



Universitat de Girona

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y
CONSERVACIÓN DE CULTIVOS DE
BACTERIAS LÁCTICAS ANTAGONISTAS DE
MICROBIOTA CONTAMINANTE DE SANGRE
DE MATADERO**

Lucero Marlene ZAMORA RODRÍGUEZ

**ISBN: 84-689-3756-8
Dipòsit legal: GI-I012-2005**

TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN
DE CULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS
ANTAGONISTAS DE MICROBIOTA CONTAMINANTE
DE SANGRE DE MATADERO**

Lucero Marlene Zamora Rodríguez

2003



Universitat de Girona

**Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia
Agroalimentària**

Institut de Tecnologia Agroalimentària

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN
DE CULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS
ANTAGONISTAS DE MICROBIOTA CONTAMINANTE
DE SANGRE DE MATADERO**

**Memoria redactada para optar al Grado de Doctor por la *Universitat de
Girona*, por**

Lucero Marlene Zamora Rodríguez

Las directoras de la tesis

Dra. Dolors Parés i Oliva
Titular del Área de Tecnología
de los Alimentos

Carmen Carretero Romay
Catedrática del Área de Tecnología
de los Alimentos

Girona, julio de 2003

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación obtenida de la *Universitat de Girona* (Plan de investigación UdG 1998) y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT - AGL2001-0888).

Agradecimientos

Quisiera agradecer de manera especial a todas las personas que con su ayuda durante estos años han hecho posible la realización de este trabajo,

A la Dra. Carmen Carretero por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y porque sin su apoyo nada sería posible en el área de Tecnología de los Alimentos.

A la Dra. Dolors Parés por su buena dirección, agradecer el seguimiento del trabajo durante los cuatro años de su realización, desde la fase experimental hasta las correcciones finales. *Gràcies per tot Dolors!*

Al Dr. Emili Montesinos por haberme dejado invadir sus laboratorios y permitirme utilizar el bioscreen y otros equipos. Por compartir la experiencia de su grupo y por supuesto por la foto del punto de sublimación. *Moltes gràcies!*

A la Dra. Maria Plà por lo que he podido aprender de ella en referencia a la biología molecular. Mi más sincero agradecimiento por su paciencia.

A la Mònica Toldrà (no te he llamado Dra.) simplemente por todo. Para comenzar quisiera agradecerte la enorme ayuda en el sentido profesional. Gracias por hacer que estos años hayan sido más agradables. Por compartir desde bromas hasta enfados o lo que nosotras llamamos “distorsión”. Siento alegría de cerrar este capítulo sabiendo que he ganado una verdadera amiga!

A la Anna Maria Aymerich, porque siempre estabas cuando más lo necesitaba. No solo por darme un *cop de mà* en el laboratorio si no también por tu amistad, la cual hoy me llevo como un gran tesoro.

Al David Rodríguez, que aunque sé que le agradan los experimentos, los laboratorios y trabajar... invirtió muchas horas en mis hijas, las BAL. Gracias por introducirme en el mundo de las *PCRs*, por la bibliografía, por compartir la vianda cuando no estaba abierto Henry's Bar, por animarme y por tu amistad!

A la Anna Bonaterra por ayuda y sus enseñanzas sobre microbiología siempre!

A la Esther Badosa un agradecimiento especial y con mayúsculas, por ser esa persona dispuesta a ayudar, enseñar en todo momento y siempre con el famoso final “*Reina*”. Creo que tengo una lista: gracias por la *P. fluorescens* EP537, aislamiento de *P. fluorescens* autóctona, mutante de *Bacillus*, gracias por enseñarme aspectos de biología molecular, bibliografía, etc. Gracias por todo *Reina*;

Creo que no hay palabras para expresar mi agradecimiento *als Nanos*, la Maria Guajardo, al Sergi Carreras, a la Aurora Piñero y a la Yolanda Bogado la experiencia más linda y satisfactoria que he podido vivir en mi época de *doctoranda*. Ya se que no estoy tan vieja pero poder compartir un poco de vuestra juventud e inquietudes me dieron fuerza y motivación para avanzar en las investigaciones.

A la Elena Sagner por su apreciación del análisis estadístico, por dejarme su ordenador en momentos críticos y por compartir el despacho.

A Eduard Dàvila por el análisis estadístico, por la confirmación de la secuencia de *L. reuteri* y pedirle que trate bien a las BAL. *Sort Eduard!*

Al Vicenç Oliveras por darme ánimos cuando aún no salían las secuencias (*Ja sortirà!*).

Al Josep Pereda por el tema de 15°C (refriterm, cámaras, etc).

A la Rebeca Jimenez por su ayuda con el atomizador, por su amistad y los gratos momentos!

Quisiera agradecer también a las personas que aunque no hayan estado vinculadas directamente con este trabajo me han ayudado en momentos puntuales:

A Silvia Sancho por su apoyo moral siempre!

A Carles Lorca por enseñarme a tomar la autopista a Barcelona. A Ricard March del Hipra por la sangre estéril. A Joan de Gràcia por enseñarme el tema de Power Point. A la Olga Montojo por la liofilización. Al Jordi Cabrefiga y Jesús Francés por las fotos! A la Marta Pujol y la Carmen Moreno (mujer biónica y maravilla, respectivamente).

A las secretarias: Susana Santaularia, Lourdes Cordech y Carmen Dilmé por el material de oficina y la solución de la burocracia.

A los Marcs y a la Aurora del centro de cálculo por las urgencias. *Què fariem sense vosaltres?*

A la gente de Ingeniería Química : Pere Mutjé por hacer posible que pasemos todos juntos lindos momentos, a la Farners, la M^a Àngels, Fabiola, Susana, Pere Sarquella, Xevi..

A los amigos de la tertulia y la broma: Jaume Alemany, Ferran Ribas, Quim Comas. Aquí incluyo a Batiste (ReyDI) por soportar mis últimos días de nerviosismo y por los márgenes.

A la Monserrat Coldecarrera por su preocupación en mi persona. *Est molt maca!*

A la gente del comedor por las discusiones y los buenos momentos: Lidia, Jordi, Isidre, Cun, Gemma, Nuri Fort, Nuri Cabezas, Lourdes, Mari Carmen, Mònica, Esther, Marta, David, Dolors, etc..... *El pebre vermell existeix...*

A *l'Institut de Tecnologia Agroalimentària* y a su director el Dr. Jaume Camps por su colaboración en todo momento.

Al *Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària*, agradezco la oportunidad de ejercer docencia y el apoyo durante estos años.

No tinc paraules d'agraïment per en Pere, la Pepita i en Ramon perquè sense la seva ajuda res hagués estat possible. Gràcies de veritat!

Dedicataria

Dedico este trabajo en primer lugar a mis padres Eladio y Socorro: A mi padre por su ejemplo de lucha y por sus sabios consejos. A mi madre agradezco su comprensión, su dulzura, su dedicación siempre. Gracias mamita!

A mis hermanos porque cada uno de ellos ha contribuido con mi formación a lo largo de mi vida.

Gracias por el cariño: Aida, David, Fernando, Charo, Susana, Ruben, Zory, Jorge y Lourdes.

A mis hijos Brenda y Gerard con todo, todo mi amor!

INDICE

Capítulo 1. Introducción

| | |
|--|----|
| 1.1 Subproductos de la industria cárnica | 3 |
| 1.2 La sangre | 3 |
| 1.2.1 Sistemas de recolección de la sangre | 4 |
| a) Sangre veterinaria | 4 |
| b) Sangre higiénica | 4 |
| 1.2.2 Fracciones de la sangre | 7 |
| 1.2.2.1 Composición química | 8 |
| 1.2.2.2 Valor nutritivo | 9 |
| 1.2.2.3 Propiedades funcionales | 10 |
| 1.2.3 Características microbiológicas de la sangre higiénica | 11 |
| 1.2.4 Sistemas de higienización | 14 |
| 1.2.5 Sistemas de conservación de la sangre | 16 |
| 1.3 Bioconservación | 18 |
| 1.3.1 La Bioconservación y la sangre | 19 |
| 1.3.2 Cultivos bioprotectores | 19 |
| 1.3.3 Bacterias ácido lácticas: cultivo bioprotector | 20 |
| 1.3.3.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL) | 21 |
| 1.3.3.2 Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas | 22 |
| 1.4 Conservación de cultivos microbianos | 25 |
| 1.4.1 Conservación en refrigeración | 26 |
| 1.4.2 Conservación por congelación | 27 |
| 1.4.3 Conservación en nitrógeno líquido | 30 |
| 1.4.4 Conservación por deshidratación | 31 |
| 1.4.4.1 Liofilización | 31 |
| 1.4.4.2 Atomización | 35 |
| 1.5 Objetivos generales y estructura del trabajo | 36 |

Capítulo 2. Evaluación del potencial antagonista en condiciones mesófilas

| | |
|--|----|
| 2.1 OBJETIVOS | 41 |
| 2.2 MATERIAL y MÉTODOS | 43 |
| 2.2.1 Confección de una colección de BAL mesófilas | 43 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.2.1.1 | Toma de muestras | 43 |
| 2.2.1.2 | Aislamiento de BAL mesófilas de sangre de matadero | 43 |
| 2.2.1.2.1 | Selección del medio de aislamiento | 43 |
| 2.2.1.2.2 | Aislamiento de BAL mesófilas | 45 |
| 2.2.2 | Aislamiento de los microorganismos indicadores autóctonos | 45 |
| 2.2.3 | Procedencia de las cepas indicadoras de colección | 48 |
| 2.2.4 | Determinación del potencial antagonista en placa de las BAL | 49 |
| 2.2.5 | Cinética de crecimiento | 49 |
| a) | Cinética de crecimiento en medio selectivo | 49 |
| b) | Cinética de crecimiento en sangre | 50 |
| 2.2.6 | Cinética de crecimiento de los microorganismos indicadores en sangre | 51 |
| 2.2.7 | Potencial antagonista de las BAL en sangre | 52 |
| 2.2.8 | Co-inoculación de BAL y microorganismos indicadores | 52 |
| 2.3 | RESULTADOS y DISCUSIÓN | 54 |
| 2.3.1 | Potencial antagonista de las BAL en placa | 54 |
| 2.3.2 | Cinética de crecimiento de las BAL | 66 |
| a) | Cinética de crecimiento de las BAL en medio selectivo | 66 |
| b) | Cinética de crecimiento de las BAL en sangre | 70 |
| 2.3.3 | Cinética de crecimiento de los microorganismos indicadores en sangre | 74 |
| 2.3.4 | Potencial antagonista de las BAL en sangre | 75 |
| 2.3.4.1 | Implantación del cultivo | 75 |
| 2.3.4.2 | Preparación del inóculo | 76 |
| 2.3.4.3 | Efecto inhibitorio | 80 |
| 2.3.4.4 | Efecto de la adición de glucosa en sangre | 82 |
| 2.4 | CONCLUSIONES | 90 |

Capítulo 3. Evaluación del potencial antagonista en condiciones psicrótrofas

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1 | OBJETIVOS | 95 |
| 3.2 | MATERIAL y MÉTODOS | 97 |
| 3.2.1 | Confeción de una colección de BAL psicrótrofas | 97 |
| 3.2.1.1 | Toma de muestras | 97 |
| 3.2.1.2 | Aislamiento de BAL psicrótrofas de sangre de matadero | 97 |
| 3.2.1.3 | Recuperación de las BAL psicrótrofas a partir de la colección de cepas mesófilas | 97 |

| | | |
|--|--|------------|
| 3.2.2 | Determinación del potencial antagonista en placa de las BAL psicrótrofas | 98 |
| 3.2.3 | Potencial antagonista de las BAL en sangre a 15°C | 98 |
| 3.2.3.1 | Obtención de los inóculos | 98 |
| | a) BAL | 98 |
| | b) Microorganismos indicadores | 98 |
| 3.2.3.2 | Evaluación de la supervivencia de las BAL en sangre a 15°C | 99 |
| 3.2.3.3 | Evaluación del crecimiento de los microorganismos indicadores a 15°C | 99 |
| | a) En medio líquido | 99 |
| | b) En sangre | 100 |
| 3.2.3.4 | Ensayo de antagonismo | 100 |
| | 3.2.3.4.1 Co-inoculación | 101 |
| 3.3 | RESULTADOS y DISCUSIÓN | 102 |
| 3.3.1 | Capacidad antagonista en placa | 102 |
| 3.3.2 | Potencial antagonista en sangre a 15°C | 105 |
| 3.3.2.1 | Obtención de los inóculos | 105 |
| 3.3.2.2 | Evaluación de la supervivencia de las BAL en sangre a 15°C | 109 |
| 3.3.2.3 | Evaluación del crecimiento de los microorganismos indicadores a 15°C | 109 |
| | a) En medio de cultivo líquido | 112 |
| | b) En sangre | 113 |
| 3.3.2.4 | Efecto inhibitorio | 117 |
| 3.4 | CONCLUSIONES | 127 |
| Capítulo 4. Identificación de las cepas con potencial antagonista | | 129 |
| 4.1 | INTRODUCCIÓN | 131 |
| 4.2 | OBJETIVOS | 132 |
| 4.3 | MATERIAL y MÉTODOS | 135 |
| 4.3.1 | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 135 |
| | 4.3.1.1 Crecimiento de los cultivos de BAL | 135 |
| | 4.3.1.2 Amplificación | 135 |
| | 4.3.1.3 Purificación del producto de PCR | 137 |
| 4.3.2 | Reacción de secuenciación del producto amplificado | 138 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.2.1 Lectura y Análisis de secuencias | 140 |
| 4.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN | 142 |
| 4.4.1 Amplificación y Purificación del producto de PCR | 142 |
| 4.4.2 Secuencias e Identificación | 143 |
| 4.5 CONCLUSIONES | 168 |
| | |
| Capítulo 5. Conservación de las cepas con potencial antagonista | 169 |
| 5.1 OBJETIVOS | 171 |
| 5.2 MATERIAL y MÉTODOS | 174 |
| 5.2.1 Bacterias ácido lácticas | 174 |
| 5.2.2 Diseño experimental | 174 |
| 5.2.3 Obtención del cultivo de BAL | 175 |
| 5.2.4 Liofilización | 177 |
| • Etapa I | 177 |
| • Etapa II | 179 |
| 5.2.5 Determinación de la viabilidad | 179 |
| 5.2.6 Atomización | 180 |
| 5.2.6.1 Preparación de la muestra | 182 |
| • Caldo MRS | 182 |
| • Leche en polvo | 182 |
| 5.2.6.2 Proceso de atomización | 182 |
| • Etapa I | 182 |
| 5.2.6.2.1 Pruebas preliminares | 182 |
| 5.2.6.2.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento | 184 |
| • Etapa II | 184 |
| 5.2.6.3 Atomización de la totalidad de las cepas | 184 |
| 5.2.7 Congelación | 184 |
| 5.2.7.1 Almacenamiento | 185 |
| 5.2.7.2 Determinación de la población de BAL | 185 |
| 5.3 Análisis Estadístico | 185 |
| 5.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN | 187 |
| 5.4.1 Liofilización | 187 |
| • Etapa I | 187 |
| 5.4.1.1 Determinación del crioprotector y temperatura de almacenamiento | 187 |
| 5.4.2 Atomización | 197 |

| | |
|--|-----|
| • Etapa I | 197 |
| 5.4.2.1 Pruebas preliminares | 197 |
| 5.4.2.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento | 200 |
| • Etapa II | 205 |
| 5.4.3 Comparación de liofilización, atomización y congelación | 211 |
| 5.5 CONCLUSIONES | 217 |
| | |
| CONCLUSIONES | 219 |
| BIBLIOGRAFIA | 225 |
| ANEXOS | 241 |
| | |
| ANEXO 1 Conservación de cepas con potencial antagonista. Recuentos durante el almacenamiento de los cultivos de BAL TA73 y Ps7 liofilizadas y atomizadas. | 243 |
| ANEXO 2 Conservación de cepas con potencial antagonista. Determinación del porcentaje de viabilidad de los cultivos: Ejemplo de cálculo | 246 |
| ANEXO 3 Conservación de cepas con potencial antagonista: Análisis estadístico | 250 |
| ANEXO 4 Conservación de cepas con potencial antagonista. Etapa II : Comparación de liofilización, atomización y congelación | 253 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Capítulo 1. | Introducción | |
| Figura 1.1 | Sistema cerrado de recogida de sangre higiénica | 6 |
| Figura 1.2 | Sistema abierto de recogida de sangre | 6 |
| Figura 1.3 | Fracciones de la sangre | 7 |
| Figura 1.4 | Diagrama de fases del agua | 34 |
| Capítulo 2. | Evaluación del potencial antagonista en condiciones mesófilas | |
| Figura 2.1 | Halos de inhibición alrededor colonias de bacterias lácticas | 54 |
| Figura 2.2 | Sensibilidad de los indicadores de colección y autóctonos a la inhibición por BAL en placa. | 61 |
| Figura 2.3 | Curvas de Crecimiento de las BAL con potencial antagonista en placa, en caldo MRS. | 68 |
| Figura 2.4 | BAL seleccionadas ordenadas en función de la duración de las fases de crecimiento. | 70 |
| Figura 2.5 | Cinética de crecimiento de las BAL en sangre con y sin adición de glucosa. | 71 |
| Figura 2.6 | Aspecto de la sangre fermentada | 73 |
| Figura 2.7 | Cinética de crecimiento de las bacterias indicadoras en sangre a 30°C. | 75 |
| Figura 2.8 | Curvas obtenidas a partir de la inoculación conjunta en sangre de la cepa láctica TA43 y uno de los microorganismos indicadores y del microorganismo indicador en ausencia de la cepa láctica (control). Inóculos iniciales del orden de 10 ⁴ ufc/mL. | 78 |
| Figura 2.9 | Confrontación en sangre de BALTA43 (10 ⁶ ufc/mL) vs <i>S.aureus</i> y <i>P.fluorescens</i> (10 ⁵ ufc/mL). | 79 |
| Figura 2.10 | Curvas de crecimiento a 30°C de BAL y bacterias indicadoras co-inoculadas en sangre. | 81 |
| Figura 2.11 | Confrontación de <i>Staphylococcus aureus</i> con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C. | 84 |
| Figura 2.12 | Confrontación de <i>Escherichia coli</i> con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C. | 85 |
| Figura 2.13 | Confrontación de <i>P. fluorescens</i> con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C. | 86 |

| | | |
|---|--|-----|
| Figura 2.14 | Confrontación de <i>Bacillus</i> spp. con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C. | 87 |
| Capítulo 3. Evaluación del potencial antagonista en condiciones psicrótrofas | | |
| Figura 3.1 | Sensibilidad de los indicadores autóctonos a la Inhibición per BAL en placa a 15°C. | 104 |
| Figura 3.2a | Curvas de crecimiento a 30°C en caldo MRS de las BAL con potencial antagonista en placa a 15°C. Inóculo: 10 ⁴ ufc/mL. | 106 |
| Figura 3.2b | Curvas de crecimiento a 30°C en caldo MRS de las BAL con potencial antagonista en placa a 15°C. Inóculo: 10 ⁴ ufc/mL | 107 |
| Figura 3.3a | Evaluación de la supervivencia en sangre a 15°C de las BAL con potencial antagonista en placa. Inóculo: 10 ⁷ - 10 ⁸ ufc/mL. | 110 |
| Figura 3.3b | Evaluación de la supervivencia en sangre a 15°C de las BAL con potencial antagonista en placa. Inóculo: 10 ⁷ - 10 ⁸ ufc/mL. | 111 |
| Figura 3.4 | Curvas de crecimiento de los microorganismos indicadores autóctonos de sangre en caldo nutritivo a 15°C. Inóculo inicial: 10 ⁴ ufc/mL. | 112 |
| Figura 3.5 | Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> en sangre a 15°C. | 115 |
| Figura 3.6 | Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus</i> spp. en sangre a 15°C. | 116 |
| Figura 3.7 | Evolución de <i>Pseudomonas fluorescens</i> autóctona a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas. | 118 |
| Figura 3.8 | Evolución de <i>Staphylococcus aureus</i> autóctono a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculado conjuntamente con BAL psicrótrofas. | 119 |
| Figura 3.9 | Evolución de <i>Escherichia coli</i> autóctona a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas. | 120 |
| Figura 3.10 | Evolución de <i>Bacillus</i> autóctono a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas. | 121 |
| Figura 3.11 | Sensibilidad <i>in situ</i> de los diferentes indicadores frente a las 11 BAL seleccionadas al final del ensayo | 124 |
| Capítulo 4. Identificación de las cepas con potencial antagonista | | |
| Figura 4.1 | Representación gráfica de la molécula de 16S ARNr de <i>Escherichia coli</i> . | 133 |
| Figura 4.2 | Esquema de los pasos de purificación y secuenciación de ADN <i>r</i> amplificado. | 140 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Figura 4.3 | Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) del producto de PCR purificado. | 142 |
| Capítulo 5. | Conservación de cepas con potencial antagonista | |
| Figura 5.1 | Esquema del diseño experimental. | 176 |
| Figura 5.2 | Deshidratación de la muestra mediante el método de la liofilización. Equipo de liofilización modelo VirTis Unitop SQ Drying Chamber + VirTis Freezemobile. | 178 |
| Figura 5.3 | Equipo de atomización Büchi Mini Spray Dryer B-191 y sus componentes. | 181 |
| Figura 5.4A | Etapas de desecación de la liofilización de cultivos con (a) leche desnatada al 20%, (b) glucosa al 10%. | 190 |
| Figura 5.4B | Cultivos liofilizados con los diferentes crioprotectores: (a) lactosa al 12%, (b) glucosa al 10% y (c) leche desnatada al 20%. | 190 |
| Figura 5.5 | Recuentos de los cultivos liofilizados con glucosa 10%, lactosa 12% y leche 20% de las BAL TA73 y Ps7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. | 192 |
| Figura 5.6 | Porcentaje de viabilidad de los cultivos liofilizados con glucosa 10%, lactosa 12% y leche 20% de las BALTA73 y BALPs7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. | 194 |
| Figura 5.7 | Promedio de los porcentajes de viabilidad a los 60 días de almacenamiento de los cultivos de las BALTA73 y BALPs7 liofilizados con los diferentes crioprotectores. | 195 |
| Figura 5.8 | Recuentos de los cultivos atomizados de las BAL TA73 y BAL PS7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. | 201 |
| Figura 5.9 | Porcentaje de viabilidad de los cultivos atomizados de la BAL TA73 y la BAL PS7 almacenadas a 5 y 20°C. | 202 |
| Figura 5.10 | Porcentaje de viabilidad a los 60 días de almacenamiento de TA73 y Ps7. | 203 |
| Figura 5.11a | Recuentos de los cultivos de las BAL mesófilas congelados a -80°C, liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C. | 208 |
| Figura 5.11b | Recuentos de los cultivos de las BAL psicrótrofas congelados a -80°C, liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C. | 209 |
| Figura 5.12a | Porcentajes de viabilidad de los cultivos de las BAL mesófilas congelados a -80°C, liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C. | 210 |
| Figura 5.12b | Porcentajes de viabilidad de los cultivos de las BAL psicrótrofas congelados a -80°C, liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C. | 211 |

LISTA DE CUADROS**Capítulo 1. Introducción**

| | | |
|-------------------|---|----|
| Cuadro 1.1 | Composición de las diferentes fracciones de la sangre | 8 |
| Cuadro 1.2 | Aminoácidos esenciales en proteínas de la sangre | 9 |
| Cuadro 1.3 | Características microbiológicas de la sangre porcina recogida mediante sistemas abiertos. | 12 |

Capítulo 2. Evaluación del potencial antagonista en condiciones mesófilas

| | | |
|-------------------|--|----|
| Cuadro 2.1 | Potencial antagonista en placa de los indicadores a 30°C. | 55 |
| Cuadro 2.2 | Recuentos en agar MRS de las BAL con potencial antagonista en placa. | 67 |
| Cuadro 2.3 | Parámetros de crecimiento de las BAL en medio selectivo | 69 |
| Cuadro 2.4 | Evolución del pH de la sangre inoculada con las BAL | 72 |
| Cuadro 2.5 | Antagonismo en placa de BAL con amplio espectro de inhibición. | 77 |
| Cuadro 2.6 | Antagonismo en sangre de las BAL seleccionadas frente a los indicadores. | 82 |
| Cuadro 2.7 | Antagonismo en sangre con glucosa (2%) de las BAL seleccionadas frente a los indicadores | 83 |

Capítulo 3. Evaluación del potencial antagonista en condiciones psicrótrofas

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Cuadro 3.1 | Antagonismo de las cepas de BAL frente a indicadores autóctonos de sangre | 102 |
| Cuadro 3.2 | Parámetros de crecimiento de las BAL en medio selectivo MRS a 30°C | 108 |
| Cuadro 3.3 | Parámetros de crecimiento de las bacterias indicadoras y velocidad específica de crecimiento en caldo nutritivo a 15°C | 113 |
| Cuadro 3.4 | Antagonismo <i>in situ</i> de las 11 BAL frente a los microorganismos indicadores a 15°C | 125 |

Capítulo 4. Identificación de las cepas con potencial antagonista

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Cuadro 4.1 | Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación del 16S ADNr de las BAL | 135 |
| Cuadro 4.2 | Cóctel utilizado en la reacción de PCR para amplificación de 16S ADNr | 136 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Cuadro 4.3 | Identificación de las BAL a partir del análisis de comparación de secuencias utilizando el software BLAST algoritmo | 145 |
| Cuadro 4.4 | Secuencias de las regiones V1-V3 y V6-V9 del 16S ADNr de las BAL con potencial antagonista | 153 |
| Cuadro 4.5 | Comparación de las secuencias de las BAL problema con las publicadas en las bases de datos | 157 |
| Capítulo 5. | Conservación de cepas con potencial antagonista | |
| Cuadro 5.1 | Diferentes condiciones evaluadas en las pruebas preliminares de atomización | 183 |
| Cuadro 5.2 | Porcentajes de recuperación de células de los cultivos de BAL después de la liofilización | 188 |
| Cuadro 5.3 | Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL después de la liofilización | 189 |
| Cuadro 5.4 | Tiempo de reducción decimal (días) de los cultivos de BAL liofilizados mantenidos a dos temperaturas de almacenamiento | 196 |
| Cuadro 5.5 | Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL después de la atomización | 200 |
| Cuadro 5.6 | Tiempo de reducción decimal (días) de los cultivos de BAL atomizados mantenidos a dos temperaturas de almacenamiento | 203 |
| Cuadro 5.7 | Porcentajes de recuperación de células viables de los cultivos de BAL liofilizados, atomizados y congelados | 205 |
| Cuadro 5.8 | Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL liofilizados y atomizados | 207 |
| Cuadro 5.9 | Valores D de los cultivos de BAL liofilizados, atomizados y congelados expresados en días | 212 |
| Cuadro 5.10 | Método de conservación más adecuado para cada una de las cepas láctica | 216 |

Capítulo 1 Introducción

1.1 Subproductos de la industria cárnica

En los mataderos, se obtienen diariamente una serie de subproductos de la matanza tales como: sangre, huesos, pezuñas, etc. En ganado vacuno pueden llegar a representar el 40 por ciento del peso vivo del animal. Para el caso de cerdos, el porcentaje de subproductos suele corresponder a un 25 por ciento del peso bruto del animal. Para otro tipo de animales sacrificados (ovejas, cabras, llamas, etc.) los residuos vienen a representar cifras comprendidas entre el 22 y 42 por ciento. Estas cifras pueden sufrir alteraciones según las razas, clase de alimentación, etc. (Madrid, 1999).

1.2 La sangre

La sangre es considerada un subproducto aprovechable por la industria alimentaria sólo en el caso que sea recogida bajo condiciones higiénicas y destinada a la elaboración de un producto de valor añadido. Desgraciadamente, la mayoría de mataderos del estado no disponen de un sistema de recogida higiénica y la sangre generada es considerada y tratada como un residuo industrial (BOE núm. 16, de 19 de enero de 1994: real decreto 2224/1986, del 17 de diciembre). La sangre siempre ha sido un problema grave para los mataderos ya que es uno de los residuos con mayor poder contaminante, que expresado en Demanda Química de Oxígeno (DQO) total, es aproximadamente 375.000 mg/L (Tritt y Schuchardt, 1992). Esta elevada carga orgánica la convierte en un producto que debe tratarse antes de verterla a un ambiente acuático natural para evitar posibles consecuencias negativas: disminución del oxígeno en disolución en el agua y muerte de los organismos que la habitan. El aprovechamiento de la sangre en el propio matadero supone la instalación de una infraestructura diferenciada que comporta inversiones elevadas y costos importantes.

Afortunadamente, en la actualidad existen empresas que recogen la sangre de los mataderos para transformarla en harina y otros productos comerciales. De esta forma se evita la contaminación de las corrientes de agua (Madrid, 1999).

La empresa APC Europe (APROCAT) es la única del estado español que se dedica al reciclaje y la revalorización de la sangre animal producida

mayoritariamente en Cataluña, la cual en 1998 procesaba aproximadamente 32.000 toneladas de sangre al año. En Cataluña se recoge el 68% de la sangre producida en los mataderos. La venta de la sangre a una empresa externa puede resolver el problema medioambiental y también reducir los costes de procesamiento que tendrían si tuvieran que hacerlo ellos mismos.

La sangre es una materia prima muy rica en proteínas de alto valor añadido. Los productos obtenidos a partir de la sangre son aprovechados por una gran variedad de mercados, entre la cual destaca el de la alimentación animal, el de la industria alimentaria y la cosmética (Costafreda, 1996).

1.2.1 Sistemas de recolección de la sangre

Basándonos en el sistema de recogida empleado en el matadero podemos distinguir dos tipos de sangre:

- a) **Sangre veterinaria**, obtenida a través del degüello normal. Como no se toman grandes precauciones para su extracción, no es un producto de alto valor. Normalmente viene contaminada con sustancias extrañas y, además, presenta un alto grado de contaminación microbiológica. En el año 2000 se prohibió la utilización de esta sangre en la fabricación de harinas para piensos como consecuencia de la aparición de brotes de encefalopatía espongiiforme en ganado bovino (BSE). Hasta el momento se considera que las encefalopatías espongiiformes transmisibles (ETT) no afectan al ganado porcino, por lo tanto la normativa europea deroga la prohibición de su utilización a partir del 12 de junio de 2003 siempre que se evite utilizarla para alimentar a animales de la misma especie, es decir se prohíbe el canibalismo (DOCE L273-10/10/02).
- b) **Sangre higiénica**, es decir una sangre limpia, exenta de cualquier otro producto (agua, excrementos, etc.). Esta sangre se extrae directamente del torrente sanguíneo y permite la obtención de productos de un valor añadido superior (Rodríguez,1994). La sangre higiénica es la que presenta características potenciales para ser utilizada por la industria alimentaria destinada al consumo humano.

El método más adecuado de recogida de sangre higiénica es el sistema cerrado que consta de un cuchillo o cánula hueca que se introduce en el animal y que va conectado a través de un conducto flexible de plástico a un tanque y a una bomba de vacío que succiona la sangre. La instalación va provista de un aparato dosificador de solución anticoagulante (citrato sódico, polifosfato, etc.), un filtro y un intercambiador de placas para enfriar la sangre hasta 4-8°C. De ahí pasa a un tanque de almacenamiento (Madrid, 1999).

En la figura 1.1 se muestra el esquema de un sistema cerrado de recolección de la sangre, que sería el ideal desde el punto de vista de calidad microbiológica.

La mayoría de mataderos que sacrifican ganado porcino en Cataluña utilizan un sistema abierto de recogida de sangre. La sangre obtenida en sistemas abiertos puede considerarse higiénica si se toman una serie de precauciones en el momento de la recolección, como (1) evitar que la sangre se mezcle con desechos o sustancias extrañas como, agua del lavado, orines, etc., utilizando una vía limpia y separada por donde fluya la sangre proveniente directamente del desangrado del animal (2) impedir la coagulación de la sangre mediante la adición de algún tipo de anticoagulante mientras se va recogiendo la sangre (citrato sódico, polifosfato, ...) y (3) refrigeración inmediata de la sangre recolectada. La figura 1.2 muestra un sistema abierto de obtención de sangre higiénica en el cual se deben tomar las medidas de precaución antes mencionadas.

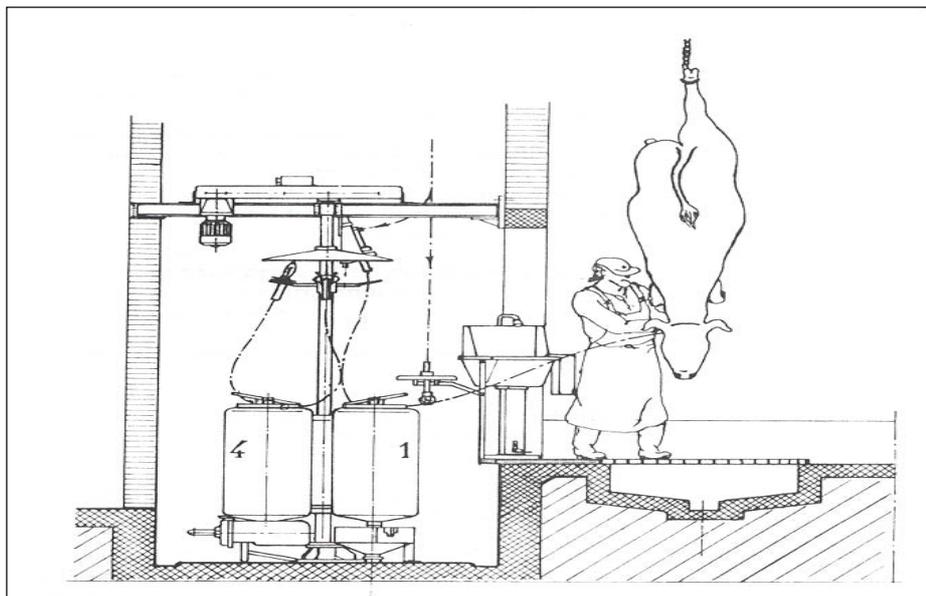


Figura 1.1: Sistema cerrado de recogida de sangre higiénica (Wisner-Pedersen, 1988)

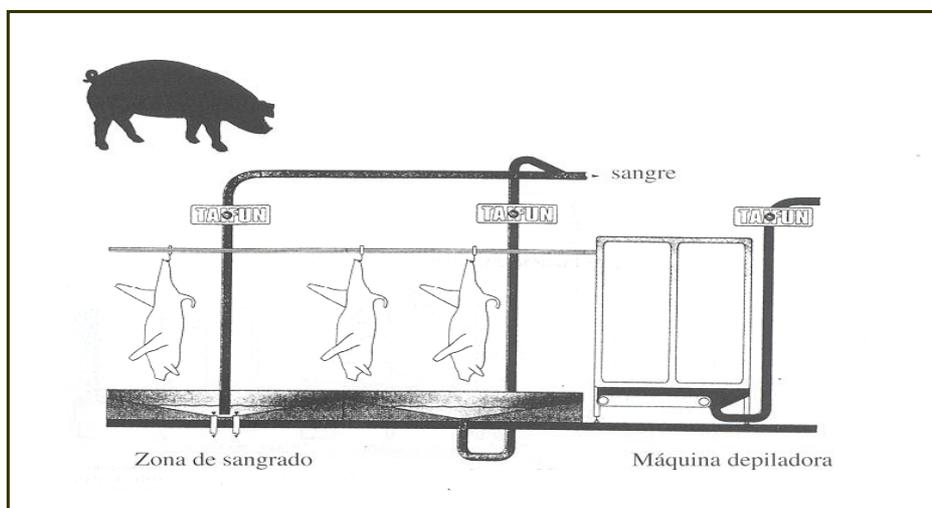


Figura 1.2: Sistema abierto de recogida de sangre. Deben tomarse medidas de precaución a fin de obtener sangre higiénica (Madrid, 1999)

1.2.2 Fracciones de la sangre

La sangre se puede dividir en dos fracciones: plasma y fracción celular. El plasma constituye del 60% al 70% de la sangre y la fracción celular constituye del 30% al 40% (Ockerman y Hansen,1994). El fraccionamiento, para separar el plasma de la fracción celular, se realiza mediante la centrifugación de la sangre completa, a la cual se le adiciona previamente un agente anticoagulante, siendo los más frecuentes el ácido cítrico o el citrato sódico y los polifosfatos.

Como se puede observar en la figura 1.3, si no se utiliza anticoagulante se obtiene la sangre coagulada y el suero que es el equivalente al plasma pero sin la presencia de fibrinógeno y de precursores de factores de la coagulación.

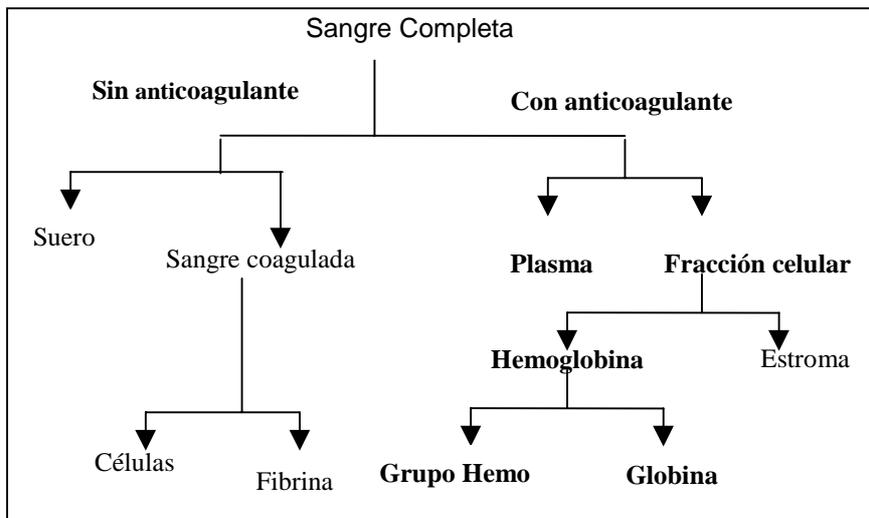


Figura 1.3 Fracciones de la sangre (Ranken, 1980)

1.2.2.1 Composición química

Dependiendo de la especie animal y de la eficiencia del proceso se pueden obtener pequeñas diferencias entre la composición de las fracciones de la sangre. La composición aproximada de las principales fracciones se muestra en el cuadro 1.1. **El plasma** es un líquido que contiene 6-8% de proteína de alto valor nutritivo (fibrinógeno, globulinas, albúmina, trombina, factores de crecimiento y lipoproteínas) que una vez purificadas se pueden utilizar en los diferentes mercados. **La fracción celular** separada del plasma contiene un 28-38% de proteína, de la cual un 90% se encuentra en forma de hemoglobina (Wisner-Pedersen, 1988). La hemoglobina está compuesta por globina (94%) y el grupo hemo (6%) que a su vez contiene un 9% de hierro (Ranken, 1980).

Cuadro 1.1
Composición de las diferentes fracciones de la sangre

| Compuesto | Sangre completa | Suero (66% de la sangre) | Plasma (60% de la sangre) | Fracción Celular (40% de la sangre) |
|------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| Agua | 80,8 | 91,2 | 90,8 | 60,8 |
| Sales minerales | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 1,1 |
| Grasas | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,4 |
| Proteínas: | 17,0 | 7,5 | 7,9 | 35,1 |
| Albúmina | 2,2 | 3,3 | 3,3 | |
| Fibrinógeno | 0,3 | | 0,4 | |
| Globulina | 2,8 | 4,2 | 4,2 | |
| Estroma | 1,7 | | | 5,1 |
| Hemoglobina | 10,0 | | | 30,0 |
| Otras sustancias | 1,1 | 0,4 | 0,4 | 2,6 |

Fuente : Ranken, 1980

1.2.2.2 Valor nutritivo

Un 70% de la materia orgánica de los efluentes que contienen la sangre, los que proceden de líneas de sacrificio, son proteínas. El sacrificio de los cerdos supone la obtención de aproximadamente 2,5 litros de sangre por animal con un contenido de proteína de alrededor un 18%, y que utilizada como fuente proteica podría llegar a representar un incremento en el rendimiento de magro de un 6-7% (Wismer-Pedersen, 1979). Si toda la sangre procedente de los 36 millones de cerdos sacrificados anualmente en España (FAO, 2001) se destinaran a la alimentación supondría un incremento de más de 14.000 toneladas de proteína disponible para la alimentación humana.

Cuadro 1.2
Aminoácidos esenciales en proteínas de la sangre

| Aminoácidos esenciales | g por 100g de proteína | | | |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|---|
| | Sangre entera ^a | Plasma ^b | Globina ^c | Combinación tipo ^d (adulto) |
| Ile | 0,4-0,9 | 1,0-3,4 | 0,2-0,3 | 1,8 |
| Leu | 12,4-13,6 | 9,2-10,1 | 13,2-13,8 | 2,5 |
| Lys | 9,2-9,7 | 6,5-9,2 | 9,8-10,5 | 2,2 |
| Met (+Cys) ^e | 1,3-1,8 | 0,6-1,3 | 1,5-1,7 | 2,4 |
| Phe (+Tyr) ^f | 7,0-8,0 | 5,1-5,7 | 7,6-7,8 | 2,5 |
| Thre | 4,7-5,2 | 2,6-7,1 | 3,8-4,1 | 1,3 |
| Tr | 1,4 | 0,6-1,9 | 1,3-2,0 | 0,7 |
| Val | 8,0-9,1 | 6,8-7,4 | 9,4-9,6 | 1,8 |

^{a,b,c} Según Ockerman y Hansen(1994); ^d Según FAO-OMS,1973, Rapport 52-522(17). ^e La Cys puede cubrir como máximo 1/3 de la necesidad total de los aminoácidos azufrados, ^f La Tyr puede cubrir, como máximo, 1/3 de la necesidad total de aminoácidos aromáticos.

En el cuadro 1.2, se muestra el contenido de aminoácidos de la sangre y sus fracciones, comparados con los valores recomendados por la FAO. La sangre contiene todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana (Tybor *et al.*, 1975) pero es deficiente en isoleucina y pobre en metionina. Sin embargo, los aminoácidos limitantes de la sangre se encuentran en abundancia en el resto de los alimentos como por ejemplo en la carne roja, por lo tanto mediante una dieta en combinación con otros alimentos esta carencia no supondría un

problema desde el punto de vista nutricional (Ranken,1980; Ockerman y Hansen, 1994).

1.2.2.3 Propiedades funcionales

Además de su elevado valor nutricional, las proteínas de la sangre presentan propiedades funcionales potencialmente útiles en la formulación de alimentos (Tybor *et al.*, 1975; De Vuono *et al.*, 1979). El plasma sanguíneo contiene 6-8% de proteína que al calentarse forma geles asociados a la desnaturalización de las moléculas proteicas (Harper *et al.*, 1978; Howell *et al.*, 1984; Cheftel *et al.*, 1989; Real del Sol *et al.*, 1991; Parés *et al.*, 1998), la capacidad de originar este tipo de estructuras es interesante en alimentos debido a que los geles proporcionan textura, consistencia y un medio que permite retener agua, nutrientes y aromas. Según Howell y Lawrie (1984) las características de los geles de plasma sanguíneo son comparables a los provenientes de clara de huevo, ingrediente que se utiliza frecuentemente como agente gelificante en diferentes alimentos.

La albúmina y la globina plasmáticas son también buenos agentes emulsionantes (Tybor *et al.*, 1973 y 1975, Nakamura *et al.*, 1984; Caldironi *et al.*, 1982; Raeker y Jonhson, 1995) y con capacidad espumante (Tybor *et al.*, 1975; De Vuono *et al.*, 1979; Etheridge *et al.*, 1981; Real del Sol *et al.*, 1991).

Parés *et al.* (1998) realizaron un estudio de la estabilidad durante el almacenamiento de las propiedades funcionales del plasma porcino deshidratado por atomización. Para ello determinaron la solubilidad, capacidad espumante y termogelificante (firmeza y capacidad de retención de agua de los geles). El plasma deshidratado mostró al inicio del estudio un elevado grado de solubilidad y buenas propiedades espumante y gelificante. El estudio permitió constatar que el plasma deshidratado, perdía algunas de sus propiedades funcionales (facilidad de rehidratación, capacidad de retención de agua y firmeza de los geles) a partir de los tres meses de almacenamiento si se conserva a temperatura ambiente, mientras que estas características se mantenían un mínimo de seis meses a temperaturas de refrigeración.

La globina de la fracción celular, si bien es cierto que no forma geles como el plasma, posee la propiedad de formar una crema viscosa, característica

interesante para su aplicación en productos que deben mantenerse fluidos (Ranken, 1980; Toldrà, 2002).

Para conseguir un producto con valor añadido a partir de la fracción celular sanguínea aprovechando sus propiedades funcionales sería necesario aplicar un proceso de decoloración a los glóbulos rojos. Podrían utilizarse diferentes técnicas de hidrólisis (ácida o enzimática) para eliminar el grupo hemo y evitar efectos indeseados (Wismer-Pedersen, 1988). El hidrolizado de glóbulos rojos (globina) tiene, además de buenas propiedades espumantes, una elevada capacidad de retención de agua y es un buen agente estabilizante a pH 5 (Tybor *et al.*, 1975; Ranken, 1980). El grupo hemo obtenido de la hidrólisis tiene aplicaciones farmacéuticas en productos para personas anémicas (Rodríguez, 1994).

El hecho de que la sangre no sea un producto extraño en productos cárnicos, ya que contienen sangre residual del proceso de desangrado, permite contemplar su adición únicamente como incremento en una sustancia natural (Parés y Carretero, 1997).

1.2.3 Características microbiológicas de la sangre higiénica

En el cuadro 1.3 se presentan los resultados del estudio de la caracterización microbiológica de sangre higiénica porcina de seis mataderos industriales de la provincia de Girona recogida mediante sistemas abiertos (Parés, 1995; Carretero y Parés, 2000). Se puede observar que los recuentos de bacterias aerobias mesófilas oscilan entre 10^5 y 10^6 ufc/mL. El recuento de estos microorganismos es utilizado como indicador de carga microbiana general y nos orienta sobre la longevidad, la seguridad potencial y las condiciones higiénicas de obtención.

Cuadro 1.3
Características microbiológicas de la sangre porcina recogida mediante sistemas abiertos

| Organismo | Recuento (ufc/mL) |
|---------------------------------|-------------------|
| Bacterias aeróbias mesófilas | $10^5 - 10^6$ |
| Bacterias aeróbias psicrótrofas | $10^4 - 10^5$ |
| Hongos y Levaduras | $10^2 - 10^3$ |
| Enterobacterias | $10^3 - 10^4$ |
| Bacterias Hemolíticas (*) | $10^4 - 10^5$ |
| Clostridia sulfito-reductores | $<10 - 10^4$ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $10^2 - 10^4$ |
| Bacterias proteolíticas (*) | $10^4 - 10^5$ |
| <i>Bacillus</i> spp. | 10^4 |

(*) Representan un 10% del recuento total de bacterias aerobias mesófilas

(**) Resultados no publicados

Fuente: Parés, 1995

El recuento de bacterias aerobias psicrótrofas fue muy elevado para todos los mataderos en estudio, 10^4 a 10^5 ufc/mL. Los microorganismos psicrótrofos son aquellos capaces de crecer con relativa rapidez a temperaturas de refrigeración. Dentro de este grupo se encuentran con frecuencia microorganismos del género *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, también algunas especies de *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*.

