio facilita la ionización de éstos y la formación de sales solubles asimilables. Igualmente, por la acción microbiana aumenta la

digestibilidad de la proteína del yogurt y la bio-disponibilidad de vitaminas como la riboflavina, haciendo estos nutrientes más fácilmente utilizables (Ortega y cols., 2002).

El consumo de bacterias probióticas también contribuye, mediante la producción de enzimas específicos, al aprovechamiento de otros nutrientes en el intestino. Muchas bifidobacterias poseen glicosidasas con capacidad para metabolizar carbohidratos no digeribles de la dieta. La degradación de estos compuestos, en su mayor parte oligosacáridos, da lugar a la producción de SCFAs (Cumplings y cols., 2001).

Debido a la capacidad de desconjugación de sales biliares que poseen algunas de estas bacterias, se ha postulado que los probióticos podría estimular el catabolismo del colesterol reduciendo la colesterolemia (Tahri y cols., 1995).

IV.C.6.b. INMUNOMODULACIÓN.

La microbiota intestinal normal a través del contacto y la interacción con el tejido linfoide de la mucosa intestinal desempeña un papel fundamental en el desarrollo y maduración del sistema inmune competente (Noverr y Huffnagle, 2004).

El carácter inmunomodulador de los probióticos hace referencia a un amplio espectro de efectos sobre la inmunidad celular y humoral (Borrueal, 2003). Ciertos probióticos son capaces de aumentar la inmunidad innata, por ejemplo mediante un incremento de la capacidad fagocítica (Gill y cols., 2001). Adicionalmente, se ha descrito que los probióticos pueden producir una estimulación de la inmunidad adquirida o específica induciendo la producción de inmunoglobulinas específicas del tipo A, que son las que defienden las mucosas. En otras situaciones patológicas hay evidencias de que los probióticos pueden inducir efectos opuestos, como la inhibición de reacciones de hipersensibilidad o reducción de alergias (Kalliomäki y cols., 2001).

IV.C.6.c EFECTOS TERAPÉUTICOS.

Entre los beneficios terapéuticos atribuidos a los probióticos mejor documentados se encuentran la mejora de la digestión de la lactosa en personas con intolerancia a este disacárido, la inhibición de patógenos en el intestino y el tratamiento y la prevención de la diarrea (Guarner y Malagelada, 2003).

Una gran parte de la población mundial presenta bajos niveles de lactasa (β galactosidasa) en la mucosa intestinal. Las personas con esta deficiencia no absorben la lactosa en el intestino delgado y su fermentación en el colon provoca diversas molestias. Las bacterias del yogurt poseen los enzimas necesarios para digerir la lactosa, de forma que en numerosos estudios se ha demostrado la eficacia del consumo de yogures y otros probióticos en el tratamiento de la sintomatología de esta disfunción intestinal (Jiang y cols., 1996).

Mediante estudios clínicos se ha demostrado también la utilidad los probióticos en la prevención y el tratamiento de diversos tipos de diarreas. Los trabajos publicados se refieren sobre todo a diarreas infantiles por rotavirus, pero también se ha comprobado una reducción en la frecuencia y duración de otras diarreas infecciosas, como la diarrea del viajero o la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos (Vanderhoof y cols., 1999).

Recientemente se han comenzado a realizar estudios sobre el tratamiento con probióticos de otras alteraciones intestinales como las enfermedades inflamatorias (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), el cáncer colorrectal o las gastritis crónicas y las úlceras gástricas causadas por *H. pylori* (Sheu y cols., 2002); aunque no en todos los casos se ha podido demostrar de forma clara su papel bioterapéutico.

VI.C.6.d.ACCION ANTAGONISTA HACIA MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La acción más importante de la microflora digestiva es sin duda la de proteger frente a las infecciones y la de la colonización, por parte de gérmenes patógenos, del tubo digestivo.

Los distintos mecanismos que forman la primera línea de defensa del huésped de las infecciones intestinales se llaman resistencia a la colonización, exclusión competitiva o efecto barrera (RolfeRD.2000).

La represión de los microorganismos patógenos se puede dar de distintos modos (RolfeRD.2000):

- la producción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o acético, a partir de los glúcidos provenientes de los alimentos actúa bajando el pH y limitando el desarrollo de *Escherichia coli* y de las salmonelas. Además, la acidificación del tubo digestivo parece favorecer los movimientos peristálticos del intestino;
- parece que los probióticos pueden reprimir el crecimiento de las bacterias patógenas; esto sucedería gracias a la producción de sustancias antimicrobianas del tipo de la bacteriocina, que inhibe los gérmenes que a menudo causan las infecciones.

Algunas bacterias utilizadas tienen la capacidad de desconjugar las sales biliares: las formas desconjugadas poseen una capacidad de inhibición mayor sobre el desarrollo de las bacterias que las formas conjugadas (ReidG, Jass J. 2003).

Las bacterias probióticas podrían actuar también inhibiendo el arraigo de los gérmenes patógenos gracias a la competición para la colonización. La adherencia de los probióticos a las células intestinales permitiría una colonización rápida y focalizada del tubo digestivo. El establecimiento de gérmenes indeseables se podría evitar también gracias a una inhibición competitiva de los probióticos gracias al consumo de los nutrientes en lugar de las bacterias patógenas (PridmoreRD, Berger B. 2004).

VI.C.6.e. ESTIMULACION DE LA INMUNIDAD

Parece que las bacterias tienen una acción estimulante sobre el sistema inmunitario del huésped, ya que actúan tanto sobre las células implicadas en la inmunidad natural como en las relacionadas con la inmunidad específica. Parece que los probióticos estimulan la actividad de los macrófagos. Todavía no conocemos los mecanismos. Sin embargo, sabemos que sólo las bacterias capaces de sobrevivir en el segmento gastrointestinal pueden actuar sobre la activación de los macrófagos. Además, parece que la presencia de los microorganismos probióticos favorece la reproducción de anticuerpos, especialmente las IgA secretoras en el lumen intestinal. Las IgA pueden inhibir la adherencia de las bacterias patógenas a la superficie de las mucosas (Ouwehand AC, Salminen S. 2002):

- Causando la aglutinación de las bacterias.
- Fijándose en las adhesinas, o sea sobre los factores de adherencia presentes en la superficie de las bacterias
- Interfiriendo con las interacciones adhesinas/receptores celulares.

Gracias a su acción sobre el sistema inmunitario, las bacterias lácticas se podrían utilizar con fines de prevención contra las infecciones intestinales, como protección contra daños relacionados con el sistema inmunitario, como inmunomoduladores.

IV.C.6.f. NEUTRALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS TÓXICOS

La inactivación de los compuestos tóxicos gracias a las bacterias lácticas representa otro aspecto muy importante de la acción probiótica y terapéutica de las mismas. Parece que los probióticos atenúan el catabolismo intradigestivo, orientando la función hepática (Ortega RM, Requejo AM. 2002). Se pueden acumular en la microflora intestinal para reducir la absorción de sustancias tóxicas como el amoníaco, los aminados y el indol; parece también que disminuyen la biotransformación de las sales

biliares y de los ácidos grasos en productos tóxicos (MishraCh, Lambert J. 1996).

IV.C.6.g. LUCHA CONTRA EL ESTRÉS

El estrés es uno de los factores que influyen en la variación de la microflora digestiva. El estrés produce una alteración de la fisiología general y, por lo tanto, también de la del aparato digestivo. Cualquier situación de estrés, independientemente de su naturaleza (emociones, frío, cansancio psicofísico), produce un aumento de los movimientos peristálticos y de las secreciones de HCl y de mucus a nivel del tracto digestivo. Como consecuencia, se modifican la microflora y las actividades que dependen de ella (OuwehandAC, Salminen S. 2002).

IV.C.6.h. PROTECCIÓN CONTRA LAS INFECCIONES INTESTINALES

Muchas investigaciones han demostrado que las bacterias lácticas pueden ejercer una actividad antimicrobiana sobre algunos componentes patógenos de la flora intestinal. La actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas se debe a la acumulación de bacteriocinas, antibióticos, agua oxigenada, ácido láctico y ácido benzoico. Beck y Nechelles han obtenido resultados significativos, con el control de distintos tipos de diarreas en el hombre. Las bacterias lácticas constituyen un verdadero antídoto eficaz contra las infecciones entéricas, cuya frecuencia actualmente está aumentando en los turistas y en las personas que viajan.

IV.C.6.i. PROTECCIÓN DEL APARATO UROGENITAL

El aparato urogenital de la mujer sana es un ecosistema caracterizado por una flora microbiana compleja, cuyo equilibrio sufre numerosas fluctuaciones. Desde los primeros estudios, se reconocieron los lactobacilos como la especie dominante en la microflora vaginal normal en la adolescencia. El predominio de los lactobacilos en el aparato urogenital de

los sujetos sanos (> del 90% de los sujetos tratados) se ha relacionado al efecto de protección que éstos ejercen contra la invasión de las cavidades del cuerpo por parte de microorganismos patógenos, tanto endógenos como exógenos (MishraCh, Lambert J. 1996).

El estudio comparado de la microflora urogenital de las mujeres en buenas condiciones de salud y de las mujeres con infecciones urinarias o vaginales ha demostrado claramente que los episodios infecciosos se asocian a una disminución importante, o hasta una desaparición, de los lactobacilos endógenos. Estas observaciones confirman la idea de que los lactobacilos endógenos representan, en la prevención de las infecciones urogenitales, un papel similar al que tienen en el intestino.