Algunos hongos y levaduras son capaces de crecer también a temperaturas de refrigeración (*Geotrichum*, *Botrytis*, *Penicillium*, etc.) y pueden ser los responsables de alteraciones en alimentos produciendo modificaciones de las características físicas y de la calidad organoléptica. Observamos que los recuentos de este grupo son del orden de $10^2 - 10^3$ ufc/mL.

Las enterobacterias se encuentran en la sangre de cerdo en un orden de $10^3 - 10^4$ ufc/mL. Su determinación es importante en microbiología alimentaria porque incluyen géneros y especies patógenas (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* enteropatogénica) bacterias modificadoras de características sensoriales de los alimentos (proteolíticos, gasógenos, acidogénicos, psicrótrofos, etc.) y géneros utilizados como indicadores de

contaminación fecal (enterobacterias lactosa positivas o coliformes) de agua y alimentos.

Las bacterias hemolíticas son los microorganismos capaces de sintetizar exotoxinas que provocan la lisis de los eritrocitos de la sangre de diferentes animales. Los recuentos en sangre de cerdo para este grupo están en el orden de entre 10^4 y 10^5 ufc/mL. En el caso del estudio de Parés (1995), la proporción que corresponde a las bacterias β -hemolíticas con respecto al recuento total (10^5 - 10^6 ufc/mL) fue del 10%. Este porcentaje es bastante alto debido a que si se retrasa el procesamiento o separación de la sangre en sus dos fracciones principales supondría un alto grado de hemólisis causado por la actividad de este grupo de microorganismos y por ende la disminución de la calidad del plasma.

Los *Clostridia* sulfito-reductores están en órdenes de magnitud o recuentos de variabilidad muy alta entre <10 - 10^4 ufc/mL. Son bacilos gram-positivos esporogénicos anaeróbios del género *Clostridium*. Son resistentes a muchos factores como, bacteriocinas, antibióticos, radiaciones, temperaturas extremas, etc. Dentro de este grupo se incluyen especies β -hemolíticas y algunas especies proteolíticas o putrefactivas (*Clostridium sporogenes*, *C. putrefasciens*, *C. botulinum*, etc.). También se encuentran especies sacarolíticas acidogénicas (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, etc.) y algunas especialmente importantes en microbiología alimentaria desde el punto de vista sanitario ya que sintetizan toxinas (*C. botulinum*, *C. perfringens*).

Los recuentos de *Staphylococcus aureus* corresponden a valores entre 10^2 y 10^4 ufc/mL y la mayoría de cepas investigadas por Parés (1995) resultaban ser DNasa positivas. Las cepas DNasa positivas están estrechamente relacionadas con la producción de enterotoxinas. Las toxinas estafilocócicas son resistentes a altas temperaturas. De esta manera a pesar de que el producto sea sometido a un tratamiento térmico no se podría garantizar la seguridad sanitaria del mismo.

Es frecuente encontrar especies proteolíticas en géneros como *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Proteus*. Muchas de las bacterias contaminantes de la sangre presentan actividad proteolítica. Los recuentos correspondientes a este grupo son de 10^4 - 10^5 ufc/mL, que representan un 10% de los valores del recuento general de bacterias mesófilas aeróbicas.

1.2.4 Sistemas de higienización

El cuidado y una atención minuciosa en la limpieza de los equipos, un frecuente recambio de los cuchillos, tanques de recepción, etc, una especial atención al mantenimiento de bajas temperaturas, si es posible por debajo de 4°C, son medidas que se deben tomar con el fin de obtener recuentos bacteriológicos bajos y que puedan hacer posible la práctica comercial (Ranken, 1980).

Si no es posible introducir medidas en el matadero que permitan recoger sangre con recuentos microbiológicos suficientemente bajos, puede recurrirse a la utilización de un **sistema de higienización** aplicable a sangre entera o a sus fracciones que garantice la seguridad sanitaria de los productos comercializados (Parés y Carretero, 1997). La bactofugación, la microfiltración y la alta presión hidrostática son tratamientos de higienización que pueden aplicarse a la sangre o a sus fracciones como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, que no podrían utilizarse sin afectar negativamente las propiedades funcionales del producto.

- La **bactofugación** es un proceso que se utiliza en la industria láctea y se basa en el hecho que los microorganismos, que poseen una densidad ligeramente superior a la de la leche, pueden separarse del líquido que los contiene por sedimentación bajo la acción de la fuerza centrífuga. La mayoría de las publicaciones sobre porcentajes de reducción conseguidos incluyen el efecto acumulado de temperatura y centrifugación. A temperaturas de 55-57°C los valores van desde un 57 a un 97% y a temperaturas más elevadas 62-63°C los porcentajes pueden variar desde un 80 a un 99% (Bergere, 1987). Parés (1998) en su estudio sobre higienización del plasma líquido consiguió mediante la bactofugación una reducción del 96-98%, es decir de 1,5 a 2 unidades logarítmicas. En este estudio se utilizaron temperaturas en el rango entre 15 y 30°C y la fuerza centrífuga empleada fue de alrededor 12. 000 x g, el doble que la utilizada en leche

- La **microfiltración** consiste en separar las macromoléculas en fase líquida, por permeación a través de una membrana semipermeable, bajo la acción de un gradiente de presión. La composición del *permeado* (líquido que atraviesa la membrana) es prácticamente la misma que la del líquido inicial y el *retentado* (la fracción que no atraviesa la membrana) contiene los microorganismos que

contaminaban el producto tratado. La eficacia de la microfiltración como sistema de reducción microbiana puede ser del mismo orden que la de la aplicación de tratamientos térmicos, pero presenta ventajas muy claras respecto a éstos ya que permite mantener las propiedades nutricionales y funcionales del producto (Vandajon *et al.*, 1996).

Parés (1998) llegó a resultados interesantes en su estudio sobre la aplicación de microfiltración en plasma: el efecto combinado de los dos tratamientos, bactofugación y microfiltración, resultó en una disminución de la población microbiana de $3,2 \pm 0,4$ reducciones decimales. Se consiguieron recuentos finales de 5×10^3 ufc/mL, partiendo de plasma con contaminaciones iniciales desde $4,3 \times 10^6$ a 1×10^7 ufc/mL.

- El estudio de la **alta presión** en áreas distintas a la tecnología de los alimentos se lleva a cabo desde hace varios años. De hecho, aparte de su empleo en cerámica y metalurgia, su aplicación a la bioquímica ha sido y es hoy día importante. La primera aplicación en productos alimenticios se realizó en 1899 en leche para intentar alargar el tiempo de conservación (Borderias, 1995).

Los tratamientos por alta presión consisten en aplicar sobre el alimento presiones comprendidas entre 100 y 1.000 MPa, lo que afecta a diversos componentes y sistemas biológicos. La duración de este tratamiento es independiente del volumen o de la masa de material no siendo necesaria energía suplementaria para mantener las condiciones un tiempo prolongado (Cheftel, 1991)

Los tratamientos de alta presión hidrostática inducen una serie de cambios morfológicos, reacciones bioquímicas, mecanismos genéticos, cambios en la membrana y pared celular de los microorganismos presentes (Hoover *et al.*, 1989)

Actualmente existen diversos grupos de trabajo en el mundo que están estudiando los mecanismos básicos responsables de los fenómenos de desnaturalización proteica, la inactivación de enzimas y la destrucción de microorganismos que puede producir estos procesos de alta presión (Felipe *et al.*, 1994).

En su estudio sobre higienización, Parés (1998) evaluó la incidencia de altas presiones sobre sangre entera, concluyendo que no era adecuada su

aplicación en este caso, ya que los tratamientos que podían tener algún efecto sobre la carga microbiana contaminante provocaban también cambios indeseables en las características del producto. En cambio, para el caso del plasma sanguíneo, el efecto del tratamiento por alta presión (450 MPa durante 15min) sobre la población de los microorganismos fue considerable ya que se observó provocaba reducciones del 90% a 5°C, del 99,82 % a 25°C y del 99,97 % a 40°C y una disminución en la velocidad de crecimiento desde $0,1 \text{ h}^{-1}$, en muestras no tratadas a $0,09 \text{ h}^{-1}$, si el tratamiento se realizaba a 5°C, $0,05 \text{ h}^{-1}$, a 25°C o $0,008 \text{ h}^{-1}$ a 40°C. Teniendo en cuenta que este resultado correspondía a curvas de crecimiento de plasma incubado a 37°C y considerando que en refrigeración su evolución sería aun más lenta, se explica el hecho de que la vida útil del plasma presurizado se incrementa de manera importante.

Según Hoover *et al.* (1989) si se utiliza alta presión hidrostática como un proceso de preservación de alimentos sería conveniente su uso conjuntamente con otro tratamiento, con el fin de incrementar la efectividad y reducir el efecto de deterioro causado por la presión excesiva.

1.2.5 Sistemas de conservación de la sangre

La sangre se almacena normalmente entre 0 y 2°C y es posible conservarla de 4 a 6 días. Si se pretende conservar las fracciones sanguíneas por largos períodos de tiempo es preciso deshidratarlas o congelarlas. Si no se destina al consumo humano se pueden utilizar conservantes, entre los que se encuentran el bisulfito sódico al 1% o ácidos como el clorhídrico, forfórico o sulfúrico a una concentración de 2,5N así como amoníaco a una concentración de 0,25-0,50%. Se ha sugerido conservar la sangre para consumo humano con ácido láctico para coagular la sangre o aumentar su estabilidad empleando compuestos como el citrato o agentes antifúngicos como el ácido sórbico o el propiónico (Ockerman y Hansen, 1994).

De todas maneras el sistema más utilizado para conservar las fracciones de la sangre durante períodos largos de tiempo es la **deshidratación**.

La eliminación del agua se puede realizar mediante procesos mecánicos (concentración por centrifugación, filtración, osmosis inversa) o tratamientos

térmicos (concentración por evaporación, secado por contacto directo, liofilización, atomización) (Mafart y Beliard, 1994). Cada uno de estos procedimientos tiene ventajas e inconvenientes. La ventaja de los procesos mecánicos es que suponen un bajo consumo energético y el inconveniente es que solo se elimina una parte del agua libre (máximo un 60% de agua) y muy pocas veces consiste en agua pura, sino que arrastra en dispersión o en solución una parte del extracto seco de los productos en proceso.

La concentración por evaporación es un proceso que elimina agua por ebullición. Es necesario trabajar a temperaturas superiores a 100°C que generalmente ocasiona un efecto negativo sobre las características organolépticas y nutritivas del producto y aún más si se trata de un producto termosensible.

La liofilización se basa en la sublimación del hielo de un producto congelado. A pesar de ser técnicamente excelente, y que además permite mantener las características organolépticas del producto, su elevado coste hace que su aplicación en subproductos sea inviable.

La utilización de aire caliente es el otro sistema de lograr la evaporación del agua. Existen diferentes sistemas basados en la transferencia de calor por aire caliente, secadores de túnel, lecho fluidizado, rotatorios o atomizadores (Mafart y Beliard, 1994)

El plasma, debido a su alto contenido en agua (90%) se suele concentrar previamente a la deshidratación por razones económicas. La concentración se suele realizar por evaporación, aunque los sistemas de concentración por membranas (ultrafiltración y ósmosis inversa) mantienen más intactas las características nutritivas y funcionales. Después se deshidratan por atomización o en lecho fluidizado, ya que son procesos que producen menor modificación de las propiedades funcionales. La fracción celular con un contenido de agua de 65% se puede deshidratar sin necesidad de una concentración previa (Ockerman y Hansen, 1994).

Las operaciones de procesado de sangre y sus fracciones (centrifugado, liofilización, deshidratación por atomización, congelación, etc.), pueden ejercer algún efecto sobre los microorganismos, pero la calidad de los productos finales tenderá siempre a reflejar las condiciones de la materia prima utilizada para su obtención. Esto hace recomendable partir de una sangre con buena

calidad microbiológica antes de someterla a los procesos de conservación y transformación.

1.3 Bioconservación

La bioconservación se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos utilizando su microbiota natural o sus metabolitos (Aymerich y Hugas, 1998). Es decir, aprovechando la capacidad de la microbiota autóctona para inhibir o frenar el crecimiento y actividad potencial de microorganismos deteriorantes o patógenos.

La bioconservación está considerada por diversos autores como una alternativa dentro de las nuevas tendencias en conservación de alimentos pues la creciente demanda del consumidor de productos menos industrializados, más naturales (sin aditivos químicos) y más saludables ha originado la aparición de nuevos problemas de conservación así como el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación que no dejen residuos tóxicos para la salud del consumidor, que no alteren las características organolépticas del producto pero que inhiban con eficacia el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes.

Es importante tener en cuenta que a pesar del aumento de nuevas tecnologías y controles como el sistema APPCC (análisis de peligros y puntos críticos de control), las mayores intoxicaciones alimentarias han ocurrido en los últimos 10-12 años y siempre en países con alto nivel de desarrollo, con técnicas de laboratorio y de control muy desarrolladas. La pregunta que se plantea es si la aparición de estas intoxicaciones no estará relacionada con la intensificación de los métodos de conservación que comportan la reducción de microorganismos de modo generalizado en estos alimentos y por tanto, de posibles competidores o inhibidores de microorganismos patógenos.

La aceptación de la bioconservación dependerá de la correcta selección y aplicación de los cultivos bioprotectores adecuados y de, probablemente, determinadas enzimas para sistemas alimentarios particulares (Holzapfel *et al.*, 1995)

Normalmente cuando se usa el término bioprotección en alimentos se engloba o relaciona con la inhibición del crecimiento de patógenos, y bioconservación se relaciona con la inhibición de microorganismos deteriorantes. En el presente estudio usaremos ambos términos indistintamente, para evitar lugar a controversias innecesarias.

1.3.1 La Bioconservación y la sangre

La sangre obtenida del matadero es un producto altamente contaminado que requiere un procesamiento inmediato. Si bien es cierto que los sistemas de higienización podrían ser muy eficientes desde el punto de vista de calidad microbiológica, su instalación en la línea de sacrificio en los mataderos comportaría muchas dificultades desde el punto de vista técnico y en algún caso sería muy costoso. La bioconservación podría ser una alternativa para mejorar la calidad microbiológica de la sangre, alargar su vida útil y reducir las necesidades de procesamiento inmediato. Esto permitiría a los mataderos obtener un mayor beneficio a partir de la sangre recogida si se valorara la calidad microbiológica de ésta o bien buscar alternativas a la venta inmediata de la sangre a la única empresa que realiza la recogida.

1.3.2 Cultivos bioprotectores

Por definición un cultivo bioprotector es un cultivo bacteriano capaz de aumentar la seguridad microbiológica de los alimentos sin modificar las cualidades sensoriales del alimento.

No obstante y según Holzapfel *et al.* (1995), para que un cultivo bioprotector pueda ser considerado como tal debe cumplir una serie de requisitos:

1. No debe representar ningún riesgo para la salud.
 - No debe producir toxinas, aminas biógenas u otros metabolitos que puedan influir negativamente en la salud del consumidor.
 - No debe ser patógeno.
2. Debe tener efectos beneficiosos para el producto.

- Debe integrarse en el producto a ser posible con efectos beneficiosos para el mismo.
 - Debe adaptarse con facilidad al producto.
 - Su actividad protectora debe ser estable.
 - Su comportamiento ante una serie de parámetros ambientales debe poderse predecir.
 - Debe ser competitivo frente a la microbiota endógena.
 - Debe poseer actividades enzimáticas deseables.
3. No debe producir efectos sensoriales negativos en un producto manufacturado bajo buenas prácticas de fabricación (gas, limo. .).
 4. Debe ser capaz de funcionar como indicador de contaminación microbiana ante condiciones de abuso de temperatura.

1.3.3 Bacterias ácido lácticas : cultivo bioprotector

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las candidatas ideales como cultivos bioprotectores. Éstas forman parte de la microbiota inicial de muchos alimentos, no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor y son consideradas como GRAS (reconocidas generalmente como seguras) por la *Food and Drug Administration* de EEUU (Hugas,1998).

Además, se sabe que pueden tener un efecto positivo en la salud del consumidor. Algunas bacterias lácticas han estado relacionadas con acciones anticancerígenas y con la regulación del tránsito intestinal (Gilliland, 1990).

Se han descrito diversos sistemas de inhibición microbiana desarrollada por bacterias lácticas como la producción de ácidos orgánicos, formación de metabolitos de oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas (Klaenhammer, 1988; Lindgren y Dobrogsz, 1990; Piard y Desmazeud, 1991 y 1992).

Estos mecanismos las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes, patógenos y/o deteriorantes como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Adams y Halls, 1988; De Vuyst y Vandamme, 1994), y también hongos y levaduras (Jay *et al.*, 1983; Batish *et al.*, 1997).

Se ha estudiado la capacidad inhibidora de las bacterias lácticas en productos alimentarios muy diversos: carne envasada refrigerada (Ahn y Stiles, 1990; Golf *et al.* 1996; Buncic *et al.*, 1997), productos cárnicos fermentados (Garriga *et al.*, 1993 y 1998, Monfort *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1997; Aymerich y Hugas, 1998, Fragoso y Fernandez, 2000), vegetales fermentados (Fleming *et al.*, 1975), conservas de verduras y frutas (Skinner *et al.*, 1999, Edwards *et al.*, 1999), carne separada mecánicamente (Raccach y Baker, 1978), pescado (Schöder *et al.*, 1979, Kang y Lee, 1999), productos lácticos (Hurst, 1972; Speck, 1981; Batish *et al.*, 1997; Buyong *et al.*, 1998, Bachrouri *et al.*, 2002). En todos los casos se describen efectos positivos o al menos prometedores, con muy pocos problemas secundarios asociados. De hecho la aplicación de bacterias lácticas a alimentos modifica muy poco el valor nutritivo y los cambios en el aroma y el gusto acostumbra a apreciarse positivamente (Lindgren y Dobrogsz, 1990)

1.3.3.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas (BAL)

Según Axelsson (1998), las bacterias ácido lácticas (**BAL**) son un grupo de bacterias gram-positivas unidas por una constelación de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de bacteria las incluye dentro del grupo de gram-positivas, no esporuladas, cocos y bacilos anaerobios que producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos.

Se pueden distinguir dos vías de fermentación del azúcar entre las bacterias ácido lácticas. La glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof), que en condiciones estándar resulta en casi exclusivamente ácido láctico como producto final y el metabolismo se conoce como fermentación homoláctica y la ruta de 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, que además del ácido láctico resulta en cantidades significativas en productos finales como el etanol, acetato y CO₂. A este tipo de metabolismo se le llama fermentación heteroláctica. Los productos resultantes de la fermentación pueden alterarse significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento. Estos cambios pueden atribuirse a alguna alteración del metabolismo del piruvato y/o el uso de un aceptor de electrones externo como el oxígeno o componentes orgánicos

La clasificación de las BAL siempre ha sido materia de controversia, pero, históricamente, el género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el núcleo principal de su clasificación. Las revisiones taxonómicas de este género sugieren que el grupo de bacterias ácido lácticas compromete los siguientes grupos: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium* generalmente está considerado dentro del mismo contexto como una bacteria ácido láctica genuina, pero filogenéticamente no tiene relación alguna ya que tiene una única vía de fermentación de azúcar. La clasificación de la bacterias ácido lácticas esta ampliamente basada en la morfología, vía de fermentación de la glucosa (fermentación homoláctica o heteroláctica), crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido (L o D), habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia al medio ácido o básico. Los marcadores quimiotaxonómicos así como la composición de ácidos grasos y los constituyentes de la pared celular también pueden ser útiles para su clasificación.

Existen nuevas herramientas de clasificación e identificación de BAL. Las más prometedoras para uso rutinario son las pruebas de ácidos nucleicos, el uso de la secuencia genética parcial ARNr utilizando la reacción de la cadena de polimerasa y patrones de proteínas solubles.

1.3.3.2 Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas

La habilidad de las BAL de producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada a través del tiempo con el fin de conservar alimentos.

Existen escritos que datan del 6000 AC, los cuales revelan como la fermentación con BAL ha sido utilizada para conservar leche desde las primeras épocas de la historia. Procedimientos de fermentación de la carne ya

fueron desarrollados en épocas muy tempranas como 1500 años AC en Babilonia y China, así también, métodos de fermentación de vegetales eran conocidos en China 300 años aC. Desde los días de Metchnikoff, las BAL han sido también utilizadas como organismos probióticos con el objetivo de mejorar la microbiota normal del intestino (Ouwehand, 1998).

Durante cientos de años las BAL han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen el yogur, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros. Las BAL no solo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano (Piard y Desmazeud, 1991 y 1992)

Según Ouwehand (1998) la fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y resulta en una cadena de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, siendo las más comunes: ácido láctico, acético, y propiónico. No obstante, también se conoce que las bacterias lácticas producen además de los ácidos orgánicos, otras sustancias antagonistas, como son el peróxido de hidrogeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehido, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos, como moléculas pequeñas no proteicas y bacteriocinas (Piard y Desmazeud, 1991 y 1992).

Las bacteriocinas se definen como un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas (Tagg *et al.*, 1976; Klaenhammer, 1988). Es probable que la actividad antimicrobiana y su estructura proteica sean las únicas características comunes de estas sustancias, mientras el término bacteriocinogenicidad se emplea para describir la actividad de las bacterias de sintetizar y liberar al exterior proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. También parece confirmarse que la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas constituye un fenotipo extendido en este grupo microbiano (Hernández *et al.*, 1993).

Las bacteriocinas, antimicrobianos de naturaleza proteica que actúan principalmente contra especies filogenéticamente relacionadas (otras bacterias lácticas, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum*, *C. perfringens*) presentan claras ventajas desde el punto de vista tecnológico, nutritivo y toxicológico dado que no confieren olor ni sabor, por su naturaleza proteica son inactivadas por las enzimas proteolíticas del tracto intestinal, por su pequeño tamaño son térmicamente estables y no parecen ser tóxicas en animales de experimentación.

La utilización de la bacteriocina nisina en alimentos destinados al consumo humano fue aprobada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1969, por la Unión Europea en 1983 (E234) y por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) en 1987. Su uso está permitido en 52 países. Según la OMS la nisina no presenta ningún efecto tóxico hasta valores estudiados de $3,3 \times 10^6$ IU/kg de peso corporal y se inactiva fácilmente por las proteasas intestinales.

Por lo general, las bacteriocinas no actúan contra bacterias gram-negativas a menos que la pared celular se encuentre debilitada y podría considerarse la aplicación combinada con otro método de conservación o contemplar esta alternativa dentro de la teoría de los obstáculos (Aymerich y Hugas, 1998).

Conviene resaltar que el desarrollo en aerobiosis de las bacterias lácticas conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno, peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la microbiota láctica y no láctica. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico) y del pH es complementaria, mientras la fracción no disociada de los ácidos orgánicos posee la mayor actividad inhibidora. La actividad antimicrobiana del diacetilo, acetaldehído y de los isómeros D de los aminoácidos es mucho menor y menos significativa que las previamente citadas.

El diacetilo es bacteriostático en las bacterias grampositivas y bactericida en las gramnegativas, aunque la pequeña producción de este compuesto por las bacterias lácticas productoras, así como su potencial mutagénico, dificultan su utilización en la industria alimentaria. La acción antagonista del acetaldehído producido fundamentalmente por *L. bulgaricus* se encuentra poco evaluado, mientras que la producción de isómeros D de algunos aminoácidos por las

bacterias lácticas es discutible ante la ausencia de una actividad racemasa en las mismas (Hernández *et al.*, 1993).

1.4 Conservación de cultivos microbianos

El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales basadas en la actuación de estos microorganismos. Las cepas valiosas se tienen que conservar durante largos periodos de tiempo libres de cambios fenotípicos adversos.

Además, y tomando como ejemplo los procesos de elaboración de alimentos fermentados donde participan cultivos microbianos, nos encontramos con que el éxito de la producción depende principalmente y directamente de las técnicas de procesamiento utilizadas, pero lo que permite estandarizar y mantener una calidad uniforme del producto final es en una gran parte la correcta selección, conservación, manipulación y resiembra o propagación de los cultivos (Tamime y Robinson, 1991).

La elección del método de conservación utilizado debe permitir mantener las características del microorganismo por las cuales fue seleccionado (Stanbury *et al.*, 1995).

En la industria alimentaria los cultivos microbianos se guardan en pequeñas cantidades conocidas como *cultivos de reserva*. Cuando se reactivan para su utilización industrial, se tienen que utilizar sistemas de siembra a gran escala con el objetivo de obtener el volumen necesario para inocular los fermentadores de producción (Tamime y Robinson, 1991 y Salminen *et al.*, 1998).

Un cultivo de aplicación industrial tiene que reunir unas determinadas características:

1. Contener el máximo número de células viables.
2. Estar libre de contaminantes.
3. Ser activo en las condiciones de procesamiento.

Por esta razón el mantenimiento de cultivos es extremadamente importante. No existe un método universal para mantener los cultivos de microorganismos.

La selección del método tiene que basarse en la naturaleza del cultivo y en las ventajas e inconvenientes del método escogido. Si el microorganismo aún no se conoce del todo es aconsejable utilizar varios métodos de conservación (Dhingra y Sinclair, 1985).

Los cultivos de microorganismos se siembran en medios estériles y en condiciones de asepsia, y se mantienen activos aplicando alguno de los siguientes métodos:

1. Reduciendo o controlando su actividad metabólica a través de la refrigeración. Este método sólo es aplicable durante períodos cortos de almacenaje (por ejemplo en medios líquidos o tubos inclinados de Agar nutritivo).
2. Conservación mediante
 - Congelación
 - Deshidratación

Normalmente se concentran o se separan de los productos residuales de su metabolismo, a continuación se resuspenden en medio estéril y se procede a la etapa final de conservación por alguno de los dos métodos mencionados.

Este sistema permite mantener los cultivos durante largos períodos de tiempo y la viabilidad de los cultivos conservados depende de (Dhingra y Sinclair, 1985):

- El medio de cultivo base.
- El método de concentración.
- La rápida eliminación de metabolitos.
- La naturaleza del medio de suspensión.
- Las condiciones de deshidratación o congelación.
- La presencia de agentes crioprotectores (en la congelación).
- La velocidad de descongelación (en el caso de cultivos congelados).

1.4.1 Conservación en refrigeración

El objetivo general de la refrigeración es incrementar la vida útil de los cultivos, y en consecuencia incrementar sus posibilidades de conservación (Casp y Abril, 1999).

Generalmente hace falta hacer resiembras en medio fresco a intervalos regulares. Es un procedimiento laborioso y que consume mucho tiempo. El intervalo entre las transferencias depende de la temperatura y la humedad de almacenamiento. Los tubos de cultivos almacenados en contenedores que no permiten la pérdida de humedad pero sí el intercambio de gases, a una temperatura entre 5-8°C necesitan transferencias cada 6-8 meses. Las condiciones que permiten que se dé una deshidratación rápida del cultivo requieren intervalos de transferencia más cortos.

1.4.2 Conservación por congelación

La congelación se puede emplear como método de conservación de cultivos bacterianos, por ejemplo, para la elaboración de productos fermentados. La mayor tasa de destrucción bacteriana se observa inmediatamente tras la congelación, después se reduce notablemente y llega a estabilizarse durante largos períodos de tiempo. Por eso, aunque el número de supervivientes disminuya, la congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias. Para conseguir una mínima destrucción de las bacterias interesa que la cristalización sea extracelular y que las bacterias se deshidraten parcialmente impidiéndose la nucleación intracelular, pero no lo suficiente como para que se reduzca su viabilidad. En los medios suelen incluirse, además, agentes crioprotectores (glicerol, clara de huevo, leche, etc.) (Ordóñez *et al.*, 1998).

El principal problema del mantenimiento de microorganismos a temperaturas por debajo del punto de congelación es la muerte durante los procesos de congelación y descongelación. Si los microorganismos pueden sobrevivir a temperaturas del orden o por debajo de -20°C seguidas de un recalentamiento rápido hasta la temperatura ambiente es posible conservarlos congelados.

La supervivencia de los microorganismos a los procesos de congelación y descongelación depende de (1) el número inicial de células viables; (2) la tasa de congelación y descongelación; (3) la temperatura de congelación y almacenamiento (de 0 a -20°C son más destructivas que <-20°C); (4) tiempo de almacenamiento; (5) presencia de protectores físicos.

Los principales inconvenientes de este sistema son los costes de los equipos y del mantenimiento, y los daños mecánicos que se pueden provocar en las células (Dhingra y Sinclair, 1985).

Proceso de congelación

Al descender la temperatura las moléculas de agua tienden a agregarse en cristales. Esta cristalización supone el paso de las moléculas de agua desde una distribución desordenada (líquido) hasta un estado de ordenación molecular (sólido). El proceso de ordenación molecular requiere el desplazamiento de las moléculas desde su posición inicial hasta aquella que les corresponde en la estructura organizada, para ello será necesario que dispongan de la suficiente movilidad y de tiempo. El proceso de congelación incluye una serie de fases (Casp y Abril, 1999):

Subenfriamiento: Antes de que se produzca la cristalización hay que colocar al producto en un estado termodinámicamente inestable que propicie al comienzo de la formación de agregados submicroscópicos de agua que produzcan la interfase adecuada, necesaria para la transformación de líquido a sólido. Esto se consigue con el subenfriamiento, o sea enfriando el producto por debajo de su punto de congelación. El grado de subenfriamiento necesario vendrá marcado por el inicio de la nucleación.

Nucleación: La cristalización se inicia cuando las condiciones son apropiadas para que se produzca la agregación de un grupo de moléculas en una diminuta partícula ordenada, que se conoce como núcleo de cristalización. La nucleación puede ser homogénea o heterogénea. La nucleación homogénea se produce en sistemas puros y lleva a la formación de cristales tridimensionales. La nucleación heterogénea es más importante en los procesos de congelación. Este tipo de nucleación tiene lugar cuando el medio no es totalmente puro, y los agregados de agua se unen sobre un agente de nucleación extraño, como pueden ser las paredes del recipiente o más comúnmente alguna partícula de material insoluble. Produce cristales bidimensionales.

Crecimiento de los cristales: Durante el subenfriamiento las moléculas de agua se encuentran en un estado termodinámicamente inestable en el cual las

fuerzas que tienden a ordenarlas son más importantes que las que tienden al desorden. A partir del momento en que la nucleación ya es efectiva, las moléculas de agua se mueven rápidamente para alcanzar la estabilidad termodinámica como cristales de hielo. El crecimiento de los cristales se produce cuando el número de moléculas de agua capaces de difundirse a lo largo de la interfase, y de situarse orientadas en una posición de crecimiento del cristal, es mayor que las que se separan del mismo. El mecanismo y la velocidad de crecimiento de los cristales dependen de la morfología de su superficie. Mientras la superficie sea rugosa y con muchos pliegues el crecimiento será continuo, pero cuando se vaya alisando se reducirá la velocidad de crecimiento y comenzarán a funcionar otros mecanismos. En condiciones de subenfriamiento ligero, la velocidad de crecimiento de los cristales se ve favorecida por los defectos que éstos tengan. En el caso de altas velocidades de enfriamiento, la existencia de defectos parece que tiene menos importancia ya que entonces las moléculas tienen mayor probabilidad de orientarse correctamente en ausencia de los pliegues.

En el caso de estructuras celulares, normalmente primero se produce la congelación del medio extracelular y provoca la salida de agua del interior del citoplasma hacia el espacio extracelular donde se congela. Dependiendo de la tasa de congelación, la célula pierde diferentes cantidades de agua antes que se produzca la solidificación del contenido intracelular.

Los cristales de hielo intracelulares provocan roturas mecánicas tanto en su formación durante la congelación como durante la descongelación, debido a fenómenos de recristalización, en los cuales el hielo se funde y se reorganiza en cristales más grandes termodinámicamente más favorables. Una descongelación rápida aminora estos efectos.

- Enfriamiento rápido: queda más agua retenida dentro de la célula susceptible de formar cristales de hielo que provoquen daños físicos. Pero si la tasa de enfriamiento es muy rápida se forman cristales muy pequeños que no pueden dañar las estructuras celulares.
- Enfriamiento lento: reduce este riesgo porque sale más agua de las células y por lo tanto se forman menos cristales, pero tiene efectos negativos debido a que los cristales formados son más grandes, al incremento de concentración intracelular de sales y a cambios en la

membrana celular. El encogimiento del protoplasto y la reducción del área superficial puede hacer que, después de la descongelación, se rompan las membranas.

Para mantener la viabilidad de los cultivos el mejor método sería la combinación de una tasa de enfriamiento intermedia (algunos estudios demuestran que la velocidad óptima se encuentra entre -1 y -2°C por minuto) y la adición de agentes crioprotectores (Dhingra y Sinclair, 1985; Lamúa, 2000).

Agentes crioprotectores

Estos agentes facilitan el flujo de agua a través de la membrana celular y protegen estructuras moleculares y supra-moleculares a través de diferentes formas de acción.

Son compuestos químicos no tóxicos, con facilidad para atravesar la membrana celular y acumularse intracelularmente. Se mantienen en forma amorfa durante el proceso de congelación y son capaces de unir electrolitos o moléculas de agua para retrasar la congelación. Entre otros efectos protectores, sirven para compensar la diferencia de presión osmótica que se genera cuando empieza a congelarse la superficie de la célula y se incrementa la concentración de solutos en el medio que le rodea. De esta manera se evita una pérdida excesiva de agua que podría provocar la deshidratación y destrucción de las células (Dhingra y Sinclair, 1985).

1.4.3 Conservación en nitrógeno líquido (-196°C)

La actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos a temperaturas muy bajas (-196°C) lo cual se puede lograr utilizando la refrigeración con nitrógeno líquido. Según Stanbury *et al.* (1995) este es el método más adecuado para la mayoría de células. Hongos, bacterias, virus, algas, levaduras y cultivos de tejidos de animales y plantas han sido preservados satisfactoriamente mediante este método.

La técnica consiste en obtener el crecimiento del cultivo hasta lograr la máxima densidad celular en fase estacionaria, resuspender las células en un agente crioprotector (como por ejemplo glicerol al 10% estéril o dimetil sulfóxido DMSO

al 10%) y congelar la suspensión en viales cerrados herméticamente (-35°C) antes de conservarlos en nitrógeno líquido. El cultivo puede sufrir pérdidas de viabilidad durante las etapas de congelación y descongelación pero no se han apreciado una reducción importante durante el periodo de almacenamiento. Mediante esta técnica se puede lograr mantener la viabilidad de cultivos durante un periodo de varios años.

Stanbury *et al.* (1995) propuso la congelación con nitrógeno líquido como la técnica idónea o alternativa para conservar por largos tiempos aquellas células que no sobreviven el proceso de liofilización. Sin embargo, el equipo es caro aunque el proceso en si es económico. El mayor inconveniente es que el nitrógeno líquido se evapora y debe ser reemplazado regularmente. Además, si el equipo falla la consecuencia puede ser la pérdida de la colección.

1.4.4 Conservación por deshidratación

Generalmente, se considera como deshidratación un procedimiento que permite eliminar por vaporización o sublimación la mayor parte del agua de un producto líquido o sólido. Por el contrario, la concentración (por evaporación, congelación, filtración a través de una membrana, concentración osmótica, centrifugación, prensado mecánico, extracción de agua por disolventes) sólo retira cierta proporción de esa agua. La concentración constituye, a veces, una fase previa a la deshidratación de productos líquidos (Cheftel *et al.*, 1992).

1.4.4.1 Liofilización

Llamada anteriormente crio-desección, la liofilización, cuyo nombre procede de la industria farmacéutica, es un proceso de secado cuyo principio consiste en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente del estado sólido al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido (Casp y Abril, 1999).

El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas: 1) el producto se congela y 2) el producto se seca por sublimación directa del hielo bajo una presión reducida (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

Según Casp y Abril (1999) la liofilización presenta una serie de ventajas:

- La temperatura de trabajo es muy baja y por lo tanto los productos termolábiles no se alteran.
- No existe peligro de oxidación por la ausencia de aire durante el procesado.
- No hay agua libre, por lo tanto no hay peligro de hidrólisis ni de crecimiento microbiano.
- Al evaporarse el hielo, quedan poros que permiten una rehidratación o reconstitución rápida.
- La humedad residual es baja.
- La duración de la conservación es larga.
- Son productos de peso ligero que no necesitan cadenas de refrigeración para su distribución.

Pero también presenta algunos inconvenientes:

- El coste de las instalaciones y los equipos es muy elevado (alrededor de tres veces el de los otros métodos).
- Altos costes de energía (también alrededor de tres veces el de los otros métodos).
- Proceso lento y largo (un ciclo habitual puede ser de 4-8 horas para liofilizar 2 gramos de producto).

Los productos liofilizados pueden volver a su estructura original por adición de agua. La estructura esponjosa del producto liofilizado permite una rápida rehidratación del mismo. Las características del producto rehidratado son análogas a las que poseía el producto inicial (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

Es un proceso en tres etapas:

(1) Fase de solidificación: la mayor parte del agua que contiene el producto se congela en forma de cristales de hielo (agua prácticamente pura) mientras que el agua no congelada y los solutos se quedan en forma amorfa llamada fase vítrea.

Es imprescindible la congelación completa de la muestra, que se puede realizar previamente a la introducción del material dentro del liofilizador o dentro del mismo liofilizador.

La forma y características del producto al final del proceso serán esencialmente idénticas a las originales ya que la estructura queda fijada durante esta etapa de congelación.

(2) Fase de deshidratación: se pueden distinguir dos subetapas:

2a. Desecación primaria o sublimación: consiste en la sublimación de los cristales de hielo de manera que sólo queda la fase amorfa con estructura porosa (los poros dejados por el agua sublimada).

Esta etapa se realiza en condiciones por debajo del punto triple del agua (punto donde coexisten agua, hielo y vapor) para evitar el paso por la fase líquida, de manera que es un proceso ideal para productos termolábiles ya que puede deshidratar a bajas temperaturas porque trabaja a presiones inferiores a 610 Pa (4,58 Torr.).

Es necesario un vacío elevado (baja presión absoluta) en el liofilizador para favorecer la sublimación, cuando la presión de vapor sobre el hielo disminuye, lo hace también la temperatura y son necesarias presiones bajas para que se sublime el hielo.

La sublimación del hielo comienza cuando se produce el vacío y disminuye la presión del sistema por debajo de la presión de vapor del hielo a la temperatura del producto. Para sublimar el hielo tiene que absorber el calor latente del sistema (aprox. 650 calorías/gramo) que se tiene que proporcionar en forma de calor. Si no es así el material experimenta un enfriamiento progresivo que provoca la disminución de la tensión de vapor y no se produce la sublimación.

2b. Desecación secundaria o desorción: el agua no congelada se traslada hacia la superficie y sale fuera de la matriz vítrea. Hace falta aportar la energía necesaria para provocar la desorción del agua absorbida o fijada por la matriz.

Para eliminar esta agua, se realiza una evaporación bajo vacío, manteniendo la misma presión, o menor, que durante la desecación primaria y elevando la temperatura del producto. Generalmente este aporte de calor se hace desde el fondo del producto por conducción y en la parte superior por radiación.

Si la muestra queda suficientemente seca se puede mantener a temperatura ambiente.

(3) Fase de rehidratación: consiste en la reconstitución del estado original por adición de agua o una solución acuosa. Los productos liofilizados son fácilmente rehidratables debido a que la estructura porosa facilita la penetración del agua (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000; Casp y Abril, 1999).

La eutexia es el fenómeno de cambio de fase de una mezcla binaria en el cual el sistema se comporta como un elemento puro en solidificación, produce un solo compuesto sólido. El punto eutéctico sería el punto en el diagrama de cambio de fases determinado por la proporción de la mezcla eutéctica (abcisas), y la temperatura de solidificación de ésta (ordenadas) en condiciones de presión constante. En soluciones de compuestos que cristalizan, el punto eutéctico coincide con la temperatura de congelación de la solución. Hay que mantener la temperatura de la mezcla por debajo del punto eutéctico durante la desecación para asegurar la correcta sublimación sin pasar por la fase líquida (figura 1.4).

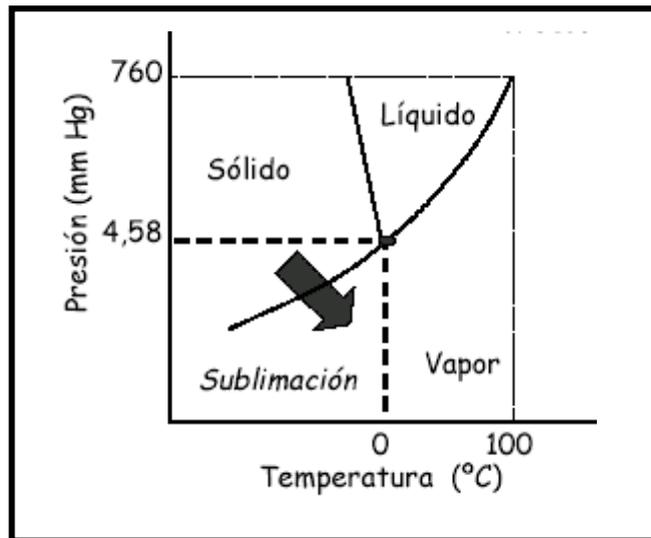


Figura 1.4: Diagrama de fases del agua.

Cuando se trata de soluciones de sustancias amorfas, mientras el solvente se congela se forma una solución intersticial progresivamente más viscosa. A partir de una determinada concentración de solutos se produce la transición vítrea y se obtiene un material tan viscoso que, a efectos prácticos se considera un sólido elástico. La línea de transición vítrea indica la temperatura

que garantiza que no se produzca flujo de material y, por tanto, la temperatura máxima a la cual se puede llevar a cabo la desecación primaria y secundaria. Por encima de esta temperatura el soluto podría fluir cuando se eliminase el hielo y esto provocaría la destrucción de la estructura del material, por eso esta temperatura se conoce también como “temperatura de colapso”.

Para asegurar la estabilidad del producto es importante mantener la muestra a temperatura inferior a su temperatura de transición vítrea o temperatura de colapso, que depende tanto del material como del contenido de agua. Por eso, puede ser necesario utilizar una serie de aditivos que mejoren las características de la muestra. Macromoléculas (por ejemplo gelatina, albúmina o azúcares como la maltosa, lactosa, sacarosa, etc.) se utilizan como estabilizantes ya que tienen temperaturas de transición muy elevadas y forman una estructura vítrea estable.

La liofilización es un buen sistema de conservación de cultivos de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación (Mafart y Beliard, 1994; Casp y Abril, 1999).

1.4.4.2 Atomización

El método de secado por atomización es uno de los más importantes métodos utilizados para secar determinados productos líquidos: leches concentradas, extractos concentrados de café, huevos, extractos de levadura, caseína, zumos de frutas, té, sangre y otros concentrados proteicos, etc. Para ello, se “atomiza” (es decir, se transforma en aerosol o niebla) una solución o una suspensión más o menos viscosa del producto; las pequeñas gotas líquidas así formadas se arrastran y deshidratan en una corriente de aire dando un polvo seco antes de caer sobre las paredes inferiores del aparato (Cheftel *et al.*, 1992; Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

Las partículas de polvo al final del proceso tienen una forma de esferas o fragmentos de esferas vacías en su interior que permiten una fácil rehidratación (Toledo, 1991).

La calidad del producto tratado no se altera mucho debido a que la intensa evaporación protege el producto del efecto que tendría la elevada temperatura del aire caliente (el proceso de evaporación absorbe buena parte del calor

aportado). En realidad la energía aportada en forma de calor cede al producto el calor latente de vaporización haciendo que el incremento de temperatura de las partículas (debido al calor sensible) sea muy bajo. Además, la tasa de reacciones degradativas disminuye a bajos contenidos de humedad, y eso favorece que el corto tiempo de exposición de la partícula seca a temperaturas elevadas (entre 4 y 6 segundos si se utiliza un nebulizador a presión y hasta 30 segundos si el nebulizador es centrífugo) no comporte un deterioro importante del producto (Mafart y Beliard, 1994).

Las ventajas del secado por atomización según Masters (1991), citado por Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado (2000), son las siguientes:

- Las especificaciones de los polvos permanecen constantes a lo largo del secadero cuando las condiciones de secado son constantes.
- Es una operación de secado continua y fácil y se puede adaptar a un control automático completo.
- Existe un amplio intervalo de diseños de secaderos que se pueden aplicar a materiales sensibles al calor, corrosivos y abrasivos.

Las desventajas más grandes de los atomizadores son los costes de instalación, eficacia térmica, calor residual y manejo del aire agotado en condiciones de saturación o cercanas a ella (Masters, 1991).

1.5 Objetivos generales y estructura del trabajo

Esta tesis se enmarca en un proyecto de investigación que tiene como objetivo desarrollar un sistema de bioprotección de la sangre higiénica de mataderos industriales que permita alargar el tiempo de vida útil después de su recolección, proporcionando una alternativa de conservación económica y sencilla, que pueda ser aplicada por el productor, evitando grandes inversiones en infraestructura y dando a la vez al producto un mayor valor añadido.

Este estudio corresponde a la primera fase del proyecto y tiene como objetivo principal la obtención de cepas de bacterias lácticas que muestren la capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de bacterias deteriorantes y/o patógenas que forman parte de la microbiota habitual de sangre de mataderos que utilizan sistemas de recogida abiertos.

El trabajo se ha estructurado en 4 capítulos:

En el capítulo 2 se presenta la metodología seguida para aislar una colección de bacterias lácticas mesófilas a partir de muestras de sangre de matadero y la evaluación del potencial antagonista a 30°C de la colección obtenida frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.* y *Pseudomonas fluorescens*.

En el capítulo 3 se presentan los resultados del potencial antagonista a 15°C de una colección de bacterias lácticas psicrótrofas también aisladas de sangre de matadero frente a los mismos indicadores del capítulo anterior.

En el capítulo 4 se lleva a cabo la identificación, mediante técnicas moleculares, de las bacterias lácticas que se han mostrado más interesantes desde el punto de vista de su potencial antagonista.

En el capítulo 5 se evalúan diferentes métodos de conservación a largo plazo de las cepas que han presentado un buen potencial antagonista en los capítulos 2 y 3. Se comparan tres alternativas: la deshidratación por atomización, la liofilización y la congelación a -80°C

Capítulo 2 Evaluación de la capacidad antagonista en condiciones mesófilas

2.1 OBJETIVOS

Hemos visto que la sangre obtenida del matadero es un producto altamente contaminado que requiere un procesamiento inmediato. Si bien es cierto que los sistemas de higienización podrían ser muy eficientes desde el punto de vista de calidad microbiológica, su instalación en la línea de sacrificio en los mataderos comportaría muchas dificultades desde el punto de vista técnico y en algún caso sería muy costoso. La bioconservación podría ser una alternativa para mejorar la calidad microbiológica de la sangre, alargar su vida útil y reducir las necesidades de procesamiento inmediato. Esto permitiría a los mataderos obtener un mayor beneficio a partir de la sangre recogida si se valorara la calidad microbiológica de ésta o bien buscar alternativas a la venta inmediata de la sangre a la única empresa que realiza la recogida.

El presente capítulo consistió en la primera etapa de una serie de pruebas y ensayos para obtener información acerca de la viabilidad de aplicar cultivos bioprotectores en sangre de matadero industrial. Estas pruebas preliminares deberían permitir formular una primera valoración sobre la posibilidad de aplicar con éxito este sistema en el substrato de interés. En función de los resultados que se han obtenido será necesario decidir si es viable o no abordar un estudio mucho más ambicioso y complejo.

El empleo de BAL como cultivo bioprotector es una técnica bastante prometedora en el campo de la conservación de alimentos. Existen numerosos antecedentes de investigadores que estudian su aplicación en diferentes ramas de la industria alimentaria. Muchos investigadores coinciden en que la bioconservación debe considerarse como un factor de conservación adicional para mejorar la seguridad y la calidad de los alimentos, su acción debe considerarse dentro de la tecnología de los obstáculos y nunca substituir a las buenas prácticas de fabricación (Aymerich y Hugas, 1998).

La implantación de la bioconservación y su aceptación depende de una selección minuciosa de las cepas que se quieran aplicar como bioprotectores (Aymerich y Hugas, 1998).

Ya que el estudio pretende lograr la implantación de un sistema de bioconservación de sangre higiénica se consideró importante realizar el aislamiento de los cultivos bioprotectores del propio hábitat en donde se pretendía aplicar la bioprotección, pues era de suponer que su readaptación

estaría más favorecida, y que éstos serían más competitivos frente a la microbiota contaminante.

Los objetivos concretos son:

- (1) Aislamiento de bacterias ácido lácticas mesófilas presentes en sangre recogida mediante sistemas abiertos en mataderos industriales.
 - (2) Estudio de la capacidad antagonista en placa de agar de las bacterias ácido lácticas frente a microbiota contaminante de la sangre, utilizando como indicadoras cepas de colección y cepas autóctonas aisladas de sangre de matadero.
 - (3) Estudio de la cinética de crecimiento de las BAL: determinación de las constantes de crecimiento en medio de cultivo y en sangre estéril.
 - (4) Determinación de la capacidad antagonista de las BAL frente a los microorganismos indicadores en sangre inoculada artificialmente.
 - (5) Comprobación del efecto de la adición de azúcar en la capacidad antagonista de las BAL en sangre inoculada con los microorganismos indicadores.
-

2.2 MATERIAL y MÉTODOS

2.2.1 Confección de una colección de BAL mesófilas

2.2.1.1 Toma de muestras

Las muestras procedían de cuatro mataderos industriales de las comarcas de Girona que utilizan sistemas abiertos de recogida de sangre higiénica. Se tomaban de los depósitos de almacenamiento utilizando recipientes estériles. Eran muestras de sangre correspondientes al total de cerdos sacrificados hasta el momento del muestreo, con anticoagulante (citrato sódico o polifosfato al 0,5% p/v) y mantenidas a temperatura de 4-5°C.

Se mantenían a temperatura de refrigeración durante su traslado y hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.2.1.2 Aislamiento de BAL mesófilas de sangre de matadero

2.2.1.2.1 Selección del medio de aislamiento de las BAL autóctonas

A partir de las muestras de sangre se realizaron bancos de diluciones decimales en agua de triptona¹ y se sembraron las diluciones adecuadas en placas de agar de tres medios selectivos para bacterias ácido lácticas mediante la técnica de siembra en profundidad con sobrecapa de agar; agar MRS², agar

| | | |
|---|--|------------|
| ¹ Agua de triptona (TW, OXOID CM 87) | | g/L |
| pH: 7,5± 0,2 | Triptona | 10,0 |
| | Cloruro de sodio | 5,0 |
| | | g/L |
| ² MRS agar (De Man, Rogosa, Sharpe OXOID, CM 361) | | |
| | Peptona | 10,0 |
| | Extracto de carne | 8,0 |
| | Extracto de levadura | 4,0 |
| | Glucosa | 20,0 |
| pH 6,2 ± 0,2 | Fosfato dipotásico | 2,0 |
| | Acetato sódico 3H ₂ O | 5,0 |
| | Citrato triamónico | 2,0 |
| | Sulfato de Magnesio 7H ₂ O | 0,2 |
| | Sulfato de Manganeso 4H ₂ O | 0,05 |
| | Agar | 10 |
| | Sorbitan mono-oleato | 1 mL |

Capítulo 2

APT³ y agar Rogosa⁴. Se utilizó la técnica de siembra en profundidad con sobrecapa de agar. La incubación se realizó en condiciones de anaerobiosis, para lo cual se utilizó un sistema de Anaerobios OXOID, que consistía en una jarra de anaerobios de 3,4 litros de capacidad, un generador de gas y un indicador de anaerobiosis. El generador de gas contiene ácido tartárico y bicarbonato sódico que cuando se utilizan juntos producen 350mL de anhídrido carbónico, que en la jarra cerrada herméticamente proporciona un nivel aproximado de 10% de CO₂. El indicador vira de rosa a blanco proporcionando una señal visual de la anaerobiosis creada. La incubación se realizó a 30°C durante 48 h.

Para la confirmación de las colonias aparecidas en las placas de medio selectivo se utilizó la tinción Gram y la prueba de la Catalasa. Se consideraban BAL las colonias Gram + y Catalasa - (Schillinger y Lücke, 1987).

El medio MRS resultó ser el más adecuado, ya que nos dio un recuento en placa de un orden de 10⁵ufc/mL de BAL, donde la totalidad de las colonias eran Gram (+) y Catalasa (-). El agar APT resultó ser inadecuado debido a la presencia de colonias que no presentaban estas características bioquímicas. El inconveniente del agar Rogosa no fue la especificidad sino el tiempo que las

| | | |
|---|------------------------|------------|
| ³ Bacto APT agar- DIFCO 265430 | | g/L |
| | Triptona | 12,5 |
| | Extracto de levadura | 7,5 |
| pH 6,7 ± 0,2 | Dextrosa | 10 |
| | Citrato sódico | 5 |
| | Tiamina HCl | 0,001 |
| | Cloruro sódico | 5 |
| | Fosfato dipotásico | 5 |
| | Cloruro de manganeso | 0,14 |
| | Sulfato ferroso | 0,04 |
| | Monooelato de sorbitan | 0,2 |
| | Agar | 15 |
| ⁴ Agar Rogosa (OXOID CM 627) | | g/L |
| | Triptona | 10,0 |
| | Extracto de levadura | 5,0 |
| pH 5,4 ± 0,2 | Glucosa | 20,0 |
| | Monooelato de sorbitan | 1,0 |
| | Fosfato monopotásico | 6,0 |
| | Citrato amónico | 2,0 |
| | Acetato sódico | 25,0 |
| | Sulfato de magnesio | 0,575 |
| | Sulfato férrico | 0,034 |
| | Agar | 20,0 |

colonias tardaban en crecer. Aun después de 72h éstas eran muy pequeñas, lo cual dificultaba su aislamiento.

2.2.1.2.2 Aislamiento de BAL mesófilas

Con el fin de aislar las bacterias lácticas se prepararon diluciones de las muestras de sangre y se sembraron en agar MRS con sobrecapa de agar, incubándolas en jarra de anaerobiosis a 30°C durante 48h. Se podían distinguir entre 2 y 3 tipos de colonias de morfología diferente. Se repicaron en estrías dos colonias por muestra de sangre, en agar MRS, y se incubaron en jarra de anaerobios durante 48h a 30°C realizándose las pruebas bioquímicas de confirmación (Gram y Catalasa). Se realizó el aislamiento de 112 cepas, a partir de 62 muestras procedentes de cuatro mataderos diferentes de la provincia de Girona, las cuales fueron codificadas de TA1 a TA112.

De cada una de las placas se tomó una colonia aislada y se realizó un primer traspaso a caldo MRS⁵, incubando durante 24 h a 30°C. Después de este tiempo, se realizó un segundo traspaso de 1 mL a caldo MRS fresco y se incubó en las mismas condiciones durante 24h. Los cultivos conseguidos se centrifugaron (4000 rpm, 20 min., 20-25°C) y seguidamente se reemplazaron los sobrenadantes por un agente crioprotector consistente en una mezcla 1:1 de glicerol al 40% y caldo MRS. Se mantuvieron en reposo durante 10 minutos. Las mezclas correspondientes a cada una de las cepas se distribuyeron en 4 viales de congelación de 2 mL de capacidad previamente codificados y se guardaron a -20°C y -80°C para su posterior utilización.

2.2.2 Aislamiento de los microorganismos indicadores autóctonos

Con el fin de determinar la capacidad antagonista de las bacterias lácticas frente a microbiota autóctona contaminante de la sangre se utilizaron como indicadoras cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens* y *Bacillus* aisladas de

⁵ Caldo MRS (OXOID CM 359)

MRS², excluyendo el agar

sangre higiénica, procedente de los mataderos de donde se habían aislado anteriormente las bacterias lácticas.

Se utilizaron medios de cultivo selectivos para cada una de las cepas indicadoras. Para el aislamiento de *E. coli* se sembró en agar VRBA⁶ y se incubó durante 24h a 37°C. Se eligieron colonias típicas de color púrpura con halo del mismo color y se confirmaron mediante el uso de galería API20E (bioMérieux 20100). Se sembró en estrías en agar nutritivo⁷, incubándose a 37°C durante 24h. A partir de una colonia aislada se realizó nuevamente una siembra para su posterior congelación.

Se utilizó el medio Baird Parker⁸ que es selectivo para el aislamiento y enumeración de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* reduce el telurito que contiene el medio formando colonias gris-negras y halos claros producto de la hidrólisis de los lípidos de la yema de huevo. Se prepararon diluciones de la muestra de sangre y se sembraron en superficie, incubándose a 37°C durante 24-48h. Se escogió una colonia que presentara las características antes mencionadas y se confirmó mediante observación microscópica que eran cocos gram-positivos formando agrupaciones en racimo. Se determinó en medio O/F⁹ que era un microorganismo anaerobio facultativo. Asimismo, se determinó que era coagulasa positivo¹⁰

⁶ Agar rojo violeta bilis (VRBA) – DIFCO

g/L

⁷ Agar Nutritivo (OXOID –CM3)

g/L

pH 7,4 ± 0,2

| | |
|----------------------|-----|
| Polvo "Lab- Lemco" | 1,0 |
| Extracto de levadura | 2,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Cloruro sódico | 5,0 |
| Agar | 15 |

pH 6,8 ± 0,2

| | |
|----------------------|------|
| Triptona | 10 |
| Polvo " Lab-Lemco " | 5 |
| Extracto de levadura | 1,0 |
| Piruvato sódico | 10,0 |
| Glicina | 12,0 |
| Cloruro de litio | 5,0 |
| Agar | 20,0 |

Añadir:

50mL de Emulsión de yema de huevo-Telurito **SR 54**

⁹ O/F, Agar para *S. aureus*

g/L

pH 7,0±0,2

| | |
|------------------------|-------|
| Triptona | 10 |
| Extracto de levadura | 1 |
| Purpura de bromocresol | 0,001 |

Estas características indicaron que se trataba de *S. aureus*, por tanto se sembró en agar nutritivo dejándola crecer a 37°C durante 48h para luego congelarla.

El aislamiento de *P. fluorescens* se realizó en agar B de King (KB)¹¹. Se aislaron colonias oxidasa positivas. Se comprobó la formación de un pigmento amarillo brillante que emite fluorescencia bajo una luz ultravioleta de 340 nm cuando crece en un medio pobre en hierro. A partir de una colonia aislada se realizó una estría en agar nutritivo. El crecimiento del cultivo se resuspendió en caldo nutritivo¹² y se distribuyó en viales de congelación con glicerol al 20%.

En el caso de *Bacillus* spp., se inoculó 1mL de sangre en 9mL de caldo nutritivo y se realizó un tratamiento térmico a 80°C durante 5min con el fin de eliminar las formas vegetativas presentes en la muestra. Seguidamente se incubó a 37°C durante 24h para favorecer el crecimiento de los microorganismos resistentes al *shock* térmico. Se centrifugó (4000 r.p.m. 20 min a 20 - 25°C). El precipitado se resuspendió en agua triptonada, se realizó un banco de diluciones que fueron sembradas en superficie en medio agar PCA¹³ y se incubaron a 37°C durante 24h. Las colonias crecidas en el medio tenían un

Agar

2

Una vez estéril añadir glucosa al 10% (10mL/100mL de medio)

¹⁰ Prueba de Cuagulasa: Homogeneizar 0,25mL de cultivo de *S. aureus* en caldo BHI (OXOID CM225) en plasma de conejo con EDTA (plasma para coagulasa con ácido etilodiaminotetraacético - DIFCO). Incubar a 37°C durante 24h. La prueba es positiva si solidifica.

¹¹ Agar B de King (King *et al.*, 1954) KB

| | | |
|--------------|--------------------------------------|------------|
| pH 7,2 ± 0,2 | | g/L |
| | Proteosa Peptona | 15 |
| | K ₂ HPO ₄ | 1,5 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,5 |
| | Glicerol | 10 |
| | Agar | 15 |

¹² Caldo nutritivo (OXOID-CM1)
Agar nutritivo⁷ excluyendo el agar

| | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------|
| ¹³ Agar PCA (OXOID-CM463) | | g/L |
| | Extracto de levadura | 2,5 |
| pH: 7,0 ± 0,2 | Digerido pancreático de caseína | 5,0 |
| | Agar | 15,0 |

diametro entre 2-7mm, todas tenían bordes irregulares y presentaban una pigmentación color crema opaco siendo algo más oscuras en la parte central. Las prueba bioquímica de potasa de Ryu fue negativa y la de Catalasa fue positiva. La tinción Gram así como la observación en microscopio de contraste de fases (Olympus BX 50) confirmaron que las colonias correspondían a un organismo gram positivo de forma bacilar, con movilidad y esporas en posición central.

2.2.3 Procedencia de las cepas indicadoras de colección

Para determinar la capacidad inhibitoria de las cepas lácticas aisladas de la sangre se utilizaron como microorganismos indicadores: *Escherichia coli* NCTC5934 y *Staphylococcus aureus* NCTC4163, ambas procedentes de la colección española de cultivos tipo (C.E.C.T., Burjasot, Valencia), *Pseudomonas fluorescens* EP537 proveniente de la colección de cepas del Institut de Tecnologia Agroalimentària - Producció i Postcollita de fruita (Girona-España) y *Bacillus subtilis* (MERCK-1.10649).

2.2.4 Determinación del potencial antagonista en placa de agar de las BAL

Las cepas lácticas aisladas fueron sembradas por picada en grupos de 12 en la superficie de una placa de agar MRS, e incubadas a 30°C durante 24h. Con el fin de minimizar la producción de ácido, el contenido de glucosa del medio fue de 0,2% en lugar de 2% que es el contenido del MRS comercial. Transcurridas las 24h de incubación de las BAL se preparó una suspensión del microorganismo indicador en agua estéril con una absorbancia a 620nm entre 0,2 y 0,3, que correspondía a una población del orden de 10^8 ufc/mL.

Se mezclaron 0,5mL de la suspensión del microorganismo indicador y 4,5 mL de agar nutritivo blando (0,7% de agar).

Esta mezcla se utilizó para realizar la sobrecapa con los indicadores en la placa donde previamente se había sembrado las BAL. La incubación se realizó durante 24h a 25°C en el caso de *P. fluorescens* y 30°C para el caso de *S.*

aureus, *E. coli* y *Bacillus*. Se observó la aparición de halos de inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores alrededor de las colonias de las BAL y el resultado se consideró positivo si el halo de inhibición alrededor de la colonia era nítido y superior a 1mm (Shillinger y Lücke,1989; Bonaterra,1997).

Se decidió reemplazar el medio MRS por el medio agar APT debido a que *P. fluorescens* no presentó crecimiento en la sobrecapa de agar nutritivo en ninguna de las pruebas de antagonismo. Esto pudo deberse a que el agar MRS contiene algunos componentes inhibidores que migran a la superficie durante la incubación, evitando el crecimiento de otros microorganismos que no sean bacterias lácticas. Para tener un criterio de comparación homogéneo de los resultados, en las pruebas definitivas las bacterias lácticas se sembraron en agar APT y las bacterias indicadoras; *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens* y *Bacillus*; en sobrecapa de agar nutritivo.

Se realizaron triplicados de las pruebas de antagonismo en placa de agar para cada una de las 112 cepas lácticas aisladas, frente a cada uno de los cuatro organismos indicadores.

2.2.5 Cinética de crecimiento

a) Cinética de crecimiento en medio selectivo

Antes de realizar las pruebas de inoculación en sangre se realizó un estudio de la cinética de crecimiento en medio selectivo caldo MRS de las bacterias lácticas que presentaron capacidad inhibitoria, determinándose el tiempo de cada una de las fases de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante un lector de microplacas Bioscreen C (Labsystems Corporation, Helsinki, Finland) que registraba las variaciones de absorbancia a través del tiempo.

Se inocularon los pocillos de la microplaca con 400 μ L de las suspensiones bacterias lácticas en MRS a una concentración de 10⁴ ufc/mL. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 600 nm a intervalos de 10

min durante 24-48h a 30°C. Se realizaron tres repeticiones para cada una de las cepas.

Simultáneamente, tres muestras de cada cultivo fueron sembradas en placas de agar MRS con el fin de confirmar la concentración del inóculo de partida y conocer la relación entre la absorbancia a 600 nm y los recuentos de cada cepa. Se mantuvieron los cultivos a 30°C y se realizaron siembras en agar MRS a las 12 y a las 24h de la inoculación.

Se determinaron las características de crecimiento de las bacterias lácticas antagonistas: los tiempos correspondientes a la fase de latencia y fase exponencial, el tiempo de inicio de la fase estacionaria y la velocidad específica de crecimiento (pendiente de la recta que se obtiene de la representación gráfica del logaritmo neperiano de los valores de absorbancia en función del tiempo en fase de crecimiento exponencial)

$$V_{esp} = \frac{\ln(abs_2) - \ln(abs_1)}{T_2 - T_1}$$

b) Cinética de crecimiento en sangre

Las cepas lácticas que presentaron capacidad antagonista frente a las bacterias indicadoras y que además mostraron facilidad de crecimiento en caldo MRS fueron inoculadas en sangre de cordero desfrinada estéril (OXOID SR51). Se incubaron suspensiones de 10^4 ufc/mL de las bacterias lácticas en caldo MRS el tiempo necesario para que el cultivo alcanzara la máxima densidad celular en fase de crecimiento exponencial para asegurar una densidad de células con un nivel de actividad adecuado para el inóculo en sangre. La sangre inoculada a una concentración de 10^4 ufc/mL del cultivo láctico se distribuía en tubos de 2mL de capacidad, se mantenía a 30°C durante 24h y se realizaban siembras, al inicio (T_0), a las 3h (T_1), 6h (T_2), 9h (T_3), 15h (T_4) y a las 24h (T_5) para realizar los recuentos en agar MRS incubado a 30°C durante 48h en anaerobiosis.

En esta fase del estudio también se determinaron las características de crecimiento en sangre de las bacterias lácticas en presencia de una cantidad más alta de azúcar. Se añadió glucosa hasta alcanzar un porcentaje del 2%, que es la cantidad utilizada en medios selectivos comerciales para BAL, suponiendo una cantidad de glucosa en sangre está entre 0,12 y 0,19% (Parés, 1995). La glucosa añadida a la sangre se esterilizó por filtración (filtro de 0,2µm FP030/3 - Schleicher & Schuell). El estudio de cinética en sangre con adición de glucosa se realizó simultáneamente y en las mismas condiciones que en sangre estéril sin glucosa. Asimismo se realizó un seguimiento de la evolución del pH de las muestras de sangre inoculadas con y sin adición de glucosa.

2.2.6 Cinética de crecimiento de los microorganismos indicadores en sangre

Como paso previo al estudio de antagonismo *in situ*, se consideró importante determinar la capacidad de adaptación y crecimiento en sangre de las bacterias indicadoras de colección y las bacterias aisladas de sangre.

Se inoculó en sangre estéril un cultivo *overnight* de los microorganismos indicadores en caldo nutritivo. Se comprobó mediante recuento en placa la concentración del inóculo. Cinco alicuotas de la sangre inoculada se incubaron a 30°C y se realizaron recuentos en placa a las 3h, 6h, 9h, 15h y 24h. *P. fluorescens* se sembró en agar KB incubándose a 22°C, las cepas de *E. coli* se sembraron en VRBA, *S. aureus* se sembró en medio BP y *Bacillus* se sembró en PCA. Tanto *E. coli*, *S. aureus* como *Bacillus* se incubaron a 37°C. El recuento de las placas se realizó una vez transcurridas 24 - 48h de incubación.

2.2.7 Potencial antagonista de las BAL en sangre

Las BAL que mostraron capacidad inhibidora en placa de agar y que además demostraron una cinética de crecimiento adecuada en sangre fueron las seleccionadas para inocularlas en sangre estéril conjuntamente con las cepas indicadoras con el fin de confirmar su potencial antagonista *in situ*. Los organismos indicadores fueron los mismos que los utilizados en las pruebas de

antagonismo en placa excepto *Bacillus*, de los cuales se utilizaron mutantes resistentes al antibiótico rifampicina.

El medio de cultivo utilizado para realizar recuentos en placa de *Bacillus* era no selectivo (PCA) y permitía también el crecimiento de las bacterias lácticas. Con el fin de realizar el seguimiento de muestras co-inoculadas a partir de recuentos en placa de las bacterias del género *Bacillus*, se decidió trabajar con mutantes resistentes a rifampicina e introducir 50 µg/mL del antibiótico en el agar PCA como factor de selección.

2.2.8 Co-inoculación de BAL y microorganismos indicadores

Al igual que las BAL, las bacterias indicadoras se dejaron crecer 24h en caldo nutritivo, se centrifugaron a 4000 rpm por espacio de 20 min a temperatura ambiente y las células precipitadas fueron traspasadas a caldo nutritivo fresco para ser incubadas a las temperaturas correspondientes de crecimiento para cada organismo (37°C para *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus* rif+; 22°C para *P. fluorescens*) durante 12h antes de ser inoculadas en la sangre. Una vez efectuada la inoculación conjunta del indicador y la BAL, la muestra fue distribuida en tubos de 2mL de capacidad e incubadas a 30°C. Se llevó a cabo el seguimiento de la cinética de crecimiento de ambos microorganismos, así como de la muestra patrón inoculada solo con la bacteria láctica y de la muestra patrón inoculada sólo con el microorganismo indicador.

Las siembras se realizaron al inicio y a diferentes intervalos de tiempo a lo largo de 24 horas. Las placas de MRS de las BAL se incubaron a 30°C. Las bacterias indicadoras se sembraron en medios selectivos. *E. coli* se sembró en masa en agar VRBA y se incubó a 37°C durante 24h. Las muestras contaminadas artificialmente con *S. aureus* fueron sembradas en superficie en agar BP e incubadas a 37°C durante 36-48h. *P. fluorescens* se sembró en superficie en medio B de King y se incubó a 22°C durante 24-36h. *Bacillus* (rif +) fue sembrado en agar PCA (50 µg/mL de rifampicina) en superficie e incubado a 37°C.

Se determinó el potencial antagonista de las BAL, tanto de las cepas de colección como de las cepas autóctonas, frente a los organismos indicadores. Se ensayaron diferentes concentraciones de inóculo inicial del cultivo potencialmente antagonista. Se repitieron las pruebas en sangre enriquecida

con glucosa para determinar un posible efecto de la adición de azúcar en la capacidad antagonista de la cepa láctica.

2.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

Las muestras de sangre de matadero utilizadas en este estudio tenían una población de bacterias lácticas de 10^4 – 10^5 ufc/mL.

2.3.1 Potencial antagonista de las BAL en placa de agar

Tal como se indicó en el apartado correspondiente a materiales y métodos fueron 112 las BAL aisladas de sangre higiénica, de las cuales se probó su actividad antagonista en placa de agar frente a cepas indicadoras de colección y autóctonas. Se consideraba que el resultado era positivo cuando se formaba un halo de inhibición alrededor de la colonia del BAL (figura 2.1).

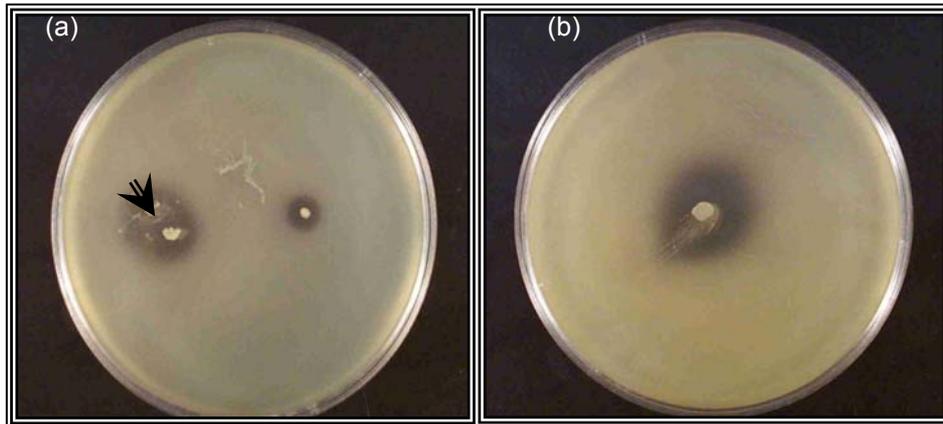


Figura 2.1 Halos de inhibición del crecimiento de (a) *E. coli* NCTC5934 y (b) *S. aureus* autóctono alrededor colonias de bacterias lácticas

En el cuadro 2.1 se presentan los resultados de las pruebas de antagonismo de la colección de BAL frente a los dos grupos de indicadores: autóctonos aislados de sangre y frente a las cuatro bacterias indicadoras de colección utilizadas *S. aureus* NCTC4163, *E. coli* NCTC5934, *P. fluorescens* EP537 y *Bacillus subtilis* (Merk). Los resultados resaltados en gris corresponden a las cepas que presentaron el espectro inhibitorio más amplio.

Cuadro 2.1

Capacidad de antagonismo *in vitro* de las bacterias lácticas frente a los microorganismos indicadores a 30°C

| Nº de cepa | Microorganismos indicadores de colección | | | | | | | | | | | | Microorganismos indicadores autóctonos | | | | | | | | | | | | |
|------------|--|---|---|----------------------------|----|----|--------------------------------|---|---|----------------------------------|----|----|--|-----|-----|----------------|---|---|-----------------------|----|---|---------------------|-----|-----|----|
| | <i>S. aureus</i> NCTC4163 | | | <i>E. coli</i> NCTC5934 | | | <i>P. fluorescens</i> EP537 | | | <i>B. subtilis</i> MERK (BGA) | | | <i>S. aureus</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>P. fluorescens</i> | | | <i>Bacillus spp</i> | | | |
| TA1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| TA2 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| TA3 | + | + | + | - | - | ++ | + | + | + | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| TA4 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | ++ | ++ | +++ | n | n | n | n | n | n | n | + | + | + |
| TA5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA7 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | ++ | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA8 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | ++ | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | + | - | + |
| TA9 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | + | |
| TA10 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | - | - | - | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA11 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | - | ++ | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA12 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | - | - | - | ++ | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| TA13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | - | - | - | - | - | - | - | + | +++ | + |
| TA14 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | ++ | +++ | + | |
| TA15 | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA16 | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| TA17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | ++ |
| TA18 | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| TA19 | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA20 | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | ++ | ++ | +++ | + | + | + | + | ++ | - | + | + | + | |
| TA21 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| TA23 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA24 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |

(Continúa)

(Continuación)

| Nº de Cepa | Microorganismos indicadores de colección | | | | | | | | | | | | Microorganismos indicadores autóctonos | | | | | | | | | | | | |
|------------|--|----|----|----------------------------|---|---|--------------------------------|---|----|----------------------------------|----|----|--|-----|-----|----------------|---|---|-----------------------|---|---|---------------------|-----|----|---|
| | <i>S. aureus</i> NCTC4163 | | | <i>E. coli</i> NCTC5934 | | | <i>P. fluorescens</i> EP537 | | | <i>B. subtilis</i> MERK (BGA) | | | <i>S. aureus</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>P. fluorescens</i> | | | <i>Bacillus</i> spp | | | |
| TA50 | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | ++ | |
| TA51 | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA52 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA53 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA54 | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | |
| TA55 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| TA56 | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA57 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | |
| TA58 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA59 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | + | + | ++ | |
| TA60 | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | - | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | +++ | +++ | + | |
| TA61 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | ++ | +++ | +++ | + | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| TA62 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | |
| TA63 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA64 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA65 | + | - | - | - | - | - | + | - | + | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| TA66 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA67 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| TA68 | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| TA69 | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA70 | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | ++ | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + |
| TA71 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | ++ | - | - | - | - | - | - | + | - | + | |
| TA72 | + | + | + | ++ | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | |
| TA73 | - | - | - | ++ | + | + | + | + | - | + | ++ | ++ | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | + | |
| TA74 | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |

(Continúa)

(Continuación)

| N° de Cepa | Microorganismos indicadores de colección | | | | | | | | | | | | Microorganismos indicadores autóctonos | | | | | | | | | | | | |
|------------|--|----|----|----------------------------|----|----|--------------------------------|---|---|----------------------------------|----|----|--|-----|-----|----------------|---|---|-----------------------|---|---------------------|---|----|----|----|
| | <i>S. aureus</i> NCTC4163 | | | <i>E. coli</i> NCTC5934 | | | <i>P. fluorescens</i> EP537 | | | <i>B. subtilis</i> MERK (BGA) | | | <i>S. aureus</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>P. fluorescens</i> | | <i>Bacillus</i> spp | | | | |
| TA75 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | |
| TA76 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | ++ | ++ | + | +++ | ++ | + | + | + | + | + | - | + | - | - | |
| TA77 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA78 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | + | |
| TA79 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | + | + | |
| TA80 | + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | |
| TA81 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | |
| TA82 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| TA83 | + | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | ++ | +++ | +++ | + | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| TA84 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA85 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| TA86 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA87 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| TA88 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | - | |
| TA89 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + | - | |
| TA90 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| TA91 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA92 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| TA93 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| TA94 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA95 | - | - | - | ++ | + | - | + | + | + | ++ | ++ | + | + | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA96 | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | ++ |
| TA97 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA98 | + | + | ++ | - | - | - | - | - | - | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA99 | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |

(Continúa)

(Continuación)

| Nº de Cepa | Microorganismos indicadores de colección | | | | | | | | | | | | Microorganismos indicadores autóctonos | | | | | | | | | | | |
|------------|--|---|---|----------------------------|----|----|--------------------------------|---|---|----------------------------------|----|----|--|-----|---|----------------|---|---|-----------------------|---|---|---------------------|---|---|
| | <i>S. aureus</i> NCTC4163 | | | <i>E. coli</i> NCTC5934 | | | <i>P. fluorescens</i> EP537 | | | <i>B. subtilis</i> MERK (BGA) | | | <i>S. aureus</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>P. fluorescens</i> | | | <i>Bacillus</i> spp | | |
| TA100 | - | - | - | ++ | ++ | ++ | + | + | + | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| TA101 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TA102 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | ++ | | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| TA103 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| TA104 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| TA105 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| TA106 | ++ | | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | |
| TA107 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | |
| TA108 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| TA109 | - | - | - | + | - | - | + | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | - | |
| TA110 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | | + | - | |
| TA111 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| TA112 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |

Símbolos : **+++**, halos de inhibición superiores a 4 mm; **++**, halos entre 2 a 4 mm; **+**, halos inferiores a 2 mm; **-**, ausencia de halo; **n**, no sobrevivieron a la congelación.

De las bacterias indicadoras provenientes de cultivos tipo la más inhibida fue *E. coli* NCTC5934, un 50% de las 112 BAL dieron un resultado positivo de antagonismo, seguida por *Bacillus subtilis* inhibida por el 47,1% de las BAL, *P. fluorescens* EP537 que fue inhibida por el 40,1% y la menos inhibida, *S. aureus* NCTC4163 que únicamente fue inhibida por el 25% de las BAL.

En el caso de las bacterias indicadoras aisladas de sangre, la más inhibida fue *S. aureus*, ya que un 66,9% de las BAL inhibieron a este organismo.

El segundo indicador en términos porcentuales sería *Bacillus* con un 53,5% y los que presentaron porcentajes más bajos de inhibición fueron *P. fluorescens* y *E. coli* con un 17 y 13,3% respectivamente. En la figura 2.2 se representa la sensibilidad de cada indicador a la inhibición por las BAL en forma de bloques. Las bacterias lácticas que presentaron el espectro más amplio de inhibición fueron 8 que corresponden al 7,14% de las 112 cepas lácticas en estudio (TA20, TA36, TA43, TA62, TA72, TA73, TA75, TA76).

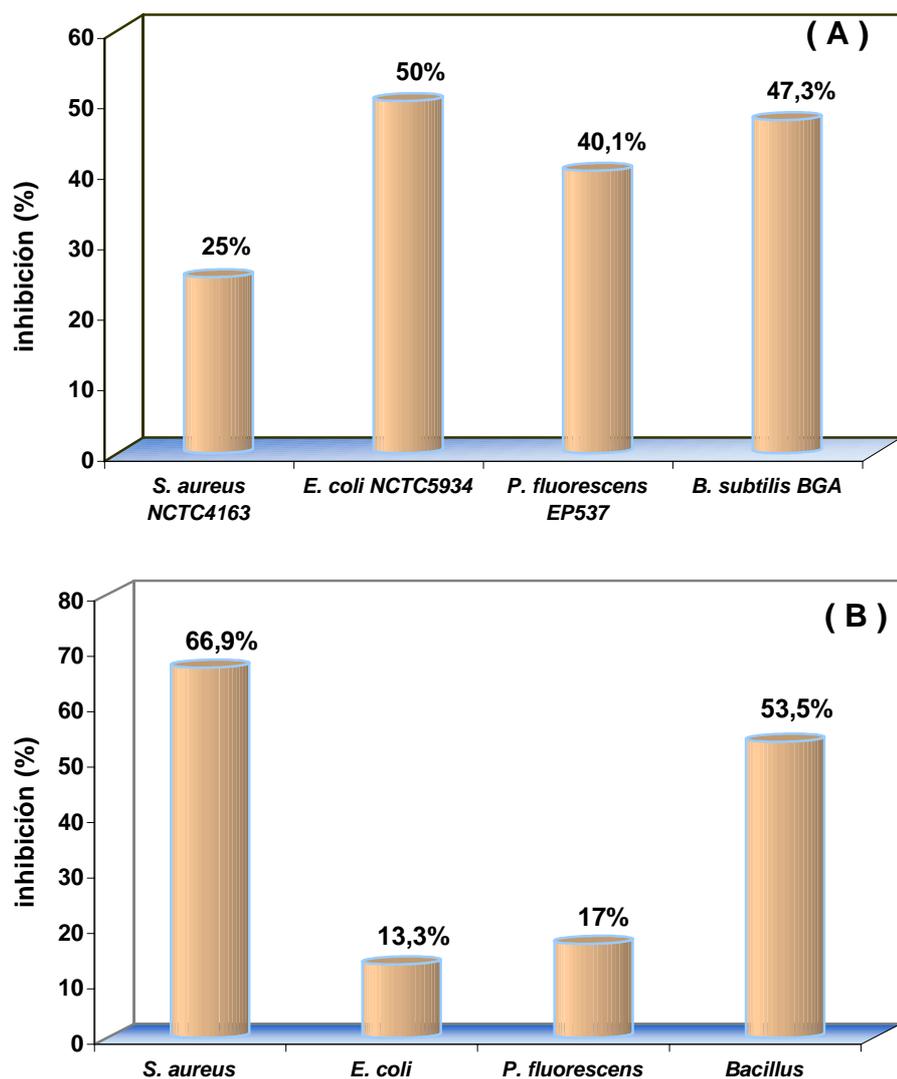


Figura 2.2 Sensibilidad de los indicadores de colección **(A)** y autóctonos **(B)** a la inhibición por BAL en placa. Los bloques representan el porcentaje de BAL con potencial antagonista frente a cada indicador con respecto a las 112 en estudio.

Se eligió utilizar como indicadores microorganismos pertenecientes a la microbiota contaminante habitual de sangre higiénica recogida en mataderos industriales mediante sistemas abiertos: *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Bacillus* spp. Parés (1995), en su estudio sobre caracterización microbiológica de sangre higiénica registró recuentos de *S. aureus* que correspondían a valores entre 10^2 y 10^4 ufc/mL, siendo la mayoría DNasa positivas, lo cual las

relacionaba estrechamente con la producción de enterotoxinas termoresistentes. Se decidió utilizar *S. aureus* como indicador dado que su inhibición con BAL sería de gran interés desde el punto de vista de calidad microbiológica. *E. coli* fue la indicadora que representó a las enterobacterias y, en un sentido más general, la contaminación fecal que habitualmente se encuentra en sangre. Muchos investigadores en diferentes áreas de la investigación utilizan como indicadoras bacterias aerobias psicrótrofas, que son aquellas capaces de crecer con relativa rapidez a temperaturas de refrigeración, dentro de las cuales se encuentran los microorganismos del género *Pseudomonas*. En nuestro caso, *P. fluorescens* fue la bacteria que representó a este grupo. Frenar el crecimiento de las bacterias psicrótrofas sería interesante ya que son las bacterias potencialmente deteriorantes de la sangre en el tanque de almacenamiento a temperatura de refrigeración, donde permanece después de la recolección hasta su procesamiento. Se consideró interesante evaluar la capacidad de inhibición de un microorganismo esporogénico que también se consideraba contaminante habitual de sangre de matadero. Se eligió trabajar con *Bacillus* ya que este microorganismo se encuentra en una concentración elevada (10^4 ufc/mL) en sangre.

En la primera fase de la investigación se estudió el potencial antagonista en placa de las 112 cepas de BAL aisladas de sangre higiénica. 13 se excluyeron posteriormente del estudio pues no sobrevivieron a la congelación. Esto pudo deberse a que en algunos cultivos lácticos el glicerol no siempre parece ser efectivo como agente crioprotector (Stadhouders *et al.*, 1979 citado por Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998). Según Kilara *et al.* (1976) y Accolas *et al.* (1972), citados por Mäyrä-Mäkinen y Bigret, (1998), los métodos más eficientes y ampliamente utilizados para la conservación a largo plazo de cultivos de bacterias lácticas son la congelación rápida de concentrados de células en nitrógeno líquido o la liofilización.

Se pudo observar que los halos de inhibición obtenidos frente a indicadores autóctonos fueron de mayor dimensión (hasta 4mm) y muy transparentes en comparación a los formados frente a los indicadores de colección (máximo 3mm), de los cuales algunos eran translúcidos.

La capacidad de las bacterias lácticas para inhibir el crecimiento de otros organismos en cultivos mixtos ha sido observado durante más de 70 años, lo que comúnmente se ha llamado antagonismo láctico (Jay, 1997). La reducción

del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano. No obstante, también se conoce que las bacterias lácticas producen además de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas (Daeschel, 1989; Klaenhammer, 1990; Hernández *et al.*, 1993).

Las pruebas en placa se realizaron utilizando el método de antagonismo indirecto (Shillinger y Lücke, 1989) en placas de medio con baja concentración de azúcar (0,2%) para minimizar la producción de ácido, por lo tanto podemos suponer que el mecanismo de inhibición de las bacterias lácticas en las pruebas en placa no fue la producción de ácido.

Existen antecedentes de estudios realizados por otros investigadores. Garriga *et al* (1993) caracterizaron los compuestos inhibitorios formados en el medio MRS-0,2% glucosa por dos cepas de *L. plantarum* (CTC 305, CTC 306) y de *L. sake* CTC 460 concluyendo que se trataba de bacteriocinas. Existen otras publicaciones donde se describen bacteriocinas que muestran actividad antibacteriana sólo en medio sólido como son la Lactacin B de *L. acidophilus* (Barefoot y Klaenhammer, 1983) y Plantacin B de *L. plantarum* (West y Warner, 1988).

Así también, Schillinger y Lücke (1989) realizaron una selección a partir de 221 Lactobacilos aislados de carne y productos cárnicos en función de su potencial inhibitorio en placa: 19 de 142 cepas de *L. sake*, 3 de 4 cepas de *L. plantarum* produjeron zonas de inhibición frente a otros lactobacilos, mientras que de 75 cepas de *L. curvatus* examinados, solo una cepa inhibió algunos microorganismos indicadores. A partir de este resultado realizó el estudio de los componentes antimicrobianos presentes en el sobrenadante de caldo MRS de los cultivos que presentaron espectro inhibitorio y llegaron a la conclusión que se trataba de moléculas proteicas que, después de un examen más profundo, se calificaron como bacteriocinas. Investigadores que han estudiado el mecanismo de inhibición de las BAL en el campo de los productos cárnicos han llegando a la conclusión que el mecanismo inhibitorio se debe en muchos casos a la formación de bacteriocinas y más aun si se encuentran en un medio con una cantidad baja de azúcar en el cual se descarta que la inhibición sea debida a la disminución del pH.

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de sustancias antibacterianas por lo que respecta a su espectro antimicrobiano, a su modo de acción y a las

propiedades químicas (Daeschel, 1989 citado por Mäyra – Mäkien y Briget, 1998). Según Juillard *et al.* (1987) citado por Mäyra – Mäkien y Briget (1998) las bacteriocinas tienen un rango de acción muy estrecho. Son activas especialmente contra bacterias gram-positivas, son sustancias termoestables, parte de la molécula es un péptido y debido a este hecho son sensibles a proteasas, entre ellas tripsina, α -quimiotripsina y pepsina (Hernández *et al.*, 1993). Lonvaud-Funed y Joyeux *et al.* (1993) estudiaron la inhibición en placa de *Leuconostoc oenos* aislado de vino por *L. plantarum* y *Pediococcus pentosacens* obteniendo como resultado la aparición en el medio un componente no identificado y la consecuente disminución del crecimiento de *L. oenos*. Las propiedades de esta sustancia fueron investigadas encontrando que eran sustancias pequeñas y termoestables. Su actividad se veía afectada por los tratamientos proteolíticos y por el calor, por lo tanto también se podía tratar de bacteriocinas.

Así también Hill (1996) confirma que la acción de las bacteriocinas normalmente se reduce a bacterias filogenéticamente relacionadas con la cepa productora. En el presente estudio se ha comprobado la capacidad de inhibición en placa de las bacterias lácticas seleccionadas frente a una diversidad de bacterias, incluidas gram-negativas como *Pseudomonas* y *E. coli*, suficientemente alejada filogenéticamente de las bacterias lácticas como para sospechar que el mecanismo de antagonismo no está relacionado únicamente con la producción de estos compuestos proteicos.

Existen estudios realizados por otros investigadores sobre la capacidad inhibidora de bacterias lácticas frente a microorganismos alejados filogenéticamente de este grupo. Gourama (1997) estudió la inhibición en placa del crecimiento y la producción de micotoxinas de *Penicillium* por especies de *Lactobacillus* aislados de productos lácticos, vegetales y frutas, concluyendo que la acción inhibitoria de los *Lactobacillus* no tenía ninguna relación con la producción de ácido láctico o peróxido de hidrógeno y además que esta sustancia antimicrobiana era sensible a las enzimas proteolíticas y a las altas temperaturas (100°C).

Dada la naturaleza proteica de estos compuestos, la confirmación de la intervención de bacteriocinas como mecanismo inhibitorio supondría la necesidad de realizar ensayos de sensibilidad a proteasas y su efecto sobre la actividad antagonista.

Otro posible mecanismo de inhibición podría deberse a la formación de peróxidos. Estos compuestos se producen únicamente en presencia de oxígeno (condiciones aeróbicas y microaerófilas). El hecho de haber incubado las placas con las cepas lácticas en anaerobiosis hace que no se hayan podido sintetizar peróxidos, al menos hasta que no se realizó la sobrecapa con los indicadores (entonces las condiciones de incubación eran aeróbicas). Para comprobar si la formación de peróxidos es la responsable de la inhibición del crecimiento de los indicadores sería necesario confirmar si la sustancia inhibidora es liberada al medio de cultivo y si su actividad disminuye en presencia de catalasa.

S. aureus, *P. fluorescens*, *E. coli* y *Bacillus* son catalasa positivos, por tanto sería necesario que la cepa láctica produjese cantidades importantes de peróxidos para inhibir el crecimiento de estos microorganismos. De todas maneras se han descrito cepas de lactobacilos que producen suficiente H₂O₂ para inhibir estafilococos (Gilliland y Speck, 1972).

Gilliland y Speck (1972) publicaron los resultados de un estudio sobre estreptococos lácticos productores de peróxidos en el cual apuntaban la necesidad de la presencia de las células bacterianas para que se dé el efecto bactericida, ya que el peróxido liberado al sobrenadante del cultivo se disipaba de manera muy rápida. En este mismo estudio se concluía que la formación de peróxidos era sólo uno de los mecanismos de inhibición frente a los microorganismos indicadores y que su contribución era importante en los primeros períodos de crecimiento.

Lemoigne (1997) demostró la actividad antagonista de las cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* frente a *Bacillus* spp. En este caso el mecanismo de inhibición era la formación de diacetilo sintetizado durante la fermentación. Así este también sería un posible mecanismo de inhibición en el caso de *Bacillus*.

La técnica utilizada no permite saber si la sustancia inhibidora es liberada al medio de cultivo. Para ello sería conveniente comprobar si la difusión del sobrenadante libre de células obtenido después de centrifugar un cultivo líquido de la bacteria láctica, también comporta la aparición de halos de inhibición (Shillinger y Lücke, 1989).

Para saber si la sustancia inhibidora se produce durante la fase estacionaria o bien desde las primeras fases de crecimiento bacteriano, sería necesario

realizar pruebas de antagonismo directo (Barefoot y Klaenhammer, 1983) inoculando al mismo tiempo en las placas de MRS la bacteria indicadora y la bacteria láctica. Si se produjera la inhibición en estas condiciones significaría que la cepa láctica sintetiza el compuesto inhibidor en las primeras fases de crecimiento.

La determinación del mecanismo de inhibición no ha sido objeto del presente estudio pero pretende abordarse si se consigue una o algunas cepas con aplicaciones potenciales a nivel industrial.