IV.C.7. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

Con independencia del tipo de microorganismo que se quiera utilizar como probiótico, existen una serie de requisitos que éste debe cumplir y que han evaluarse de forma individual en cada cepa. Las bases teóricas para la selección de bacterias probióticas incluyen aspectos de **seguridad, criterios funcionales y criterios tecnológicos** (Tannock, 1999a). Recientemente Reuter y cols. (2002) han establecido que para poder asegurar la calidad de los alimentos que contienen microorganismos probióticos, los cultivos bacterianos deberían cumplir las siguientes condiciones:

- 1- Ejercer algún efecto beneficioso demostrado para la salud.
- 2- Alcanzar el intestino humano en estado viable y a una concentración adecuada, para lo que las cepas han de resistir las barreras del TGI.
- 3- Permanecer viable y en número suficiente durante todo el periodo de vida útil del producto en el que se incluyan. Las cepas deben retener sus propiedades durante las fases de producción, distribución y almacenamiento.

Un elemento importante también a tener en cuenta en el proceso de selección de probióticos es la procedencia de la cepa. El origen humano de la cepa es deseable ya que la interacción entre la bacteria y el hospedador es con frecuencia específica. Aunque existen microorganismos probióticos de otras fuentes, la mayor parte de los se han ensayado con éxito son de procedencia humana (Salminen y col., 1998a).

IV.D.BACTERIOCINAS.

Durante su evolución, las bacterias han adquirido diversos mecanismos de adaptación que les permiten tener éxito en la competencia

por nutrientes y espacio en su hábitat. Estos mecanismos incluyen desde el mejoramiento de los sistemas de quimiotaxis hasta la adquisición de sistemas de defensa como la producción de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Riley M., 2002). Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos (Cotter P. D., Hill C., 2005) y se ha observado que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariotas (Jenssen H., Hamill P., 2006). Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas (Klaenhammer T.R. 1988). Estas moléculas han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos. Sin embargo, con el desarrollo comercial exitoso de la bacteriocina nisina (producida por *Lactococcus lactis*) y el uso de las herramientas de la biología molecular e ingeniería genética, en años recientes ha habido un resurgimiento importante en el estudio de las bacteriocinas, particularmente en sus aplicaciones biomédicas potenciales y en la bioconservación de los alimentos (Cotter P. D., 2005).

IV.D.1. BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS - CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN.

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas representan un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos; sin embargo, sólo se han constituido dos principales categorías con base en sus modificaciones estructurales, su tamaño, su termoestabilidad y sus mecanismos de acción (Tabla 2). La clase I (lantibióticos) la constituyen péptidos catiónicos de 19 a 38 residuos de aminoácidos, los cuales sufren modificaciones postraduccionales y ejercen su efecto a nivel de la membrana y la pared

celular. Las modificaciones postraduccionales que se les realizan son diversas, las más importantes involucran reacciones de deshidratación de residuos de serina y treonina, lo que da lugar a la formación de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente (Cotter P. D., 2005).

La reacción de estos aminoácidos con el grupo tiol (SH) de un residuo de cisteína, genera un enlace tioéter generando lantionina (en el caso de Dha) y β-metil-lantionina (en el caso de Dhb). La formación de estos enlaces dentro del péptido genera una serie de estructuras “globulares” que son características de los lantibióticos (Figura 8A). Esta clase de bacteriocinas se divide a su vez en los subgrupos A y B, teniendo como miembro representativo del subgrupo A, a la nisina (Figura 8A), mientras que la mersacidina, producida por bacterias del género *Bacillus*, es un miembro del subgrupo B (Figura 8B)(Cotter P. D., 2005). Por otra parte, la clase II (no lantibióticos) está formada por bacteriocinas constituidas por 30 a 60 residuos de aminoácidos, no contienen lantionina, son estables al calor e inducen la formación de poros en la membrana de las células blanco. Estas bacteriocinas se dividen a su vez en las subclases IIa, IIb, IIc y IId (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las bacteriocinas de bacterias Gram Positivas

Clase	Subclase	Bacteriocina representativa	Bacteria Productora
I Lantibiótico	I A	Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>
I Lantibiótico	I B	Mersacidina	<i>Bacillus spp.</i>
II No lantibiótico	II a	Leucocina A	<i>Leuconostoc gelidum</i>
II No lantibiótico	II b	Lactocoquina G	<i>L. lactis</i>
II No lantibiótico	II c	Enterocina AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i>
II No lantibiótico	II d	Lactocoquina A	<i>L. lactis</i>

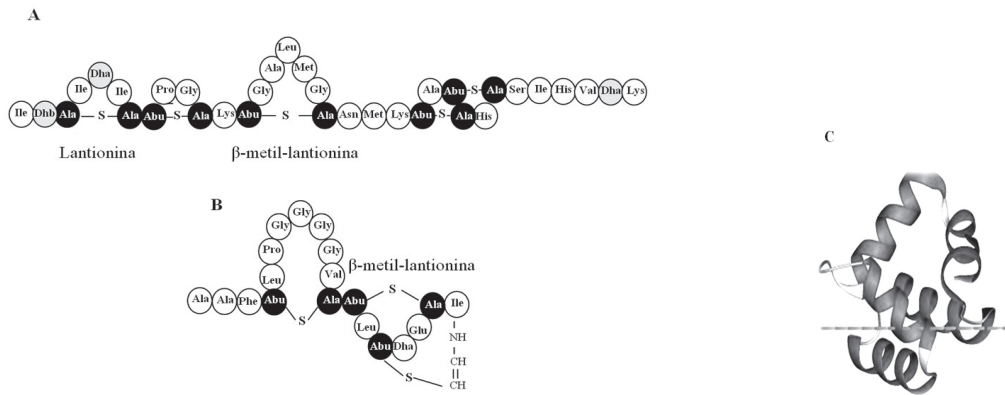


Figura 9. Estructura de diversas bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Estructura globular de los lantibióticos nisina (A) y mersacidina (B). Los residuos de lantionina se indican en negro y como Ala—S—Ala. Los residuos de β -metil-lantionina se muestran en negro y como Abu—S—Ala . C) Estructura -helicoidal de la enterocina AS-48 de 70 residuos. Se muestra su estructura cíclica, con los extremos amino y carboxilo unidos por un enlace peptídico (Sánchez B. M. J., col., 2003).

IV.D.3. GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE BACTERIOCINAS Y REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN.

Los genes que codifican los factores necesarios para la síntesis de las bacteriocinas están organizados como operones, llegando incluso a conformar dos o más. Por ejemplo, el operón de la enterocina A (no lantibiótico) de *Enterococcus faecium* contiene los genes que codifican la pre-enterocina (*entA*), además de los genes que codifican la proteína involucrada en la autoprotección de la cepa productora (*entI*), el gen de inducción de la síntesis de la bacteriocina (*entF*), los genes de las proteínas involucradas en su transporte extracelular (*entT, D*), así como los genes de las proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de la bacteriocina (*entK, R*) (Figura 10). En el caso de los lantibióticos, estos poseen

adicionalmente los genes que codifican las enzimas de modificación de la bacteriocina (McAuliffe O., Ross R. P., 2001).

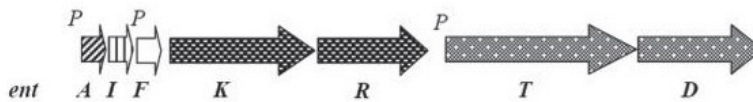


Figura 10. Organización genética de los operones de la enterocina A de *Enterococcus faecium* (no lantibiótico). Función de cada uno de los genes, ver texto. Genes con funciones similares se muestran con la misma trama. P = Regiones promotoras (Cotter P. D., 2005).

La regulación de la síntesis de las bacteriocinas está mediada por dos sistemas de transducción de señales constituidos por dos o tres componentes. Los factores que activan estos sistemas incluyen, la presencia de otra bacteria competidora, estrés por temperatura o pH y un mecanismo de “censado poblacional” o “*quorum sensing*” (Kuipers O. P., col., 1998). Un ejemplo interesante es el sistema de tres componentes que regula la síntesis de la enterocina A de *E. faecium*, el cual está regulado por el mecanismo de censado poblacional. Este sistema incluye una proteína histidina-cinasa (HPK por sus siglas en inglés “*histidine protein kinase*”), situada en la membrana citoplásmica la cual censa señales extracelulares; un regulador de respuesta citoplásmica (RR del inglés “*Response Regulador*”), el cual media una respuesta adaptativa que, generalmente, es un cambio en la expresión de los genes y un factor de inducción (IF del inglés “*Induction Factor*”), cuya presencia es detectada por la proteína HPK (Figura 11, etapa 1) (Cotter P. D., 2005).

En este caso, el sistema se dispara como una consecuencia del exceso del IF a través de una lenta acumulación durante el crecimiento celular, HPK detecta esta concentración e inicia la cascada de señales que

activa la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de la enterocina A (Figura 11, etapas 2 y 3) (Ennahar S., col., 2000). Otros ejemplos de este tipo de regulación incluyen numerosos miembros de la clase II como la sakacina P y la sakacina A de *Lactobacillus sake*. Por otra parte, algunos ejemplos de la regulación mediada por sistemas de dos componentes incluyen a numerosos lantibióticos, por ejemplo, la subtilina de *Bacillus subtilis* y la nisina de *L. lactis*. En estos sistemas las bacteriocinas tienen una función dual ya que poseen actividad antimicrobiana y actúan como una molécula señal induciendo su propia síntesis (Kleerebezem M. 2004).