2.3.2 Cinética de crecimiento de las BAL

a) Cinética de crecimiento de las BAL en medio selectivo

Con el fin de realizar el estudio de la cinética de crecimiento de las BAL en medio selectivo (caldo MRS), se seleccionaron las 8 cepas que tuvieron el espectro inhibitorio más amplio en placa frente a las indicadoras que provenían de cultivos tipo y frente a las bacterias indicadoras aisladas de sangre. Estas serían las probables cepas antagonistas *in situ*, por tanto se consideró importante conocer las características de crecimiento para determinar las condiciones de obtención del inóculo.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron por turbidimetría, como se explicó en el apartado 2.2.5, mediante el lector de microplacas Bioscreen que registraba la variación de la absorbancia a 600 nm a través del tiempo. De esta manera fue posible conocer los parámetros de crecimiento de las BAL referentes a los tiempos correspondientes a cada fase de la curva de crecimiento: tiempo de duración de la fase de latencia, fase exponencial y el momento en el cual se iniciaba la fase estacionaria. Los recuentos en placa de las BAL realizados paralelamente al ensayo en Bioscreen se muestran en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2
 Recuentos en agar MRS de las BAL con potencial antagonista en placa
 (ufc/mL).

| BAL | Inicio (T ₀) | 12horas | 24horas |
|------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| TA20 | 3,2x10 ⁴ | 3,7x10 ⁷ | 3,9x10 ⁸ |
| TA36 | 3x10 ⁴ | 7,2x10 ⁵ | 3,8x10 ⁸ |
| TA43 | 2,1x10 ⁴ | 1,7x10 ⁸ | 1,7x10 ⁸ |
| TA62 | 5,5x10 ⁴ | 9x10 ⁵ | 8,7x10 ⁶ |
| TA72 | 2,2x10 ⁴ | 5,5x10 ⁵ | 2,4x10 ⁵ |
| TA73 | 8,8x10 ⁴ | 9,7x10 ⁷ | 2,2x10 ⁸ |
| TA75 | 1x10 ⁴ | 9,6x10 ⁷ | 6,3x10 ⁸ |
| TA76 | 7,7x10 ⁴ | 5,8x10 ⁸ | 4,2x10 ⁸ |

En la figura 2.3 se muestran las curvas de crecimiento en caldo MRS de las bacterias lácticas seleccionadas obtenidas con el lector de microplacas.

En el cuadro 2.3 se presenta la duración de cada fase del crecimiento de las BAL. Los resultados se obtuvieron de los promedios de las tres repeticiones de las curvas de crecimiento.

De las 8 cepas ensayadas, 5 alcanzaron la densidad celular máxima en menos de 24h de incubación a 30°C (TA20, TA43, TA73, TA75, TA76) . Este fue el criterio de selección utilizado para determinar el orden en que se realizaría los estudios de inhibición en sangre. Algunas cepas (TA36, TA62 y TA72) aún después de 24-36h de incubación permanecían en la fase de latencia (figuras 2.3 y 2.4).

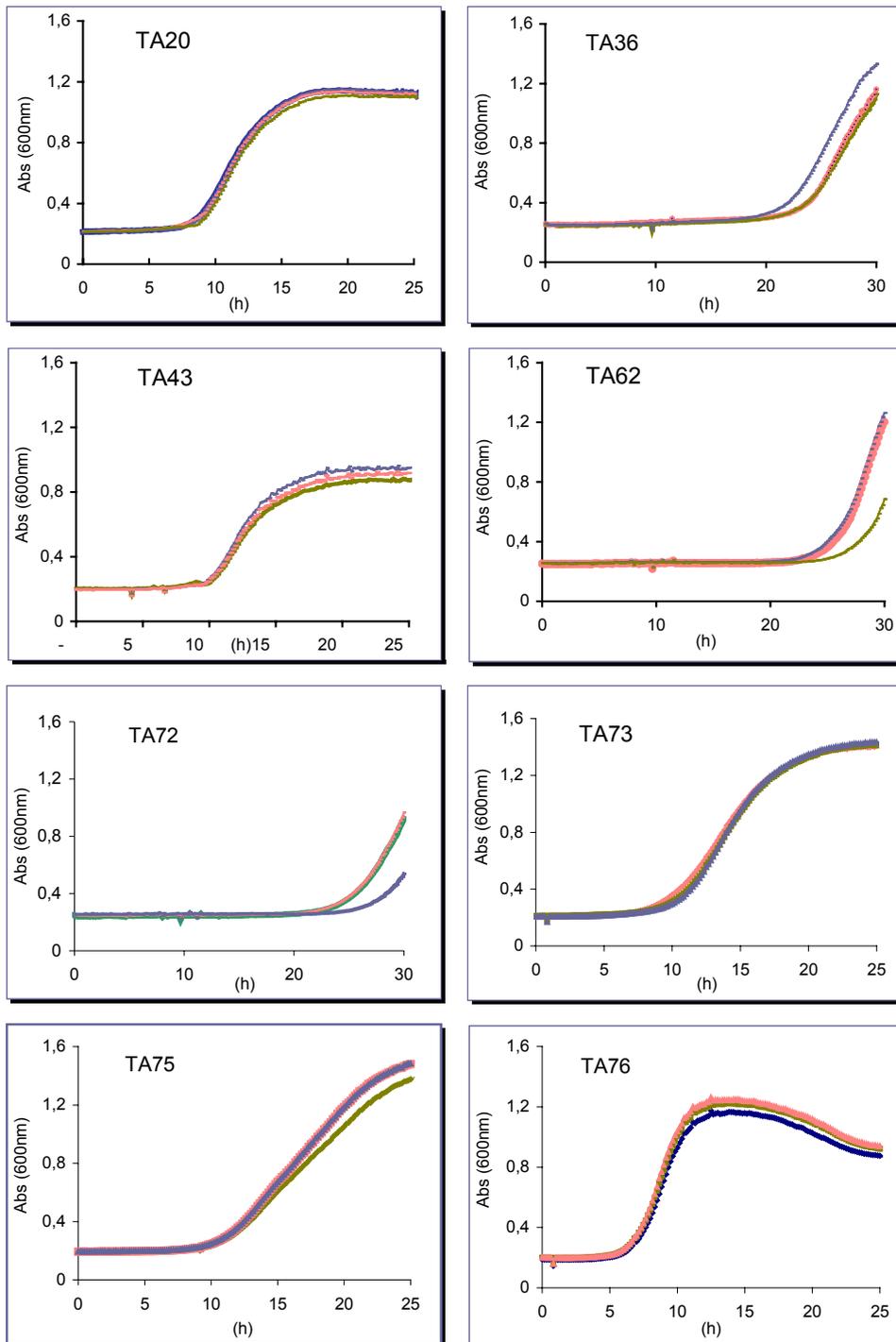


Figura 2.3 Curvas de Crecimiento de las BAL con potencial antagonista en placa, en caldo MRS. Inóculo : 10^4 ufc/mL

El hecho de que en el presente estudio queden desplazadas cepas con potencial antagonista en placa no significa que en un futuro se descarte la posibilidad de incluirlas en otras investigaciones y probarlas como bioprotectoras *in situ*.

Cuadro 2.3
Parámetros de crecimiento de las BAL en medio selectivo

| BAL | Duración de fase de latencia (h) * | Duración de fase exponencial (h)* | Inicio de fase estacionaria (h)* | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)* |
|-------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| TA20 | 9,83 ± 0,15 | 8,50 ± 0,15 | 18,33± 0,00 | 0,20± 0,02 |
| TA43 | 11,46 ± 0,15 | 8,65 ± 0,37 | 20,11± 0,31 | 0,26± 0,02 |
| •TA36 | 23,88 ± 0,80 | •5,67 | •29,55 | 0,16± 0,00 |
| TA62 | 26,75 ± 1,20 | ie | na | 0,24± 0,01 |
| TA72 | 27,13 ± 1,44 | ie | na | 0,17± 0,03 |
| TA73 | 9,55 ± 0,51 | 9,54 ± 0,68 | 20,19± 0,41 | 0,19 ± 0,02 |
| TA75 | 10,49 ± 0,29 | 14,60 ± 1,73 | 24,96± 0,05 | 0,11 ± 0,01 |
| TA76 | 6,11 ± 0,19 | 5,85 ± 1,36 | 12,16± 0,60 | 0,33± 0,02 |

*Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. • TA36, solo en una de las repeticiones se alcanza la fase estacionaria. **ie**, solo inicia la fase exponencial ; **na**, no alcanza la fase estacionaria.

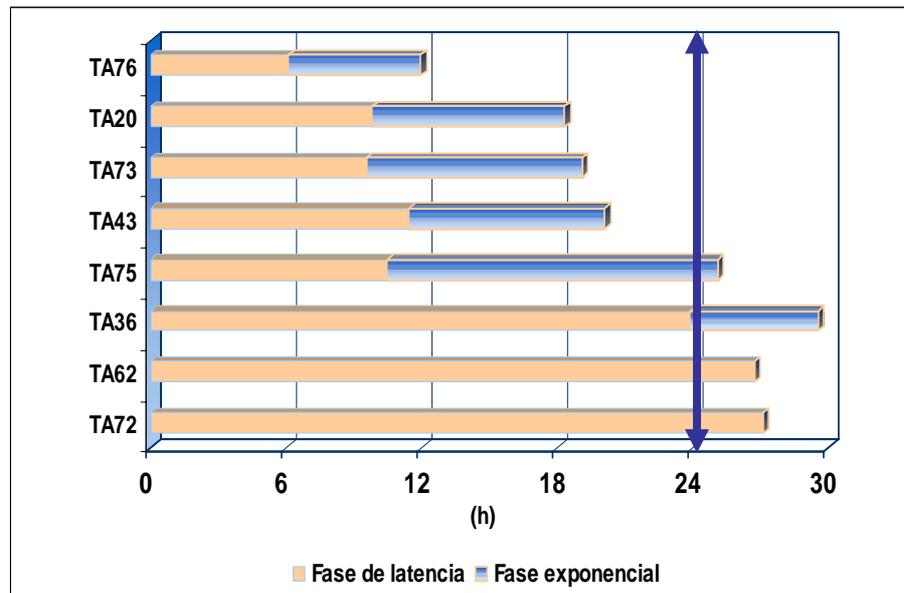


Figura 2.4 8 BAL seleccionadas ordenadas en función de la duración de las fases de crecimiento.

Los recuentos en placa (cuadro 2.2) corroboraron que las 5 BAL seleccionadas habían alcanzado la densidad celular máxima (aproximadamente 10^8 ufc/mL) antes de las 24h de incubación.

b) Cinética de crecimiento de las BAL en sangre

El tiempo de incubación para obtener el inóculo en sangre fue diferente para cada una de las 5 cepas en función de los parámetros de crecimiento obtenidos.

Según Holzapfel *et al.* (1995), una de las características que debe cumplir un cultivo bioprotector es que debe adaptarse con facilidad al producto. Las 5 cepas seleccionadas presentaron una readaptación excelente en sangre, con y sin adición de glucosa (2% de concentración final) alcanzando concentraciones de 10^8 a 10^9 ufc/mL a las 24h de incubación. Se observó el efecto positivo que supone la adición de glucosa en el estímulo del crecimiento de la bacteria láctica. El uso de azúcar con el fin de estimular el desarrollo de las bacterias

láticas durante la fermentación de la sangre de matadero ya ha sido utilizado a nivel industrial (Morgan,1985; Pinel, 1985).

En la figura 2.5 se presentan las curvas de crecimiento de las 5 BAL seleccionadas. En los gráficos se observa que las BAL alcanzaban una densidad más alta de células cuando se agregaba glucosa presentando una diferencia de un orden de magnitud respecto a la sangre no enriquecida.

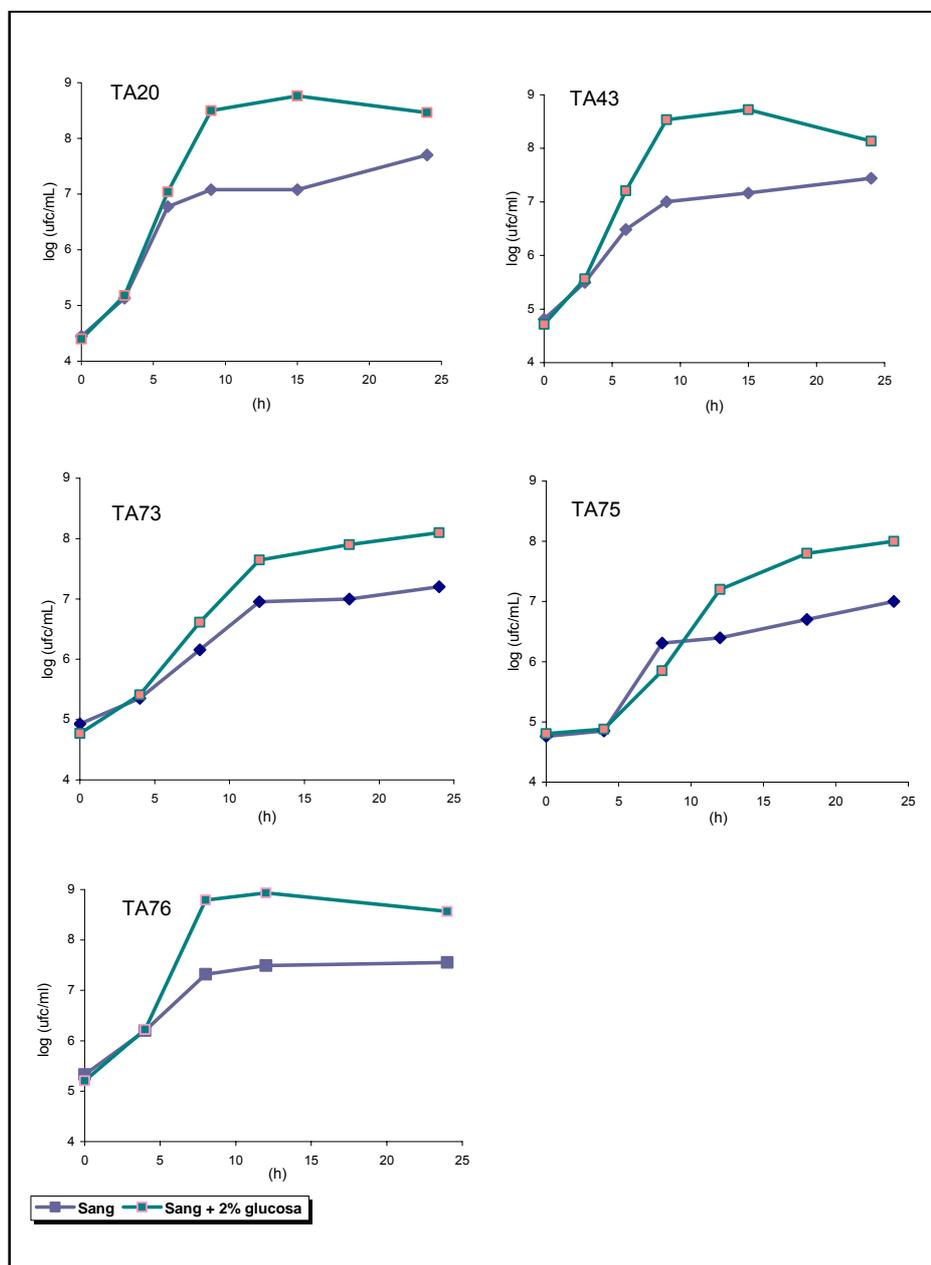


Figura 2.5 Cinética de crecimiento de las BAL en sangre con y sin adición de glucosa.

En todos los casos las BAL se vieron estimuladas por la presencia de una cantidad más alta de azúcar, este hecho se refleja en sus características de crecimiento. Marth y Steele (2001) también demostraron que la adición de pequeñas concentraciones de glucosa o de otros azúcares como lactosa y maltosa estimulan el desarrollo de las BAL.

Cuadro 2.4
Evolución del pH de la sangre inoculada con las BAL

| Tratamiento | 0h. | 6h. | 15h. | 24h. |
|------------------|------|------|------|------|
| TA20 | 7,54 | 7,70 | 7,93 | 7,93 |
| TA20 + 2%glucosa | 7,54 | 7,60 | 6,59 | 5,46 |
| TA43 | 7,55 | 7,68 | 7,83 | 8,00 |
| TA43 + 2%glucosa | 7,55 | 7,61 | 6,78 | 6,05 |
| TA73 | 7,24 | 7,51 | 7,62 | 8,00 |
| TA73 + 2%glucosa | 7,24 | 7,45 | 7,22 | 6,26 |
| TA75 | 7,57 | 7,86 | 8,00 | 8,27 |
| TA75 + 2%glucosa | 7,57 | 7,75 | 7,73 | 7,16 |
| TA76 | 7,24 | 7,52 | 7,64 | 8,04 |
| TA76 + 2%glucosa | 7,24 | 6,84 | 5,67 | 5,11 |

El resultado del seguimiento de la evolución del pH se muestra en el cuadro 2.4. Se observó que en las muestras de sangre que contenían mayor cantidad de azúcar el valor de pH iba disminuyendo. En la sangre sin glucosa añadida el pH se mantenía o aumentaba ligeramente durante las 24h de incubación, probablemente porque la cantidad de ácido producido a partir de la fermentación de glucosa no era suficiente para superar la capacidad tamponante del medio. También se observó que las muestras de sangre inoculadas con las BAL en presencia de glucosa se iban oscureciendo, mientras que las muestras sin adición de glucosa mantuvieron su color original.

Este cambio de color se muestra en la figura 2.6, donde se puede ver dos muestras inoculadas con la BAL con y sin adición de azúcar después de transcurridas 15 y 24h de incubación.

El color de la sangre se atribuye a la hemoglobina, que es el pigmento de la sangre. Su coloración está en función del estado de oxidación del grupo hemo (Fe^{2+} o Fe^{3+}). Las principales formas de la hemoglobina (Hb) son desoxihemoglobina (desoxiHb), la oxihemoglobina (oxiHb) y la metahemoglobina (metaHb). La desnaturalización de la Hb causada por el tratamiento térmico o por disminución del pH provoca que ésta se transforme en metaHb, pigmento de color marrón oscuro. Esto es lo que sucede cuando la fracción celular de la sangre se deshidrata mediante atomización, porque se produce una oxidación del Fe del grupo hemo (Toldrà *et al.*, 2000). En el presente estudio la causa del oscurecimiento podía ser el descenso del pH como consecuencia de la presencia de una cantidad más elevada de azúcar en las muestras enriquecidas con glucosa al 2% que era transformada en ácido láctico.



Figura 2.6 (A) y (B) Sangre + BAL a las 15 y 24h de incubación. **(C) y (D)** Sangre + glucosa al 2% + BAL a las 15 y 24h de incubación.

2.3.3 Cinética de crecimiento de los microorganismos indicadores en sangre

Hemos visto que las BAL se readaptaban muy bien al medio de donde habían sido aisladas, y más aun si crecían en sangre enriquecida con glucosa al 2%. Antes de realizar las pruebas de inhibición *in situ* se estudió la capacidad de adaptarse en sangre de las bacterias indicadoras, tanto para el caso de las que provenían de cultivos de colección, como de las autóctonas aisladas de sangre higiénica. Todas las bacterias indicadoras demostraron tener capacidad de adaptarse a la sangre, excepto *P. fluorescens* EP537 que mantenía recuentos del orden de 10^4 ufc/mL a las 24h, caso contrario a *P. fluorescens* autóctona que aún partiendo de concentraciones iniciales bajas como 10^2 ufc/mL alcanzaba un orden de 10^8 ufc/mL en 24h. Asimismo, *S. aureus* NCTC4163 y *S. aureus* endógeno de sangre alcanzaron niveles de 10^8 ufc/mL después de 24h, *E. coli* NCTC5934 alcanzaba recuentos de 10^7 ufc/mL a las 24h de incubación si partíamos de una concentración inicial de 10^3 ufc/mL y partiendo de una concentración inicial de 10^5 ufc/mL alcanzaba una población del orden de 10^8 ufc/mL. *E. coli* autóctona mostró buena capacidad de readaptación a la sangre, alcanzando poblaciones de 10^8 ufc/mL, tanto si partíamos de poblaciones iniciales de 10^4 como de 10^5 ufc/mL.

En el caso de *Bacillus*, algunas pruebas preliminares demostraron que si se partía de inóculos bajos del orden de 10^2 ufc/mL la etapa de adaptación era muy larga (hasta de 24h). Así se estableció que era importante trabajar con inóculos de partida mínimos de 3 unidades logarítmicas con el fin de conseguir poblaciones entre 10^7 ufc/mL (*B. subtilis*) y 10^8 ufc/mL (*Bacillus* autóctono) en 24h.

La cepa indicadora *P. fluorescens* EP537 no demostró buena capacidad de crecimiento en sangre, probablemente por haber sido aislada de un hábitat completamente distinto (material vegetal) y se decidió excluirla del estudio de antagonismo en sangre.

En la figura 2.7 se puede observar como las bacterias indicadoras aisladas de sangre fueron las que se readaptaron mejor al medio si las comparamos con las que provenían de cultivos de colección.

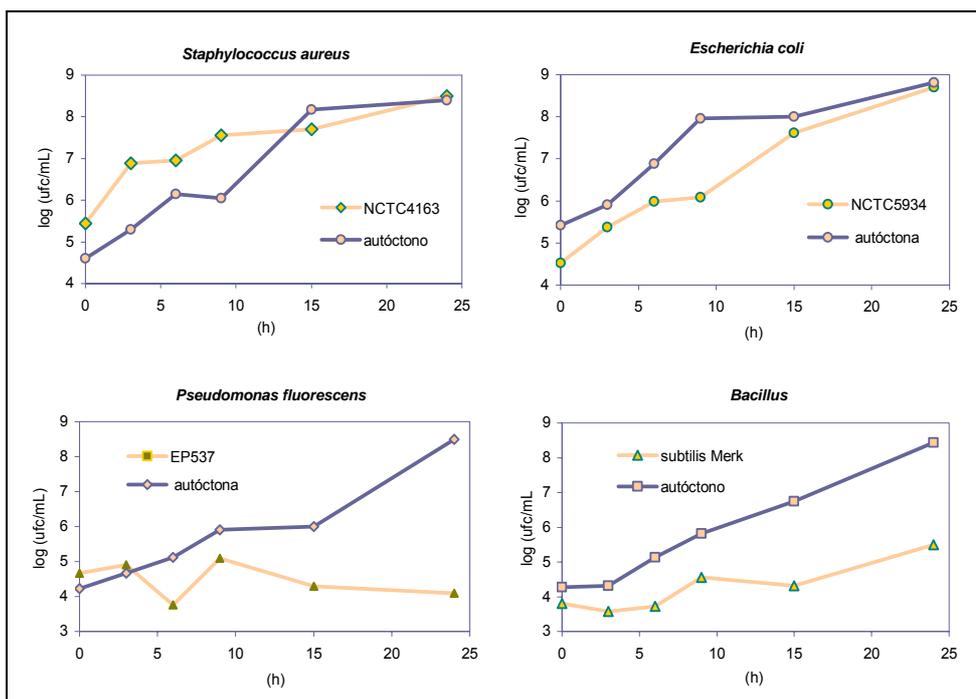


Figura 2.7 Cinética de crecimiento de las bacterias indicadoras en sangre a 30°C

2.3.4 Potencial antagonista de las BAL en sangre

2.3.4.1 Implantación del cultivo

Según Stiles (1996) (citado en Aymerich y Hugas, 1998) los cultivos bioprotectores de bacterias lácticas y/o sus metabolitos con actividad antimicrobiana pueden aplicarse en la bioconservación de cuatro formas básicas: (1) como cultivo productor de bacteriocinas en productos fermentados. En esta aplicación el cultivo debe ser al mismo tiempo un cultivo iniciador (productos cárnicos, quesos, etc.) (2) como cultivo bioprotector en productos cárnicos frescos. En esta aplicación la cepa debe ser capaz de mantener su inóculo inicial en refrigeración. No debe producir cambios sensoriales. (3) mediante licores de fermentación o sus concentrados procedentes de las bacterias lácticas en medios complejos (ALTA 2341 es un producto de fermentación derivado de *Pd. acidilactici* y está considerado como ingrediente

alimentario), (4) como sustancia purificada o semi-purificada. En esta aplicación la acción microbiana está más controlada ya que la cantidad de la sustancia aplicada es conocida pero está sujeta a la regulación de la lista positiva de aditivos alimentarios (ácido láctico E270, la bacteriocina nisina E234).

La aplicación de cultivos lácticos en sangre higiénica no está muy difundida, pero sabemos que en Francia en el año 1983 ABC Bio-industries implantó el uso de fermentos lácticos en siete mataderos industriales mediante un sistema que consistía en inocular un fermento láctico en sangre recolectada de forma higiénica, con anticoagulante y con adición de azúcar. La fermentación de la sangre por el cultivo láctico permitía la reducción del pH hasta valores de 4,7-4,8. El producto final obtenido era un líquido espeso, rojo oscuro, de olor ligeramente ácido no desagradable, bastante aceptable como alimento para animales de compañía o de animales de zoológicos. El aspecto del producto obtenido por ABC Bio-industries era similar al que se obtenía cuando realizábamos los ensayos de cinética de crecimiento o readaptación en sangre con adición de azúcar (figura 2.6). Según Morgan (1985) la sangre recogida en buenas condiciones alcanza un pH entre 4,5 – 4,7 en 48h a una temperatura de alrededor de 20°C y el descenso de la carga microbiana es verdaderamente asombroso, teniendo en cuenta que, conservada biológicamente en estas condiciones puede mantenerse durante varios meses a temperatura ambiente.

Teniendo presente los resultados obtenidos por ABC Bio-industries optamos por evaluar además de diferentes combinaciones de inóculo inicial de las BAL frente al indicador en sangre, el efecto de la adición de glucosa al 2%.

2.3.4.2 Preparación del inóculo

El estudio *in situ* se inició realizando pruebas preliminares para determinar la concentración a la cual debía inocularse la BAL en la sangre con el fin de conseguir la inhibición del microorganismo indicador.

De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de antagonismo en placa, cinética de crecimiento en medio selectivo y la readaptación de las bacterias aisladas de sangre higiénica, se decidió iniciar el estudio de antagonismo *in situ* utilizando la bacteria láctica TA43, que fue la que mostró el espectro más amplio de inhibición en placa y por tanto la que había marcado precedentes más esperanzadores. Esta cepa presentó potencial inhibitorio frente a las

indicadoras de colección, así como frente a bacterias indicadoras autóctonas aisladas de sangre. El resto de las cepas seleccionadas también habían presentado un gran espectro inhibitorio pero a diferencia de la TA43 los halos formados eran de menor dimensión y en alguna de las tres repeticiones no se observó presencia de halo. Todas las cepas mostraron tener un crecimiento en caldo MRS conforme a lo esperado y todas ellas se readaptaron adecuadamente en sangre con y sin adición de glucosa. En el cuadro 2.5 se muestra un resumen extraído de los resultados de antagonismo en placa de las cepas TA20 , TA43,TA73,TA75 y TA76.

Cuadro 2.5
Antagonismo en placa de BAL con amplio espectro de inhibición

| | | TA20 | TA43 | TA73 | TA75 | TA76 |
|-------------------|------------------|-----------|-------------|---------|--------|----------|
| Ind. de colección | <i>S. aureu</i> | - - + | + ++ + | - - - | - - - | - - - |
| | <i>E. coli</i> | + + - | + + + | ++ + + | - - - | ++ ++ ++ |
| | <i>P. fluor.</i> | + - + | + + + | + + - | - - - | + + + |
| | <i>B. subti.</i> | - - - | + + + | + ++ ++ | - - - | + ++ ++ |
| Ind. autóctonos | <i>S. aureu</i> | ++ ++ +++ | +++ +++ +++ | + + + | - ++ + | + +++ ++ |
| | <i>E. coli</i> | + + + | +++ +++ +++ | + - - | + - - | + + + |
| | <i>P. fluor.</i> | + ++ - | + ++ +++ | + + + | + - - | + + - |
| | <i>Bacill.</i> | + + + | + + - | + - + | - - - | + - - |

Símbolos : +++, halos de inhibición superiores a 4 mm; ++, halos entre 2 a 4 mm; +, halos inferiores a 2 mm; - , ausencia de halo.

En el primer ensayo de inoculación en conjunto (bioprotector + indicador) en sangre se utilizaron concentraciones iguales de ambos microorganismos: 10⁴ ufc/mL.

Se vio los organismos indicadores se desarrollaron exactamente igual en presencia y ausencia del microorganismo láctico, no se observó efecto antagonista por parte de la BAL .

También *E. coli* NCTC5934 y *E. coli* autóctona en presencia de la BAL TA43 presentaron cinética de crecimiento igual al control. Los indicadores autóctonos

en general alcanzaron poblaciones de un orden logarítmico superior a la BAL TA43.

En la figura 2.8 se puede observar la evolución de la bacteria láctica TA43 y de los indicadores *S. aureus* y *P. fluorescens* inoculadas conjuntamente, así como de la evolución del microorganismo indicador sin presencia de la cepa láctica (control).

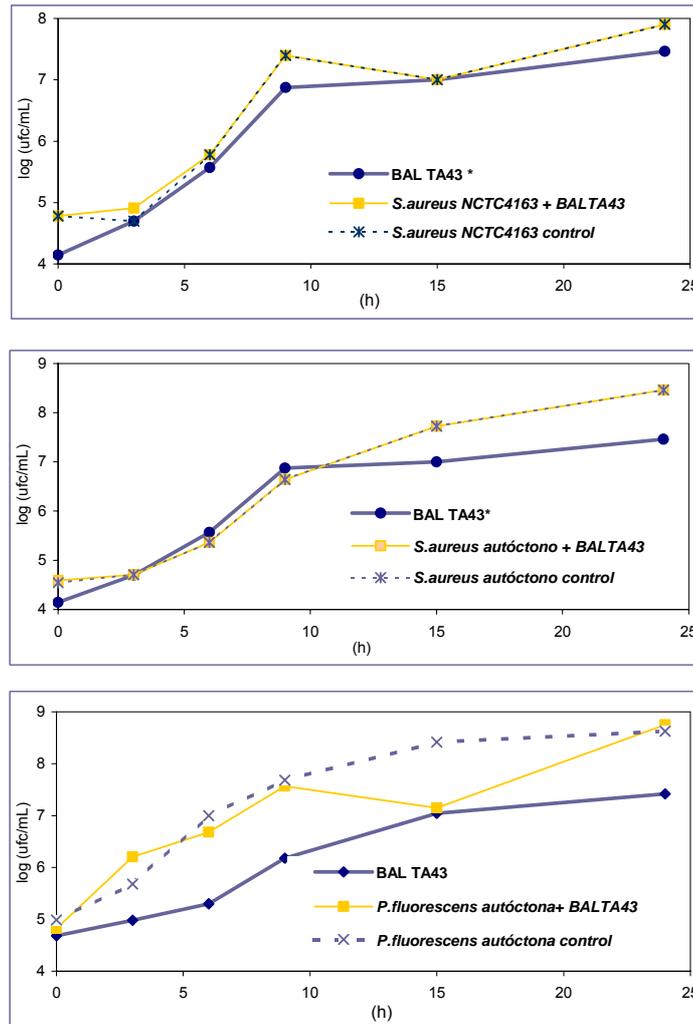


Figura 2.8 Curvas obtenidas a partir de la inoculación conjunta en sangre de la cepa láctica TA43 y uno de los microorganismos indicadores y del microorganismo indicador en ausencia de la cepa láctica (control). Inóculos iniciales del orden de 10^4 ufc/mL.

De acuerdo con los resultados de inoculación de partida iguales se dedujo que no se daba el efecto inhibitorio por parte de la bacteria láctica y a partir de aquí se intentó favorecer a la BAL inoculando cada vez concentraciones iniciales más altas con respecto al organismo indicador.

No se puede establecer una relación directa entre el nivel inicial de inóculo y efecto antagonista ya que al incrementar el inóculo inicial de la BAL con respecto al indicador no favoreció su capacidad inhibitoria.

En la figura 2.9 se muestra la evolución de *S. aureus* NCTC4163 y de *P. fluorescens* a 10^5 ufc/mL inoculados conjuntamente con BAL TA43 en sangre a 10^6 ufc/mL. Se observa como en el caso de *S. aureus* NCTC4163 el control alcanzó una población del orden de 10^8 ufc/mL, mientras que inoculado conjuntamente con la BAL se vio inhibido en dos ordenes de magnitud a las 24h. El hecho de incrementar el inóculo inicial de la BAL con respecto al indicador no favoreció su capacidad inhibitoria, esto se vio reflejado claramente en el caso de *S. aureus* NCTC4163 ya que cuando se confrontaron concentraciones de 10^6 ufc/mL de la BAL y 10^5 ufc/mL del microorganismo indicador se obtuvo a las 24h, una diferencia de dos ordenes logarítmicos entre la población del indicador en presencia de la BAL y el control, pero cuando se confrontaron inóculos del orden de 10^6 ufc/mL vs 10^4 ufc/mL de la BAL y de *S. aureus* NCTC4163 la diferencia fue de un orden logarítmico.

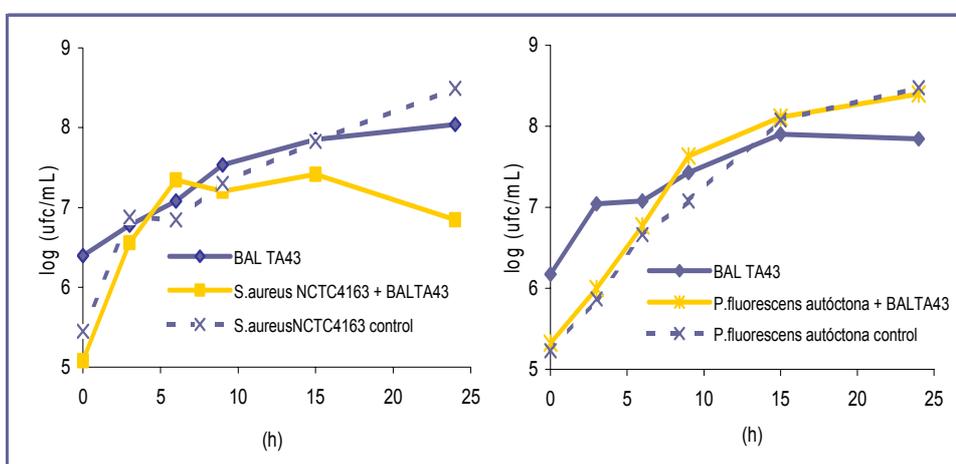


Figura 2.9 Curva de crecimiento a 30°C de la BALTA43 (10^6 ufc/mL) y *S. aureus* y *P. fluorescens* (10^5 ufc/mL) co-inoculadas en sangre

Por lo que respecta a *P. fluorescens* se observa como la presencia de la BAL no afectó su crecimiento, ya que presentó una cinética muy semejante al control, alcanzando en ambos casos una población de 10^8 ufc/mL.

De acuerdo con los ensayos descritos, se concluyó que la BAL debía inocularse en una concentración mínima de 10^6 ufc/mL, ya que con inóculos de partida bajos como 10^4 ufc/mL no se conseguían condiciones ventajosas frente al indicador y no se apreciaba la capacidad de la BAL para controlar el crecimiento de las bacterias indicadoras.

2.3.4.3 Efecto inhibitorio

Los resultados de co-inoculación de la BAL TA43 y el resto de microorganismos indicadores continuaron la misma tendencia. En el caso de *S. aureus* aislado de sangre aun utilizando concentraciones altas de la bacteria láctica no se observó antagonismo *in situ*. Se probaron concentraciones de 10^6 ufc/mL vs 10^4 ufc/mL y 10^7 ufc/mL vs 10^2 ufc/mL de la BAL TA43 y del indicador respectivamente. En ambos casos tanto el control como *S. aureus* inoculado conjuntamente con la BAL alcanzaron poblaciones de 10^8 ufc/mL.

Asimismo los resultados del efecto inhibitorio de las BAL TA20, TA73, TA75, TA76 fue semejante. En el caso de la cepa TA20 se apreció efecto inhibitorio frente a *S. aureus* autóctono en un orden logarítmico: Mientras que el control alcanzó una población de 10^9 ufc/ml, el que crecía conjuntamente con la BAL alcanzó 10^8 ufc/mL en 24h. También *Bacillus subtilis* fue inhibido únicamente por la BAL TA75 en un orden de magnitud.

En la figura 2.10 se muestran algunos seguimientos de la cinética en sangre inoculada únicamente con los indicadores así como de la cinética cuando se inoculaban conjuntamente con las BAL. Las curvas de crecimiento nos indican que en todos estos casos el crecimiento de las bacterias indicadoras no se vio afectado por la presencia de las BAL.

En el cuadro 2.6 se presenta un resumen de los resultados obtenidos de los ensayos de co-inoculación realizados en sangre.

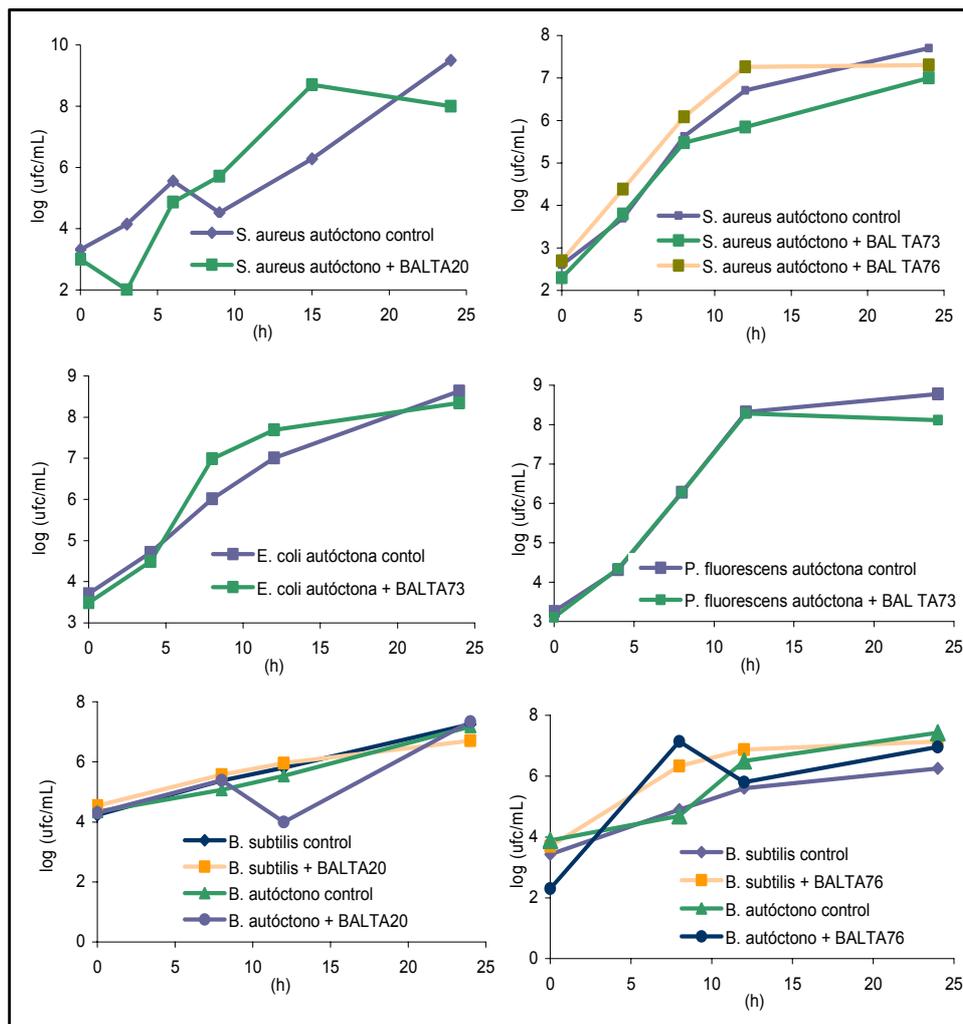


Figura 2.10 Curvas de crecimiento a 30°C de BAL y bacterias indicadoras co-inoculadas en sangre.

Cuadro 2.6
Antagonismo en sangre de las BAL seleccionadas frente a los indicadores

| | TA20 | TA43 | TA73 | TA75 | TA76 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>S.aureus</i> NCTC4163 | — | ++ | N | N | N |
| <i>E.coli</i> NCTC5934 | N | — | N | N | N |
| <i>Bacillus subtilis</i> BGA | — | — | — | — | — |
| <i>S. aureus</i> autóctono | + | — | — | + | — |
| <i>E. coli</i> autóctono | — | — | — | — | — |
| <i>P. fluorescens</i> autóc. | — | — | — | — | — |
| <i>Bacillus</i> autóctono | — | — | — | — | — |

Símbolos: + , 1 reducción decimal; ++, 1 a 3 reducciones decimales; +++, ≥ 4 reducciones decimales; — , No se observó inhibición; N, no determinado.

2.3.4.4 Efecto de la adición de glucosa en sangre

Con el fin de estimular el crecimiento de la BAL se probó enriquecer la sangre agregando glucosa (2% concentración final en sangre).

Este hecho favoreció el antagonismo por parte de las BAL frente a la mayoría de los organismos indicadores, especialmente frente a los autóctonos. En el cuadro 2.7 se muestra un resumen de resultados y se ve claramente la tendencia diferente que siguieron los indicadores provenientes de la colección de cultivos tipo y los aislados de sangre. Afortunadamente, los resultados más alentadores se obtuvieron en los ensayos de co-inoculación con autóctonos. En las figuras 2.11, 2.12, 2.13 y 2.14 se presentan algunos seguimientos, donde se observa que en general los indicadores alcanzaban poblaciones de 10^7 - 10^8 ufc/mL mientras que cuando se co-inoculaban con las bacterias lácticas se veía inhibido su crecimiento.

Cuadro 2.7
Antagonismo en sangre con glucosa (2%) de las BAL seleccionadas frente a los indicadores

| | TA20 | TA43 | TA73 | TA75 | TA76 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>S.aureus</i> NCTC4163 | — | — | N | N | N |
| <i>E.coli</i> NCTC5934 | — | — | — | — | — |
| <i>Bacillus subtilis</i> BGA | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> autóctono | ++ | — | ++++ | ++++ | ++++ |
| <i>E. coli</i> autóctono | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>P. fluorescens</i> autóct. | +++ | ++++ | +++ | ++++ | + |
| <i>Bacillus</i> autóctono | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ |

Símbolos: + , 1 reducción decimal; ++, 1 a 3 reducciones decimales; +++, ≥ 4 reducciones decimales; +++++, inhibición total; — , No se observó inhibición; N, no determinado.

La figura 2.11 corresponde a *S. aureus*. Tal como se puede apreciar la cepa TA20 inhibió parcialmente a *S. aureus* autóctono en dos unidades logarítmicas (figura 2.11a). TA43 no presentó resultados interesantes frente a *S. aureus* ya que no demostró potencial inhibitorio frente a ninguna de las dos cepas. Se consiguió la inhibición total de *S. aureus* autóctono cuando se confrontó a TA73, TA75, TA76.

En la figura 2.12 se ve que en el caso de *E. coli* se consiguieron inhibiciones máximas entre 2 y 3 unidades logarítmicas. *E. coli* NCTC5934 a pesar de la adición de glucosa en la sangre no fue inhibida en ninguno de los casos.

Para el caso de *P. fluorescens* se obtuvieron inhibiciones desde 1 orden logarítmico (TA76) hasta la inhibición total (TA43 y TA75). Si comparamos las figuras 2.13a y 2.13b también se observa que si se partía de un inóculo más alto del BAL TA43 esta bacteria láctica inhibía totalmente de *P. fluorescens* en un tiempo más corto. Es así como partiendo de concentraciones de 10^6 ufc/mL de la BAL TA43 (figura 2.13a) y de 10^5 ufc/mL del indicador la inhibición fue de cuatro ordenes de magnitud en 24h y si se partía de un inóculo de 10^7 ufc/mL de la BAL versus 10^3 ufc/mL del microorganismo indicador los recuentos de *P. fluorescens* eran inferiores a 10^2 ufc/mL a partir de las 20 horas de incubación.

Al igual que *E. coli* las cepas de *Bacillus* (rif+) se lograron inhibir en un máximo de tres unidades logarítmicas. Si observamos la figura 2.14 se podría decir que las BAL más prometedoras en cuanto a este indicador serían TA20 y TA73.

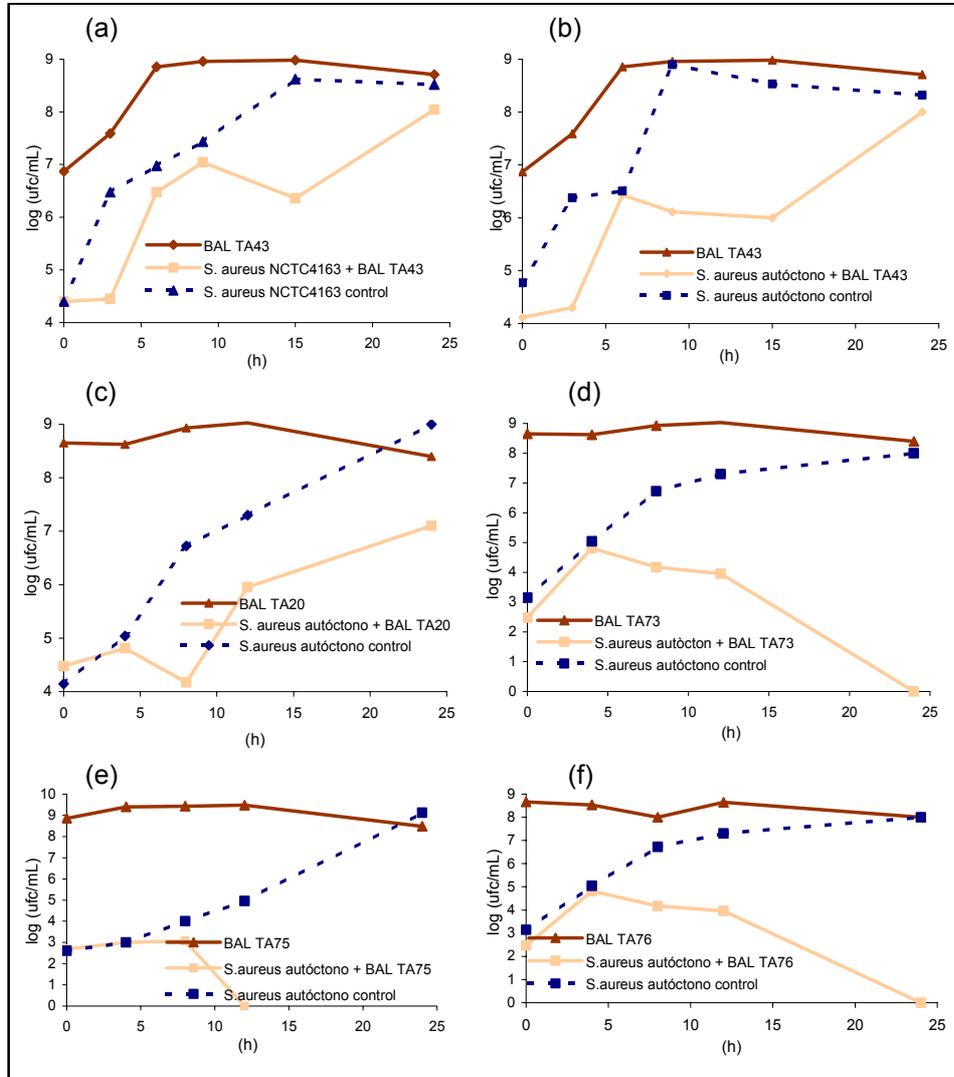


Figura 2.11 Confrontación de *Staphylococcus aureus* con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C.