IV.D.4. SECRECIÓN DE LAS BACTERIOCINAS Y MECANISMOS DE AUTOPROTECCIÓN.

Las bacteriocinas son sintetizadas como pre-péptidos inactivos que contienen un péptido señal en la región N-terminal (Figura 11, etapa 3). Esta señal mantiene a la bacteriocina en forma inactiva dentro de la célula productora facilitando su interacción con el transportador, y en el caso de los lantibióticos juega un papel importante en el reconocimiento del pre-péptido por las enzimas que realizan las modificaciones postraduccionales.

El péptido señal puede ser removido proteolíticamente durante el transporte del pre-péptido hacia el espacio periplásmico por las mismas proteínas transportadoras (transportadores membranales tipo ABC dependientes de ATP, que también pueden contener un dominio proteolítico) (Figura 11, etapa 4), o por proteínas Serina-proteasa presentes en la parte externa de la membrana celular. De esta manera el extremo carboxilo terminal es separado del péptido señal y es liberado al espacio extracelular representando al péptido biológicamente activo (Figura 11, etapa 5) (Ennahar S., col., 2000).

Las bacterias productoras de bacteriocinas poseen proteínas que las protegen de la acción de sus propios péptidos. Se desconocen los

mecanismos moleculares exactos por los que estas proteínas les confieren protección a las bacterias productoras; sin embargo, se han propuesto dos sistemas de protección, los cuales, en algunos casos actúan en la misma bacteria (Kleerebezem M. 2004). La protección puede ser proporcionada por una proteína específica que secuestra e inactiva a la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura conformacional haciéndolo inaccesible a esta última (Figura 11, etapa 6). El segundo sistema lo constituyen las proteínas de transporte ABC, que en algunos casos proporcionan el mecanismo de protección mediante la expulsión de las bacteriocinas que se unen a la membrana (Otto M., Peschel A., 1998).

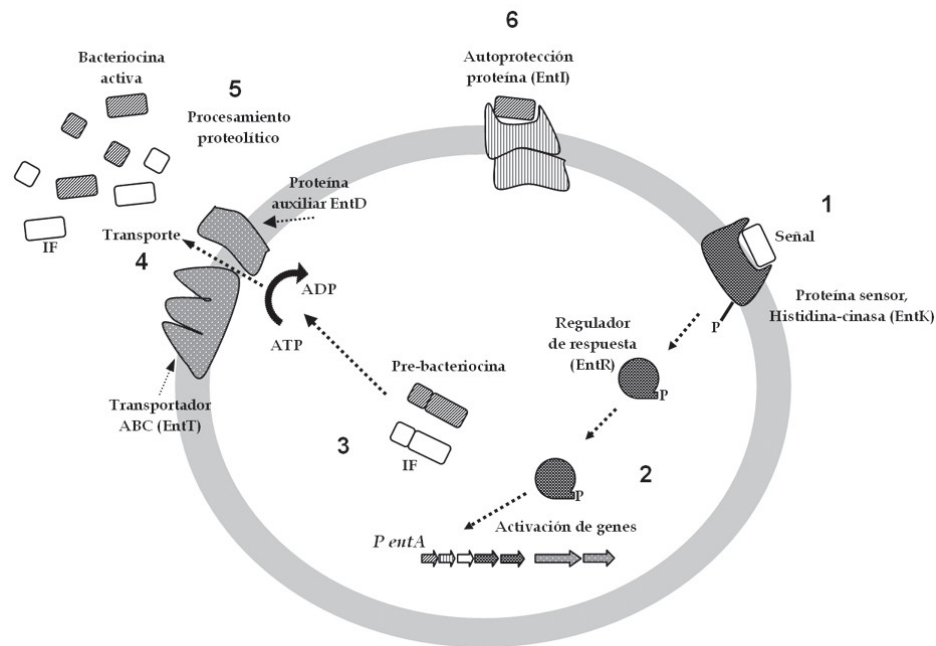


Figura 11. Regulación de la síntesis de la enterocina A de *Enterococcus faecium* (no lantibiótico). Etapa 1, la proteína EntK detecta la presencia del factor de inducción (IF) y se autofosforila. Etapas 2 y 3, el grupo fosfato es transferido al regulador de respuesta EntR, el cual activa los genes involucrados en la síntesis del pre-péptido (pre-enterocina A) y del IF. Etapas 4 y 5, la pre-enterocina A y el IF son transportada al exterior por las

proteínas EntT y EntD y procesados por este mismo sistema, liberando a la enterocina A activa y al IF. Etapa 6, la proteína EntI protege a la bacteria productora de la acción de la enterocina A (Cotter P. D., 2005).

IV.D.5. ESPECTRO Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.

En general, el espectro de acción antibacteriano de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas se restringe a este grupo de bacterias. Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas con un amplio límite de acción, inhibiendo el crecimiento de especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos patógenos de humanos y virus. Incluso pueden tener actividad contra diversas células eucariotas, tales como eritrocitos humanos y de bovinos (Datta V., col., 2005).

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas; la hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, y la flexibilidad que le permite a la bacteriocina realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. Estas características varían de molécula a molécula, no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (Jenssen H., Hamill P., 2006).

Se ha demostrado que los blancos de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son la membrana y la pared celular, así como algunas enzimas importantes en el metabolismo de la célula. Los mecanismos de acción incluyen: i) la formación de poros en la membrana celular, lo que causa la pérdida del contenido celular, éste es el mecanismo descrito para las bacteriocinas nisina y lactococina A de *L. lactis*; ii) La

inhibición de la síntesis de la pared celular, mecanismo de acción descrito para la mersacidina, que involucra la unión al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidogluano (UDPMur-Nac-pentapéptido-GlcNAc) y; *iii*) La inhibición de la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas; mecanismo reportado para la cinamicina de *Streptomyces cinnamoneus*. Se han descrito bacteriocinas que poseen un mecanismo de acción dual; por ejemplo, la nisina (Figura 12) (Breukink E., col. 1999).

El modelo más aceptado que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina propone que inicialmente la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular (Figura 12, etapa 1). Posteriormente, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidogluano y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular (Figura 12, etapa 2). Luego, la bacteriocina cambia su orientación con relación a la membrana y se inserta en esta última, lo que involucra la traslocación de su extremo carboxilo terminal a través de la membrana. Finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro transmembranal que permite la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (Figura 12, etapa 3) (Cotter P. D., 2005).

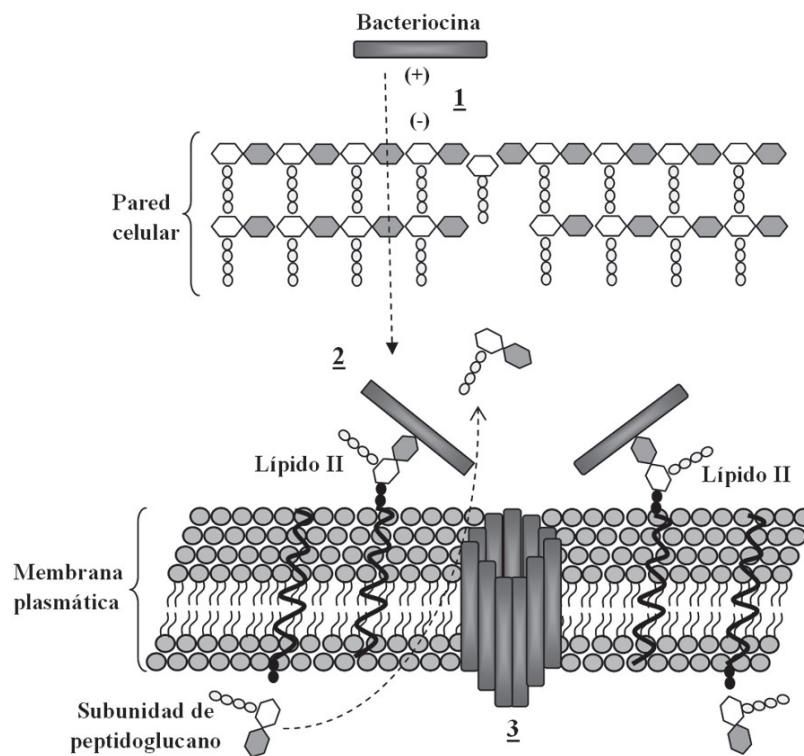


Figura 12. Modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina de *Lactococcus lactis*. Etapa 1, la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador

de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. Etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular.

IV.D.6.APLICACIONES ACTUALES Y POTENCIALES.

IV.D.6.a.APLICACIONES EN LA INDUSTRIA

ALIMENTARIA.

Algunos de los desafíos a los que se enfrenta la industria alimentaria en la actualidad incluyen la demanda de alimentos libres de microorganismos patógenos, alimentos con una larga vida y alimentos que no contengan conservadores químicos.

Las bacteriocinas son una opción atractiva que podría ofrecer al menos parte de la solución, ya que estas moléculas inhiben numerosos microorganismos patógenos alimentarios, son estables al calor y son activas en intervalos amplios de pH. Las bacteriocinas tienen varias ventajas que pueden solucionar los problemas mencionados, sobre todo porque son productos bacterianos naturales que se inactivan fácilmente por proteasas intestinales, por lo que la gran mayoría cumplen con las características que requiere un producto para utilizarse como bioconservador (Cotter P. D., 2005).

En la actualidad, la nisina y la pediocina PA1 se utilizan de manera comercial como bioconservadores de alimentos, en los cuales la nisina ha sido utilizada en la forma de "nisaplina" (Danisco), la cual es una preparación que contiene nisina (2.5 %), NaCl (7.5 %) y leche seca sin grasa (12 % de proteína y 6 % de carbohidrato).

Por su parte, la pediocina PA1 ha sido utilizada en forma de “ALTA 2431” (Quest), la cual se basa en fermentados producidos por la cepa *Pediococcus acidilactici* productora de pediocina PA1.

IV.D.6.b.APLICACIONES BIOMÉDICAS.

La nula toxicidad de las bacteriocinas hacia humanos y animales, pero con una actividad dirigida hacia bacterias patógenas de éstos, ha permitido que se investiguen sus potenciales aplicaciones en terapias biomédicas. En particular, los mecanismos de acción de las bacteriocinas y su actividad en contra de patógenos resistentes a las terapias convencionales con antibióticos, las convierten en una opción atractiva como posibles agentes antimicrobianos (Cotter P. D., 2005) (Tabla 3).

Las bacteriocinas de amplio espectro podrían utilizarse en contra de bacterias Gram positivas patógenas de humanos y animales. Por ejemplo, la lacticina 3147 de *L. lactis* ha mostrado actividad *in vitro* en contra de *Staphylococcus aureus* (resistentes a meticilina), enterococos (resistentes a vancomicina), estreptococos (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*), *Clostridium botulinum* y *Propionibacterium acnés* (Galvin M., Hill C., 1999).

Así mismo, experimentos *in vivo* utilizando modelos animales han mostrado resultados positivos luego del uso de antibióticos como la mersacidina en el tratamiento de infecciones causadas por *S. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a meticilina, además de terapias bucales, como la prevención de la caída de dientes, mal aliento y gingivitis (Howell T. H., col., 1993).

La compañía farmacéutica Biosynexus ha anunciado que la nisina se encuentra en la fase final de experimentación para su uso en humanos, cuya presentación será como crema tópica con efecto antimicrobiano sobre cepas de *S. aureus* que colonizan las fosas nasales. Así mismo, una cepa

modificada de *S. mutans* que produce el lantibiótico mutacina 1140, se encuentra en fase I de experimentación en los E.E.U.U., para su uso en terapias bucales debido a que desplaza cepas cariogénicas nativas de *S. mutans*(Hillman J. D. 2002).

Por otro lado, en Nueva Zelanda, el suplemento dietético BLIS K12® es vendido como inhibidor de bacterias responsables del mal aliento debido a que contiene una cepa de *S. salivarius* que produce las bacteriocinas salivaricina A2 y B46. Adicionalmente, la compañía ImmuCell ha liberado el producto Wipe Out®, que se recomienda en la prevención de la mastitis y cuyo ingrediente activo, la nisina, controla dos de las principales bacterias que causan la mastitis, *S. aureus* y *S. agalactiae*.

Finalmente, desde una perspectiva médica no antimicrobiana, las bacteriocinas como la cinamicina podrían tener aplicaciones biomédicas diferentes, ya que esta inhibe la función de las enzimas fosfolipasa A2 y la enzima convertidora de angiotensina, involucradas en el sistema inmune y en el mantenimiento de la presión sanguínea de humanos, respectivamente, por lo que podrían ser utilizadas en procesos inflamatorios y en la regulación de la presión sanguínea (Tabla 3). Por su parte, la nisina ha mostrado actividad anticonceptiva y protectora vaginal en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando como modelo conejos y ratones(Reddy K. V., col., 2004)

Tabla 3. Ejemplos de algunas bacteriocinas y sus aplicaciones biomédicas potenciales.

Bacteriocina y cepa productora	Actividad	Aplicaciones biomédicas potenciales
Nisina <i>Lactococcus lactis</i>	Inhibe bacterias Gram positivas y negativas,incluyendo	Mastitis bacteriana , higiene bucal,tratamiento de <i>S.aureus</i> resistente a

	<i>Helicobacter pylori</i>	meticilina, infecciones enterococales, formulaciones tópicas, desodorantes y cosméticos, tratamiento de úlceras pépticas y enterocolitis.
Epidermina	Inhibe <i>Propionibacterium acnés</i> , estafilococos, Estreptococos	Acné, foliculitis, impétigo.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibe cepas de estafilococos y estreptococos	Tratamiento de <i>S.aureus</i> resistente a meticilina e infecciones estreptococales.
Mersacidina		
<i>Bacillus spp.</i>		Disminución de la inflamación, regulación de la presión sanguínea y tratamiento por infecciones virales.
Cinamicina	Inhibidor de fosfolipasa A2, enzima convertidora de angiotensina y virus del herpes simple.	
<i>Streptomyces cinnamomus</i>		

V. MATERIALES Y METODOS

V.A.MATERIAL BIOLÓGICO

V.A.1.Microorganismo. En el presente trabajo se hizo uso de las bacterias:*Propionibacterium freudenreichii subs. shermanii* (DSM 4902)y *P. acidipropionici*. (DSM 4900)obtenidas comercialmente.

V.B.MEDIOS DE CULTIVO

V.B.1.Activación de los microorganismos. Los microorganismos fueron activados en medio industrial y medio anaeróbico fluido (ver anexos para ver su composición) bajo condiciones de cultivo estacionarias (cultivo Batch) por un periodo de 14 días a 30°C de temperatura. A partir de este punto todas las pruebas se realizaron por duplicado.

V.C. MÉTODOS

V.C.1. Proceso Fermentativo – Cultivo Batch. *Propionibacterium freudenreichii subs. shermanii* y *P. acidipropionici*. fueron cultivadas en tres medios a 37 °C a condiciones de anaerobiosis por la adición de gas nitrógeno en medio definido, que contiene glucosa, Urea, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, KCl, MnSO₄.H₂O, Sol 2 (oligoelementos), Sol.3 (selenito), Cysteina, además vitaminas Biotina., Tiamina y Piridoxina, agua destilada capacidad para 100mL, medio anaeróbico fluido con una composición compleja y medio complejo industrial conteniendo extracto de

levadura, glicerina, KH_2PO_4 , utilizado para el crecimiento de propionibacterias en la industria.

V.C.1.a. Determinación de la Cinética de Crecimiento.

En botellas de 100 mL *P. acidipropionici* (DSM 4900) y *Propionibacterium freudenreichii* Subs. *shermanii* (DSM 4902) fueron cultivados a 37 °C a condiciones de anaerobiosis saturando con Nitrógeno en Medio Definido, (glucosa 0.5g/100mL, Urea 0.5 g/100mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.037 g/100mL KH_2PO_4 0.065 g/100mL, KCl 0.05 g/100mL, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0003g/100mL, Sol 2 (oligoelementos) 1mL/L, Sol.3 (selenito) 1mL/L, Cysteina 0.5g/L, además vitaminas con concentraciones finales de Biotina $5.4 \cdot 10^{-5}$ g/mL, Tiamina $5.4 \cdot 10^{-5}$ g/mL y Piridoxina $1.2 \cdot 10^{-3}$ g/mL, agua destilada capacidad para 100mL, Medio Anaeróbico Fluido con una composición compleja y Medio Industrial conteniendo extracto de Levadura 10g/L, Glicerina 20g/L, KH_2PO_4 1.5g/L. Las botellas fueron selladas con anillas metálicas para su posterior autoclavado. Se inoculó a cada botella con 7 mL de cada uno de las bacterias; las condiciones de cultivo fueron de 30 °C, monitoreando el crecimiento bacteriano, según el método que se describirá mas adelante.

Una vez que el microorganismo fue inoculado en el medio de cultivo; se realizó la medición de la curva de crecimiento por medio de un espectrofotómetro, por el cual se obtuvo las densidades ópticas de las muestras, tomando 1 mL de cada una de ellas y realizando las lecturas a 560 nm que es la longitud de onda de la luz visible.

V.C.1.b. Determinación de la actividad antimicrobiana. INHIBICIÓN DE PATÓGENOS.

Para el estudio de la inhibición de patógenos se determinó la actividad antagónica de diversos aislados de cepas de Propionibacterias (4900-4902) contra microorganismos. Las cepas ensayadas fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* ATTC 1448, que crecieron en medio BHI a 37°C durante 24 h. Se utilizó un ensayo de inhibición en placa con oradaciones para depositar los cultivos de

patógenos. A partir de cultivos de 24h de las cepas patógenas, se depositaron 100 µl en la superficie de placas de Agar Mueller Hinton. A continuación se realizaron unos orificios con sacabocados en las cuales se depositó 40-50 µl del cultivo de las cepas de Propionibacterias. Las placas se incubaron en estufas de 30-36° C durante 24h hasta que se apreció los halos de inhibición. Después de un ensayo por duplicado, una zona clara de inhibición de más de 5 mm de diametro alrededor de los orificios del agar, fue considerada como positiva. Se ensayó como control negativo el efecto del agar de Mueller Hinton sobre el crecimiento de los patógenos.

Cabe destacar que la actividad antimicrobiana se realizará en los medios de cultivo que fueron sometidos a optimización.