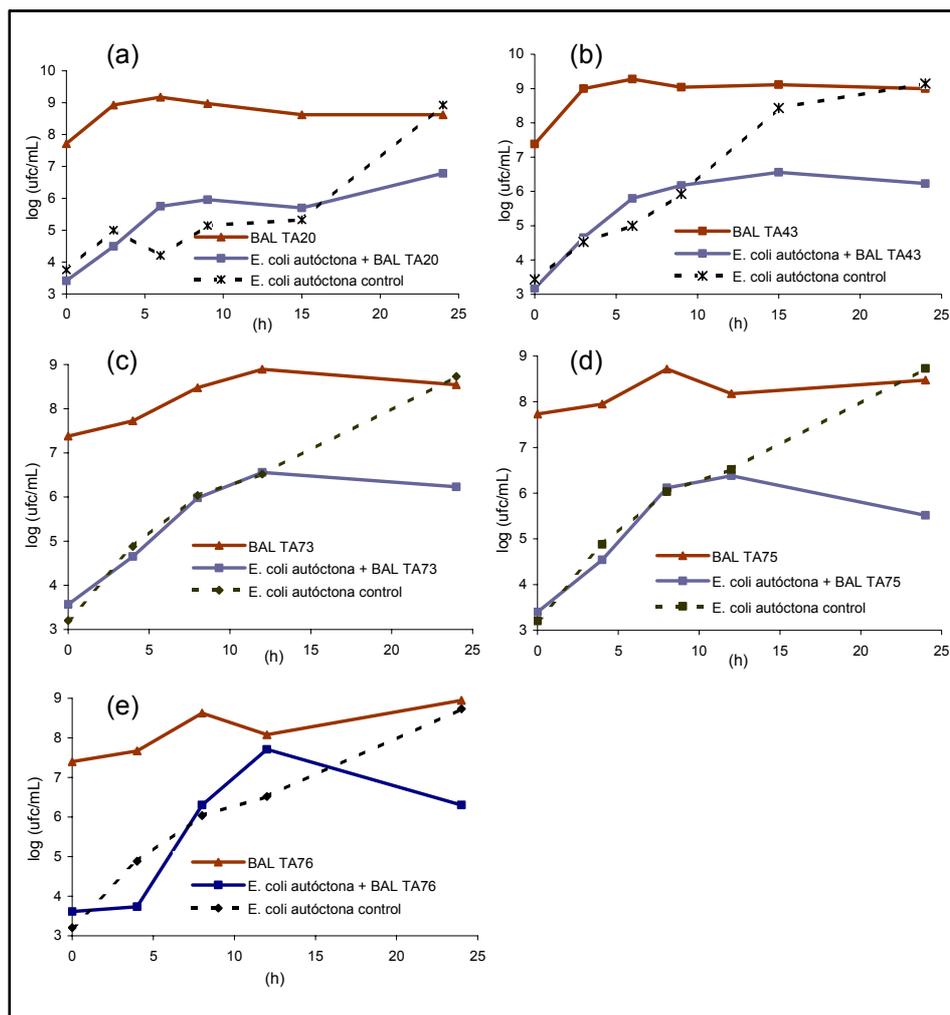


Figura 2.12 Confrontación de *Escherichia coli* con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C.

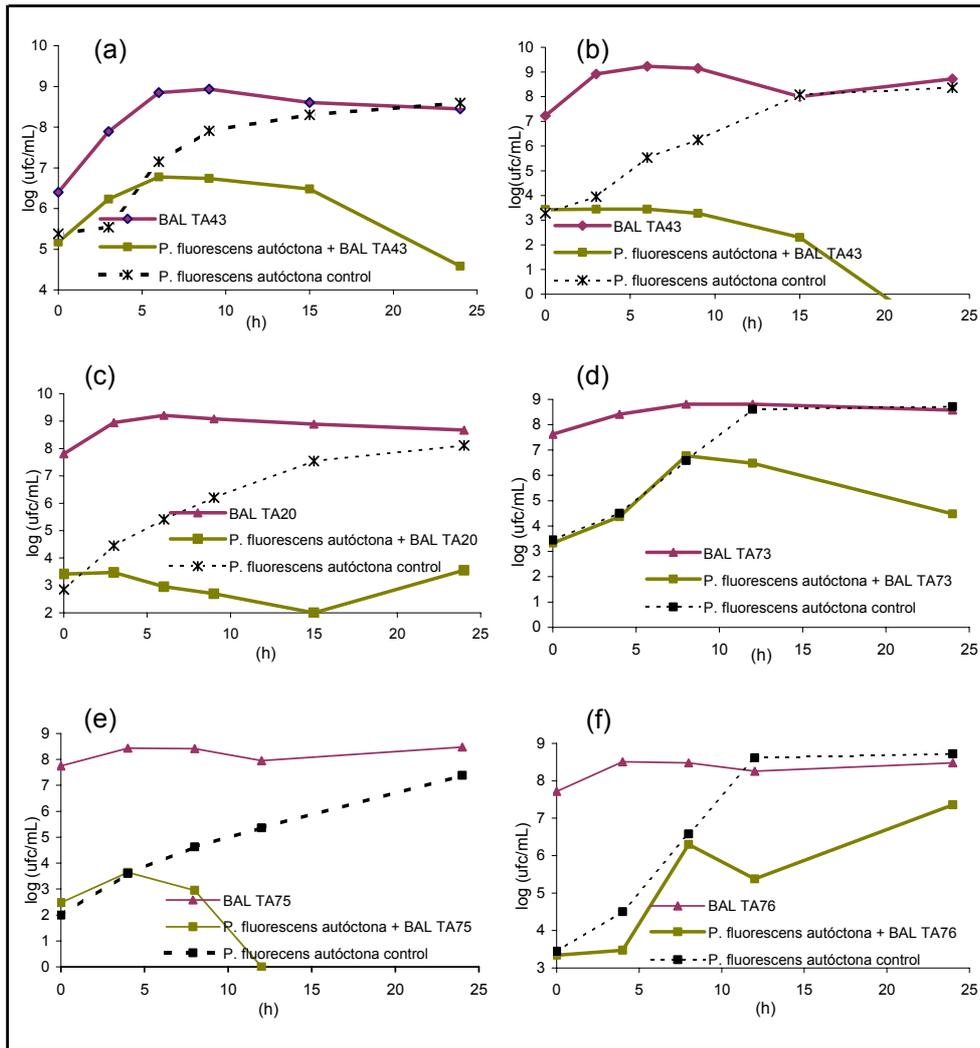


Figura 2.13 Confrontación de *P. fluorescens* con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C.

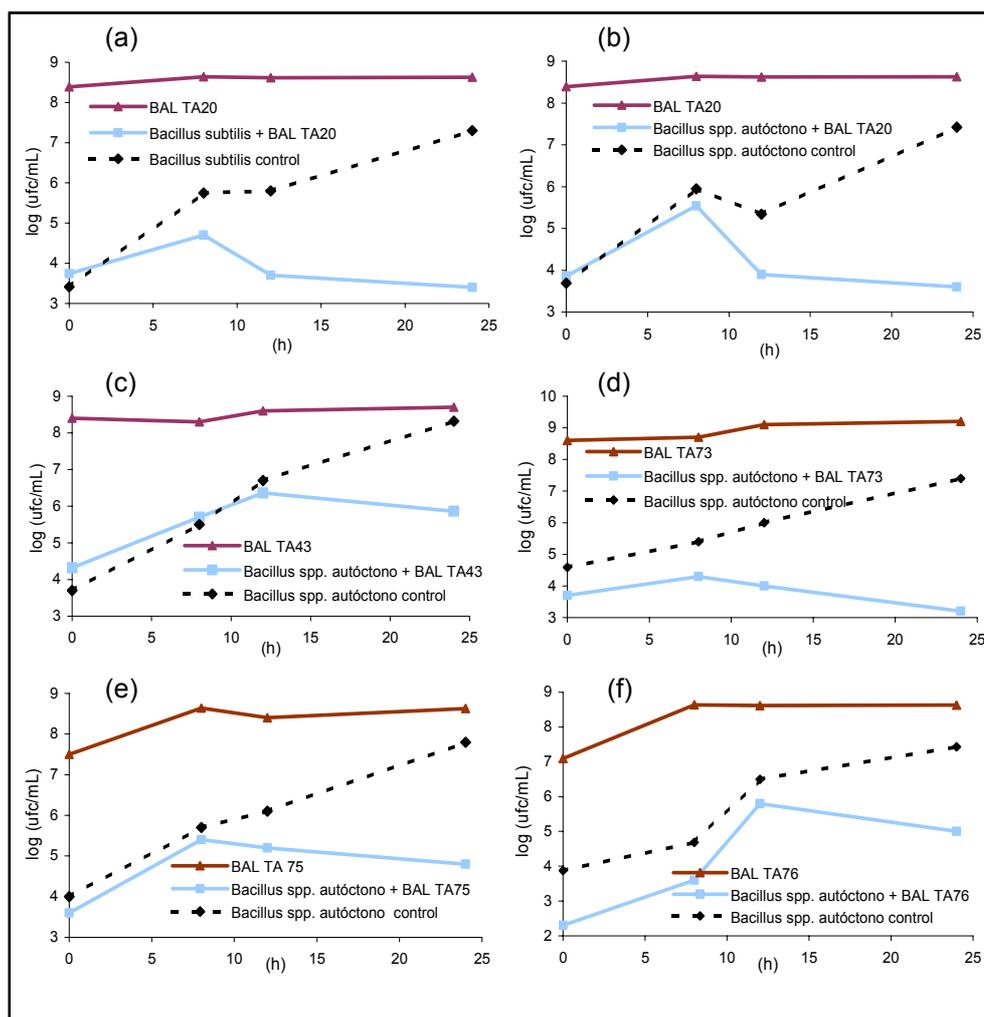


Figura 2.14 Confrontación de *Bacillus* spp. con las BAL con potencial antagonista en placa. Co-inoculación en sangre enriquecida con glucosa (2%) e incubación a 30°C.

Entre los factores que pueden condicionar la eficacia de los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas están (1) la adecuación del medio para la producción del compuesto inhibidor, (2) una posible pérdida de la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, (3) la competencia con otras bacterias presentes en el medio, (4) la inactivación del compuesto inhibidor por las enzimas producidas por otros microorganismos.

Las pruebas que se han realizado en este estudio son útiles sólo para comprobar la capacidad de las cepas lácticas seleccionadas para superar los

dos primeros condicionantes: la adaptación al medio y el mantenimiento en este medio de la capacidad antagonista demostrada en las pruebas en placa. Consideramos que se trata de una primera aproximación ya que sirven para determinar la capacidad de inhibición que muestran frente a los microorganismos indicadores en el medio donde deben ejercer su efecto antagonista, pero por el hecho de haber trabajado con sangre estéril inoculada tan solo con la cepa láctica y el cultivo indicador, hemos obviado la competencia con la microbiota contaminante propia de la sangre que se quiere conservar, que la bacteria láctica debería ser capaz de superar con el fin de ejercer el efecto deseado.

La siguiente etapa del estudio tendría que consistir en la evaluación de la capacidad de las cepas que hayan dado resultados más esperanzadores para implantarse como cultivos dominantes en sangre real de matadero, compitiendo con el resto de microorganismos lácticos y la microbiota contaminante que contiene. Para realizar este estudio sería necesario encontrar la manera de realizar la monitorización de la cepa inoculada, que podría consistir en una identificación basada en su perfil plasmídico (Anderson y Mc Kay, 1983), que ya ha sido utilizado en otros estudios (Garriga *et al.*, 1996).

A partir de los resultados obtenidos podemos afirmar que no se ha podido reproducir en sangre las actividades inhibitoras demostradas por las cepas lácticas en el estudio en placa. Cuando los estudios *in situ* se tienen que realizar en medio sólido frecuentemente se debe afrontar la dificultad de la difusión del compuesto inhibidor en el medio donde debe demostrar su eficacia real. En nuestro caso no ha sido necesario superar este posible obstáculo pero nos hemos encontrado con el hecho de que frecuentemente es difícil reproducir en un medio líquido, donde las bacterias se encuentran en suspensión en forma de células individuales o en pequeños grupos, las actividades demostradas por los mismos microorganismos cuando crecen en forma de colonias en medios sólidos.

Aún desconocemos el mecanismo de inhibición utilizado por las BAL, en los experimentos realizados en sangre se puede deducir que podría estar relacionado con la acidificación, pero a pesar de esto las pruebas en placa se realizaron en un medio con contenido bajo en glucosa (0,2%), por lo tanto al menos en placa debe haber algún otro mecanismo implicado en la inhibición.

En este segundo grupo de pruebas se obtuvieron resultados más positivos. Esto podría llevarnos a suponer que uno de los mecanismos de inhibición responsables del efecto que hemos observado sea precisamente la producción de ácido láctico, en cantidades más elevadas que en sangre no enriquecida debido precisamente a la presencia de una mayor cantidad de azúcar fermentable. De todas maneras, debe tenerse en cuenta que el ácido láctico tiene una capacidad antimicrobiana muy débil, a menos que se encuentre en forma no disociada y esto sólo se produce a valores mucho más bajos de pH (inferiores a pH 4) que los alcanzados en nuestras pruebas.

Es poco probable, por tanto, que el efecto inhibitor sea debido al descenso de pH ya que después de 24h de incubación de la sangre enriquecida con glucosa alcanzamos niveles de pH del orden de 5,6-6,05; valores que probablemente no son suficientemente bajos para actuar como restrictivos y explicar los efectos inhibitorios observados. Un factor que cabría tener en cuenta es que el pH alcanzado está dentro del rango en el cual pueden crecer los indicadores utilizados. *Escherichia coli* (4,5-9,0) *Staphylococcus aureus* (4,0-9,5) y *Pseudomonas* (puede verse inhibida a valores de pH inferiores a 5,0 (Jay, 1997). El efecto inhibitorio del ácido láctico frente a *Bacillus* (rif +) no queda claro ya que Casp y Abril (1999) demostraron que la actividad antimicrobiana del ácido láctico es mucho más débil frente a *Bacillus* spp., además, en el caso del presente estudio el pH de la sangre pasadas 120h de incubación fue de 5,15 y este no es un valor suficientemente bajo para inhibir a este microorganismo ya que se mantiene viable en rangos de pH entre 5-10 (Casp y Abril, 1999).

En los resultados obtenidos por ABC, Bio-Industries (1983) el pH bajaba hasta valores de 4,5-4,7. En este caso sí que el efecto inhibitor de los organismos indicadores se podría atribuir a la combinación de la concentración de ácido orgánico y a los valores restrictivos de pH alcanzados pero aún el efecto conseguido con el sistema de ABC Bioindustries no podría explicarse sólo por el descenso de pH porque en un medio acuoso no tamponado acidificado con ácido láctico hasta los mismos valores de pH que los obtenidos en sangre, no se obtenía el mismo nivel de inhibición. Debe tenerse muy presente que la cantidad de ácido láctico necesario para disminuir el pH de la sangre hasta valores de 4,5-4,7 debe de ser muy elevado, ya que estamos tratando con un sistema tamponado.

Se ha observado también que en presencia de glucosa, a pesar que se mantiene la velocidad específica de crecimiento, la biomasa alcanzada por los cultivos lácticos es superior (como mínimo en un orden de magnitud) a la que se obtiene en ausencia de glucosa. Esto podría indicar que es necesaria una densidad celular más elevada para conseguir el efecto antagonista. Sería conveniente buscar la manera de probar la inoculación de la BAL antagonista a concentraciones aún más elevadas que la máxima utilizada en el presente estudio (10^7 ufc/mL). Raccach y Baker (1978) citado por Jay (1997) en su estudio sobre inhibición del crecimiento *S. aureus* a 15°C por *Pediococcus cerevisiae* y *L. plantarum* en carne de cerdo deshuesada mecánicamente y cocida, inocularon la BAL a una concentración de 10^9 ufc/mL, consiguiendo frenar su crecimiento tanto si se inoculaba conjuntamente con una o con ambas BAL. En este estudio el indicador puro (control) alcanzó un orden de magnitud de 10^7 ufc/mL, mientras que el que fue inoculado en asociación con las BAL mantuvo el orden del inóculo inicial de 10^3 ufc/mL durante 7 días de almacenamiento.

2.3.5 Conclusiones

1. En el estudio de potencial antagonista en placa de agar de las 112 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de sangre higiénica frente a indicadoras de colección el 25% inhibieron a *S. aureus* NCTC4163, 50% inhibieron a *E. coli* NCTC5934, 40,1% inhibieron únicamente *P. fluorescens* EP537 y el 47,3% inhibieron a *B. subtilis* BGA. 8 BAL aisladas de sangre presentaron el espectro de inhibición más amplio en placa frente a las cuatro indicadoras provenientes de cultivos de colección.
2. Mediante la evaluación del potencial antagonista en placa de agar frente a los microorganismos indicadores autóctonos se determinó que el 66,9% de las 112 bacterias lácticas inhibieron a *S. aureus*, 13,3% a *E. coli*, 17% a *P. fluorescens* y 53,5% a *Bacillus* spp.
3. No todas las cepas mostraron la misma cinética de crecimiento en caldo selectivo MRS. A pesar de que la velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial fue semejante para cada una de las 8 cepas seleccionadas en función a su espectro de inhibición, todas presentaron diferentes tiempos de duración de la fase de latencia, y exponencial, 5

alcanzaron la densidad celular máxima en menos de 24h de incubación a 30°C y las 3 cepas restantes aún después de 24-36h de incubación permanecían en la fase de latencia o al inicio de la fase exponencial.

4. Las 5 cepas seleccionadas del estudio en medio selectivo (TA20, TA43, TA73, TA75 y TA76) presentaron una readaptación excelente en sangre, con y sin adición de glucosa (2%). Se observó el efecto positivo que supone la adición de glucosa en el estímulo del crecimiento de las bacterias lácticas.
 5. No se ha conseguido reproducir en sangre las actividades inhibitorias demostradas por los cultivos en los ensayos en placa de agar.
 6. En sangre no enriquecida con glucosa, sólo se logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* NCTC4163 por la cepa láctica TA43 entre 1 a 2 ordenes de magnitud y *S. aureus* autóctono en 1 orden de magnitud por la BAL TA20 y TA75.
 7. Se comprobó el efecto positivo de la adición de azúcar al 2% en la sangre con respecto al potencial antagonista de la totalidad de indicadores autóctonos. En el caso de *E. coli* se alcanzaron inhibiciones de 3 ordenes de magnitud, para *P. fluorescens* de 4 unidades logarítmicas hasta la inhibición total. *S. aureus* autóctono fue inhibido en 2 ordenes logarítmicos por TA20 y totalmente por las BAL TA73, TA75 y TA76. *Bacillus* (rif+) fue inhibido en la mayoría de los casos en 4 unidades logarítmicas. En cuanto a los indicadores de colección, la adición de glucosa únicamente favoreció la inhibición de *B. subtilis*.
-

Capítulo 3 Evaluación de la capacidad antagonista en condiciones psicrotófas

3.1 OBJETIVOS

The Refrigerated Foods and Microbiological Criteria Committee of the National Food Processors Association recomienda que se incorporen barreras adicionales de protección en alimentos refrigerados (Hutton *et al.*, 1991).

Las BAL pueden ser utilizadas como una barrera de protección adicional con la finalidad de alargar la vida útil de los alimentos refrigerados (Gombas, 1989; Crandall y Montville, 1993 citado por Skinner *et al.*, 1999).

Se puede citar como antecedente de aplicación de bioprotección a bajas temperaturas en productos del mar la experiencia de Fragoso y Fernández (2000). Bjork *et al.*, 1979; Reiter y Härnolv, 1984 (citados por Daeschel, 1989) demostraron que la aplicación de la bioprotección era idónea para alargar la vida útil de la leche refrigerada.

En el capítulo 2 se evaluó la capacidad antagonista de BAL en condiciones mesófilas a 30°C y vimos que los resultados obtenidos eran bastante esperanzadores así es que se decidió continuar el estudio en otra fase con la evaluación del potencial inhibitorio de BAL autóctonas a temperaturas más bajas. Desde el punto de vista de aplicación de la bioconservación a nivel industrial es importante realizar una selección de cepas bioprotectoras que no sólo sean capaces de sobrevivir y/o mantenerse activas a temperaturas de refrigeración sino también que manifiesten su potencial inhibitorio frente a microbiota habitual contaminante de sangre a esta temperatura.

La evaluación del potencial antagonista en condiciones mesófilas nos dio solo una aproximación positiva de la posibilidad de aplicación de la técnica de bioconservación en sangre pero su aplicación en condiciones de refrigeración sería interesante ya que la temperatura también actuaría como una barrera frente a la proliferación microbiana y al mismo tiempo el producto tendría más posibilidades de mantener sus características funcionales. El objetivo final es utilizar la sangre y/o sus fracciones en la fabricación de ingredientes alimentarios destinados al consumo humano por su alto contenido proteico, por tanto no tendría ningún sentido llegar a resultados exitosos frente a la proliferación microbiana si hemos perdido calidad en el producto por haber utilizado una temperatura muy alta. Es decir, y en un sentido más general en el presente capítulo se pretende dar un paso más hacia a la utilización de esta técnica a escala industrial procurando detener el crecimiento de los

microorganismos deteriorantes y/o patógenos y a la vez mantener las buenas cualidades de la sangre.

En el presente capítulo se profundiza en el estudio de la inhibición de microorganismos indicadores autóctonos ya que desde el punto de vista de aplicación futura en condiciones reales se ha considerado más interesante. En los primeros ensayos la utilización de indicadores provenientes de colección se justificaba ya que se buscaba tener mayor variabilidad de indicadores del mismo género. Pero, se consideró que de aquí en adelante no tenía sentido continuar su evaluación a una temperatura más baja ya que en condiciones mesófilas los resultados correspondientes a este grupo de indicadores no fueron muy alentadores. En las pruebas de confrontación *in vitro* los halos eran más pequeños comparados a los formados frente a los indicadores autóctonos. Este mismo fenómeno se reflejó en las pruebas *in situ* en que también los resultados fueron mejores frente a los indicadores autóctonos de sangre. Únicamente *Bacillus subtilis* se mostró muy sensible a la inhibición frente a las BAL evaluadas.

Los objetivos concretos del presente capítulo fueron:

- (1) Confeccionar una colección de BAL psicrótrofas aisladas de sangre de matadero.
- (2) Determinar la capacidad antagonista *in vitro* de la colección frente a bacterias indicadoras autóctonas aisladas de sangre (*S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *Bacillus* spp) a 15°C.
- (3) Determinar los parámetros de crecimiento de las BAL y de los microorganismos indicadores en sangre a 15°C.
- (4) Confirmar la capacidad antagonista *in situ* a 15°C de las cepas que presentaron el espectro más amplio de inhibición *in vitro* frente a las bacterias indicadoras autóctonas.

3. 2 MATERIAL y MÉTODOS

3.2.1 Confección de una colección de BAL psicrótrofas

3.2.1.1 Toma de muestras

Las muestras de sangre de donde se aislaron las bacterias lácticas en esta parte del estudio provenían de los cuatro mataderos industriales de donde provenían las correspondientes a la colección de BAL mesófilas del capítulo 2.

3.2.1.2 Aislamiento de BAL psicrótrofas de sangre de matadero

Con la finalidad de aislar BAL psicrótrofas se realizó un banco de diluciones decimales de la sangre en agua de triptona y se sembraron en profundidad en agar MRS con sobrecapa de agar. La incubación se realizó en condiciones de anaerobiosis a diferentes temperaturas 5, 10, 15 y 20°C.

Las placas incubadas a 5, 10 y 15°C no presentaron crecimiento al cabo de 7 días de incubación, en cambio las que se incubaron a 20°C presentaban colonias después de 3 días. A partir de estos resultados se decidió realizar el aislamiento de BAL a 20°C y se consideraron BAL aquellas que eran Gram (+) y Catalasa (-) (Schillinger y Lücke,1987)

Se estudió la capacidad de crecimiento de las colonias aisladas a 20°C en caldo MRS a 15°C y se consideraron como BAL psicrótrofas aquellas que fueron capaces de crecer a esta temperatura en 24h.

Después de excluir de la colección aquellas cepas que no presentaron esta capacidad de crecimiento a 15°C en caldo MRS se obtuvieron un total de 48 cepas psicrótrofas.

3.2.1.3 Recuperación de las BAL psicrótrofas a partir de la colección de cepas mesófilas

Se evaluó la capacidad de las cepas de la colección de BAL mesófilas de crecer en caldo MRS a 15°C y se incluyeron en la colección de BAL psicrótrofas las 52 cepas que demostraron esta característica.

La colección de BAL psicrótrofas fue de un total de 100 cepas que se codificaron como Ps1 hasta Ps100 y se congelaron tal como se indica en el apartado 2.2.1.2.2.

3.2.2. Determinación del potencial antagonista en placa de las BAL psicrótrofas

La selección de las BAL en función del potencial antagonista en placa se realizó mediante el método indirecto de Schillinger y Lücke (1989) que se describe en el apartado 2.2.4, con la diferencia que el tiempo de incubación de las bacterias lácticas después de ser picadas en APT fue de 72h y el tiempo de incubación una vez sembrada la sobrecapa de los indicadores fue de 96h. La temperatura de incubación siempre fue de 15°C. La aparición de halos alrededor de las BAL era la señal que indicaba su potencial antagonista.

El tiempo de incubación de cada bacteria a 15°C sembradas en picada (BAL) y en sobrecapa (indicadores) se determinó previamente al ensayo.

Se realizaron triplicados de las pruebas de antagonismo en placa para cada una de las 100 BAL aisladas, frente a cada uno de los microorganismos indicadores.

3.2.3 Potencial antagonista de las BAL en sangre a 15°C

3.2.3.1 Obtención de los inóculos

a) BAL

Se determinaron los parámetros de crecimiento de las BAL en caldo MRS para preparar los inóculos correspondientes (apartado 2.2.5)

b) Microorganismos indicadores

Para obtener las suspensiones de los microorganismos indicadores se descongelaron y se sembraron en agar PCA. Una colonia aislada del crecimiento en placa se sembró en caldo nutritivo y se incubó durante 24h, pasado este tiempo se centrifugaron (4000 rpm, 20 min, 20-25°C). Las células precipitadas se resuspendieron en agua triptonada y se sembraron en caldo nutritivo fresco a una concentración aproximada de 10^4 ufc/mL. Se incubaron a

las temperaturas correspondientes a cada microorganismo indicador (37°C para *Bacillus spp.*, *E. coli* y *S. aureus*, 22°C para *P. fluorescens*) durante 12h. A partir de aquí se realizó un banco de diluciones decimales para cada microorganismo en agua de triptona hasta alcanzar la concentración deseada.

3.2.3.2 Evaluación de la supervivencia de las BAL en sangre a 15°C

Antes de realizar la confrontación *in situ* se consideró importante evaluar la capacidad de adaptación en sangre de las BAL con potencial antagonista en placa. Se utilizó sangre enriquecida con glucosa al 2% ya que en el capítulo 2 se demostró el efecto positivo de la adición de azúcar sobre el potencial inhibitorio de las BAL en sangre. La sangre con glucosa se inoculó a una concentración de 10^7 - 10^8 ufc/mL, y se evaluó la supervivencia a 15°C.

Se realizaron siembras: al inicio (t_0), a las 24h (t_1), a las 48h (t_2), a las 120h (t_3) y a las 144h (t_4) de incubación. Las siembras se realizaron en profundidad en agar MRS y las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 30°C. Los recuentos se realizaron a las 48h.

3.2.3.2 Evaluación del crecimiento de los microorganismos indicadores a 15°C

Como paso previo a la inoculación conjunta de las pruebas de antagonismo se consideró importante determinar la capacidad de adaptación a 15°C de los organismos indicadores (*S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *Bacillus spp.*) ya que éstos fueron aislados a sus temperaturas óptimas de crecimiento.

Se estudiaron las características de crecimiento en a) en medio líquido y b) en sangre.

a) En medio líquido

La finalidad de realizar el estudio de la cinética de los indicadores en caldo nutritivo era tener una aproximación de su comportamiento a 15°C y el tiempo necesario para alcanzar cada fase de crecimiento a esta temperatura antes de inocularlos en sangre.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante el lector de microplacas Bioscreen C (Labsystems Corporation, Helsinki, Finland) que registraba las variaciones de la absorbancia del medio de cultivo a través del tiempo. La microplaca del Bioscreen se inoculó con 350 µL de las suspensiones de los microorganismos indicadores a una concentración de 10^4 ufc/mL en caldo nutritivo, obtenida según se explica en el punto 3.2.3.1b.

Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 600 nm a intervalos de 20 min durante 96 horas. Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los cuatro indicadores.

De manera simultánea se realizaron recuentos en placas de agar PCA. A partir de las curvas se determinaron: los tiempos correspondientes a la fase de latencia y fase exponencial, la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de inicio de la fase estacionaria.

b) En sangre

La muestra de sangre se inoculó con una suspensión de 10^4 ufc/mL, se repartió en viales de 2mL de capacidad y se incubaron a una temperatura de 15°C.

Se realizaron recuentos a intervalos regulares desde el tiempo 0 hasta 120h de incubación. Las siembras se realizaron en medios selectivos y a las temperaturas óptimas para cada organismo (apartado 2.2.6) El ensayo se realizó por triplicado.

3.2.3.4 Ensayo de antagonismo

Las BAL que presentaron capacidad inhibitoria *in vitro* y que además fueron capaces de adaptarse en sangre a 15°C se seleccionaron para confirmar su potencial antagonista *in situ*.

Antes de realizar la inoculación conjunta (BAL + microorganismos indicadores) las BAL se sembraron en sangre con glucosa al 2% a una concentración de 10^6 ufc/mL y se incubaron a 15°C durante 96h con la finalidad de obtener cultivos previamente adaptados al medio y a la temperatura de trabajo.

Paralelamente a la adaptación en sangre de las BAL se prepararon los inóculos de las bacterias indicadoras siguiendo el procedimiento del apartado 3.2.3.1b con el fin de realizar la inoculación conjunta.

3.2.3.4.1 Co-inoculación

Se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento de ambos microorganismos en las muestras co-inoculadas, así como de las muestras inoculadas únicamente con el microorganismo indicador y con la BAL en estudio.

Se inocularon muestras de sangre desfibrinada estéril (Oxoid SR51) con cada uno de los microorganismos indicadores a una concentración final de 10^4 ufc/mL y la bacteria láctica a una concentración final de 10^7 ufc/mL.

Se realizaron recuentos en medio selectivo a diferentes tiempos, *Pseudomonas fluorescens* al inicio (t_0), a las 24h (t_1), a las 48h (t_2) y a las 144h (t_3); *Escherichia coli*, *Bacillus* (rif +) y *Staphylococcus aureus* al inicio (t_0), a las 24h (t_1), a las 48h (t_2) y a las 120h (t_3) desde la inoculación tal como se indica en el apartado 2.2.8.

El potencial antagonista de cada BAL se determinó por comparación del crecimiento de cada indicador en presencia y ausencia de la bacteria láctica.

3.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.3.1 Capacidad antagonista en placa

En el cuadro 3.1 se presentan los resultados de las pruebas de antagonismo de la colección de BAL psicrótrofos frente a las cuatro bacterias autóctonas utilizadas como indicadores (*S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *Bacillus spp.*).

Fueron 11 BAL (Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps59, Ps60, Ps76, Ps82, Ps95, Ps99) las que formaron halos de inhibición frente a todas las cepas indicadoras y por tanto las que presentaron el espectro de inhibición más amplio.

Cuadro 3.1
Antagonismo de las cepas de BAL frente a indicadores autóctonos de sangre

| | <i>Bacillus spp.</i> | | | <i>E. coli</i> | | | <i>P. fluorescens</i> | | | <i>S. aureus</i> | | |
|-------------|----------------------|-------|-------|----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | 1ªrep | 2ªrep | 3ªrep | 1ªrep | 2ªrep | 3ªrep | 1ªrep | 2ªrep | 3ªrep | 1ªrep | 2ªrep | 3ªrep |
| Ps1 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps2 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps3 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - |
| Ps4 | - | - | +++ | ++ | (+) | ++ | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps5 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | (+) | + | (+) |
| Ps6 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | (+) | ++ |
| Ps7 | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Ps8 | - | - | +++ | (+) | ++ | (+) | - | - | - | (+) | - | - |
| Ps9 | - | - | +++ | (+) | ++ | ++ | - | - | - | ++ | (+) | (+) |
| Ps10 | - | - | +++ | (+) | (+) | ++ | - | - | - | +++ | +++ | + |
| Ps11 | - | - | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + | (+) | ++ |
| Ps12 | - | (+) | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | + | (+) | + | (+) |
| Ps13 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | - | + | - |
| Ps14 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | + | (+) | ++ | + | + | (+) |
| Ps15 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | (+) | +++ | (+) |
| Ps16 | +++ | +++ | +++ | (+) | ++ | (+) | - | - | - | - | - | - |
| Ps17 | +++ | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | - | (+) | +++ | ++ |
| Ps18 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | (+) | - | (+) |
| Ps19 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | - | - | - | ++ | +++ | (+) |
| Ps20 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | ++ | +++ |
| Ps21 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | - | - | - | (+) | + | + |
| Ps22 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | + | + |
| Ps23 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | (+) | + | (+) | + | + | ++ | + |
| Ps24 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps25 | ++ | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | (+) | (+) | (+) | ++ |
| Ps26 | (+) | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | - | (+) | - | - |
| Ps27 | - | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | (+) | (+) |
| Ps28 | - | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - |
| Ps29 | - | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | - | (+) | - | (+) |

(continúa)

Evaluación del potencial antagonista en condiciones psicrótrofas

(continuación)

| | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ps30 | - | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | (+) | (+) |
| Ps31 | - | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | ++ | ++ | + |
| Ps32 | - | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | - | ++ | +++ | + |
| Ps33 | - | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | (+) | - |
| Ps34 | (+) | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | (+) | (+) |
| Ps35 | - | +++ | +++ | ++ | ++ | (+) | - | - | - | +++ | ++ | + |
| Ps36 | - | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | - | - | - | (+) | - | (+) |
| Ps37 | +++ | - | +++ | (+) | ++ | (+) | - | - | - | (+) | (+) | ++ |
| Ps38 | +++ | - | +++ | (+) | (+) | ++ | - | - | - | - | - | (+) |
| Ps39 | +++ | +++ | +++ | (+) | ++ | (+) | (+) | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps40 | +++ | +++ | +++ | (+) | ++ | (+) | (+) | - | - | +++ | (+) | (+) |
| Ps41 | +++ | - | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | + | (+) | (+) |
| Ps42 | +++ | (+) | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | (+) | + |
| Ps43 | +++ | - | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | ++ | (+) |
| Ps44 | +++ | - | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | ++ | ++ | ++ |
| Ps45 | +++ | (+) | +++ | ++ | ++ | ++ | (+) | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps46 | +++ | (+) | +++ | ++ | (+) | (+) | (+) | - | - | + | - | (+) |
| Ps47 | +++ | + | +++ | ++ | (+) | ++ | - | - | (+) | - | + | + |
| Ps48 | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | (+) | (+) | ++ | ++ | ++ | (+) | +++ |
| Ps49 | +++ | ++ | ++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps50 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | - | (+) |
| Ps51 | ++ | +++ | ++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | ++ | + | ++ |
| Ps52 | +++ | +++ | ++ | (+) | ++ | (+) | - | - | - | - | - | - |
| Ps53 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - |
| Ps54 | +++ | ++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - |
| Ps55 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | +++ | ++ | + |
| Ps56 | ++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | ++ | (+) | + |
| Ps57 | ++ | ++ | ++ | (+) | (+) | (+) | - | (+) | - | + | + | + |
| Ps58 | ++ | ++ | ++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | (+) | ++ |
| Ps59 | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | +++ | ++ | ++ |
| Ps60 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | (+) | (+) | (+) | ++ | ++ | + |
| Ps61 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps62 | - | - | - | - | - | - | - | (+) | - | - | - | - |
| Ps63 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | (+) | + | (+) |
| Ps64 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | (+) | (+) | - | ++ | ++ | ++ |
| Ps65 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | (+) | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps66 | ++ | ++ | +++ | (+) | ++ | (+) | - | (+) | (+) | - | (+) | (+) |
| Ps67 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (+) | (+) | (+) |
| Ps68 | ++ | ++ | ++ | - | (+) | (+) | - | - | - | + | ++ | ++ |
| Ps69 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps70 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps71 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps72 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps73 | ++ | ++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | (+) | (+) | + | ++ | ++ |
| Ps74 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (+) |
| Ps75 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | (+) | - | (+) | - | - | - |
| Ps76 | +++ | +++ | ++ | (+) | (+) | ++ | (+) | (+) | (+) | ++ | ++ | ++ |
| Ps77 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps78 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps79 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | (+) | - | - | - | - | - |
| Ps80 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | (+) | - | - | - | - | - |
| Ps81 | ++ | +++ | +++ | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps82 | ++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | + |
| Ps83 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - |

(continúa)

(continuación)

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ps84 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps85 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps86 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps87 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps88 | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n |
| Ps89 | +++ | (+) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps90 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps91 | - | - | - | - | - | - | - | - | (+) | + | (+) | (+) |
| Ps92 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | - | - | + | ++ | + |
| Ps93 | +++ | +++ | +++ | (+) | ++ | (+) | - | - | - | + | + | + |
| Ps94 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | (+) | - | (+) | - | + | +++ | + |
| Ps95 | +++ | +++ | +++ | (+) | (+) | ++ | (+) | (+) | (+) | (+) | ++ | + |
| Ps96 | +++ | +++ | (+) | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + | (+) | + |
| Ps97 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + | + | + |
| Ps98 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ps99 | +++ | +++ | +++ | (+) | ++ | + | (+) | (+) | (+) | +++ | ++ | + |
| Ps100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Símbolos: +++, halos de inhibición superiores a 4mm. ++, halos entre 2 y 4 mm. +, halos inferiores a 2mm. (+), halos inferiores a 1, 5mm. -, ausencia de halos. N, no crecieron en picada en agar a 15°C.

De las bacterias indicadoras la más inhibida fue *Bacillus* spp., un 81% de las cepas de BAL dieron un resultado positivo, seguido de *E. coli* que fue inhibida por un 78% de las cepas, en tercer lugar *S.aureus* por un 72% de las BAL y *P. fluorescens* solo fue inhibida por el 28% de las cepas de BAL (figura 3.1)

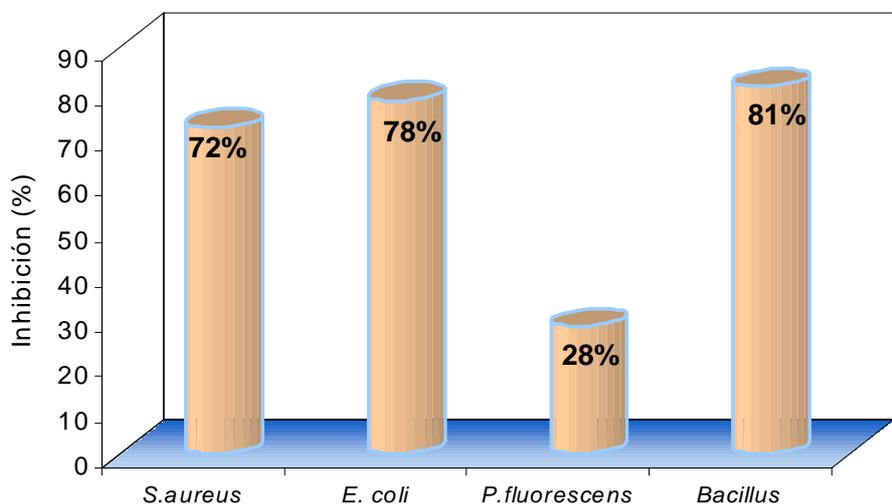


Figura 3.1 Sensibilidad de los indicadores autóctonos a la Inhibición por BAL en placa a 15°C. Los cilindros representan el porcentaje de BAL con potencial antagonista frente a cada indicador.

Si se comparan los resultados con los obtenidos en las pruebas *in vitro* a 30°C se observan diferencias considerables con respecto a la sensibilidad. En el capítulo 2 vimos como en condiciones mesófilas 49,4% de las BAL inhibieron a *Bacillus spp*, *E. coli* fue inhibido por un 6,45%, *P. fluorescens* por un 19,35% y *S. aureus* por un 69,89%.

A 15°C se obtuvieron halos de inhibición mucho más grandes (superiores a 4mm en muchos casos) que los obtenidos a 30°C (inferiores a 4mm en la mayoría de los casos). Probablemente la causa de la aparición de halos más grandes a 15°C puede haber sido el tiempo total de incubación más larga de las BAL previo a la siembra en sobrecapa del microorganismo indicador. Por tanto, podría pensarse que las BAL sintetizaron durante este tiempo una concentración más alta de metabolitos o sustancias inhibitoras.

Existe una relación directamente proporcional entre la medida de los halos de inhibición formado y la concentración de cloruro de sodio agregado al medio (Okereke y Montville, 1991). Esta relación no se ha podido dar en el caso de este estudio ya que a ambas temperaturas (30°C y 15°C) el medio APT utilizado contenía la misma concentración de sal.

3.3.2 Potencial antagonista en sangre a 15°C

3.3.2.1 Obtención de los inóculos

En la figura 3.2 se muestran las curvas de crecimiento a 30°C en caldo MRS de las BAL seleccionadas.

En el cuadro 3.2 se presenta la duración de cada fase de crecimiento de las BAL. Los resultados se obtuvieron a partir del promedio de las tres repeticiones de las cinéticas de crecimiento.

Se corroboró mediante recuentos en placa en agar MRS que efectivamente el inóculo inicial fue de 10^4 ufc/mL y que la concentración final alcanzada en la fase estacionaria fue de 10^8 ufc/mL. Estos datos permitieron preparar el inóculo en sangre modificando el tiempo de incubación para cada BAL en función de los parámetros de crecimiento obtenidos.

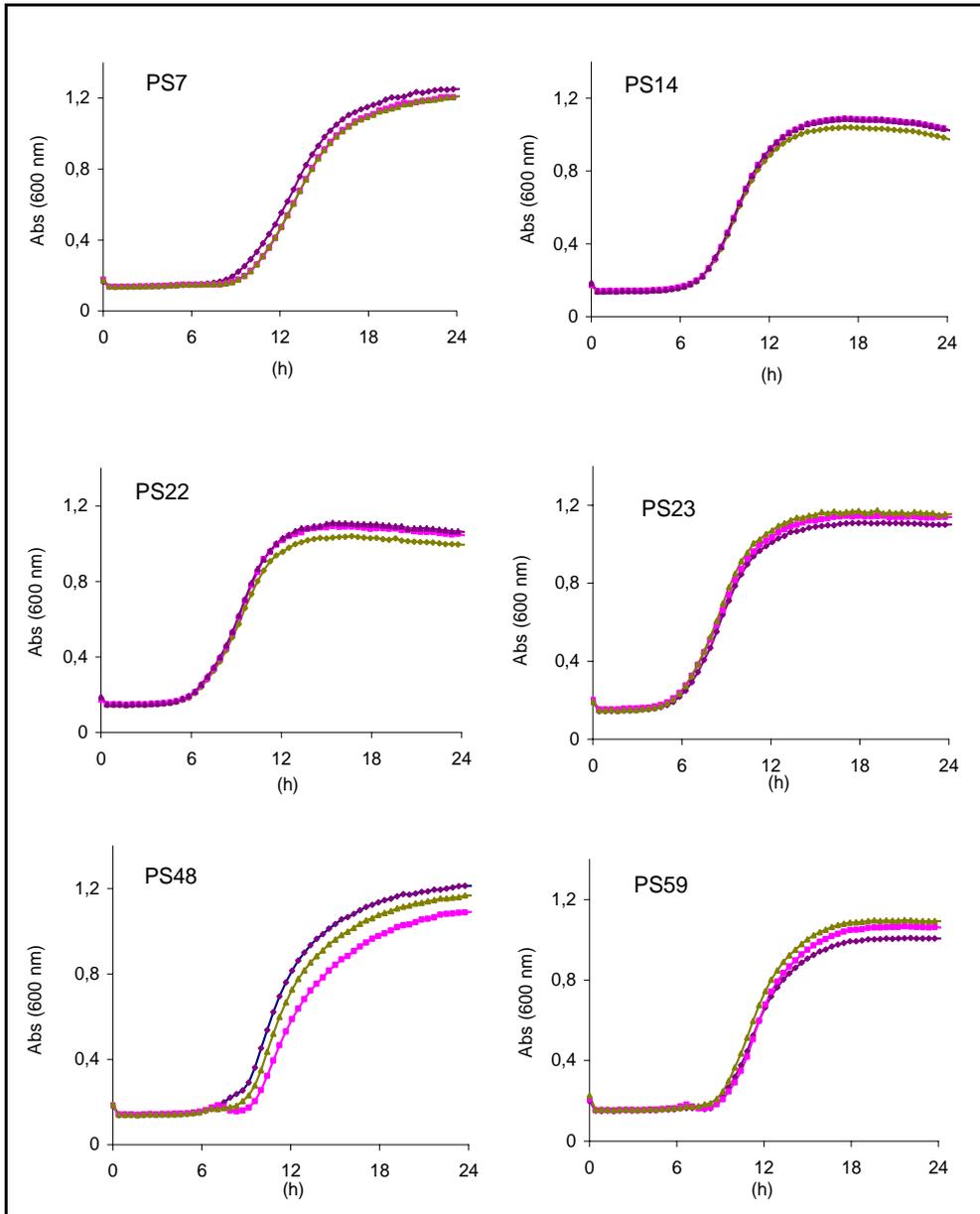


Figura 3.2a Curvas de crecimiento a 30°C en caldo MRS de las BAL con potencial antagonista *in vitro* a 15°C. Inóculo: 10^4 ufc/mL

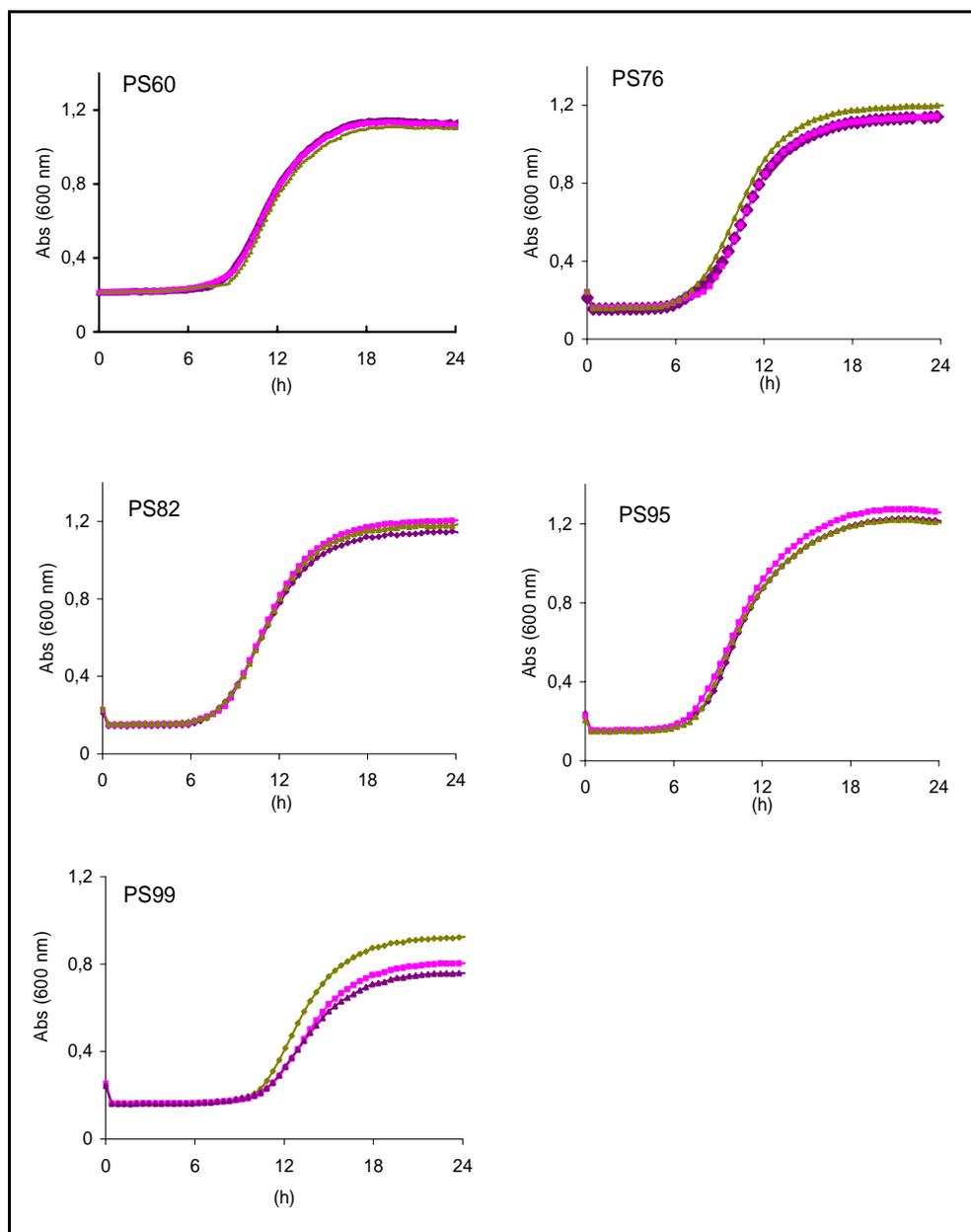


Figura 3.2b. Curvas de crecimiento a 30°C en caldo MRS de las BAL con potencial antagonista *in vitro* a 15°C. Inóculo: 10^4 ufc/mL.