V.C.2. Optimización de las condiciones nutricionales ofertadas por el Medio Definido.

V.C.2.a. Modificación del Medio Definido con relación a Oligoelementos, selenito y urea. Se procedió a la variación de los componentes del medio definido, del cual se realizó las variaciones de concentración de las Sol. 2 (oligoelementos) con 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L, Sol. 3 (selenito) con 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L y Urea con 0.2 g/100mL; 0.5 g/100mL; 0.8 g/100mL, y el cambio de la fuente de carbono de glucosa por glicerol; cultivadas a condiciones de anaerobiosis, realizando la curva de crecimiento por lectura de las densidades ópticas, por el método ya mencionado anteriormente.

V.C.2.b. Modificación del Medio Definido con relación a Glucosa – urea y Lactosa – urea. (Diseño Factorial)

Diseño Factorial

Una vez seleccionado el medio de cultivo, se optimizaron las condiciones de cultivo tomando en cuenta la variable de fuente de carbono (glucosa y lactosa) y fuente de nitrogeno (concentración de urea) (Tabla 1).

Tabla 1. Categorización de las variables.

NIVEL	VARIABLES	
	CONCENTRACIÓN GLUCOSA % p/v	CONCENTRACIÓ UREA %p/v
-1	0,1	0,1
0	0,5	0,5
1	1	1

El diseño factorial en estas condiciones se indican en la Tabla 3.

$3^2 = 9$ experimentos (27 por triplicado).

Tabla 2. Categorización de las variables

NIVEL	VARIABLES	
	CONCENTRACIÓN LACTOSA % p/v	CONCENTRACIÓ UREA %p/v
-1	0,1	0,1
0	0,5	0,5
1	1	1

El diseño factorial en estas condiciones se indican en la Tabla 4.

$3^2 = 9$ experimentos (27 por triplicado).

Tabla 3. Diseño de los experimentos Batch para la optimización del medio de cultivo en medio definido en función de la relación de la concentración de GLUCOSA y UREA.

EXPERIMENTO	CONCENTRACIÓN GLUCOSA	CONCENTRACIÓ UREA
1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	1	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1

Tabla 4. Diseño de los experimentos Batch para la optimización del medio de cultivo en medio definido en función de la relación de la concentración de LACTOSA y UREA.

1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	1	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1

V.C.3. Selección de los microorganismos con capacidad de coagulación de la leche

10 mL de leche estéril pH 6,6, fueron inoculados con un volumen de 1% v/v de un cultivo de cada una de las cepas a ensayar. Se incubaron a 37°C, sin agitación durante 3 días. Pasado el tiempo de incubación se observó la formación o no de un coágulo uniforme.

3.6. ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO EN EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CEPA PURA de *Propionibacterium freudenreichii*
Subs. Shermanii(DSM 4902) y *P. acidipropionici* (DSM 4900).

Medio definido

Medio Anaeróbico

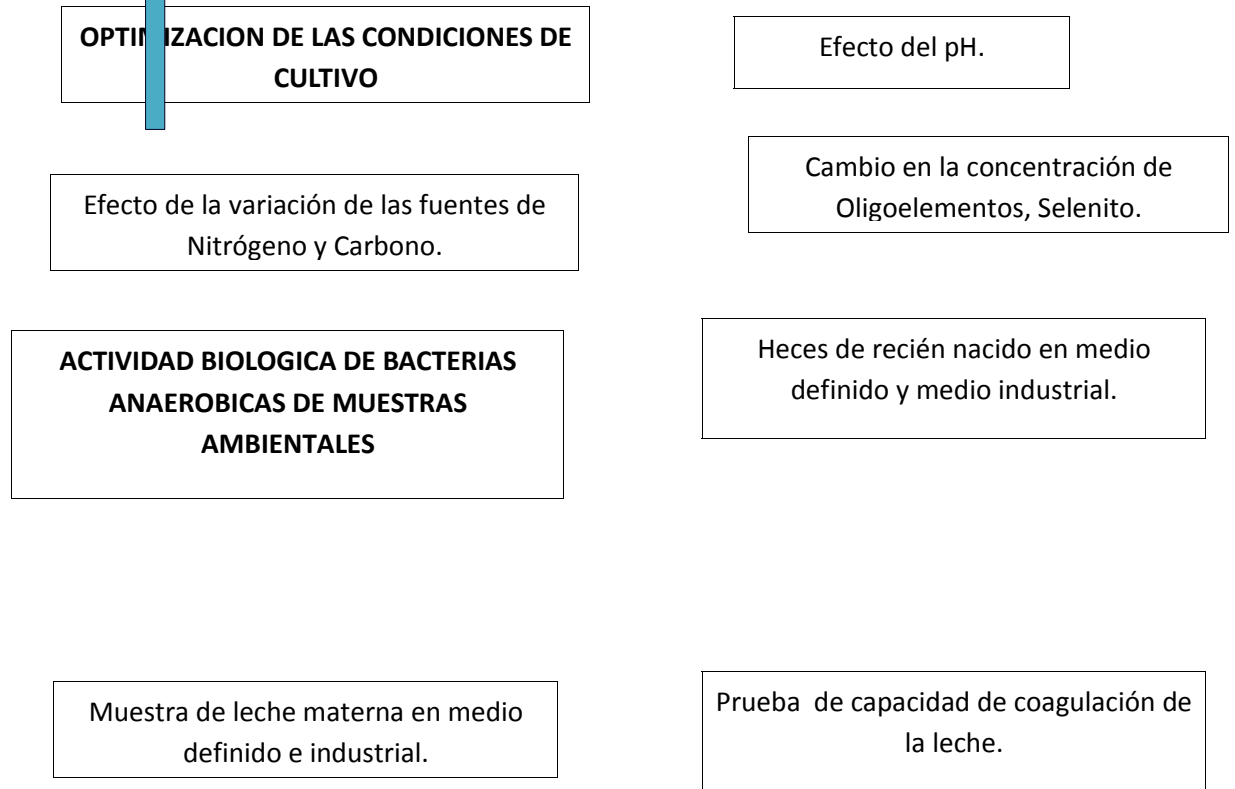
Medio Industrial

ACTIVIDAD INHIBITORIA

Extracción de fermento

Test de inhibición

Control de pH y crecimiento bacteriano



VI. RESULTADOS

PROCESO FERMENTATIVO – CULTIVO BATCH.

a) Determinación de la cinética de crecimiento.

Figura 1. Curva de crecimiento en Medio Anaeróbico Fluido de Cepas de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y *P. freudenreichii* Subs. *shermanii* (DSM 4902)

Como podemos observar en la figura 1 el mayor crecimiento en el medio es el de *Propionibacterium acidipropionici* (DSM 4900) en comparación de *P. freudenreichii* Subs. *shermanii* (DSM 4902).

Figura 2. Curva de crecimiento en Medio Definido de Cepas de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y *P. freudenreichii* Subs. *shermanii* (DSM 4902)

En la figura 2 observamos que la cepa de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) presenta mayor crecimiento que la *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902)

Figura 4. Curva de crecimiento en Medio Industrial de Cepas de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900)y *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902)

En la figura 4 de igual manera se presenta el mayor crecimiento de la cepa *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) frente la cepa *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902).

b) Determinación de la actividad antimicrobiana. INHIBICIÓN DE PATÓGENOS.

La capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos es uno de los mecanismos mediante el cual los probióticos contribuyen a la protección del hospedador, producen diversas sustancias con efectos antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y sustancias relacionadas. Usando un ensayo de inhibición en placa con oradaciones. Se midió el diámetro de los halos de inhibición y se tipificó la actividad antagónica como (-): no inhibición, (+/-): algo de inhibición pero no un halo claro, halo claro de entre < 8 mm alrededor del crecimiento, >8 mm de inhibición . Los resultados obtenidos con 2 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana contra patógenos de cepas de propionibacterias seleccionadas.

<i>Microorganismos Patógenos</i>	<i>Escherichia coli</i> (Halos de inhibición)	<i>Salmonella entérica</i> (Halos de inhibición)	<i>Pseudomona</i> (Halos de inhibición)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 1448 (Halos de inhibición)
----------------------------------	--	---	--	---

MEDIO DEFINIDO- GLUCOSA <i>Propionibacterium acidipropionici.</i> (DSM 4900)	-	< 8	> 8	< 8
<i>P. freudenreichii</i> Subs. <i>shermanii</i> (DSM 4902)	-	< 8	> 8	< 8
MEDIO INDUSTRIAL <i>Propionibacterium acidipropionici.</i> (DSM 4900)	> 8	> 8	< 8	< 8
<i>P. freudenreichii</i> subs. <i>shermanii</i> (DSM 4902)	-	< 8	< 8	< 8
MEDIO ANAEROBICO <i>Propionibacterium acidipropionici.</i> (DSM 4900)	-	> 8	< 8	-
<i>P. freudenreichii</i> Subs. <i>shermanii</i> (DSM 4902)	-	< 8	< 8	> 8

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES OFERTADAS POR EL MEDIO DEFINIDO.

a) Modificación del Medio Definido con relación a Oligoelementos, selenito y urea. Del medio definido se realizaron las variaciones Urea, oligoelementos y selenito que a continuación se muestra en la figura 5.

Figura 5. Variaciones de concentración de: Urea con 0.2 g/100mL; 0.5 g/100mL; 0.8 g/100mL, oligoelementos (Sol. 2) con 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L, y selenito (Sol. 3) con 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L.