Cuadro 3.2
Parámetros de crecimiento de las BAL en medio selectivo MRS a 30°C

| BAL | Duración de Fase de latencia (h)* | Duración de Fase exponencial (h)* | Inicio de fase estacionaria (h)* | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)* |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| Ps7 | 8,75 ± 0,34 | 7,77 ± 0,39 | 16,52 ± 0,35 | 0,23 ± 0,01 |
| Ps14 | 7,08 ± 0,00 | 5,98 ± 0,19 | 13,06 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 |
| Ps22 | 6,25 ± 0,00 | 6,25 ± 0,00 | 12,5 ± 0,00 | 0,25 ± 0,00 |
| Ps23 | 5,28 ± 0,19 | 6,8 ± 0,19 | 12,08 ± 0,00 | 0,24 ± 0,00 |
| Ps48 | 8,61 ± 0,85 | 7,64 ± 0,78 | 16,25 ± 0,67 | 0,21 ± 0,01 |
| Ps59 | 8,47 ± 0,19 | 6,67 ± 0,34 | 15,14 ± 0,26 | 0,25 ± 0,01 |
| Ps60 | 7,89 ± 0,67 | 6,95 ± 0,47 | 14,83 ± 0,51 | 0,19 ± 0,01 |
| Ps76 | 6,53 ± 0,19 | 6,8 ± 0,19 | 13,33 ± 0,02 | 0,22 ± 0,01 |
| Ps82 | 6,94 ± 0,19 | 7,78 ± 0,19 | 14,72 ± 0,02 | 0,23 ± 0,00 |
| Ps95 | 6,94 ± 0,19 | 7,64 ± 0,19 | 14,58 ± 0,01 | 0,21 ± 0,01 |
| Ps99 | 9,72 ± 0,19 | 6,25 ± 0,00 | 15,97 ± 0,00 | 0,21 ± 0,02 |

*Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar

3.3.2.2 Evaluación de la supervivencia de las BAL en sangre a 15°C

En las figuras 3.3a y 3.3b se presentan las gráficas del seguimiento de la supervivencia en sangre con glucosa al 2% a 15°C de las 11 BAL seleccionadas. Se puede observar como en la mayoría de los casos a las 144h de incubación las BAL alcanzaban poblaciones de 10^9 ufc/mL cuando se partía de 10^7 - 10^8 ufc/mL.

En el capítulo 2 se vio como cuando se inoculaba sangre con glucosa y se realizaba un seguimiento a 30°C la población de BAL aumentaba 4-5 logs en 24h. En los ensayos de este capítulo no se realizó el seguimiento de la población de BAL a 15°C partiendo de inóculos bajos en sangre. Se utilizaron concentraciones iniciales altas (10^7 - 10^8 ufc/ml) con el fin de que alcanzaran la máxima concentración celular en el mínimo tiempo posible. Es evidente que el crecimiento y los procesos biológicos de los microorganismos se retarda a temperaturas más bajas. En el caso concreto de *Lactococcus lactis* se determinó que el tiempo de duplicación aumentaba de 48min a 30°C a 3,5 h, 57h y 7 días a 16°C, 8°C, y 4°C (Sanders *et al.* ,1999).

3.3.2.3 Evaluación del crecimiento de los microorganismos indicadores a 15°C

En este trabajo se utilizaron bacterias indicadoras autóctonas de sangre que habían sido aisladas a sus temperaturas óptimas de crecimiento. La finalidad de estos ensayos fue conocer su comportamiento a temperaturas más bajas antes de realizar las co-inoculaciones con BAL.

Sin embargo también se ha constatado que algunas BAL pueden producir una cantidad más elevada de ácido láctico por unidad de tiempo y/o pueden desarrollarse más rápidamente a bajas temperaturas (Hutton *et al.* ,1991).

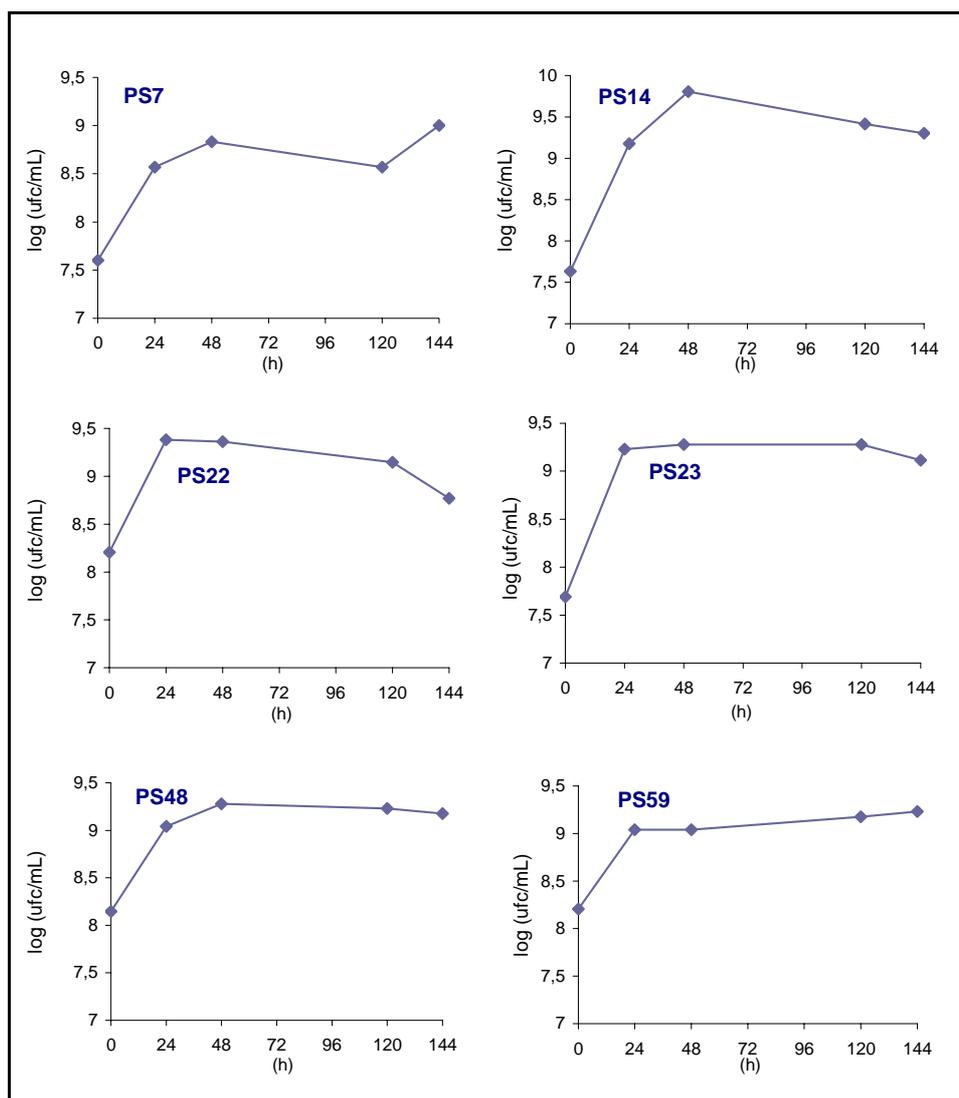


Figura 3.3a Evaluación de la supervivencia en sangre a 15°C de las BAL con potencial antagonista *in vitro*. Inóculo: 10^7 - 10^8 ufc/mL.

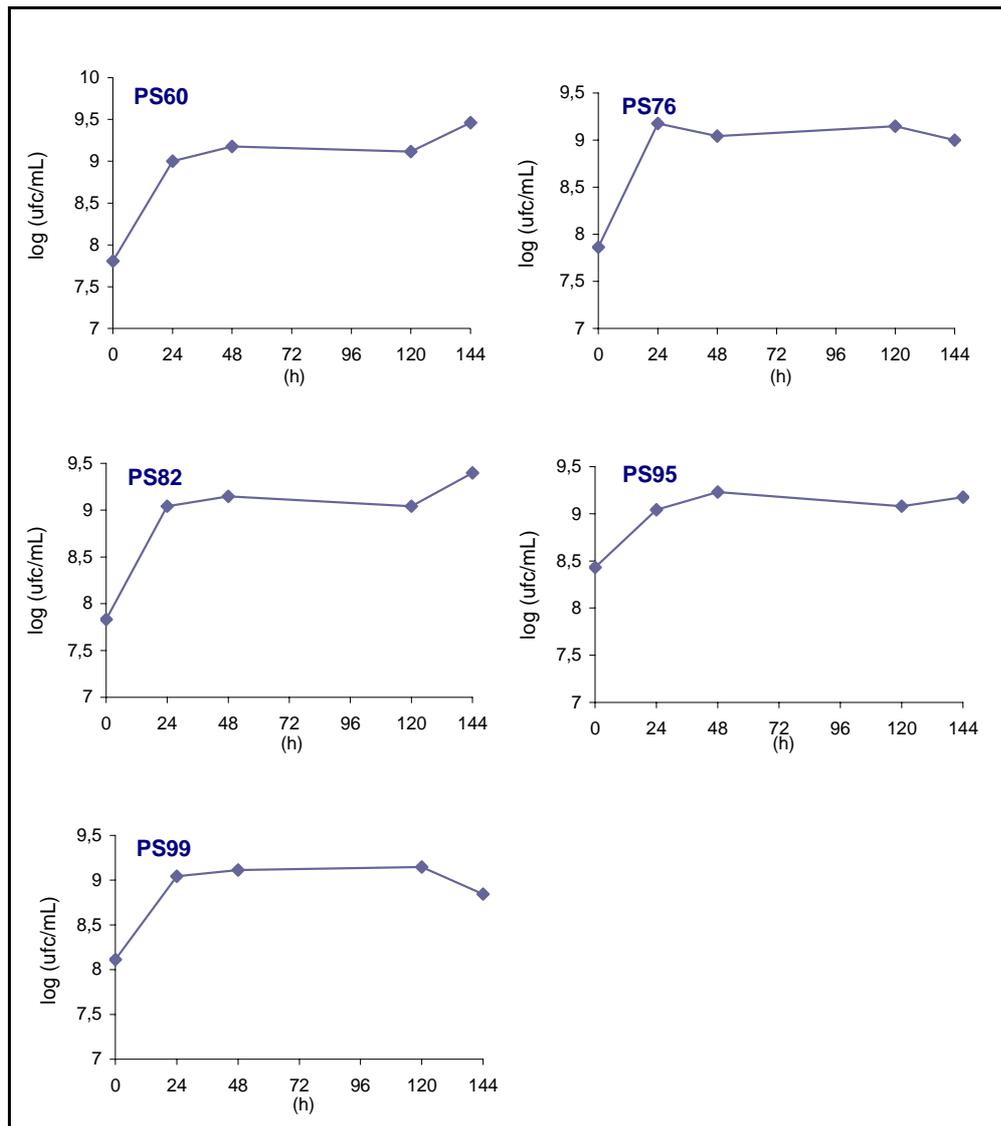


Figura 3.3b Evaluación de la supervivencia en sangre a 15°C de las BAL con potencial antagonista *in vitro*. Inóculo: 10^7 - 10^8 ufc/mL.

a) En medio de cultivo líquido

En la figura 3.4 se muestran las curvas de crecimiento en caldo nutritivo de *Bacillus spp.*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. aureus* obtenidas a 15°C en el bioscreen C.

En todos los casos se alcanzó una concentración celular máxima de 10^7 - 10^8 ufc/mL al inicio de la fase estacionaria con un inóculo de partida de 10^4 ufc/mL.

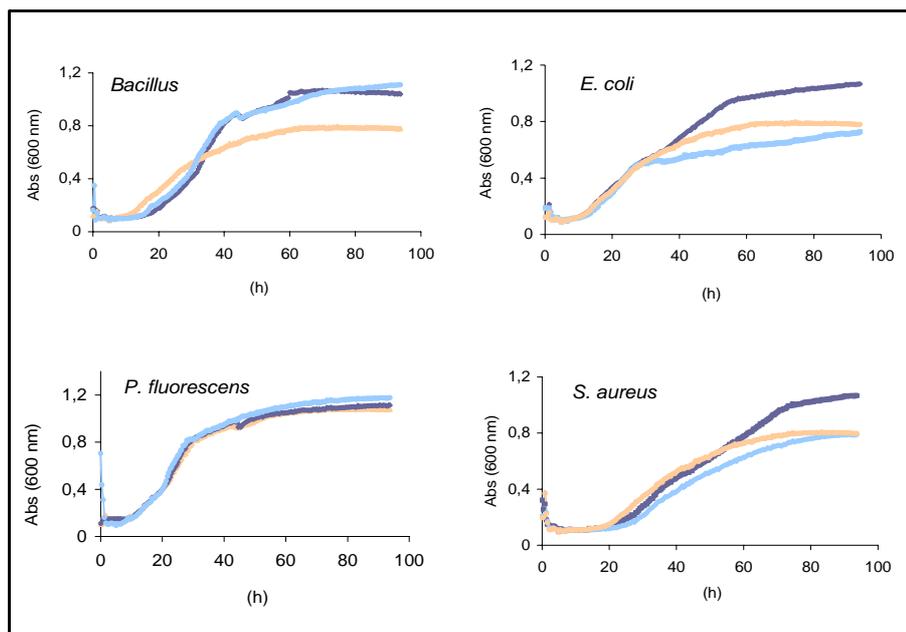


Figura 3.4 Curvas de crecimiento de los microorganismos indicadores autóctonos de sangre en caldo nutritivo a 15°C. Inóculo inicial: 10^4 ufc/mL.

En el cuadro 3.3 se presentan la duración de cada fase de crecimiento y la velocidad específica de crecimiento de los cuatro microorganismos indicadores.

Si se observa el tiempo correspondiente a cada fase se ve como el organismo indicador más rápido en alcanzar la máxima concentración celular a 15°C fue *P. fluorescens* (39,16h), seguido de *E. coli* y *Bacillus spp.* (55,48 y 61,80h) y el más lento fue *S. aureus* (68,60h).

La importancia del estudio de cinética de crecimiento radicaba en conocer si los microorganismos utilizados serían buenos indicadores, porque en caso de no ser capaces de crecer a esta temperatura (15°C) se podría pensar que la

refrigeración ya está actuando como una barrera para su desarrollo. En diferentes fuentes se ha visto como estos microorganismos se desarrollan a temperaturas de refrigeración y hasta se ha comprobado en el caso de *P. fluorescens* y *Bacillus* spp. que son capaces de crecer en condiciones de congelación (Werner y Placzcek, 1978).

Cuadro 3.3
Parámetros de crecimiento de las bacterias indicadoras y velocidad específica de crecimiento en caldo nutritivo a 15°C *

| Indicador | Duración de Fase de latencia (h) | Duración de Fase Exponencial (h) | Inicio de fase estacionaria (h) | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹) |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>S. aureus</i> | 22,08 ± 1,8 | 46,52 ± 5,85 | 68,60 ± 1,33 | 0,037 ± 0,004 |
| <i>E. coli</i> | 12,89 ± 0,34 | 42,59 ± 9,72 | 55,48 ± 2,79 | 0,053 ± 0,01 |
| <i>P. fluorescens</i> | 8,61 ± 0,19 | 30,55 ± 0,59 | 39,16 ± 0,71 | 0,062 ± 0,002 |
| <i>Bacillus</i> spp. | 12,22 ± 0,52 | 49,58 ± 3,74 | 61,80 ± 1,15 | 0,051 ± 0,005 |

* Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar

b) En sangre

La evaluación de la capacidad de crecimiento en medio de cultivo confirmó que las bacterias indicadoras se adaptaban a la temperatura de trabajo pero antes de realizar las pruebas de inhibición *in situ* fue necesario determinar si eran capaces de readaptarse en sangre.

En la figura 3.5 se presentan las curvas de crecimiento en sangre a 15°C de *Bacillus* spp., *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. aureus*. En el caso de *Bacillus* spp se vio como utilizando inóculos de partida de 10³ ufc/mL alcanzaba poblaciones máximas de 10⁶ ufc/mL (primero y segundo ensayo) en 120h. En cambio, en el tercer ensayo en que se partía de una población de 10⁴ ufc/mL fue capaz de

alcanzar una concentración poblacional de 10^7 ufc/mL en el mismo tiempo. Este resultado se tendría en cuenta en el momento de sembrar los inóculos de partida en la inoculación conjunta con BAL.

Como se puede observar en todos los ensayos *S. aureus* no fue capaz de crecer en 120h de incubación a la temperatura de trabajo, se ve como se mantenía el inóculo inicial de 10^4 ufc/mL, *E. coli* si fue capaz de crecer a esta temperatura en dos unidades logarítmicas en los tres ensayos. En el primer ensayo en 72h alcanzó una concentración de 10^6 ufc/mL pero en los otros dos ensayos alcanza la misma concentración en 120h. *P. fluorescens* demostró ser el indicador que se adaptaba mejor en sangre si se compara con el resto de indicadores ya que como se puede ver alcanzó concentraciones de 10^8 ufc/mL en 48h y de 10^9 ufc/mL en 120h.

P. fluorescens fue la bacteria que alcanzó la máxima concentración y de forma más rápida. Este resultado coincidió con el comportamiento presentado por este indicador en caldo nutritivo y era el esperado ya que *P. fluorescens* es una bacteria psicrótrofa incluso capaz de crecer a temperatura de refrigeración comercial (4-5°C).

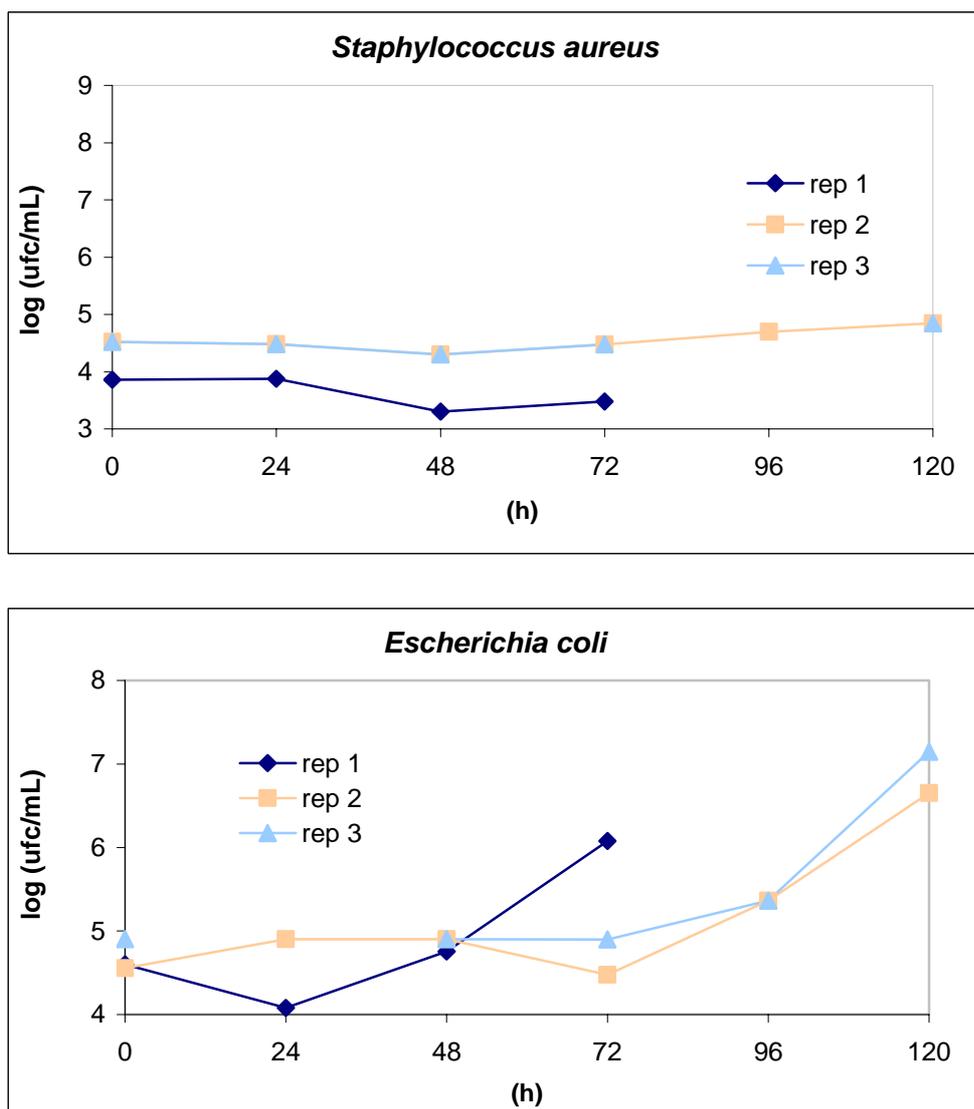


Figura 3.5 Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en sangre a 15°C.

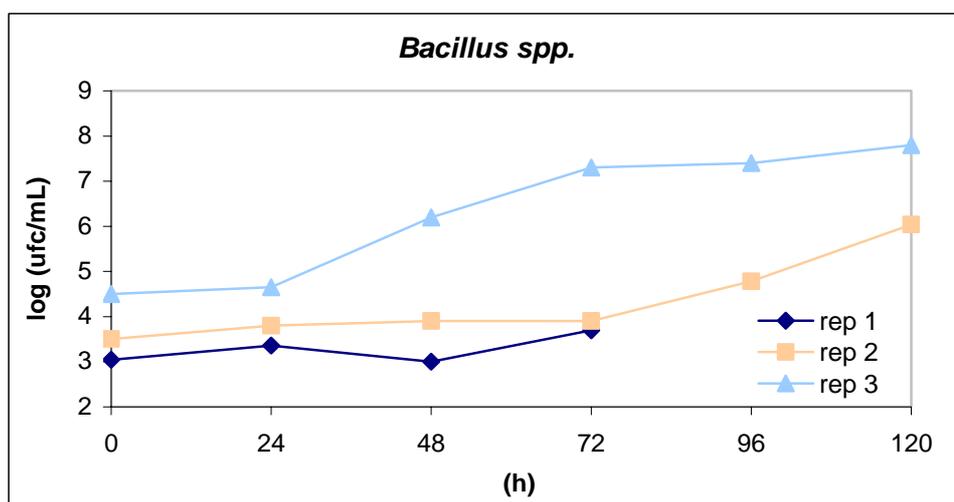
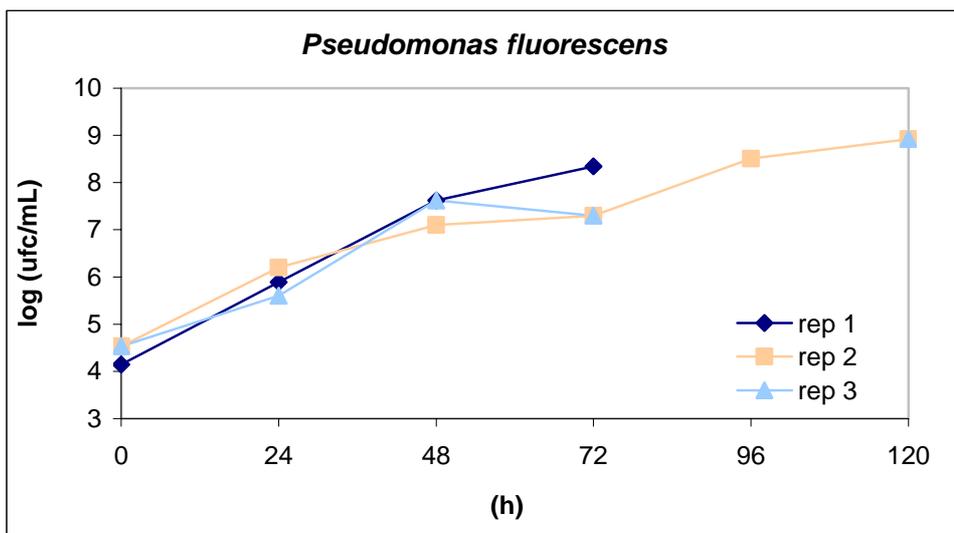


Figura 3.6 Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus spp.* en sangre a 15°C.

3.3.2.3 Efecto inhibitorio

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de antagonismo en placa, el crecimiento en medio selectivo y la supervivencia en sangre, se decidió iniciar el estudio de antagonismo *in situ* utilizando las 11 BAL seleccionadas.

En la figura 3.7 se puede observar la evolución de las 11 BAL y de *P. fluorescens* inoculadas conjuntamente en sangre, así como la evolución del microorganismo indicador en ausencia de las cepas de BAL (control). En todos los casos el crecimiento de este indicador fue inferior en presencia de las BAL. Las curvas reflejan la variabilidad de los niveles de inhibición de las diferentes cepas lácticas frente a *P. fluorescens*. En los casos más desfavorables se observan inhibiciones de 1 log (Ps22 y Ps23) hasta 4-5 logs en los casos en que *P. fluorescens* se vio más inhibida (Ps7 y Ps95).

En las co-inoculaciones de las 11 BAL con *S. aureus* (figura 3.8) no se observó efecto inhibitorio por parte de la mayoría de BAL, solamente Ps95 fue capaz de inhibir en una unidad logarítmica a este indicador a las 120h de incubación. De todas maneras, se puede decir que *S. aureus* no fue capaz de crecer durante las 120h de incubación (tiempo de duración del ensayo), este hecho indica que su crecimiento queda inhibido por la temperatura de trabajo es decir que la refrigeración ya está actuando como barrera frente a su desarrollo.

En la figura 3.9 se observa cierta tendencia a la inhibición de *E. coli* por parte de la mayoría de BAL pero en este caso se consiguen inhibiciones máximas del orden de 1 y 2 unidades logarítmicas, siendo las BAL Ps48 y Ps22 las más prometedoras desde el punto de vista de su potencial antagonista frente a este indicador. De todas maneras no podemos saber si los niveles de inhibición se hubieran mantenido igual o si éstos hubieran sido mayores en caso de que el ensayo de confrontación hubiese sido más largo. Bachrouri *et al.* (2002) inocularon en yogurt dos cepas de *E. coli*, una patogénica (0157:H7) y la otra no (CECT 516), a una concentración de 10^4 ufc/g, con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que se encontraban en este producto a una concentración de 10^9 ufc/g y realizaron seguimientos durante periodos más largos que en el presente estudio. En este caso no se detectó la presencia de ninguna de las cepas de *E. coli* pasadas las 312h a 4°C, 168h a 8°C, 28h a 17°C y 16h a 22°C.

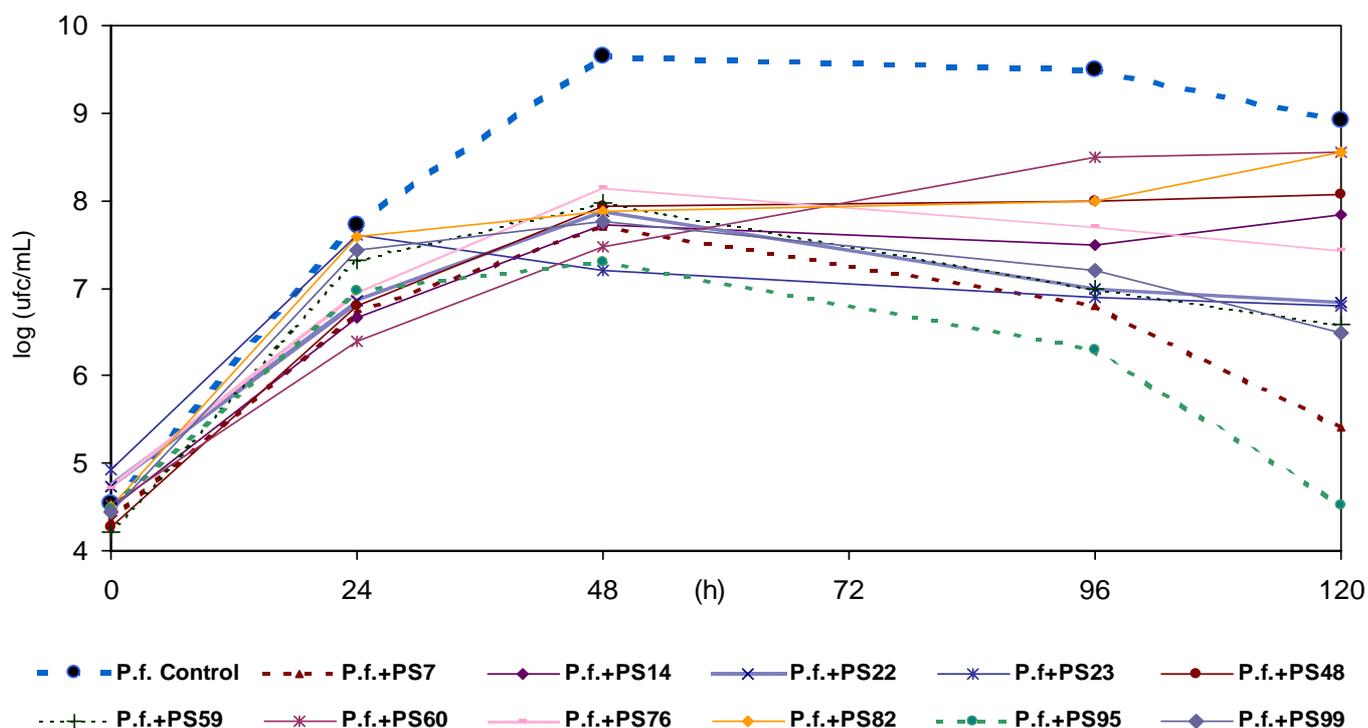


Figura 3.7 Evolución de *Pseudomonas fluorescens* autóctona (P.f.) a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas (PS). Inóculos iniciales: *Pseudomonas fluorescens* (10^4 ufc/mL) y BAL (10^7 ufc/mL).

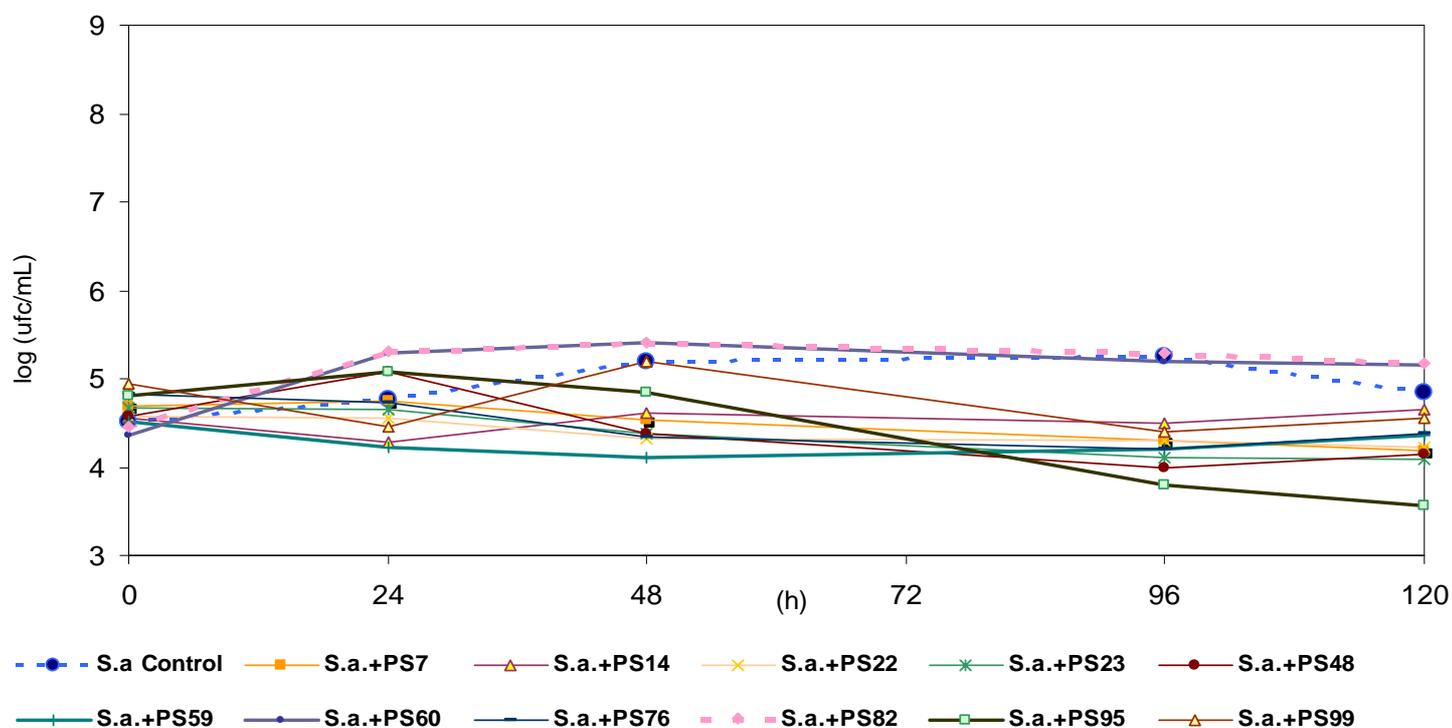


Figura 3.8 Evolución de *Staphylococcus aureus* autóctono (S.a.) a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculado conjuntamente con BAL psicrótrofas (PS). Inóculos iniciales: *S.aureus* (10^4 ufc/mL) y BAL (10^7 ufc/mL).

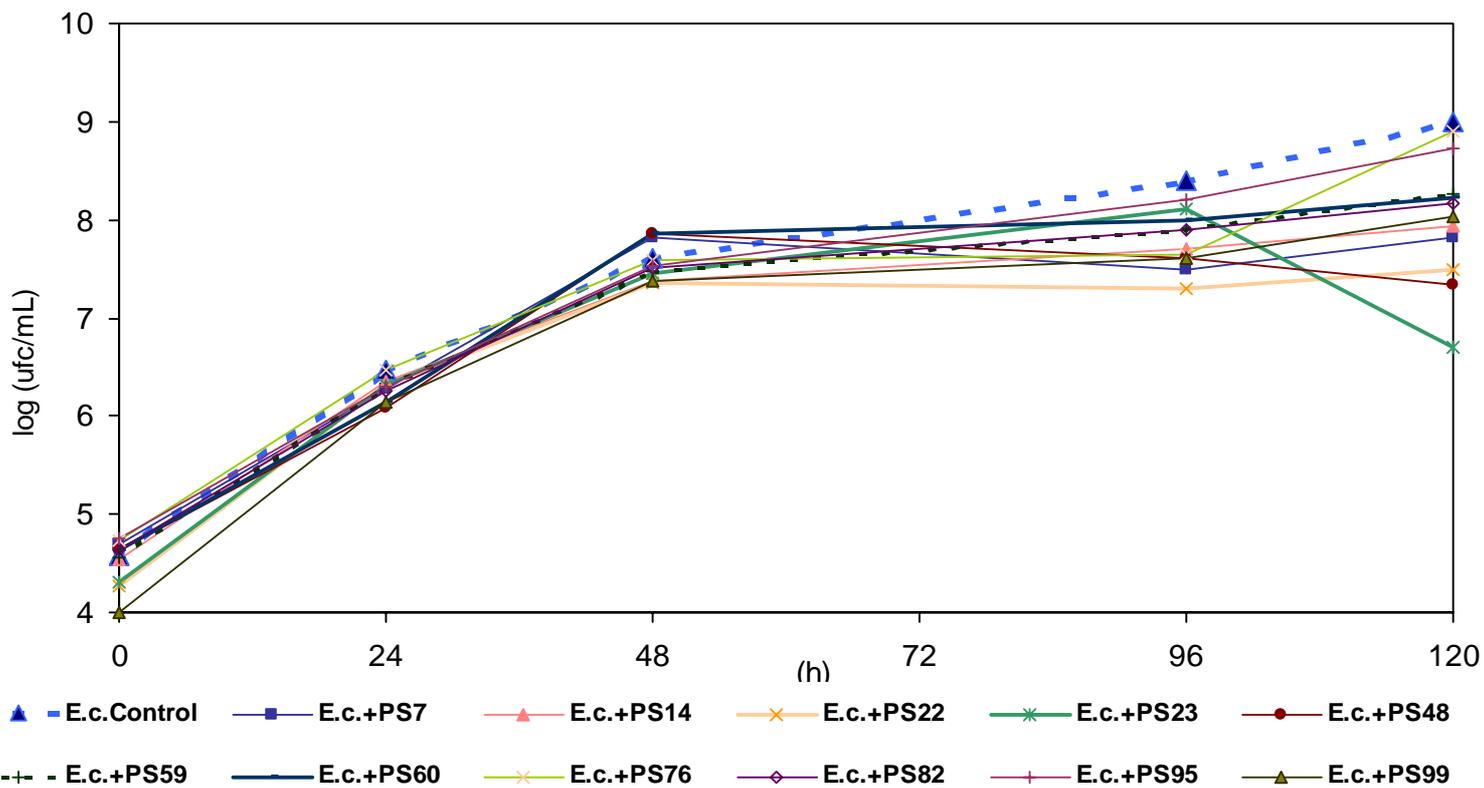


Figura 3.9 Evolución de *Escherichia coli* autoctona (E.c.) a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas (PS). Inóculos iniciales: *E.coli* (10^4 ufc/mL) y BAL (10^7 ufc/mL).

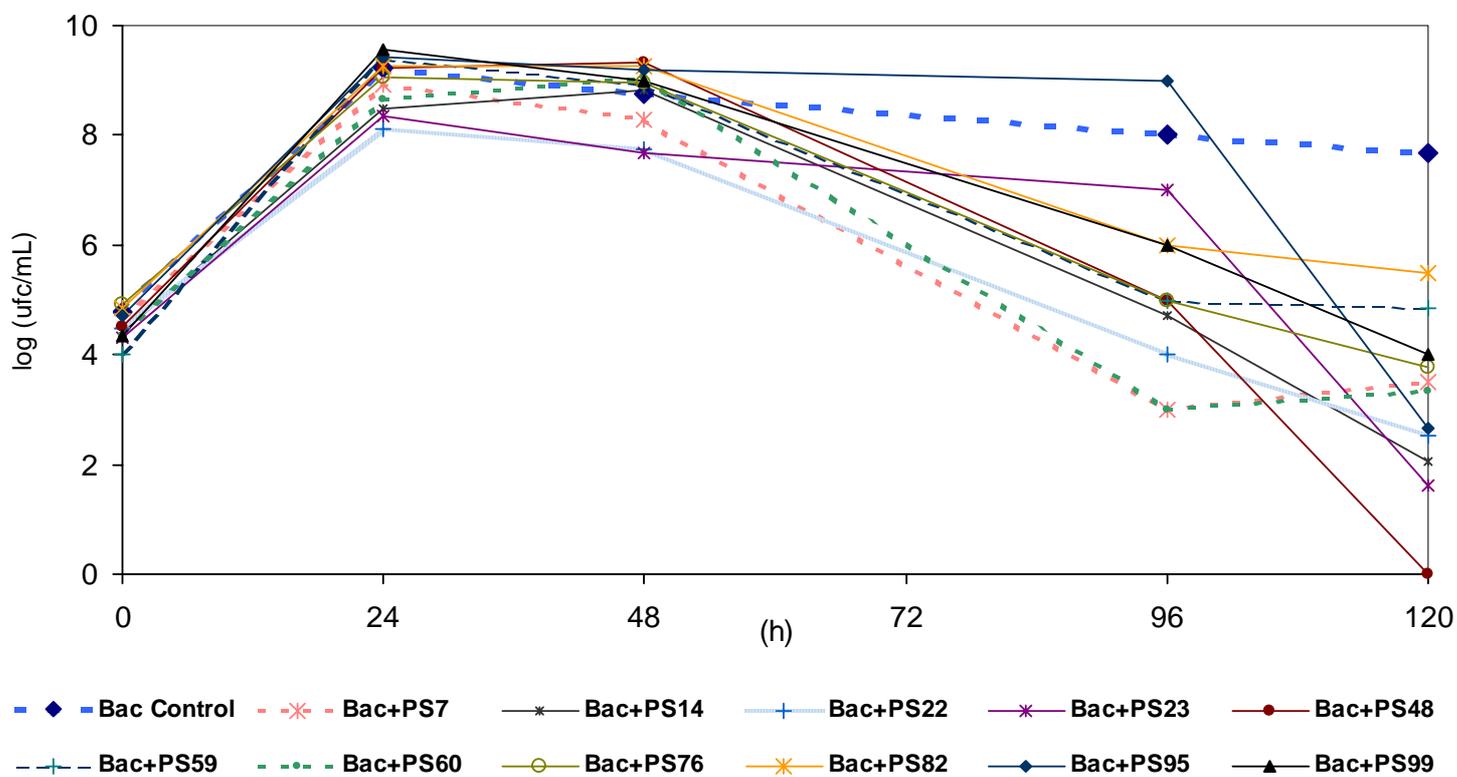


Figura 3.10 Evolución de *Bacillus* autóctono (Bac) a 15°C en ausencia de cepas lácticas e inoculada conjuntamente con BAL psicrótrofas (PS). Inóculos iniciales: *Bacillus* (10^4 ufc/mL) y BAL (10^7 ufc/mL).

Otro aspecto a tener en cuenta en futuros ensayos, es la experiencia de Bredholt *et al.* (1999) en que probó el efecto sinérgico de 5 cepas de BAL actuando conjuntamente frente a diferentes indicadores en productos cárnicos cortados envasados al vacío a 10°C. En el caso de *E. coli* 0157:H7 presente a una concentración de 10^3 ufc/g y de 5 BAL a una concentración de 10^4 - 10^5 ufc/g se vio inhibida totalmente. Estos investigadores no llegaron a determinar si el efecto inhibitorio tuvo que ver con una BAL determinada o con las 5 actuando de manera sinérgica.

En la figura 3.10 se observa como *Bacillus* (rif +) fue el indicador más sensible a la inhibición *in situ* ya que se obtuvieron inhibiciones del orden de 4 a 7 unidades logarítmicas. La BAL que presentó el mayor efecto inhibitorio frente a *Bacillus* (rif +) fue Ps48 ya que a las 120h ya no se detectaba la presencia de este microorganismo indicador.

La inhibición total de *Bacillus* (rif +) únicamente se consiguió en condiciones psicrótrofas. La razón por la cual los resultados fueron mejores que en condiciones mesófilas podría estar vinculada con la relación existente entre la concentración de la sustancia antimicrobiana en el medio por cada célula de indicador. *Bacillus* (rif+) crece lentamente a esta temperatura y al utilizar un inóculo de BAL mucho más elevado, ésta se encuentra en ventaja y sintetiza sus barreras más rápidamente y esto resultaría en una concentración más elevada de metabolitos inhibidores por célula diana así como en un tiempo más largo de exposición del indicador al daño causado por la sustancia específica.

Los resultados de Abriouel *et al.* (2002) sobre sensibilidad de *Bacillus cereus* frente a la bacteriocina AS-8 sintetizada por *Enterococcus faecalis* S-48 concuerdan con los obtenidos en este estudio en el cual concluyó en que la actividad antimicrobiana estaba influenciada por la temperatura ya que obtuvo mayores niveles de inhibición a 15°C y 5°C que a 37°C.