Como podemos observar en la figura 5, el medio definido con la variación de la concentración de Urea 0.5 g/100mL, oligoelemento 0.5 y 1 g/L y selenito 1.5 g/L y 1 g/l presenta un mayor crecimiento de las cepas *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) frente la cepa *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902).

Tabla 2. Velocidades de crecimiento de las propionibacterias cultivadas en medio definido optimizado.

Cepa Bacteriana	Medio Definido con variación de sus componentes	Velocidad de crecimiento ($\mu = \text{días}^{-1}$)	Tiempo de duplicación ($T_d = \text{Dias}$)
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> . (DSM 4900)	Urea 0.5g/100 mL	0.8322	0.8327
	Oligoelementos 0.5 g/ L	0.4393	1.5775
	Selenito 1.5 g/ L	0.3459	2.0034
<i>P. freudenreichii Subs. shermanii</i> (DSM 4902).	Urea 0.5g/100 mL	0.7442	0.9312
	Oligoelementos 1 g/ L	0.7819	0.8863
	Selenito 1 g/ L	1.1113	0.6236

Determinación de la actividad biológica de cepas Propionibacterias en el medio definido con la variación de sus componentes.

Usando un ensayo de inhibición en placa con oradaciones. Se midió el diámetro de los halos de inhibición y se tipificó la actividad antagónica como (-): no inhibición, (+/-): algo de inhibición pero no un halo claro, halo claro < 8 mm alrededor del crecimiento, > 8 mm de inhibición. Los resultados obtenidos con 2 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana contra patógenos de cepas de propionibacterias cultivadas en medio definido con variación de sus componentes.

Microorganismos Patogenos	<i>Escherichia coli</i> (halo de	<i>Salmonella</i> entérica	<i>Pseudomona</i> (halo de	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC	Variación del Medio
---------------------------	----------------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------------	---------------------

	inhibición)	(halo de inhibición)	inhibición)	1448 (halo de inhibición)	Definido
<i>Propionibacterium acidipropionici.</i> (DSM 4900)	< 8	< 8	< 8	< 8	Urea 0.2 g/100ml
	> 8	> 8	> 8	> 8	Urea 0.5 g/100ml
	> 8	> 8	< 8	< 8	Urea 0.8 g/100ml
	< 8	< 8	< 8	< 8	Selenito 0.5 ml/l
	< 8	< 8	< 8	< 8	Selenito 1 ml/l
	> 8	> 8	> 8	> 8	Selenito 1.5 ml/l
	> 8	> 8	> 8	> 8	Oligoelementos 0.5 ml/l
	> 8	< 8	< 8	< 8	Oligoelementos 1 ml/l
	> 8	< 8	< 8	< 8	Oligoelementos 1.5 ml/l
	<i>P. freudenreichii</i> <i>Subs. shermanii</i> (DSM 4902)	> 8	< 8	< 8	> 8
> 8		> 8	> 8	> 8	Urea 0.5 g/100ml
< 8		< 8	> 8	< 8	Urea 0.8 g/100ml
> 8		< 8	> 8	< 8	Selenito 0.5 ml/l
> 8		> 8	> 8	> 8	Selenito 1 ml/l
> 8		< 8	< 8	< 8	Selenito 1.5 ml/l
> 8		< 8	< 8	> 8	Oligoelementos 0.5 ml/l
> 8		> 8	> 8	> 8	Oligoelementos 1 ml/l
> 8		< 8	< 8	< 8	Oligoelementos 1.5 ml/l

b) Modificación del Medio Definido con relación a Glucosa – urea (Diseño Factorial)

Se realizó una variación de la fuente de carbono entre Glucosa y Lactosa del medio definido, utilizando un diseño factorial y se muestra en la figura 6 la cinética de crecimiento.

Figura 6. Optimización de condiciones de los medios de cultivo con relación a la fuente de carbono Glucosa – urea. (Diseño Factorial)

Tabla 3. Velocidades de crecimiento de las propionibacterias cultivadas en medio definido optimizado.

Cepa Bacteriana	Medio Definido con variación de sus componentes	Velocidad de crecimiento ($\mu = \text{días}^{-1}$)	Tiempo de duplicación ($T_d = \text{Dias}$)
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> . (DSM 4900)	Experimento 6 (1 0)	5.4506	0.1271
<i>P. freudenreichii Subs. shermanii</i> (DSM 4902)	Experimento 9 (1 1)	1.9291	0.3592

c) Modificación del Medio Definido con relación a Lactosa – urea (Diseño Factorial)

Figura 6. Optimización de condiciones de los medios de cultivo con relación a la fuente de carbono Lactosa – urea. (Diseño Factorial)

Tabla 4. Velocidades de crecimiento de las propionibacterias cultivadas en medio definido optimizado.

Cepa Bacteriana	Medio Definido con variación de sus componentes	Velocidad de crecimiento ($\mu = \text{días}^{-1}$)	Tiempo de duplicación ($T_d = \text{Dias}$)
-----------------	---	---	---

<i>Propionibacterium acidipropionici.</i> (DSM 4900)	Experimento 5 (0 0) 1.5001	0.4620
	<i>P. freudenreichii Subs. shermanii</i> (DSM 4902)	Experimento 1(-1 -1) 0,8105

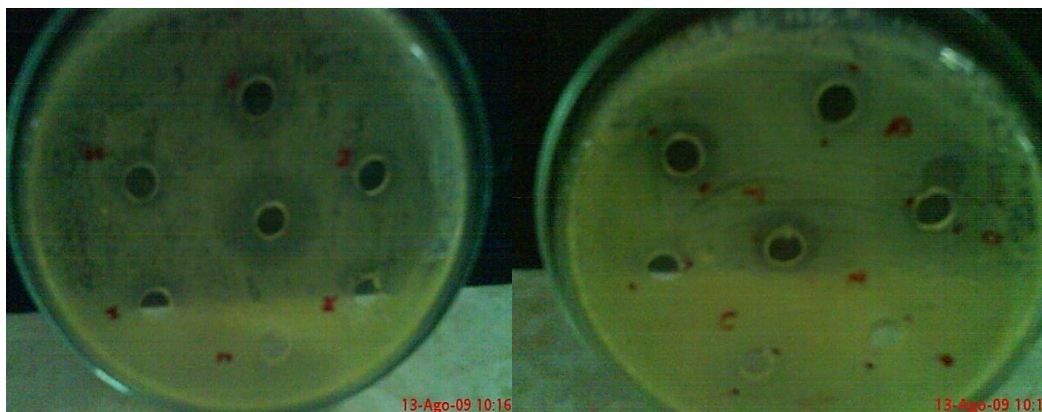
Determinación de la actividad biológica de cepas Propionibacterias en medios sometidos a optimización.

Se midió el diámetro de los halos de inhibición y se tipificó la actividad antagónica como (-): no inhibición, (+/-): algo de inhibición pero no un halo claro, (+): halo claro de entre 6 y 8 mm alrededor del crecimiento, (++) : 8 mm de inhibición o más. Los resultados obtenidos con 2 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana contra patógenos de cepas de propionibacterias cultivadas en el medio definido optimizado con relación a la fuente de carbono.

Microorganismos Patogenos	<i>Escherichia coli</i> (halo de inhibición)	<i>Salmonella</i> entérica (halo de inhibición)	<i>Pseudomona</i> (halo de inhibición)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 1448(halo de inhibición)	Optimizacion del Medio Definido
<i>Propionibacteriu m acidipropionici.</i> (DSM 4900)	> 8	-	-	-	Gluc 1 0
	> 8	< 8	< 8	< 8	Lac 0 0
<i>P. freudenreichii Subs. shermanii</i> (DSM 4902)	< 8	-	-	-	Gluc 1 1
	> 8	-	< 8	< 8	Lac - 1 -1

Figura 7. Actividad antimicrobiana contra patógenos de cepas de propionibacterias seleccionadas en medios sometidos a optimización.



SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE MUESTRAS AMBIENTALES CON CAPACIDAD DE COAGULACIÓN DE LA LECHE.

Pensando que las cepas aisladas podrían a futuro emplearse en la elaboración de leches fermentadas con probióticos, se evaluó si las cepas podían coagular la leche. De las 4 cepas ensayadas, todas presentaron esta propiedad.

Es importante señalar que las cepas se obtuvieron de las heces de los infantes, heces de burro, de oveja, de llama y leche materna. Esto no es sorprendente ya que es bien conocido que el tracto digestivo y los órganos genitales de los animales, son hábitats donde muchas especies encuentran condiciones favorables para su desarrollo.

Tabla 6. Selección de microorganismos con capacidad de coagulación de la leche.

<i>MEDIO DE CULTIVO</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>FORMACIÓN DE COÁGULO</i>
Definido	Heces de bebe	+
Industrial	Heces de bebe	+
Anaeróbico fluido	Heces de bebe	+/-
Definido	Leche materna	+/-
Industrial	Leche materna	+

	Leche materna	+
	Heces de burro	+
Anaeróbico fluido	Heces de oveja	+/-
Anaeróbico fluido	Heces de llama	+
Anaeróbico fluido		
Anaeróbico fluido		

En la tabla se observa que las muestras de heces de bebé son formadores de coagulo ya sea en el medio definido como industrial.

En la muestra de leche materna existe coagulo tanto en el medio industrial como anaeróbico fluido.