En muchos estudios se utiliza como indicador esporogénico a *Clostridium botulinum*, de hecho es más común encontrar referencias acerca de la inhibición de este microorganismo. La experiencia de diferentes investigadores coincide en que *C. botulinum* puede mostrarse muy sensible frente a la actuación de BAL en ciertas condiciones. Al igual que en el presente estudio el hecho de mantener la BAL a una concentración alta y la adición de azúcar, como un efecto positivo sobre el potencial antagonista coincide con algunos

autores. Según Hutton *et al.* (1991) es importante utilizar un inóculo de partida elevado (mínimo de 10^6 ufc/mL) y 1% de dextrosa para que *Pediococcus acidilacti* sea capaz de inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* así como la formación de toxinas en ensalada de pollo a 10°C. Crandall y Montville (1993) consiguieron resultados relevantes ensayando confrontaciones de diferentes cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* frente a *C. botulinum* a 15°C cuando se adicionaba glucosa a concentración de 0,5% en muestras que simulaban una masa cárnica o *model gravy system*.

Acerca de este mismo indicador capaz de formar esporas y toxinas, Skinner *et al.* (1999) comprobaron que no se encontraba toxicidad en sopa de guisantes en el caso de las muestras co-inoculadas con *Lactobacillus plantarum* en ninguna de las temperaturas ensayadas (5, 15, 25 y 35°C).

En los ensayos correspondientes a este capítulo en todas las co-inoculaciones las BAL se mantuvieron a una concentración de 10^8 - 10^9 ufc/mL durante todo el seguimiento.

Si se establece una comparación entre los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo en placa (figura 3.1) y los obtenidos en las pruebas *in situ* se puede constatar que *Bacillus* spp fue el microorganismo más sensible a la inhibición a 15°C en ambos casos (figura 3.11). En cuanto al resto de indicadores, no existe una correlación en los resultados. El segundo indicador más inhibido en las pruebas en placa fue *E. coli*, en tercer lugar *S. aureus* y por último *P. fluorescens*, en cambio en las pruebas de antagonismo *in situ* el segundo más inhibido fue *P. fluorescens* seguido de *E. coli* y *S. aureus* que no creció.

En el cuadro 3.4 se ve como las cepas más interesantes en cuanto su potencial antagonista *in situ* son las resaltadas en gris (Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 y Ps99) ya que frenaron el crecimiento de los indicadores.

Como se ha mencionado anteriormente, la bioconservación con BAL en sangre es una técnica poco estudiada, pero existen trabajos referentes a otros alimentos en los cuales se comprobó que la aplicación de BAL puede frenar o inhibir el crecimiento de la población de los microorganismos contaminantes más comunes en el producto específico en estudio y a temperatura de refrigeración.

Como se mencionó en el segundo capítulo se conoce un antecedente de la aplicación de fermentos lácticos en sangre como cultivo bioprotector a nivel industrial. La experiencia positiva en cuanto a descenso de la carga microbiana de Morgan (1985) y ABC bio-industries se dio a 20°C donde la estabilidad del producto fue óptima durante varios meses.

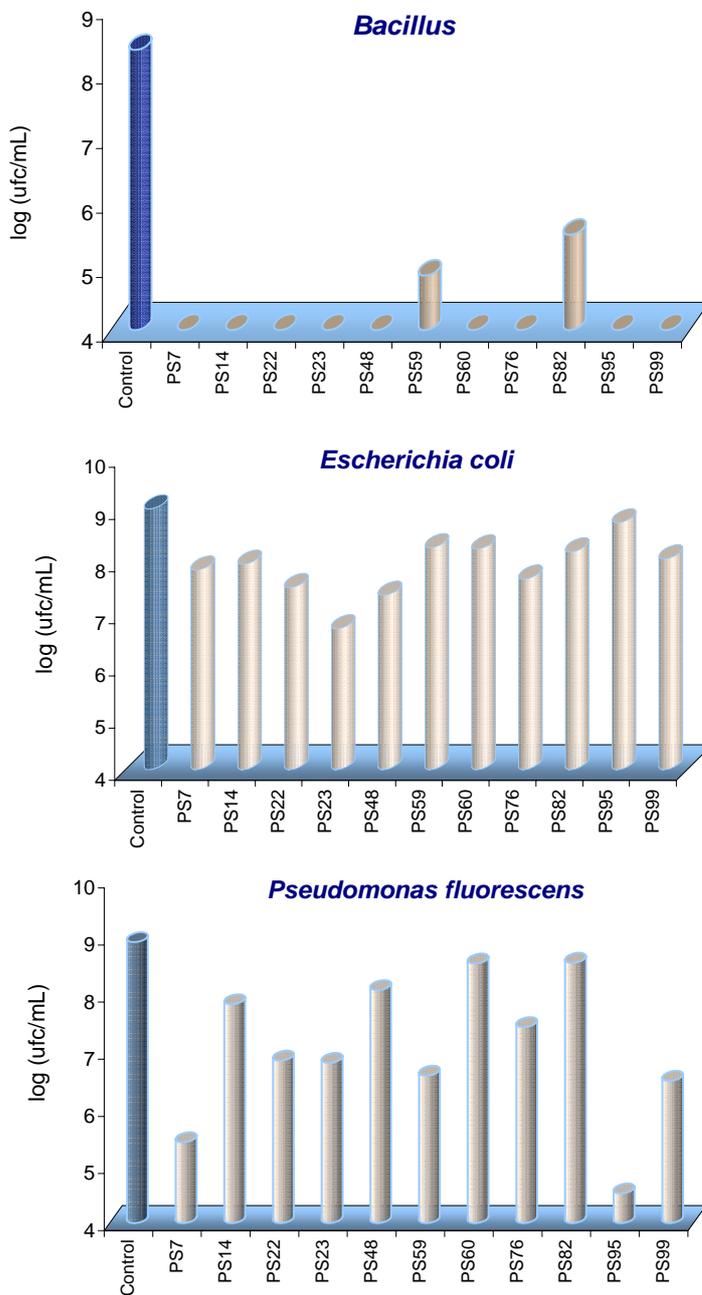


Figura 3.11 Sensibilidad *in situ* de los diferentes indicadores frente a las 11 BAL seleccionadas al final del ensayo: 144h para *P. fluorescens*, 120h para *Bacillus* (rif +) y *E. coli*.

Cuadro 3.4

Antagonismo *in situ* de las 11 BAL frente a los microorganismos indicadores a 15°C

| BAL | Microorganismo indicador | | | |
|------|--------------------------|----------------|-----------------------|------------------|
| | <i>Bacillus</i> (rif +) | <i>E. coli</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>S. aureus</i> |
| Ps7 | +++ | ++ | +++ | R |
| Ps14 | +++ | ++ | ++ | R |
| Ps22 | +++ | ++ | ++ | R |
| Ps23 | +++ | ++ | ++ | R |
| Ps48 | ++++ | ++ | + | R |
| Ps59 | ++ | + | ++ | R |
| Ps60 | +++ | + | + | R |
| Ps76 | +++ | - | ++ | R |
| Ps82 | ++ | + | + | R |
| Ps95 | +++ | + | +++ | R (+) |
| Ps99 | ++ | + | ++ | R |

Símbolos: +, 1 reducción decimal; ++, 1 a 3 reducciones decimales; +++, ≥ 4 reducciones decimales; +++++, inhibición total; -, no se observó inhibición; R, crecimiento frenado por la temperatura.

Los posibles mecanismos de inhibición utilizados por las BAL *in situ* se ha discutido en general en el apartado 2.3.4.4. En este grupo de ensayos a 15°C nuevamente se vio como los valores de pH finales de la muestras de sangre co-inoculadas estaban alrededor de 5,5. Se puede pensar que nuevamente el mecanismo de inhibición utilizado por las BAL no fue exclusivamente la acidificación sino que además debe existir otras sustancias inhibidoras formadas en el medio. Como se ha visto todos los indicadores utilizados se pueden desarrollar adecuadamente a este valor de pH (Jay, 1997; Casp y Abril, 1999).

En esta fase del estudio tampoco se estudiaron las posibles causas de la inhibición de cada microorganismo, y no se sabe si la temperatura es un parámetro determinante sobre el potencial antagonista. Es cierto que existe

una respuesta bacteriostática y en algunos casos bactericida por parte de las BAL, pero un aspecto que no se ha valorado aun en este estudio es la posible acumulación de metabolitos formados por los microorganismos indicadores.

En los ensayos correspondientes a este capítulo se ha trabajado a 15°C. Sería necesario evaluar si en estas condiciones se pueden mantener las características funcionales de la sangre o si se requiere trabajar a temperaturas más bajas. En el caso que a 15°C se llegue a un equilibrio entre el detenimiento de la proliferación microbiana y la conservación de las propiedades de las proteínas de la sangre no sería necesario trabajar a 4-5°C en el tanque de refrigeración, hecho que supondría un ahorro energético y por tanto económico.

En este estudio se ha evaluado la sensibilidad a la inhibición de cada indicador independientemente uno del otro. Este es un hecho que no se dará en sangre de matadero en condiciones reales cuando las BAL se inocularan en sangre con muchos microorganismos contaminantes. El Kimchi (producto a base de vegetales fermentados por BAL con producción de ácido láctico típica de Korea con un pH de 4,0-4,5 y con 3-4% de sal) es un buen ejemplo de la actuación simultánea de BAL *in vivo* frente a varios microorganismos patógenos presentes en este producto (*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* y *E. coli*). Ha (1994) citado por Lee (1997) realizó un seguimiento a la temperatura de fermentación del producto (20°C) y determinó que la población de BAL al inicio de la fermentación era de 10^5 ufc/mL mientras que la de todos los microorganismos patógenos era de 10^4 ufc/mL. Después de 2 días la población de *C. perfringens* y *S. typhimurium* era nula, en el caso de *S. aureus* sucedió a los 4 días de fermentación y no se detectó *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* y *E. coli* a los 5 días. Paralelamente las BAL alcanzaron una población de 10^8 ufc/mL en dos días de incubación a esta temperatura y se mantuvo durante los 7 días en que se desarrolló este ensayo. A pesar de que no se trata del mismo producto ni de los mismos microorganismos contaminantes es un antecedente que da cierta esperanza de éxito a futuros experimentos.

Los resultados obtenidos muestran la necesidad de abarcar otros aspectos de aplicación de BAL en sangre de matadero como puede ser el estudio realizado

en condiciones reales, ya que hasta el momento se ha utilizado únicamente sangre inoculada artificialmente.

Otros aspectos interesantes a tener en cuenta serían:

- La aplicación de varias cepas de BAL antagonistas y comparar los resultados con los obtenidos cuando actuaban individualmente.
- La combinación de la bioconservación con otras técnicas de higienización sin aplicación de calor, como podrían ser las altas presiones hidrostáticas.
- Como complemento desde el punto de vista científico sería interesante determinar los mecanismos de inhibición que actúan en cada caso.

3.4 Conclusiones

1. Del estudio del potencial antagonista en placa de las 100 BAL psicrotomas autóctonas frente a los microorganismos indicadores, 72% inhibieron a *S.aureus*, 78% inhibió a *E. coli*, 28% a *P. fluorescens* y un 81% inhibió a *Bacillus* spp. 11 BAL presentaron el espectro más amplio en placa.
2. Todas las BAL seleccionadas fueron capaces de sobrevivir en sangre con glucosa (2%) a 15°C durante 144h cuando se partía de un inóculo de $10^7 - 10^8$ ufc/mL llegando a aumentar su población en un orden logarítmico en todos los casos.
3. Se determinó que el tiempo de incubación para obtener las BAL en la máxima actividad era entre 12 y 17h a 30°C, ya que la totalidad de las cepas lácticas alcanzaban la máxima densidad celular en fase exponencial en este tiempo.
4. Todos los microorganismos indicadores demostraron su capacidad de adaptación a la temperatura de trabajo (15°C) en medio de cultivo y en sangre, excepto *S. aureus* que no creció en sangre, ya que mantenía el mismo nivel poblacional que el inóculo de partida.

5. Del estudio del potencial antagonista *in situ* se determinó que el microorganismo más sensible a la presencia de BAL fue *Bacillus* spp.(rif +) ya que 8 de las 11 cepas inhibieron esta bacteria en más de 4 ordenes logarítmicos. El segundo más inhibido fue *P. fluorescens*, ya que 2 BAL inhibieron su población en más de 4 ordenes logarítmicos. *E. coli* fue inhibido en un máximo de 3 ordenes de magnitud. En el caso de *S. aureus* se concluyó que el crecimiento fue frenado por la temperatura de trabajo.
6. Todas las BAL fueron capaces de inhibir en sangre con glucosa (2%) a 15°C a *Bacillus* spp. (rif +), *E. coli* y *P. fluorescens* siendo más interesantes por su potencial antagonista Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 y Ps99, ya que inhibían a estos organismos indicadores en ordenes más altos de magnitud que el resto de las BAL ensayadas.

Capítulo 4 Identificación de las cepas con potencial antagonista

4.1 INTRODUCCIÓN

El término bacteria ácido láctica (BAL) fue utilizado durante mucho tiempo como sinónimo de “organismos de la leche agria”. Significativamente el primer cultivo puro de bacterias fue “*Bacterium lactis*” (probablemente *Lactococcus lactis*) obtenido por J. Lister en 1873. Se logró un gran progreso en cuanto a la clasificación de estas bacterias cuando se descubrió la similitud existente entre las bacterias de la leche agria y las productoras de ácido láctico de otros hábitats distintos (Henneberg, 1904; Löhnis, 1907 citados por Axelsson, 1998).

Más tarde Orla-Jensen (1919) publicó una monografía acerca de la clasificación sistemática de BAL. Su trabajo había estado basado en algunas características de estas bacterias: morfología (cocos o bacilos, formación de tétradas), vía fermentativa de la glucosa (homo o heteroláctica), capacidad de crecimiento a cierta temperatura (10°C y 45°C) y patrón de utilización de azúcares. Orla-Jensen concluyó que las BAL comprendían cuatro géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Definió que todas ellas pertenecían a un gran grupo natural y que estaban filogenéticamente relacionadas entre sí y a la vez separadas de otros grupos (Axelsson, 1998).

En aquel momento tan sólo podían ser examinadas las características fenotípicas que eran evaluadas como marcadores filogenéticos. Durante muchos años, los investigadores han propuesto una serie de técnicas taxonómicas moleculares para identificar las BAL con el fin de superar las conocidas desventajas de los métodos clásicos basados en las características fenotípicas. Estos avances incluyen también métodos fenotípicos como electroforesis en gel de policrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) de proteínas de la célula entera, patrones electroforéticos de hidrolasas del peptidoglicano; así como métodos de genética molecular. La caracterización a nivel de especie y sub-especie puede llevarse a cabo mediante estudios de homología del ADN. La comparación de secuencias tiene actualmente mucho impacto, pues se trata de una técnica muy precisa para determinar las relaciones filogenéticas entre microorganismos.

La secuenciación automática a partir del producto de PCR es un método que ha convertido en un trabajo fácil la determinación de la secuencia de un fragmento de ADN de cualquier bacteria (hasta aquellas no cultivables) en corto tiempo. Se ha comprobado que para las determinaciones a nivel de género y especie el estudio de la secuencia del ADN ribosomal (ADNr) es muy apropiado porque esta molécula contiene regiones muy conservadas y

regiones muy variables. Por tanto los ensayos pueden ser diseñados para dar información a diferentes niveles filogenéticos en particular género y especie. Las regiones de ADN que separan los ADNr, específicamente las regiones espaciadoras intergénicas (ISR, del inglés *Intergenic Spacer Regions*) son mucho más variables y permiten con frecuencia identificar incluso serotipos (Torriani *et al.*, 1999).

Los genes del 16S y 23S se han utilizado para identificar microorganismos del género *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* de diferentes nichos, carnobacteria de carne, para distinguir *Vagococcus* de otras BAL, *Streptococcus thermophilus* y hasta para diferenciar entre subespecies *lactis* y *cremoris* de *Lactococcus lactis*. La comparación de las secuencias ribosomales de diferentes microorganismos se ha utilizado para construir un árbol filogenético y que se ha demostrado que es muy similar al elaborado en base a las características fenotípicas o mediante métodos tradicionales. Además, tiene un elevado grado de correspondencia con el árbol general construido en base a técnicas microbiológicas clásicas. La base de datos de secuencias de 16S ADNr de las BAL ha ido creciendo durante los últimos años y se ha convertido en una herramienta muy útil (Axelsson, 1998). A pesar de ello debe considerarse que todas son herramientas útiles en el caso que se quiera realizar una identificación. Si es necesario, los métodos tradicionales siempre pueden utilizarse como complemento o para aproximarse aun más al objetivo en algún caso en concreto.

4.2 OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo fue identificar las bacterias lácticas que habían presentado potencial antagonista frente a los microorganismos indicadores contaminantes habituales en sangre de matadero (capítulos 2 y 3). Estas BAL serían las posibles candidatas como bioprotectoras en una aplicación en sangre en condiciones reales. Se ha considerado importante su identificación ya que se trata de una herramienta útil para discutir los resultados y compararlos con los obtenidos en estudios realizados anteriormente por otros investigadores.

La metodología a utilizar para identificar las BAL fue mediante técnicas moleculares ya que la experiencia de muchos autores coincide en que son muy

fiables y más rápidas que las técnicas fenotípicas que se han venido utilizando convencionalmente (Torriani *et al.*, 1999).

En un sentido general, el objetivo del presente capítulo fue identificar las cepas de BAL a nivel de género y especie por comparación de las secuencias correspondientes al gen que codifica la síntesis de 16S ARNr (16S ADNr) con las secuencias publicadas en las bases de datos. En el presente trabajo se utilizará siempre la terminología 16S ADNr.

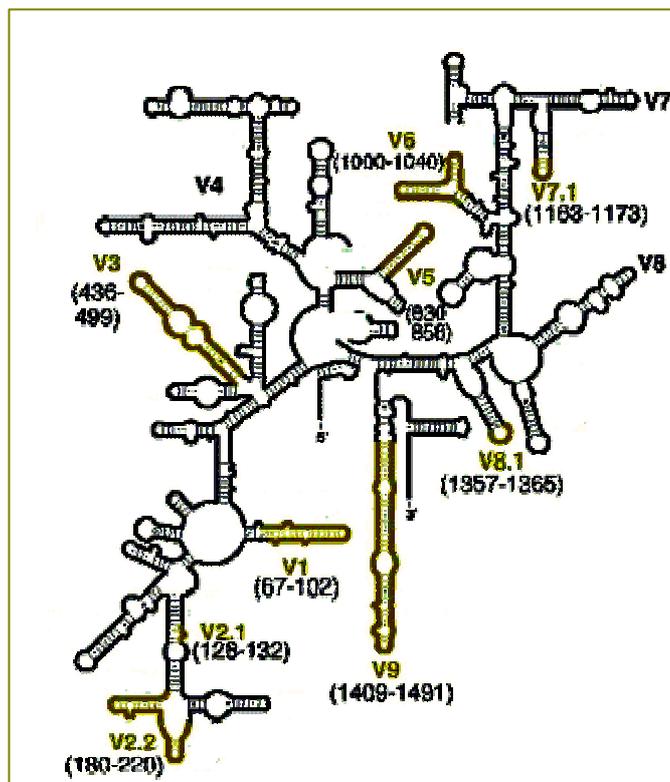


Figura 4.1 Representación gráfica de la molécula de 16S ARNr de *Escherichia coli*. V₁ a V₉: Ubicación de las regiones variables (Chang-Shung *et al.*, 2002).

El estudio ha consistido concretamente en:

- Realizar la amplificación mediante PCR del 16S ADNr (nt7-nt1500) de las 5 BAL procedentes de la colección de mesófilas (TA20, TA43, TA73, TA75, TA76) y de las 7 procedentes de la colección de psicrótrofas (Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95, Ps99) con potencial antagonista en sangre.
- Secuenciar las regiones variables del 16S ADNr V1-V3 y V6-V9 y compararlas con las secuencias existentes en la base de datos a través de programas informáticos para identificar su género y especie o especies más probables.

4.3 MATERIAL y MÉTODOS

4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.3.1.1 Crecimiento de los cultivos de BAL

Las cepas de BAL se descongelaron y se sembraron en superficie en agar MRS con el fin de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 30°C durante 48h en anaerobiosis. Seguidamente una colonia separada se resuspendió en 50µL de agua de triptona.

Se comprobó que no era necesaria la extracción de ADN. Probablemente las subidas de temperatura a 95°C que tienen lugar durante la PCR (ver más adelante) propiciaban un desequilibrio suficiente de la pared celular para que el ADN fuera accesible a los reactivos de la PCR.

4.3.1.2 Amplificación

La amplificación se llevó a cabo con el *kit* de *Taq DNA polimerasa* (Invitrogen Life Technologies-California EUA) utilizando los cebadores 16S universales 8-f y 1492-r (cuadro 4.1).

Cuadro 4.1

Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación del 16S ADNr de las BAL

| Cebador | Sentido | Secuencia | Referencia |
|---------|----------------|---------------------------------------|---------------|
| 968- f | <i>forward</i> | 5'- aac gcg aag aac ctt a -3' | Lane, 1991 |
| 8- f | <i>forward</i> | 5'- agt ttg atc ctg gct cag -3' | 16S universal |
| 534- r | <i>reverse</i> | 5' - tgg cac gta gtt agc cgt - 3' | este trabajo |
| 1492- r | <i>reverse</i> | 5' - acg gtt acc ttg tta cga ctt - 3' | 16S universal |

Se empleó un termociclador modelo GeneAmp (PCR system 9700, Applied Biosystems-California EUA). Se utilizaron las mismas condiciones para las 12

BAL en estudio. Todas las reacciones constaron de **(1)** una fase inicial de desnaturalización del ADN de 2 minutos de duración a 95°C **(2)** 35 ciclos que consistían en tres etapas: desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, unión específica de los cebadores a 52°C durante 1 minuto y la extensión durante 1minuto 27segundos a 72°C y **(3)** la extensión final de 72°C durante 5 minutos. Finalmente se conservó el producto de PCR a 4°C.

En el cuadro 4.2 se describe la composición de la mezcla utilizada en las reacciones.

Cuadro 4.2
Cóctel utilizado en la reacción de PCR para amplificación de 16S ADNr

| Reactivo | Concentración stock | Concentración final | µL/reacción |
|--|---------------------|---------------------|--------------|
| Agua | | | 34,20 |
| Tampón de reacción [©] | 10x | 1x | 5,00 |
| MgCl ₂ | 50mM | 3mM | 3,00 |
| DNTP _s DATP+dCTP+dGTP+dTTP | 10mM* | 200µM* | 1,00 |
| Cebador 8f | 10µM | 900nM | 0,75 |
| Cebador 1492r | 10µM | 900nM | 0,75 |
| Taq [©] | 5U/µL | 1U | 0,30 |
| ADN | | | 5,00 |
| Total | | | 50,00 |

* Concentración final de cada uno de los desoxiribonucleotidos.

© Invitrogen ref.10342-020

Con el fin de comprobar la amplificación del 16S ADNr se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Roche 7000007) de los productos de PCR. El gel se preparó a una concentración de 1,5% en tampón TAE 0,5x^{T1}(cada pocillo

T1

TAE 0,5X

Tris M: 60,05 121g/mol

Acido acético glacial 28,55mL

EDTA 0,5M estéril (93,05g EDTA, 400mL agua pH: 8,0) 50mL

Enrasar a 500mL. Ajustar a pH 7,5-7,8 con HCl

se cargó con 8µL de la muestra con 2µL de tampón de carga^{T2}). Se realizó la electroforesis a 100V durante 30 minutos y se utilizó el marcador de peso molecular comercial *plus ADN ladder*TM (Invitrogen Life Technologies- California EUA). La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio (Amresco, X328) a una concentración de 1µg/mL, se visualizó con una luz UV en un transiluminador, seguidamente se fotografió.

Se comprobó la aparición de una banda de un peso molecular aproximado de 1500 pares de bases para cada una de las cepas.

4.3.1.3 Purificación del producto de PCR

Se purificó el producto de PCR con la finalidad de eliminar los cebadores y posibles dímeros de los mismos así como otros reactivos de la PCR (polimerasas, dNTPs, etc.) que podían inhibir o dificultar la reacción de secuenciación.

La purificación se realizó con el kit QIAEX II (QIAGEN - 20021). El principio de la técnica se basa en que el ADN se adsorbe específicamente a partículas de sílica-gel en presencia de una elevada concentración de sales y a pHs ácidos. Su recuperación a pHs básicos en ausencia de sales produce un ADN apto para la mayor parte de las reacciones posteriores. Esta matriz tiene un tamaño de exclusión de 100 pb. El protocolo consiste básicamente en tres etapas principales: la adsorción específica de ADN a las partículas de sílica-gel, lavado y elución de ADN. Los pasos seguidos fueron los recomendados por el fabricante. Brevemente:

1. Diluir la muestra en tampón QX1 (1:4). Este tampón contiene una elevada concentración de sales caotrópicas e indicador de pH. Mediante observación del color se verifica un $\text{pH} \leq 7,5$. Añadir las partículas de sílica-gel QIAEX II (3 µl por 1 µg de ADN) en agitación e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para completar la absorción. Centrifugar y retirar el sobrenadante.

^{T2} Tampón de carga

| | |
|-----------|--------------------|
| 0,25% p/v | azul de bromofenol |
| 0,25% p/v | xileno cianol |
| 30% v/v | glicerol |

2. Lavar el pellet dos veces con 500 µL de tampón PE que contiene etanol y que permite el lavado de contaminantes salinos. Secar el pellet conseguido al aire durante 10 a 15 minutos o hasta que el pellet quede de color blanco.
3. Resuspender el ADN en 20 µL de tampón TE (Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM, pH **8,0**) o agua. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El pH es un parámetro muy importante ya que la recuperación máxima de ADN se alcanza a pH entre 7,0 y 8,5. Centrifugar para descartar las partículas de silica-gel y recuperar el sobrenadante que es donde se encuentra el ADN puro.

Nuevamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido con el fin de determinar su concentración por comparación con estándares de concentración conocida (*plus ADN ladder*TM, Invitrogen Life Technologies-California EUA). Las reacciones de secuenciación se realizan sobre aproximadamente 20ng de ADN purificado.

4.3.2 Reacción de secuenciación del producto amplificado

El método de secuenciación utilizado en el presente trabajo se basa en la reacción enzimática desarrollada por Sanger (1977), que consiste en la extensión por Taq polimerasa de una cadena de ADN a partir de un cebador específico y siguiendo una cadena molde con la particularidad de efectuarse la síntesis en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs). Los ddNTPs son desoxinucleótidos (dNTPs) modificados a los que se ha eliminado un grupo hidroxil-3' lo cual provoca la interrupción de la elongación de la cadena. En la adaptación del método Sanger utilizado (Kit BigDyeTM Terminator V3.0 *cycle Sequencing-Ready reaction* - Applied Biosystems EUA) se utilizan ddNTPs marcados con fluorocromos dicloro [R6G] para ddATP, dicloro [TAMRA] para ddCTP, dicloro [R110] para ddGTP y dicloro [ROX] para ddTTP.

El producto de la reacción consistirá en numerosas cadenas de ADN con el cebador específico en 5' y con el extremo 3' marcado por la incorporación de un ddNTP.

El producto de la reacción se analiza mediante el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). En este equipo las

moléculas se separaran por peso molecular a través de un polímero en medio desnaturizante sometido a un campo eléctrico. En consecuencia se ordenarán según el peso molecular hasta llegar a la zona de detección donde un láser excita a los fluorocromos y éstos emiten una longitud de onda característica dependiendo de su naturaleza. Un software interpreta los espectros de fluorescencia traduciéndolos en forma de secuencia de nucleótidos G, A, T y C. La secuenciación se expresa en forma de electroforegramas en los que cada una de las cuatro bases está indicada por un color diferente.

El protocolo seguido consistió en tres etapas que se indican a continuación:

1. Preparación del cóctel

| | |
|------------------------------|-------------|
| Agua destilada | 5µL |
| Cebador (3,2 µM) | 1µL |
| Terminator Mix (BigDye) * | 3µL |
| ADN molde (aprox. 0,2 µg/mL) | 1µL |
| Volumen total | 10µL |

* Incluye enzima AmpliTaq FS, MgCl₂, tampón, dNTPs y ddNTPs marcados

2. Introducción de las muestras en el termociclador siguiendo el programa:

Desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C.

3. Precipitación del ADN

Añadir a la reacción de secuenciación 80 µL de solución de precipitación NaOAc /EtOH^{P1} e incubar 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 20 minutos a 12000 rpm. Después de lavar con EtOH al 70% resuspender el pellet en 30 µL TSR (*Template Suppression Reagent* del Kit). Desnaturalizar durante 3 minutos a 94°C y enfriar en hielo durante 3 minutos. Pasar los 30 µL a tubos ABI 310 de 0.5 mL y taparlos con tapones especiales tipo *serotap*. Guardar a 4°C protegido de la luz.

^{P1} 90mM NaOAc /60% EtOH

En el cuadro 4.1 se indican los cebadores utilizados para secuenciar cada zona en estudio. En la figura 4.2 se muestra un resumen de los pasos seguidos a partir de la obtención del producto de PCR.

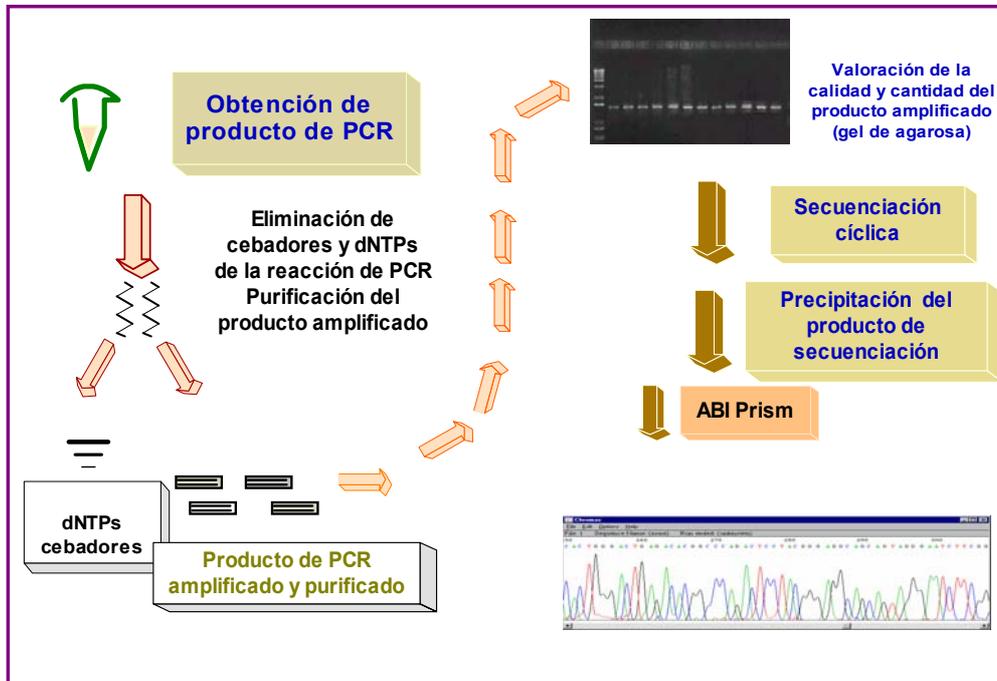


Figura 4.2 Esquema de los pasos de purificación y secuenciación de ADN amplificado.

4.3.2.1 Lectura y Análisis de secuencias

- a) Las secuencias definitivas se obtuvieron mediante la observación de los electroforegramas correspondientes al mismo segmento del 16S ADN de cada BAL. Se secuenciaron las 2 cadenas con los cebadores forward (8f y 968f) y reverse (534r y 1492r) (cuadro 4.1) con el fin de confirmar la identidad de cada una de las posiciones nucleotídicas.

- b) Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de 16S ADN_r que se encuentran en el GenBank mediante el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) del NCBI. Una vez obtenido el resultado de identificación se consideraron todos los organismos que presentaron igual porcentaje de similitud con la secuencia problema.

El ADN *DataBank of Japan* (DDBJ), *The European Molecular Biology laboratory* (EMBL) y el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA) forman el International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Esta base de datos actualmente dispone de una colección de aproximadamente de 28.507.990.166 bases y 22.318.833 secuencias registradas (febrero, 2003 Genbank statistics). Estas tres organizaciones intercambian datos diariamente siendo el objetivo común dar a conocer abiertamente la información obtenida individualmente y formar un GenBank a nivel mundial cada día más amplio.

- c) Las alineaciones de las secuencias se realizaron mediante el software Clustal W de la EBI (*European Bioinformatics Institut*, Reino Unido, www.ebi.ac.uk) que forma parte de EMBL.

4.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.4.1 Amplificación y Purificación del producto de PCR

En la figura 4.3 se observa la fotografía del gel de agarosa de las muestras de 16S ADNr amplificado de cada BAL. La comparación con el patrón de peso molecular demuestra que en todos los casos se obtuvieron bandas de aproximadamente de 1484 pb, que es el peso molecular esperado. La evaluación de las bandas permitió corroborar la integridad del ADN amplificado y descartar la presencia de artefactos o dímeros de cebadores.



Figura 4.3 Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) del producto de PCR purificado. Carriles: 1 y 15, marcadores de peso molecular *plus ADN ladder*TM del 2 al 13 (BAL Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95, Ps99, TA20, TA43, TA73, TA75, TA76) y 14, control negativo.

4.4.2 Secuencias e Identificación

Las secuencias de las regiones conservadas del 16S ADN son muy similares aun cuando se trata de diferentes géneros, este hecho hace que no sean una buena diana para la identificación de microorganismos a nivel de género o especie. Es por esta razón que en el presente estudio se decidió secuenciar las regiones variables, en concreto de los segmentos variables de mayor longitud (V1-V3 y V6-V9) que están situados en los extremos de la subunidad 16S. Asimismo, comparaciones preliminares de las secuencias de 16S ADNr de bacterias lácticas disponibles en la base de datos confirmó que los ensayos tenían que encaminarse hacia este mismo objetivo. Para las comparaciones preliminares se utilizaron secuencias del 16S ADNr de una serie de especies representativas de las BAL pertenecientes a los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*. Del análisis se concluyó que las regiones que presentaban mayor variabilidad eran las secuencias de los fragmentos V₁ - V₃ y V₆ - V₉.

En el cuadro 4.3 se muestra el resultado de identificación obtenido a partir de la comparación a través del programa BLAST de las secuencias de 16S ADNr de cada BAL en estudio con las secuencias del 16S ADNr de la base de datos del NCBI. El *score* presentado es el parámetro que asigna el análisis BLAST de valor representativo del grado de similitud entre la secuencia problema y cada una de las secuencias de las BAL presentadas en el cuadro. Su valor está en función del tipo y posición de las diferencias, así como de la longitud del fragmento analizado. Los *scores* más elevados o que corresponden a secuencias con mayor grado de similitud se han resaltado en negrita, y han permitido asignar género y especie a cada cepa problema. Asimismo en el cuadro se muestra para cada cepa la especie que mostró el *score* más alto después de la especie asignada, con el fin de poder apreciar el grado de disimilitud en función de este parámetro.

Se pudo observar que para una única especie se encuentra en la base de datos diferentes secuencias que presentaron un grado de disimilitud muy elevado en función del *score*. Por ejemplo los primeros 29 resultados del BLAST de Ps14 para la región V1-V3 pertenecían a *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus seriolicida* (*L. garvieae junior* o sinónimo de *L. garvieae*) y *uncultured strains* pero el *score* difería desde 856 hasta 716, lo cual demuestra

que existe una gran variabilidad de las secuencias de estos microorganismos aún cuando pertenecen a la misma especie.

Los resultados de comparación con el genbank se presentan en tres apartados para cada BAL, en el cuadro 4.3 se presenta la identificación de cada cepa cuando se comparó **(1)** únicamente la secuencia del fragmento V6-V9 **(2)** únicamente la secuencia del fragmento V1-V3 y **(3)** la suma de ambas o el total de bases secuenciada en este estudio.

Si se establece una comparación de los resultados de identificación obtenidos para cada BAL se ve que fueron semejantes cuando se utilizó únicamente la secuencia del fragmento V1-V3 y cuando se utilizó la suma de los fragmentos (V1-V3 + V6-V9). El fragmento V6-V9 sólo era mucho menos adecuado ya que permitía la identificación a nivel de género pero en muchos casos mostraba la misma similitud con secuencias de varias especies distintas.

Se pudo concluir que la región V1-V3 aporta la misma información que la secuenciación de las dos regiones V1-V3 y V6-V9.

Este resultado es de interés para futuros ensayos en los cuales el objetivo sea la identificación de un número más grande de cepas, ya que únicamente secuenciando la región V1-V3 se conseguiría información suficiente para su identificación. Esta es una ventaja importante desde el punto de vista económico y de tiempo invertido ya que permite reducir el número de experimentos.

En el cuadro 4.3 se resalta la identificación asignada a cada una de las BAL en estudio. Se eligieron aquellas especies que presentaron el *score* más elevado en los resultados correspondientes al fragmento V1-V3 o V1-V3+V6-V9. Cuando el *score* más alto correspondía a una especie denominada “*uncultured strain*” en el Genbank, se asignó como la más probable a la siguiente especie de la lista con nombre conocido.

Cuadro 4.3

Identificación de las BAL a partir del análisis de comparación de secuencias utilizando el software BLAST algoritmo

Ps7*** *Enterococcus malodoratus***

| V6- V9 | Código de acceso | score |
|--|-------------------------|--------------|
| <i>Enterococcus pseudoavium</i> 16S rARN gene | EPS18356 | 718 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene | EMA18339 | 718 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ERA18296 | 718 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ECOL18274 | 718 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene, strain LMG 12999 | ERA301838 | 718 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, strain LMG 10747 | EMA301835 | 718 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061012 | 718 |
| <i>Enterococcus avium</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061008 | 718 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061003 | 718 |
| <i>Enterococcus pseudoavium</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061002 | 718 |
| Uncultured bacterium gene for 16S rARN, partial sequence, clone:G-54. | AB094188.1 | 718 |
| <i>Enterococcus canis</i> strain LMG 21553 16S rARN, partial sequence. | AY156090.1 | 710 |
| Uncultured bacterium (human infant) D8D 16S rARN , partial sequence | AF253332 | 710 |
| <i>Eubacterium</i> sp. 1275b 16S rARN gene, partial sequence | AF135452 | 710 |
| V1-V3 | | |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene | EMA18339 | 819 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61012 | 819 |
| <i>Enterococcus gilvus</i> 16S rARN gene | AYO33814.1 | 803 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ERA18296 | 795 |
| (V1-V3) + (V6-V9) | | |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene | EMA18339 | 823 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61012 | 823 |
| <i>Enterococcus gilvus</i> 16S rARN gene | AYO33814.1 | 807 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ERA18296 | 799 |

* especie asignada

Ps14*** *Lactococcus garvieae***

| V6- V9 | | |
|---|------------|------------|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 765 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 765 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 765 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 765 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 765 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN | ABO79371.1 | 765 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16S rARN, partial sequence | AB012306.1 | 749 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S ribosomal ARN (16S rARN) | ENERRD | 733 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16S ribosomal ARN gene, complete sequence | AF283499 | 728 |
| V1- V3 | | |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 858 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 858 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN | ABO79369.1 | 850 |
| (V1- V3)+(V6-V9) | | |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 858 |

Capítulo 4

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 858 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF283499 | 858 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 858 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN | ABO79369.1 | 850 |

Ps 22

* *Lactococcus garvieae*

V6- V9

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 638 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 638 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 638 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 638 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 638 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN | ABO79371.1 | 638 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16S rARN, partial sequence | AB012306.1 | 618 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S ribosomal ARN (16S rARN) | ENERRD | 609 |

V1- V3

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 704 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain D5 16S rARN gene, partial sequence | AY126267.1 | 696 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN gene, partial sequence | ABO79369.1 | 696 |

(V1- V3)+ (V6- V9)

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 704 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 704 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain D5 16S rARN gene, partial sequence | AY126267.1 | 696 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN gene, partial sequence | ABO79369.1 | 696 |

Ps23

* *Lactococcus garvieae*

V6- V9

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 680 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 680 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 680 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 680 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 680 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN gene | ABO79371.1 | 680 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16S | ABO12306.1 | 664 |

V1-V3

| | | |
|---|------------|-----|
| Uncultured bacterium clone AP1-35 16S rARN gene, partial sequence | AY119428.1 | 755 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 749 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 749 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 749 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 749 |
| uncultured bacterium clone AP1-45 16S rARN gene, partial sequence | AY119434.1 | 749 |
| uncultured bacterium clone AP1-43 16S rARN gene, partial sequence | AY119433.1 | 749 |

(V1-V3) + (V6- V9)

| | | |
|---|------------|-----|
| Uncultured bacterium clone AP1-35 16S rARN gene, partial sequence | AY119428.1 | 755 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 749 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 749 |

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 749 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 749 |
| uncultured bacterium clone AP1-45 16S rARN gene, partial sequence | AY119434.1 | 749 |
| uncultured bacterium clone AP1-43 16S rARN gene, partial sequence | AY119433.1 | 749 |

PS48

*** *Lactococcus garvieae***

V6- V9

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 664 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 664 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 664 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 664 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 664 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN gene | ABO79371.1 | 664 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16s | ABO12306.1 | 648 |

V1- V3

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 741 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 741 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN gene, partial sequence | ABO79369.1 | 733 |

(V1- V3)+ (V6- V9)

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 741 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 741 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN | ABO79371.1 | 735 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U1-1 gene for 16S rARN , partial sequence | ABO79369.1 | 733 |

Ps95

*** *Lactococcus garvieae***

V6-V9

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 741 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 741 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN, partial sequence | ABO79371.1 | 741 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16S rARN, partial sequence | ABO12306 | 726 |

V1-V3

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 733 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 733 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 733 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 733 |
| uncultured bacterium clone AP1-45 16S rARN gene, partial sequence | AY119434.1 | 733 |

(V1-V3)+(V6-V9)

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 745 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> rARN gene, partial sequence | AFO61005 | 745 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN, partial sequence | ABO79371.1 | 745 |
| uncultured bacterium clone AP1-45 16S rARN gene, partial sequence | AY119434.1 | 733 |

Ps99

***Enterococcus malodoratus**

V6- V9

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Enterococcus pseudoavium</i> 16S rARN gene | EPS18356 | 712 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene | EMA18339 | 712 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ERA18296 | 712 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene | ECOL18274 | 712 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene, strain LMG 12999 | ERA301838 | 712 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, strain LMG 10747 | EMA301835 | 712 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061012 | 712 |
| <i>Enterococcus avium</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061008 | 712 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061003 | 712 |
| <i>Enterococcus pseudoavium</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF061002 | 712 |
| Uncultured bacterium gene for 16S rARN, partial sequence, clone:G-54. | AB094188.1 | 712 |
| <i>Enterococcus canis</i> strain LMG 21553 16S rARN, partial sequence. | AY156090.1 | 712 |
| Uncultured bacterium (human infant) D8D 16S rARN , partial sequence | AF253332 | 710 |
| <i>Eubacterium</i> sp. 1275b 16S rARN gene, partial sequence | AF135452 | 704 |

V1-V3

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Enterococcus malodoratus</i> 1 | EMA18339 | 819 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> | AFO61012 | 819 |
| <i>Enterococcus gilvus</i> 16S ribosoma | AY033814.1 | 803 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16 | ERA18296 | 795 |

(V1-V3) + (V6-V9)

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Enterococcus malodoratus</i> | EMA18339 | 823 |
| <i>Enterococcus malodoratus</i> | AFO61012 | 823 |
| <i>Enterococcus gilvus</i> 16S ribosoma | AY033814.1 | 807 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> 16 | ERA18296 | 799 |

TA20

*** Lactococcus garvieae**

V6- V9

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 745 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> | AFO61005 | 745 |
| <i>Enterococcus</i> spp. U5-1 gene for 16S rARN | ABO79371.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> gene for 16... | ABO12306.1 | 730 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> 16S ribosomal ARN (16S rARN) | ENERRD | 718 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN | AF283499 | 708 |

V1-V3

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 730 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 730 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 730 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 730 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 730 |
| <i>Enterococcus seriolicida</i> | AFO61005 | 730 |
| Uncultured bacterium AP1-45 16S rARN gene, partial sequence. | AY119434.1 | 726 |
| Uncultured bacterium AP1-43 16S rARN gene, partial sequence. | AY119433.1 | 726 |

(V1-V3)+(V6-V9)

| | | |
|---|------------|-----|
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG1 | AF352166.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG5 | AF352165.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG4 | AF352164.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG2 | AF352163.1 | 745 |

| | | |
|---|------------|------------|
| <i>Enterococcus seriolicida</i> | AFO61005 | 745 |
| <i>Enterococcus</i> sp. U5-1 for gene for 16S rARN | ABO79371.1 | 745 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> 16SrARN gene, complete sequence | AF283499 | 730 |

TA43

****Lactobacillus reuteri***

V6-V9

| | | |
|--|------------|------------|
| <i>L.reuteri</i> (DSM 20016 T) 16SrARN gene | LR16SRRI | 480 |
| Uncultured bacterium clone p-165-a2 16S rARN gene partial sequence | AF371482.1 | 472 |
| <i>Lactobacillus</i> sp. CLE-4 16S rARN, 3'-partial sequence | AYO17056S2 | 472 |
| Uncultured bacterium 16S rARNgene clone s25-5 | UBA308392 | 472 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> 16SrARN gene partial clone Ca119 | LRE241723 | 464 |
| Uncultured bacterium partial 16S rARN gene , clone S24-8 | UBA400259 | 464 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> 16S rARN gene | LBARGDAAA | 442 |

V1-V3

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured swine feces bacterium F1116S rARN gene,partial sequence | AF261785 | 684 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> gene for16S rARN,partial seuqence strain JCM1112 | ABO17358.1 | 678 |
| Uncultured bacterium 16S rARNgene clone s25-5 | UBA308392 | 676 |
| <i>L.reuteri</i> (DSM 20016 T) 16SrARN gene | LR16SRRI | 676 |
| Uncultured bacterium partial 16SrARN gene , clone S24-6. | UBA400274 | 676 |
| Uncultured bacterium clone p-165-a2 16S rARN gene partial sequence | AF371482.1 | 668 |

(V1-V3)+ (V6-V9)

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured swine feces bacterium F1116S rARN gene,partial sequence | AF261785 | 684 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> gene for16S rARN,partial seuqence strain JCM1112 | ABO17358.1 | 678 |
| Uncultured bacterium 16S rARNgene clone s25-5 | UBA308392 | 676 |
| <i>L.reuteri</i> (DSM 20016 T) 16SrARN gene | LR16SRRI | 676 |
| Uncultured bacterium partial 16SrARN gene , clone S24-6. | UBA400274 | 676 |
| Uncultured bacterium clone p-165-a2 16S rARN gene partial sequence | AF371482.1 | 668 |

TA73

****Lactobacillus murinus***

(V6-V9)

| | | |
|------------------------------------|------------|------------|
| Uncultured bacterium clone p-487 | AF371500.1 | 513 |
| Uncultured bacterium 1 | UBA308393 | 513 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S | AF157049 | 513 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S | LBARR16SF | 505 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S r | LBARR16SX | 496 |
| <i>L.animalis</i> 16S rARN gene | LAN16SARN | 484 |

(V1-V3)

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured bacterium p-487-o2 16S rARN gene, partial sequence | AF371500.1 | 757 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 16S rARN gene, partial sequence | AY186045.1 | 753 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 753 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 753 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S r ARN | LBARR16SF | 682 |

(V1-V3)+ (V6-V9)

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured bacterium p-487-o2 16S rARN gene, partial sequence | AF371500.1 | 757 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 16S rARN gene, partial sequence | AY186045.1 | 753 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 753 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 753 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S r ARN | LBARR16SF | 682 |

TA75

***Lactobacillus murinus**

V6-V9

| | | |
|--|-----------|------------|
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 674 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 674 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S r ARN | LBARR16SX | 652 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 646 |
| <i>L.animalis</i> 16S rARN gene | LAN16SNA | 644 |

V1-V3

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured bacterium clone p-487-o2 16S rARN gene, partial sequence | AF371500.1 | 811 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 16S rARN gene, partial sequence | AY186045.1 | 803 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 803 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 803 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 730 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SX | 716 |

(V1-V3)+(V6-V9)

| | | |
|---|------------|------------|
| Uncultured bacterium p-487-o2 16S rARN gene, partial sequence | AF371500.1 | 813 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 16S rARN gene, partial sequence | AY186045.1 | 805 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 805 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 805 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 731 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SX | 718 |

Ta76

***Lactobacillus murinus**

V6-V9

| | | |
|--|-----------|------------|
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 634 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 634 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SX | 611 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 607 |
| <i>L.animalis</i> 16S rARN gene | LAN16ARN | 595 |

V1-V3

| | | |
|--|------------|------------|
| Uncultured bacterium clone p-487 | AF371500.1 | 789 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 | AY186045.1 | 781 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 781 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 781 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 708 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SX | 694 |

(V1-V3)+(V6-V9)

| | | |
|--|------------|------------|
| Uncultured bacterium clone p-487 | AF371500.1 | 789 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> strain MP3 | AY186045.1 | 781 |
| Uncultured bacterium 16S rARN gene, clone S25-9 | UBA308393 | 781 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S rARN gene, partial sequence | AF157049 | 781 |
| <i>Lactobacillus animalis</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SF | 708 |
| <i>Lactobacillus murinus</i> 16S ribosomal ARN | LBARR16SX | 694 |

En el cuadro 4.4 se muestran las secuencias de todas las BAL objeto de estudio. Se pueden observar también las diferencias respecto a las secuencias de las BAL publicadas en el Genbank que mostraron mayor similitud con las estudiadas (*scores* más altos).