Ya para las muestras de heces de burro, oveja y llama solo la mayor presencia de coagulo se observa en las heces de burro en medio anaeróbico fluido.

Figura 8. Selección de microorganismos con capacidad de coagulación de la leche.



Actividad biológica de bacterias anaeróbicas de muestras ambientales.

De igual manera se midió el diámetro de los halos de inhibición y se tipificó la actividad antagónica como (-): no inhibición, (+/-): algo de inhibición pero no un halo claro, (+): halo claro de entre 6 y 8 mm alrededor del crecimiento, (++): 8 mm de inhibición o más. Los resultados obtenidos con 3 cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana contra patógenos de muestras ambientales cultivadas en el medio definido, anaeróbico fluido y medio industrial

Microorganismo Muestra ambiental	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella entérica</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>Staphylococcus aureus ATTC 1448</i>
Heces de llama	> 8	> 8	> 8	> 8
Heces de oveja	< 8	> 8	> 8	> 8
Heces de burro	< 8	< 8	> 8	> 8

Como podemos observar en la tabla 7 solo estas muestras ambientales mostraron actividad biológica frente a los patógenos

VII. DISCUSION

Se conoce que los antimicrobianos se generan de los ácidos orgánicos débiles producidos principalmente por las moléculas no disociadas, sin embargo varios investigadores han informado que la inhibición total de ácido débil es dependiente de los efectos combinados producidos por moléculas no disociadas así como los iones disociados. Otros estudios demuestran que la actividad biológica depende de la variación del pH, por ejemplo cuando *M. Luteos* se usó como un organismo de la prueba usando 20 g de ácido láctico y acético, los cuales presentaron 11 mm y 32,9 mm de diámetro de zonas claras a pH 4,5, pero ninguna zona clara se observó a pH 5,5 para ambos ácidos. Así la eficacia antimicrobiana de estos ácidos débiles aumentó al reducir el pH. Es así que los fermentos producidos fueron para evaluar su posible acción inhibitoria sobre el desarrollo de microorganismos patógenos cultivados en placa.

Los efectos antagonistas de los probióticos contra microorganismos patógenos o alterantes se han atribuido principalmente a la producción de ácidos orgánicos (Ibrahim y Bezkorovainy, 1993; Asahara y cols., 2001; Bruno y Shah, 2002). Sin embargo, son muchos los autores que han descrito la producción, tanto en lactobacilos como en bifidobacterias, de compuestos antimicrobianos no relacionados con la acidificación y activos in vitro contra patógenos Gram-positivos y Gram-negativos (Gagnon y cols., 2004).

A pesar de las consideraciones anteriores, hay algunos efectos beneficiosos de las bacterias probióticas sobre la salud que están bien documentados de forma científica (Ouwehand y cols., 2002). Entre los principales podemos citar su contribución al metabolismo intestinal (fermentación de la lactosa, producción de ácidos grasos de cadena corta, etc.), la inhibición de patógenos y la inmunomodulación. Poco se conoce, sin embargo, de las propiedades que se requieren para resistir y competir en el tracto gastrointestinal (aunque se sospecha de características como la resistencia a la acidez, la resistencia a sales biliares y la capacidad de unión a las mucosas). En todo caso, la modificación de la microbiota por microorganismos de otro origen choca con la idea de la homeostasis: la fuerza de la naturaleza que tiende a minimizar los cambios, incluyendo los que se derivan de la introducción de bacterias en un hábitat ya “ocupado”. Los fenómenos de exclusión competitiva en el intestino (Satokari y cols., 2003) tienen mucho que ver en la resistencia de las especies residentes a ser desplazadas por otras foráneas y, de hecho, el consumo de grandes cantidades de probióticos parece no tener grandes efectos en la composición de la microbiota intestinal mayoritaria. Los microorganismos “introducidos” no alcanzan en ocasiones los niveles de las poblaciones residentes y, en todo caso, desaparecen pronto tras el cese del consumo (Tannock y cols., 2000).

Otra consideración que hay que tener en cuenta de los probióticos son los criterios de seguridad, dado que los microorganismos introducidos pueden

umentar determinadas actividades enzimáticas que, en exceso, pueden resultar perjudiciales (como parece ser el caso de la desconjugación y deshidroxilación de sales biliares) (Salminen y cols., 1998b). Más preocupante aún es la posibilidad de que en ciertas circunstancias puedan actuar como patógenos oportunistas causando enfermedades; aunque en el caso de las bacterias del ácido láctico más típicas esto sólo parece ocurrir cuando hay graves patologías subyacentes (Marteau, 2001).

La presencia de coagulo en las muestras se los hizo pensando que las cepas de las muestras ambientales podrian a futuro emplearse en la elaboración de leches fermentadas con probióticos. Se sabe que la capacidad de coagulación de la leche se debe a la hidrolisis de las proteínas de la leche y estas se ven favorecidas por el almacenamiento a temperaturas bajas, por la destrucción por el calor de las bacterias lácticas y de otras bacterias productoras de gas, y por la destrucción del acido ,producido en la leche por los moho y por levaduras formadoras de película o por la neutralización de los acidos por los productos del metabolismo de otros microorganismos.

La proteólisis acida origina la producción de una cuajada que se retrae y libera gran cantidad de suero. Esta fase va seguida de la digestión lenta de la cuajada, la cual cambia de aspecto para transformarse de opaca en traslucida , y es posible que sea disuelta totalmente por ciertos tipos de bacterias. A veces se forma partículas de cuajada separadas que se retraren tanto que apenas son visibles en la gran cantidad de suero.

La proteólisis acida puede ser producida por varias especies de *Micrococcus*, algunas de las cuales crecen en la ubre de la vaca y producen la proteólisis de la leche ordeñada asépticamente. Uno de los estreptococos de origen intestinal o enterococos, *Streptococcus faecalis var. Liquefaciens*, es un microoragismo productor de acido láctico que al mismo tiempo es muy proteolítico.

Faltan por ensayar ahora los requisitos tecnológicos (Mattila-Sandholm y cols., 2002), determinantes a la hora de su posible aplicación industrial; así como y probar sus efectos “beneficiosos” en modelos animales y en futuros ensayos clínicos. Además se busca en futuros trabajos modificar las condiciones para su crecimiento bajando los costos del proceso y su posterior aislamiento de la bacteria probiótica, puesto que es muy útil para el uso en alimentos que son consumidos por el ser humano ya que no solo lo protege de posibles infecciones sino mejora la calidad de vida de los seres humanos

VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó la capacidad que tienen ciertas bacterias como la *Propionibacterium* (DSM 4900 y 4902) para generar un metabolito secundario como lo es el probiótico, que es la actividad biológica en estudio, obteniendo halos de inhibición frente a bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *S.aureus*,

con la que se comprobó mejores resultados cultivándolo en medio definido puesto que se podría variar sus componentes. Pero debemos tener en cuenta que su crecimiento en el medio definido- glicerol no fue muy optima por tanto en los posteriores estudios se desecho este tipo de medio.

Es así que al variar los componentes del medio definido como lo es la Urea con 0.5 g/100 mL, Oligoelementos (Sol 2) 0.5 g/L y 1 g/L, finalmente Selenito (Sol. 3) 1.5 g/L y 1 g/L respectivamente para cada cepa, presentó un mejor crecimiento. Estos a la vez presentaron actividad de inhibición mayor, frente a los enteropatógenos ya mencionados.

Posteriormente se realizó la optimización de la fuente de carbono cambiando la glucosa por la lactosa siguiendo un diseño factorial, del cual se observó crecimiento en todos los experimentos de la glucosa- urea , solo realizando el antibiograma se determinó cual de los experimentos es útil para evitar el crecimiento de patógenos. En la actividad biológica solo el experimento 6 para la cepa *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y el experimento 5 de la cepa *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902) son las que presentaron un halo de inhibición frente los patógenos.

Con relación a la optimización del medio definido Lactosa- urea solo los experimentos 4 y 7 no presentaron una cinética de crecimiento. Su actividad biológica se observó en el experimento 5 de *Propionibacterium acidipropionici*. (DSM 4900) y experimento 1 de *P. freudenreichii Subs. shermanii* (DSM 4902).

Finalmente se recogió muestras ambientales las cuales fueron cultivadas en los tres medios: Definido, Selectivo y Anaeróbico fluido. Se estudió su capacidad de coagulación de la leche con el fin de determinar que microorganismos son capaces de producir probióticos a partir de la fermentación de la leche donde las heces de bebé y la leche materna tuvieron actividad en los tres

medios; solo las heces de burro, oveja y llama presentaron coagulación en medio anaerobico fluido,de la cual se determino la actividad biológica como antagonistas del crecimiento de patógenos donde las muestras ambientales: heces de llama, oveja y burro presentaron la Actividad antimicrobiana.

IX. BIBLIOGRAFIA

- **Benno** Y, Suzuki K, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T. 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol Immunol* 30: 521-532.
- **Bergogne-Bérézin** E. 2000. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents* 16: 521-526.
- **Borrueal** N. 2003. Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. *Gasroenerol Hepatol* 26: 13-22.

- **Breukink E.**, Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H. G., Kruijff B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286(5448): 2361-2364.
 - **Cleveland J**, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20.
 - **Conway PL**. 1995. Microbial ecology of the human large intestine. En: Gibson GR, Macfarlane GT (eds). *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition Physiology and Pathology*. CRC Press, Florida. pp 1-24.
 - **Cotter P. D.**, Hill C., Ross R. P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology*, 3:777-788.
 - **Cotter P. D.**, Hill C., Ross R. P. 2005. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Current Protein and Peptides Science*, 6(6):61-75.
 - **Croucher SC**, Houston AP, Bayliss CE, Turner RJ. 1983. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl Environ Microbiol* 45:1025-1033.
 - **Cummings JH**. 1997. The large Intestine in Nutrition and Disease. Danone Chair Monograph, Instituto Danone, Bruselas.
 - **Cummings JH**, Macfarlane GT, Englyst HN. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl): 415S-420S.
 - **Datta V.**, Myskowski S.M., Kwinn L. A., Chiem D. N., Varki N., Kansal R. G., Kotb M., Nizet V. 2005. Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Molecular Microbiology*, 56(3):681-695.
 - **Drasar BS**, Barrow PA. 1985. *Intestinal Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.
 - **Ennahar S.**, Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:85-106.
 - **Fanaro S**, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*. 91: 48-55.
 - **FAO/WHO**. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. <http://www.fao.org/ESN/Probio/probio.htm>.
 - **Favier CF**, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68: 219-226.
- Finegold SM**, Sutter VL, Sugihara PT, Elder HA, Lehmann SM, Phillips RL. 1977. Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. *Am J Clin Nutr* 30: 1781-1792.
- **Flynn S**, van Sinderen D, Thornton GM, Holo H, Nes IF, Collins JK. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol* 148: 973-84.

- **Fooks** LJ, Fuller R, Gibson GR. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int Dairy J* 9: 53-61.
- **Fuller** R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66: 365-378.
- **Galvin M.**, Hill C., Ross R. P. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology*, 28(5):355-358.
- **Gibson** GR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. 1992. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 165-172.
- **Gibson** GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota; introducing the concept of prebiotic. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- **Gill** HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *AmJ Clin Nutr* 74: 833-839.
- **Gorbach** SL, Nahas L, Lerner PI, Weinstein L. 1967. Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age and periodic sampling on numbers of faecal microorganisms in man. *Gasroenterology* 53: 845-855.
- **Grönlund** MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after caesarean delivery. *J Pediatr Gasroenerol Nutr* 28: 19-25.
- **Guarner** F, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39: 237-238.
- **Guarner** F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.
- **Harmsen** HJ, Gibson GR, Efferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaz A, Roberfroid MB, Welling GW. 2000b. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett*: 183: 125-129.
- **Hata** K, Andoh A, Sato H, Araki Y, Tanaka M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. 2001. Sequential changes in luminal microflora and mucosal cytokine expression during developing of colitis in HLA-B27/beta2-microglobulin transgenic rats. *Scand J Gastroenerol* 36: 1185-1192.
- **Hillman J. D.** 2002. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:361-366.
- **Holzappel** WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41: 85-101.
- **Hooper** LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.
- **Hopkins** MJ, Sharp R, Macfarlane GT. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S RNA abundance and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48: 198-205.
- **Horwitz** BJ, Fisher RS. 2001. The irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 344: 1846-1850.
- **Howell T. H.**, Fiorellini J. P., Blackburn P., Projan S. J., De la Jarpe J., Williams R. C. 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing

plaque and gingivitis in beagle dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(5):335-339.

- **Ishibashi N**, Yamazaki S. 2001. Probiotic and safety. *Am J Clin Nutr* 73: 465-470.
- **Isolauri E**, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. 2001. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30: 1604-1610.
- **Jenssen H.**, Hamill P., Hancock E.W.R. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):491-511.
- **Jiang T**, Mustapha A, Savaiano DA. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci* 79: 750-757.
- **Kalliomäki M**, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076-1079.
- **Klaenhammer T.R.** 1988. Bacteriocins of acid lactic bacteria. *Biochimie*, 70(3):337-349
- **Kleessen B**, Bunke H, Tovar K, Noak J, Sawatzki G. 1995. Influence of two infants formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr* 84: 1347-1356.
- **Kleerebezem M.** 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, 25(9):1405-1414.
- **Kuipers O. P.**, De Ruyter P. G., Beerthuyzen M., De Vos W. M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 64(1):15-21.
- **Luckey TD.** 1972. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 25: 1292-1294.
- **McAuliffe O.**, Ross R. P., Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25:285-308.
- **Macfarlane GT**, Gibson GR, Cummings JH. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 72: 57-64.
- **Mackay AD**, Taylor MB, Kibbler CC, Halminton-Miller JMT. 1999. *Lacobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infec* 5: 290-292.
- **Mackie RI**, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69: 1035S-1045S.
- **Macy JM**, Yu I, Caldwell C, Hungate RE. 1978. Reliable sampling methods for analysis of the ecology of the human alimentary tract. *Appl Environ Microbiol.* 35: 113-120.
- **Malfertheiner P**, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 16:167-80.
- **Marteau P**, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 80: 1031-1037.
- **Marteau P.** 2001. Safety aspects of probiotic products. *Scand J Nutr* 45: 22-24.

- **Mattila-Sandholm T**, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* 12: 173-182.
- **Mishra Ch**, Lambert J. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific J Clin Nutr* 5: 20-24.
- **Mitsuoka T**. 1992a. Intestinal flora and aging. *Nu Rev* 50: 438-446.
- **Miyazawa E**, Iwabuchi A, Yoshida T. 1996. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germfree and conventional rats. *Nutr Res* 16: 603-613.
- **Moore WE**, Moore LV. 1995. Intestinal flora of population that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 61: 3202-3207.
- **Nord CE**, Kager L. 1984. The normal flora of the gastrointestinal tract. *Neth J Med* 27: 249-252.
- **Noverr MC**, Huffnagle GB. 2004. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. *Trends Microbiol* 12: 562-568
- **Oberman H**, Libudzisz Z. 1998. Fermented milks. En: Wood BJB (ed). *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic and Professional, Londres. pp 308-350.
- **Ortega RM**, Requejo AM, López AM, Navia B. 2002. Repercusión del consumo de probióticos en el estado nutricional. En: Ortega RM, Marcos A, Aranceta J, Mateos JA, Requejo AM, Serra L (eds). *Alimentos Funcionales. Probióticos*. Editorial Médica Panamericana, Madrid. pp 77-87.
- **Otto M.**, Peschel A., Gotz F. 1998. Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu3298. *FEMS Microbiology Letters*, 166(2):203-211.
- **Ouwehand AC**. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Salminen S, von Wright A (eds). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc, Nueva York. pp 139-160.
- **Ouwehand AC**, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- **Parodi PW**. 1999. The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Aust J Dairy Technol* 54:103-121.
- **Pridmore RD**, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet AC, Zwahlen MC, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2512-2517.
- **Reddy K. V.**, Aranha C., Gupta S., Yedery R. D. 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction*, 128:117-126.
- **Riley M. A.**, Wertz J.E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. *Annual Reviews of Microbiology*, 56:117-137.
- **Rolfe RD**. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000; 130: 396-402.
- **Ross JM**, Needham JR. 1980. Genital flora during pregnancy and colonization of the newborn. *J R Soc Med* 73: 105-110.

- **Rotimi VO**, Duerden BI. 1981. The development of bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol* 14: 51-62.
- **Rowland IR**. 1995. Toxicology of the colon. Role of the intestinal microflora. En: Gibson G, Macfarlane GT (eds). *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. CRC Press Boca Raton, Florida. pp 155-174.
- **Salminen S**, Ouwehand AC, Isolauri E. 1998a. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int Dairy J* 8: 563-572.
- **Salminen S**, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. 1998c. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80 (Suppl 1): S147-S171.
- **Sánchez B. M. J.**, Martínez R. M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Cruz V., Albert A. 2003. Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state. *Journal of Molecular Biology*, 334:541-549.
- **Sanders ME**. 1998. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int Dairy J* 8: 341-347.
- **Satokari RM**, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Matto J, de Vos WM. 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* 26: 572-584.
- **Schrezenmeir J**, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics; approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73 (2 Suppl): 361S-364S.
- **Shah NP**. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- **Sheu BS**, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. 2002. Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1669-1675.
- **Simon GL**, Gorbach SL. 1982. Intestinal microflora. *Med Clin North Am* 66: 557-74.
- **Sobel JD**, Kaye D. 1995. Urinary tract infections. En: Mandel LG, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practise of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone Inc, USA.
- **Stephen AM**, Cummings JH. 1980. The microbial contribution to human faecal mass. *J Med Microbiol* 13: 45-56.
- **Tahri K**, Crociani J, Ballongue J, Schneider F. 1995. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Lett Appl Microbiol* 21: 149-151.
- **Tannock GW**. 1983. Effect of dietary environmental stress on the gastrointestinal microbiota. En: Hentges DJ (ed). *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, Londres. pp 517.
- **Tannock GW**. 1999a-b. Probiotics: a Critical Review. Horizon Scientific Press, Inglaterra.
- **Toivanen P**, Vahtovuo J, Eerola E. 2001. Influence of major histocompatibility complex in bacterial composition of fecal flora. *Infect Immun* 69: 2372-2377.
- **Tuohy KM**, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *DrugDiscov Today* 8: 692-700.
- **Vanderhoof JA**, Whitney DB, Antonson DL. 1999. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J Pediatr* 135: 564-568.

- **Zoetendal** EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. J Nur 134: 465-472.