Se calcularon los porcentajes de similitud (número de bases iguales entre el número total de bases secuenciadas multiplicado por 100). Las diferencias respecto a las BAL publicadas en el Genbank incluyen mayoritariamente mutaciones puntuales. En algunos casos se detectaron deleciones en las secuencias de las BAL problema (cuadro 4.5).

La finalidad de realizar el cálculo del porcentaje de similitud fue disponer de un valor más inteligible. La obtención del *score* es un cálculo mucho más complejo en el cual intervienen muchas variables como por ejemplo tipo de mutación, posición en la secuencia, etc. y tiene el inconveniente de no permitir la comparación directa del resultado entre fragmentos diferentes de la molécula del 16S ADNr. Por otro lado el inconveniente que presenta el valor de porcentaje de similitud es que únicamente se basa en el número de diferencias, siendo por tanto mucho menos fiable.

Este hecho ha llevado a casos aparentemente contradictorios, por ejemplo la BAL Ps7 que presenta *scores* diferentes en los resultados correspondientes al fragmento V1-V3 para *E. malodoratus* y *E. gilvius* (cuadro 4.3) presenta el mismo porcentaje de similitud frente a estos dos microorganismos (cuadro 4.5). En el caso de las BAL TA73 y TA75, se les asignó como especie más probable *L. murinus* ya que presentaba *scores* más elevados que *L. animalis* pero en el cuadro 4.5 se ve como el porcentaje de similitud fue más alto para *L. animalis* que el de *L. murinus*. Esto se debe a que el peso de las mutaciones es diferente cuando se calcula el *score* que el porcentaje de similitud.

Como se puede observar la identificación realizada a través del 16S ADNr permitió agrupar las 12 BAL en tres géneros: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp.

La técnica utilizada en este estudio ha permitido la identificación a nivel de género y en algunos casos dudar entre un número reducido de especies muy afines entre sí, lo cual era el objetivo al que se pretendía llegar.

Como se ha visto, en el presente estudio se han utilizado dos segmentos variables del 16S ADNr para identificar a las BAL. En futuros estudios se podría plantear utilizar para fines de identificación las secuencias de la zona comprendida entre el 16S y el 23S (ISR). Muchos investigadores han

determinado que la información genética del ISR tiene una ventaja clara sobre la región V2-V3. A pesar de que la primera mitad del 16S (V1-V3) contiene las secuencias específicas a nivel de especie, la región intergénica puede aportar información adicional respecto a la especie, serotipo, etc. ya que se trata de un segmento hipervariable y corto pues comprende 200 bases de longitud si los genes del ARNt están ausentes (Tannock *et al.*, 1999; Tilsala-Timisjarvi y Alatosava, 1997; Berthier y Ehrlich, 1998; Nour, 1998 y Nakagawa *et al.*, 1994).

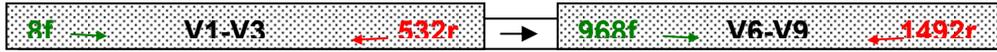
Cuadro 4.4
Secuencias de las regiones V1-V3 y V6-V9 del 16S ADNr de las BAL con potencial antagonista

| 81f → | V1-V3 | ← 532r | → | 968f → | V6-V9 | ← 1492r |
|---|-------|--------|--|--------|-------|---------|
| PS7 | | | | | | |
| 55 GGAGCTTGCTCCACCGAAAGAAAAGGAGTGGCGA ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCA GAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAC CGTATAACA TAGAAACCGCATGGTTTCTATTTG AAAGCGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCG CGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCA CCAAGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT GATCGGCCAATTGGGACTGAGACACGGCCAAA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGC AATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCTG AGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT GTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAAGTTTC ATCCC | | | 1015 TTCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGA TGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGT TAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACCTAGCGA GACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGA TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG GCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGA GTCGCGAAGTCNCGAGGCTAAGCTAATCTCTTA AAGCTTCTCTCAGTTGCGATTGTAGGCTGCAAC TCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGG GCTTTGTGATACACAC | | | |
| 467 | | | 1389 | | | |
| PS14 | | | | | | |
| 51 ATACATGCTAGTCGAGCGATGATTAAGATAGCT TGCTATTTTTATGAAGAGCGGCGAACGGGTGAGT AACCGGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACA ACGTTTGGAAACGAAACGCTAATACCGCATAACAA TGAGAATCGCATGATTCTTATTTAAAGAAGCAA TTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCTTGTATTA GCTAGTTGGTAGTGTAAAGGACTACCAAGGCGAT GATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG GAGGACGAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGC AACCCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAA GGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAA GAACGTTAAGTAGAGTGAAAATTACTTAAGTGA CGG | | | 1010 CGTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTCGG GACACGGGATACAGGTGGTGCATGTTGTCGTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCATC ATTAAGTTGGGCACCTAGTGAGACTGCCGGTG ATAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAAT CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT GCTACAATGGATGGTACAACGAGTCCGCAACCC GCGAGGGTGCCTAATCTCTTAAACCATTCTC AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC GCCGCGGTGAATACGTTCCCGG | | | |
| 495 | | | 1395 | | | |
| PS22 | | | | | | |
| 66 GCGATGATTAAGATAGCTTCTATTTTTATGAAGA GCGGCGAACGGGTGAGTAACCGTGGGAAATCTG CCGAGTAGCGGGGACAACGTTTGGAAACGAACG CTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCATGATTC TTATTTAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGAT GATCCCGCTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAA AGGACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTG AGAGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCGGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCAACG CCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGA | | | 1052 TCAGGTGGTATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAGTTGGG CACTCTAGTGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAG GAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA TGGTACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTGGC CTTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCCGATT GCAGGCTGCAACTCGCCCTGCATGAAGTCGGA TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG AATACGTTCCCGG | | | |
| 436 | | | 1396 | | | |

Números: posición del primer y último nucleótido respecto a la secuencia del 16S ADNr de *E. coli*.

Las bases resaltadas en colores indican las diferencias de la secuencia de la BAL problema con respecto a las secuencias publicadas por el NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Ps7; ● *E. malodoratus* EMA18339 y *E. raffinosus* ERA18296 ● *E. gilvius* AYO33814.1y *E. raffinosus* ERA18296 ● *E. raffinosus* ERA18296. **Ps14;** ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005 **Ps22;** ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005.



Ps23

83
 CTTGCTATTTTTATGAAGAGCGGGCAACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGA
 CAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCATAAC
 AATGAGAATCGCATGATTCTTATTTAAAAGAAGC
 AATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTAT
 TAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGGACTACCAAGGCG
 ATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGG
 CNACCCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGA
 AGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAA
 GAACGTTAGTAGAGTGGAAATTACTTAA

487

1030
 GGTTCTTCGGACCGGGATCAGGTGGTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTG
 CCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCC
 GGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAC
 GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCCAAC
 CGCGAGGTGCGCTAATCTCTTAAAACATTCTC
 AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGA
 AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACG
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGTTCTT

1398

Ps48

70
 TGATTAAGATAGCTTGCTATTTTTATGAAGAGCG
 GCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCG
 AGTAGCGGGGACAACGTTTGGAAACGAACGCTA
 ATACCGCATAACATGAGAATCGCATGATTCTTA
 TTTAAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGAT
 CCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGG
 ACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGA
 GGGTGTACGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CGGCAATGGGGCAACCCCTGACCGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTC
 TGTTC

449

1032
 GTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATG
 GTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGT
 TGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTG
 CCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
 CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACAC
 ACGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCCAA
 CCCGCGAGGGTGCCTAATCTCTTAAAACATTCT
 TCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC
 GCCCGGTGAATACGTTCCCGGTTCTTGTACACA
 C

1406

Ps95

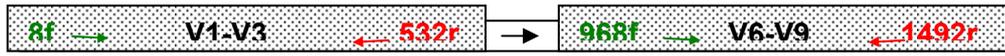
101
 GCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCG
 AGTAGCGGGGACAACGTTTGGAAACGAACGCTA
 ATACCGCATAACATGAGAATCGCATGATTCTTA
 TTTAAAAGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGAT
 CCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGG
 ACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGA
 GGGTGTACGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CGGCAATGGGGCAACCCCTGACCGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTC
 TGTGTTAGAGAAGACCGTTAAG
 TAGAGTGGAAA

474

1025
 GGAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGC
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGG
 GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACT
 AGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGA
 CTGCCGTTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
 CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTCGC
 CAACCCGCGAGGGTGCCTAATCTCTTAAAACCA
 TTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
 CACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGTTCTTGTAC
 ACAC

1402

Ps23, ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005. No se detectó la base A en la posiciones 441, 466 y 479 presentes en las secuencias de *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005 **Ps48**, ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005. No se detectó la base A en la posición 77 **Ps95**, ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005.



PS99

60
 TTGCTCCACCGAAAGAAAAGGAGTGGCGAACGGG
 TGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGG
 GGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTAT
 AACACAGTAGAAACCGCATGGTTCTATTGAAAGG
 CGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTG
 CATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAG
 GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCG
 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGG
 ACGAAAGTCTGACCAGCAACCGCCGCTGAGTGA
 AGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAG
 AGAAGAACAAGGATGAGAGTAAAGTTTC
 462

1018
 CCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATGTTAGTTG
 CCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
 GTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGT
 CCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTC
 AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGA
 AGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGCTACA
 1386

TA20

79
 ATAGCTTGCTATTTTTATGAAGAGCGCGAACCG
 GTGAGTAACCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGG
 GGGACAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCA
 TAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTAAAAG
 AAGCAATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCTT
 GTATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGGACTACCAA
 GGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
 TACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG
 GGGCAACCTGACCAGCAACCGCCGCTGAGTG
 AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTG
 446

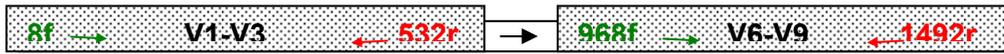
1027
 AAGGAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTA
 CTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGA
 GACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
 TACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTC
 CCCAACC CGGAGGGTGCCTAATCTCTTAAAAC
 CATCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCC
 TGCAATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
 AGCACCGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGT
 ACACAC
 1406

TA43

73
 TGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGA
 TCACCAGTGAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGTAACCTGCCCCGAGCGGGGATAACATTG
 GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGC
 CATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTA
 TCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAG
 TTGGTAAGGTAACGGcTTACCAAGGCGATGATGC
 ATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGcCAcAATGG
 AACTGAgACACGGTCCATACTCCTaCGGGAGGCa
 GCAGTAgGgAATCTTCCacaAtGGGCGCAAGCCT
 gATGG
 418

1091
 GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 tGCAACGAGCGCAACCTTGTACTAGTTGCCAG
 CATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTG
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGATC
 ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
 TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCG
 AGaGTaaGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTT
 CGGA
 1332

Ps99; ● *E. malodoratus* EMA18339 y *E. raffinosus* ERA18296 ● *E. gilvius* AYO33814.1 y *E. raffinosus* ERA18296 ● *E. raffinosus* ERA18296.
TA20, ● *L. garviae* AF352166.1 y *E. seriolicida* AFO61005
TA43, ● *L. reuteri* ABO17358.1



TA73

41
 GTCGACGAAACTTCTTTATCACCGAGTGCCTTGCACT
 CACCGATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
 CACGTGGGCAACCTGCCAAAAGAGGGGGATAACAC
 TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTA
 CCGCATGGCAACTATGTAAGGTTGGCTATGCTACC
 GCTTTTGGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGG
 TGAAGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCC
 GAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTTGGACTGAGA
 CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG
 CCGCTGGGTGAAGAANGTCTTCGGATCGTAAACCC
 TGTGT

444

1021

AGGACTTTCCTTCGGGGACAGAAATGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGT
 TGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATT
 GTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCA
 AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTTGGGGA
 TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACATGGACGGTACAACgAGT
 CGCAAGACCGCGAGGTTTAGCAATCTCTTAAA

1291

TA75

27
 CTAATACATGCAAGTCAACGAAACTTCTTTATCAC
 CGAGTGCCTTGCACTCACCAGATAAAGAGTTGAGTGGC
 GAACGGGTGAGTAAACACGTGGGCAACCTGCCAAA
 GAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCG
 CATAACCATAGTTACCGCATGGCAACTATGTAAGG
 GTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTTACCAAGGC
 AATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCA
 CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGA
 GGACGAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGC
 CTGATGGAGCAACCGCGCTGGGTGAAGAAGGTCTT
 CGGATCGTAAAACCTGTGTTAGAGAAAGAAAGTGC
 GTGAGAGTAACTGTTACGTTTCGCGGTAT

490

1022

GGACTTTCCTTCGGGGACAGAAATGACAGGTGGT
 CATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTT
 TAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCAAG
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTTGGGGATG
 ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
 ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTGC
 CAAGACCGCGAGGTTTAGCAAATCTCTTAAAGCC
 GTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCT
 ACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
 GCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCA

1410

TA76

53
 TTCTTTATCACCGAGTGCCTTGCACTCACCAGATAAAG
 AGTTGAGTGGNGAACGGGTGAGTAAACACGTGGGCAA
 CCTGCCAAAAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGG
 TGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGAA
 CTATGTAAGGTTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATG
 GGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGG
 CTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACCTGAGAGG
 TTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGTGGGTG
 AAGAAGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTTAGA
 GAAGAAGTGCCT

461

1096

AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGT
 TGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGTTGGGGATGACGT
 CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
 ACGTGTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAG
 ACCGCGAGGTTTAGCAAATCTCTTAAAGCCGTT
 TCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT
 GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
 GCCCGGTTGAATACGTTCCCGG

1389

TA73, ● *L. murinus* AF157049. ● *L. animalis* LBARR16SF ● *L. murinus* AF157049 y *L. animalis* LBARR16SF. No se detectó la base A en las posiciones 46 y 435.

TA75, ● *L. murinus* AF157049. ● *L. animalis* LBARR16SF ● *L. murinus* AF157049 y *L. animalis* LBARR16SF. No se detectó la base C en la posición 1031.

Ta76, ● *L. murinus* AF157049. ● *L. animalis* LBARR16SF ● *L. murinus* AF157049 y *L. animalis* LBARR16SF. No se detectó la base A en la posición 477 cuando se comparó con *L. animalis* LBARR16SF.

Cuadro 4.5
Comparación de las secuencias de las BAL problema con las publicadas en las bases de datos

| BAL problema | BAL más similar publicada en Genbank | Nº de bases diferentes | Similitud (%) |
|--------------|---|------------------------|---------------|
| Ps7 | <i>E. malodoratus</i> | 2 | 99,75 |
| | <i>E. gilvius</i> | 2 | 99,75 |
| | <i>E. raffinosus</i> | 6 | 99,23 |
| Ps14 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 1 | 99,87 |
| Ps22 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 2 | 99,72 |
| Ps23 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 5* | 99,36 |
| Ps48 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 2* | 99,73 |
| Ps95 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 2 | 99,74 |
| Ps99 | <i>E. malodoratus</i> | 2* | 99,74 |
| | <i>E. gilvius</i> | 2* | 99,74 |
| | <i>E. raffinosus</i> | 6* | 99,23 |
| TA20 | <i>L. garviae</i> y <i>E. seriolicida</i> | 1 | 99,86 |
| TA43 | <i>L. reuteri</i> | 1 | 99,82 |
| TA73 | <i>L. animalis</i> | 6 | 99,10 |
| | <i>L. murinus</i> | 7 | 98,95 |
| TA75 | <i>L. animalis</i> | 3* | 99,65 |
| | <i>L. murinus</i> | 4* | 99,53 |
| TA76 | <i>L. murinus</i> | 2 | 99,72 |
| | <i>L. animalis</i> | 3* | 99,58 |

El porcentaje de similitud se calculó dividiendo el número de bases iguales a la referencia (NCBI) por el número de bases total secuenciadas de la BAL problema. * Incluye deleciones.

La identificación de las BAL es una herramienta de gran valor en este estudio, ya que será posible conocer otros aspectos acerca de estas cepas. Hasta el momento solo se conocía su potencial antagonista frente a los microorganismos indicadores de microbiota contaminante de sangre de matadero en las condiciones evaluadas en los capítulos 2 y 3. Los resultados de este capítulo han demostrado que varias de las cepas que mostraron capacidad inhibidora en condiciones mesófilas y psicrótrofas pertenecían al mismo género y especie. El hecho de que fueran aisladas a partir de muestras recogidas en fechas distintas y procedente de distintos mataderos confirma que no se tratan de clones. En los siguientes ensayos en condiciones reales puede plantearse la utilización de una cepa de cada género y especie, aquellas que hayan mostrado tener el espectro de inhibición más amplio *in situ* o las que hayan dado niveles más elevados de inhibición frente a un microorganismo indicador en concreto. De ahora en adelante será posible comparar los resultados con referencias bibliográficas del campo de la bioconservación así como conocer antecedentes en relación con su aplicación como bioprotectores y los efectos que podrían tener en la salud de los consumidores.

A continuación se muestra una revisión global acerca de las cepas identificadas con relación a su espectro de inhibición, los posibles mecanismos de inhibición utilizados y algunas citas bibliográficas de interés.

Género *Lactococcus* spp.

Las BAL TA20, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 fueron identificadas como *Lactococcus garvieae* o su sinónimo *junior Enterococcus seriolicida* (Kusuda *et al.*, 1991). No hubo controversia en cuanto a la identidad de estas cepas, la identificación fue clara y los porcentajes de similitud de las 6 cepas mencionadas fueron mayores a 99% (cuadro 4.5).

En la bibliografía consultada sobre identificación de BAL *L. garvieae* se confundía con *Lactococcus lactis* cuando se utilizaban técnicas fenotípicas de identificación ya que estos dos microorganismos están estrechamente relacionados en este sentido. Se afirma que la prueba de la susceptibilidad a la clindamicina es la única prueba fenotípica que permite diferenciar *L. garvieae* de *L. lactis* y después de esta prueba está el ensayo de la PCR como test rápido útil para identificar específicamente y diferenciar estos dos

microorganismos (Zlotkin *et al.*, 1998; Eldar *et al.*, 1999). También es importante mencionar que en algunos casos se han producido equivocaciones sobre identificación de *L. garvieae* y *L. lactis* en informes clínicos (Elliot *et al.*, 1991).

En las publicaciones que tratan sobre *L. garvieae* es frecuente encontrar citas sobre su posible patogenicidad en mamíferos y peces y éste es un dato que preocupa en relación a su futura aplicación como cultivo bioprotector. Este microorganismo fue originariamente aislado de vacas con mastitis (Garvie *et al.*, 1981; Collins *et al.*, 1984) y se informó que éste y *L. lactis* estaban asociados con diferentes tipos de infecciones en humanos y animales (Elliot, 1991), pero su rol como agente infeccioso continúa siendo incierto o no está claro (Aguirre y Collins, 1993). Sin embargo, cepas pertenecientes a especies de *L. lactis* son utilizadas como cultivos *starter* en una variedad de productos lácteos fermentados y son generalmente reconocidas como microorganismos seguros (GRAS).

Un análisis sobre el potencial antagonista de *L. garvieae* en el presente estudio obliga a recurrir a una revisión de los niveles de inhibición conseguidos por TA20, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 frente a las bacterias indicadoras en los capítulos 2 y 3: En los ensayos en placa a 30°C la BAL TA20 fue capaz de formar halos de inhibición frente a *S. aureus*, *Bacillus*, *E. coli* y *P. fluorescens*. En las pruebas *in situ* a esta misma temperatura mostró capacidad de inhibir parcialmente el crecimiento de los mismos indicadores cuando se añadía glucosa (2%) en la sangre. Esta BAL (TA20) identificada como *L. garvieae* aislada a 30°C demostró capacidad de crecimiento a 15°C por tanto formó parte de la colección de BAL psicrótrofes con código Ps60. Los resultados de evaluación del potencial antagonista en condiciones psicrótrofes de Ps60 así como del resto de *L. garvieae* (Ps14, Ps22, Ps23, Ps48 y Ps95) fueron bastante afines. Todas formaron halos de inhibición en las pruebas en placa frente a las cuatro bacterias indicadoras autóctonas aisladas de sangre (*S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *Bacillus* spp.). En las confrontaciones en sangre con adición de glucosa (2%), la bacteria menos sensible a la inhibición fue *E. coli*. Se consiguió una inhibición máxima de 3 unidades logarítmicas.

P. fluorescens fue inhibida desde una unidad logarítmica por Ps48 y Ps60 hasta un máximo de 4 unidades logarítmicas por Ps95. *Bacillus* spp. fue claramente el indicador más sensible ya que su crecimiento se vio inhibido en mínimo 4 ordenes logarítmicos y en el caso de Ps48 la inhibición fue total.

Como se ha visto en el capítulo 3 como el crecimiento de *S. aureus* quedó inhibido a 15°C, la concentración del inóculo inicial se mantuvo durante todo el ensayo de confrontación excepto cuando se confrontó a Ps95 que fue capaz de inhibir el crecimiento de este indicador en un orden logarítmico.

Aún no se puede establecer cual fue el mecanismo de inhibición utilizado por las BAL identificadas como *L. garvieae* frente a cada bacteria indicadora pero a diferencia de los capítulos anteriores ha sido posible establecer una relación más directa y específica entre esta bacteria láctica y los metabolitos que puede sintetizar en base a estudios realizados por otros investigadores.

Villani *et al.* (2001) detectó y caracterizó la bacteriocina garviecin L1-5 producida por *L. garvieae* aislado de leche de vaca. Este es un dato importante ya que hasta el momento no se había detectado la formación de bacteriocinas por esta BAL. Se trata de una proteína de peso molecular de aproximadamente 2 KD. Su actividad antagonista se probó en placa mediante el método de difusión en agar en la que se confrontaba la bacteriocina pura a diferentes concentraciones frente a varias bacterias indicadoras Gram-positivas y Gram-negativas (*L. lactis*, *L. garvieae*, *Enterococcus faecalis*, varias cepas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutirinum* y *Clostridium sporogenes*). Garviecin L1-5 fue activo frente a especies estrechamente relacionadas con el microorganismo productor de esta bacteriocina, frente a todas las especies de *L. monocytogenes* y frente a las tres especies de *Clostridium* spp. probadas. No se produjo la inhibición del productor *L. garvieae* así como de las bacterias Gram-negativas.

Como se ha visto, en el presente estudio se consiguió una barrera frente organismos Gram-negativos, lo cual obliga a pensar que la BALTA20 utiliza algún otro mecanismo frente a *E. coli* y *P. fluorescens*. Una posibilidad es que el ácido láctico formado, además de ejercer su papel como sustancia antimicrobiana, también puede actuar como permeabilizador de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, y como consecuencia potenciar los efectos de otras sustancias antimicrobianas como por ejemplo, de las bacteriocinas (Alakomi *et al.*, 2000; Ouwenhand, 1998).

Género *Lactobacillus*

3 cepas de BAL fueron identificadas como *Lactobacillus murinus* o *Lactobacillus animalis* (TA73, TA75, TA76). Los porcentajes de similitud calculados fueron muy próximos como para decidir la verdadera identidad entre *L. murinus* y *L. animalis* en cualquiera de los tres casos. Los valores fluctuaron entre un mínimo de 98,95 y un máximo de 99,72% (cuadro 4.5). Si únicamente se tuviera en cuenta el número de bases diferentes entre las secuencias de las BAL problema y la de referencia del Genbank se podría decir que TA73 y TA75 se aproximan más a *L. animalis*, con 6 y 3 diferencias, y que TA76, con 2 diferencias correspondería a *L. murinus*.

La polémica acerca de la identificación entre *L. murinus* y *L. animalis* se presenta en muchos estudios realizados en este campo. En el manual de Bergey (1986) existe una cita que hace referencia a la semejanza entre las secuencias de ADN de estos dos microorganismos. Asimismo, en el informe correspondiente al *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* del 2001, el subcomité que trató sobre taxonomía bacteriana concretamente de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y organismos relacionados, se confirmó que el tema concerniente a la identificación de estas dos BAL es un problema que aún no ha sido resuelto. Concluyeron que la condición de especies separadas entre *L. murinus* y *L. animalis* debería verificarse cuando existan nuevos datos acerca del ARNr y de la homología de ADN. Uno de los científicos presentes (B. Pot) en dicha reunión aceptó hacerse cargo de los estudios de identificación mediante el método SDS-PAGE.

En un estudio realizado por Dewhirst *et al.*, (1999) que trataba sobre aspectos fenotípicos y filogenéticos de la microbiota murina, los resultados de los análisis basados en técnicas moleculares difirieron de la presunta identificación inicial de tres cepas identificadas previamente como *Lactobacillus acidophilus* (ASF 360), *Lactobacillus salivarius* (ASF 361) y *Bacteroides distasonis* (ASF 519) en base a criterios fenotípicos. Cuando se compararon las secuencias de 16S ARNr de ASF 360 y ASF 361 con las secuencias de *L. acidophilus* y *L. salivarius*, respectivamente, se demostró que eran totalmente diferentes a las secuencias de estos microorganismos con lo cual se concluyó en que no existía relación alguna. Por otro lado, la secuencia de ASF 361 era esencialmente idéntica a secuencias de cepas de *L. murinus* y *L. animalis* (ambos aislados de ratones), lo cual obliga a sospechar que todas ellas pertenecían a una misma especie. Según estos autores todos los resultados

apuntan a pensar que las cepas de tipo *L. murinus* y *L. animalis* pertenecen a una misma especie. En este estudio se vio como cepas de *L. murinus* aisladas del tracto intestinal de ratas y ratones eran iguales a *L. animalis* aislados de la placa dental y del tracto intestinal de algunos animales. Por lo tanto, es necesario resolver estos aspectos taxonómicos de *L. murinus* y *L. animalis* a través de un examen más profundo. La posibilidad de que estas especies sean las mismas ya había sido propuesta por Kandler y Weiss (1986). La denominación de *L. murinus* fue dada dos años antes que *L. animalis*, por tanto el nombre de *L. murinus* tendría prioridad sobre *L. animalis* de acuerdo con las reglas de la nomenclatura.

A pesar que la diferencia entre estas dos BAL no es una materia clara, se ha encontrado una cita en que se utiliza la denominación *L. animalis* (= *L. murinus*) referente a una patente europea de una vacuna oral propiedad de Shaw *et al.*, (2001).

Todas las BAL (TA73, TA75 y TA76) identificadas como *L. murinus/L. animalis* en el presente estudio fueron aisladas a 30°C, y además se incluyeron en la colección de psicrótofos con códigos Ps85, Ps86 y Ps87 ya que demostraron capacidad de crecimiento a 15°C en caldo MRS (capítulo 3). En cuanto a su potencial antagonista presentaron un espectro amplio de inhibición en placa en condiciones mesófilas (capítulo 2) frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *Bacillus* spp. autóctonos de sangre de matadero. Este hecho hizo que fueran seleccionadas para ser co-inoculadas en sangre con estos mismos indicadores a 30°C. Los resultados de inhibición *in situ* del capítulo 2 muestran como estas BAL también se vieron favorecidas en cuanto su potencial antagonista cuando se añadió glucosa (2%) a la sangre. *S. aureus* fue inhibido totalmente por las tres BAL. En cuanto al resto de indicadores las inhibiciones fluctuaron desde un orden logarítmico (TA76 vs *P. fluorescens*) hasta la inhibición total de *P. fluorescens* por TA75.

La evaluación de los microorganismos identificados como *L. murinus/L. animalis* no fue viable a 15°C ya que en las pruebas en placa fueron incapaces de crecer en picada en superficie de agar (cuadro 3.1) a esta temperatura, lo cual limitó su evaluación como antagonista en placa y su posible selección y utilización en las pruebas en sangre en condiciones psicrótrofas. Sin embargo, no se descarta que en futuros estudios se considere incluirlas en ensayos a bajas temperaturas confrontándolas a una diversidad de microorganismos

contaminantes en sangre sin que necesariamente pasen por la evaluación en placa, teniendo en cuenta que sí fueron capaces de crecer en medio líquido.

Respecto al mecanismo de inhibición utilizado por estas BAL no se pueden dar datos en este sentido. Tampoco se ha encontrado antecedentes sobre la aplicación de *L. murinus/L. animalis* como cultivo bioprotector en alimentos. Algunas publicaciones en el campo de medicina dental confirman que *L. murinus* presente en la cavidad oral de ratones es capaz de producir sustancias antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans* LG-1, *Streptococcus sanguis* Ny101 y *Actinomyces viscosus* Ny. (St-Amand y Lavoie, 1988). Asimismo los ensayos realizados por Dewhirst, *et al.* (1999) demostraron que la administración oral de una combinación de *Lactobacillus* spp. donde estaba incluida esta BAL protegía a ratones de laboratorio de colitis, síntoma de una grave enfermedad gastrointestinal causada por *Helicobacter hepaticus* en roedores.

De las 12 cepas, una de ellas (TA43) fue identificada como *Lactobacillus reuteri* con un porcentaje de similitud de 99,82%. Esta cepa fue aislada de sangre de matadero a 30°C y también fue incluida en la colección de BAL psicrótrofas con el código Ps77 (capítulo 3). La actividad inhibitoria en placa de esta cepa fue evaluada a 30°C y a 15°C, pero únicamente fue posible obtener resultados en condiciones mesófilas ya que no creció cuando se sembró en picada en superficie de agar APT en los ensayos de confrontación con los diferentes indicadores a 15°C (cuadro 3.1). Según Bergey (1986) *L. reuteri* no es capaz de crecer a 15°C. Asimismo, Klein *et al.* (1998) en su estudio sobre taxonomía y fisiología de bacterias lácticas probióticas observó que 3 cepas de *L. reuteri* no demostraron capacidad de crecimiento a 20°C y a 15°C. En este estudio hacía mención a la información dada por Holzapfel *et al* (1996) en la que confirmaba que la capacidad de crecimiento de *L. reuteri* a 20°C es negativa.

En cuanto al espectro de inhibición en placa se vio como TA43 formó halos frente a la totalidad de indicadores provenientes de colección y autóctonos aislados de sangre. Fue sin lugar a duda la BAL que presentó los resultados más prometedores en placa en condiciones mesófilas y por tanto la que se eligió para comenzar los primeros ensayos *in situ*. El efecto inhibitorio de esta BAL también se vio favorecido con la adición de glucosa al 2% en sangre. Consiguió inhibir en tres unidades logarítmicas a dos de los indicadores autóctonos o dianas importantes desde el punto de vista de futuras

aplicaciones: *E. coli* y *Bacillus* spp (rif+), la inhibición total de *P. fluorescens*, pero el crecimiento de *S. aureus* no fue inhibido por esta BAL.

L. reuteri es una bacteria láctica de gran interés como probiótico productor de bacteriocinas. Es usado en nutrición animal así como en productos lácteos fermentados y preparaciones farmacéuticas (Klein *et al*, 1998).

En cuanto al mecanismo de inhibición que puede haber utilizado TA43 frente a cada indicador existen varias posibilidades. Las cepas de *L. reuteri* además de ácidos orgánicos, son capaces de producir una variedad de compuestos antimicrobianos, como la reutericina, la reuterina y la reuter ciclina. Según, Gänzle *et al.*, (2000) no se puede afirmar si estos compuestos actúan juntos o si colaboran en la actividad inhibitoria global de *L. reuteri*. Sin embargo, la formación y actuación de estas sustancias antimicrobianas estará en función de la composición del medio donde se encuentre la BAL.

La reutericina corresponde al nombre de la bacteriocina que es capaz de producir esta BAL, la cual es un péptido sintetizado a nivel de ribosoma y cuyo espectro de inhibición está limitado a bacterias filogenéticamente muy próximas, en concreto a otras bacterias lácticas (Ouwenhand, 1998). La reuterina se encuentra dentro de la clasificación de sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular y es producida por algunas cepas de *L. reuteri* a partir del catabolismo del glicerol en condiciones de anaerobiosis (Ouwehand, 1998; Casas *et al.*, 1998).

La reuter ciclina es una sustancia antimicrobiana que fue caracterizada por Gänzle *et al.*, (2000) descrita como un nuevo derivado del ácido tetrámico sintetizada por *L. reuteri* LTH2584. Esta sustancia tiene un amplio espectro de inhibición frente a diferentes indicadores, entre ellos *Lactobacillus* spp., *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus* e incluso frente a un mutante de *E. coli*.

La síntesis de la reuter ciclina así como su actividad antimicrobiana estará en función de la fuente de ácidos grasos utilizada. Por ejemplo, la utilización de Tween 80 (polioxietileno sorbitol monooleato) como emulsificante y/o fuente de ácidos grasos aumenta la producción de esta sustancia en caldo MRS y como consecuencia se incrementa la actividad inhibitoria. Probablemente la actividad antimicrobiana de TA43 frente a los indicadores en las pruebas en placa del capítulo 2 podría estar relacionada con la producción de reuter ciclina si se considera que uno de los componentes del medio APT utilizado para realizar las confrontaciones en placa es precisamente Tween 80.

El efecto inhibitorio demostrado en sangre por parte de TA43 podría relacionarse con la formación de reuterina. Se sabe que para que *L. reuteri* sintetice esta substancia es necesaria la presencia de glicerol. A pesar que no se agregó glicerol a las muestras, la sangre contiene una cantidad suficiente de este compuesto para sospechar que la BAL haya podido formar reuterina. Debe considerarse que está demostrado que los microorganismos más sensibles frente a la reuterina son los Gram-negativos (Gänzle *et al.*, 2000) que en el caso del presente estudio se trataría de *P. fluorescens* y *E. coli*. En caso de que TA43 haya utilizado otra fuente natural de ácidos grasos de la sangre no se descartaría la síntesis de reuteriniclina.

Género *Enterococcus* spp.

En el cuadro 4.5 se observa que 2 cepas (Ps7 y Ps99) pertenecían al género *Enterococcus*. Las secuencias de estas BAL son semejantes a las de tres especies: *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus gilvius* y *Enterococcus raffinosus*. Ps7 mostró un porcentaje de similitud de 99,75% a *Enterococcus malodoratus* y *Enterococcus gilvius* y Ps99 mostró una similitud de 99,74% cuando frente a estos dos microorganismos. Las secuencias de ambas BAL presentaron el mismo valor de 99,23% de similitud cuando se alinearon a la secuencia de *Enterococcus raffinosus*. Todos los valores de similitud son elevados como para tomar una decisión definitiva sobre la identidad de Ps7 y Ps99. En principio no se descartaría ninguna de las tres posibilidades.

Quizás si se realizaran pruebas fenotípicas complementarias se podría llegar a aclarar esta duda. En el manual de Bergey (1986) en el apartado que trata sobre estas especies se ve como *E. malodoratus* no es capaz de crecer a 45°C a diferencia de *E. raffinosus*. Asimismo la reacción de Voges-Proskauer es negativa para *E. malodoratus* y positiva para *E. raffinosus*. En cuanto a *E. gilvius* no se han encontrado datos sobre características fenotípicas en este manual, ya que se trata de una especie nueva caracterizada por Tyrrel, *et al* (2002). Este investigador presenta un resumen de características fenotípicas en el cual se ve que la reacción de reducción de tetrazolio es positiva en el caso *E. gilvius* y negativa para *E. malodoratus*. La producción de ácido a partir de arabinosa y de metil- α -D-glucopiranososa es claramente negativa, a diferencia de *E. raffinosus*. Por tanto se podrían plantear algunos ensayos

complementarios al presente estudio en los cuales se utilice estas herramientas para discernir la identidad de Ps7 y Ps99.

Hasta el momento sólo conocemos que estas dos BAL pertenecientes al género *Enterococcus* presentaron capacidad antagonista frente a las bacterias indicadoras utilizadas en este estudio tanto *in vitro* como en sangre a 15°C. Debe considerarse que en el futuro sería necesario un análisis más profundo acerca de los posibles efectos de su utilización como cultivos bioprotectores sobre la salud, teniendo en cuenta que el objetivo final es que se utilice en la bioconservación de sangre destinada a la producción de aditivos o productos alimentarios para consumo humano.

Según Franz *et al.* (1999) a las bacterias del género *Enterococcus* se les han atribuido características beneficiosas en cuanto a su aplicación como *starters* en alimentos y en otros casos perjudiciales. Por ejemplo, en algunos quesos el crecimiento de estos microorganismos contribuye beneficiosamente en la maduración y el desarrollo del olor del producto. Sin embargo en algunos productos cárnicos, pueden sobrevivir a tratamientos con altas temperaturas y como consecuencia causar la alteración en almacenamiento. También se sabe que se utilizan como probióticos para mejorar el balance de la microbiota intestinal o como tratamiento de la gastroenteritis en humanos y animales (Klein *et al.*, 1998).

La correcta identificación de las especies tiene gran importancia tanto para la microbiología médica como para el campo de la microbiología de alimentos. Por ejemplo un organismo implicado en casos clínicos necesita ser identificado correctamente con el fin de aplicar un tratamiento con el antibiótico apropiado, ya que los patrones de susceptibilidad difieren considerablemente entre especies y en el campo de la microbiología de alimentos la correcta identificación a nivel de especie es importante si se pretende utilizar un organismo perteneciente a este género como *starter* y asegurándose de que su aplicación no acarreará problemas o riesgos a la salud del consumidor final (Morrison *et al.*, 1997).

Las bacterias del género *Enterococcus* como habituales colonizadores del intestino pueden servir como indicadoras de contaminación fecal, por tanto tienen particular importancia en el campo de la salud pública. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* pueden considerarse sospechosos de ser los agentes causantes de enfermedades ocasionadas por alimentos contaminados, sin embargo esta hipótesis aun no está confirmada (Stiles, 1989; MSDS, 2003).

A excepción de estas dos BAL al resto de bacterias pertenecientes a este género raramente se ha relacionado o involucrado en patogenicidad en humanos (Jett *et al.*, 1994). Este dato es esperanzador si se pretende aplicar Ps7 y Ps99 en bioconservación de sangre de cerdo.

Estas bacterias identificadas como *E. malodoratus*/*E. gilvius*/*E. raffinosus* pertenecen a la colección de BAL psicrótrofas. Ambas formaron halos de inhibición a 15°C frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* y a *Bacillus* spp. (cuadro 3.1). Debido a su amplio espectro de inhibición en placa se seleccionaron y se co-inocularon con los mismos indicadores en los ensayos *in situ*, donde también mostraron ser muy activas frente a estos mismos indicadores. Las inhibiciones conseguidas en sangre por Ps7 y Ps99 fueron parciales desde 1 orden logarítmico (Ps7 vs *E. coli*) hasta más de 4 ordenes logarítmicos (Ps7 vs *P. fluorescens* y *Bacillus* spp). No se registraron inhibiciones totales frente a ninguno de los indicadores.

Las sustancias antimicrobianas desarrolladas por Ps7 y Ps99 no se han investigado, sería un punto a tener en cuenta en futuros estudios. Las cepas pertenecientes al género *Enterococcus*, incluidos *E. faecium* y *E. faecalis* son conocidas por ser productoras de bacteriocinas. Ejemplos de las enterocinas mejor caracterizadas son la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996), la enterocina B (Casaus *et al.*, 1997), Enterocina P (Cintas *et al.*, 1997), Enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998). En función de la vía por la cual son producidas o a sus características fisico-químicas se les engloba dentro de la clasificación de las bacteriocinas (clases I, II y III). Cada una de ellas tiene una actividad antimicrobiana específica pero en algún caso como por ejemplo las Enterocinas L50A y L50B muestran actividad sinérgica cuando se utilizan juntas (Cintas *et al.*, 1998).

Aún no se utilizan a escala industrial cultivos *starters* del género *Enterococcus*, pero ya se ha descrito su actividad anti-listeria durante la maduración de quesos y la inhibición de *Clostridium tyrobutyricum* causante del abombamiento (*blowing*) de quesos durante el almacenamiento (Franz *et al.*, 1999). Las cepas del género *Enterococcus* son principalmente usadas en alimentación de cerdos y aves de corral. Sin embargo, existen productos farmacéuticos que contienen estos microorganismos como cultivos probióticos destinados a terapias de casos clínicos en seres humanos. El género *Enterococcus* encierra diferentes especies pero solo dos de ellas son importantes como probióticos: *E. faecium* es principalmente usado en animales pero también se aplica en casos de seres

humanos, mientras que *E. faecalis* es principalmente usado como probiótico en seres humanos (Klein *et al.*, 1998).

4.5 CONCLUSIONES

1. La secuenciación del segmento V1-V3 del 16S DNAr ha permitido identificar 7 BAL a nivel de género y especie y en el caso de las 5 restantes ha conducido a dudar entre un número muy reducido de especies muy próximas entre sí.
2. Las bacterias que habían mostrado actividad antagonista en condiciones psicrótrofas fueron identificadas como *Lactococcus garvieae* o su sinónimo *Enterococcus seriolicida* (Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95) y *Enterococcus malodoratus/Enterococcus gilvius/Enterococcus raffinosus* (Ps7 y Ps99).
3. Todas las BAL con actividad antagonista en condiciones mesófilas pertenecían al género *Lactobacillus*. TA73, TA75 y TA76 se identificaron como *Lactobacillus murinus/Lactobacillus animalis*. TA43 se identificó como *Lactobacillus reuteri*.
4. La BAL TA20 que demostró capacidad antagonista en condiciones mesófilas y psicrótrofas se identificó como *Lactococcus garvieae*.

Capítulo 5 Conservación de las cepas con potencial antagonista

5.1 OBJETIVOS

El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial para las actividades de investigación o industriales basadas en la actuación de estos microorganismos. Las cepas valiosas se tienen que conservar durante largos periodos de tiempo libres de cambios fenotípicos adversos (Tamime y Robinson, 1991).

La denominación como GRAS y la aplicación de BAL como cultivo iniciador (*starters*) de productos fermentados ácidos de origen animal y vegetal, como bioconservador o como agentes probióticos ha incrementado cada vez más el interés por conservar estos microorganismos por periodos largos en almacenamiento sin que pierdan sus propiedades (Mauriello *et al.*, 1999).

Los cultivos se pueden mantener activos mediante refrigeración si el periodo de almacenamiento es corto y mediante congelación o deshidratación para largos periodos de tiempo (Dhingra y Sinclair, 1985).

Un cultivo de aplicación industrial tiene que reunir unas determinadas características: (1) Contener el máximo número de células viables (2) Estar libre de contaminantes (3) Ser activo en las condiciones de procesamiento.

El objetivo del presente capítulo fue encontrar el método de conservación más adecuado para mantener la viabilidad durante periodos de almacenaje prolongados de cultivos de 12 BAL con potencial antagonista demostrado frente a microorganismos deteriorantes de sangre de cerdo procedente de matadero industrial en los capítulos 2 y 3.

No existe un método universal para mantener los cultivos de microorganismos. La selección del método tiene que basarse en la naturaleza del cultivo y en las ventajas e inconvenientes del método escogido. Si el microorganismo aún no se conoce del todo es aconsejable utilizar varios métodos de conservación (Dhingra y Sinclair, 1985).

Se comparó la eficacia de diferentes métodos de conservación: liofilización, atomización y congelación a -80°C .

La congelación era el método que se había utilizado hasta el momento para conservar las colecciones de BAL mesófilas y psicrótrofas en este trabajo. El espectro de inhibición demostrado por estas cepas tanto en placa como en sangre co-inoculada exige el planteamiento de la realización de pruebas en sangre contaminada en condiciones reales, lo cual puede conllevar a la

necesidad de trasladar los cultivos y una idea más ambiciosa engloba su aplicación como bioprotectores a nivel industrial. Por tanto se consideró necesario evaluar métodos de conservación alternativos a la congelación para estas bacterias.

La liofilización, es un proceso de secado cuyo principio consiste en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente del estado sólido al estado de vapor, sin pasar por el estado líquido (Casp y Abril, 1999).

La liofilización es un buen sistema de conservación de cultivos de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación (Mafart y Beliard, 1994; Casp y Abril, 1999).

La atomización es un proceso de secado por arrastramiento que consiste en pulverizar el producto en finas gotas que se ponen en contacto con una corriente de aire caliente que actúa tanto de fluido calefactor como de fluido vehiculador. Se produce una evaporación inmediata que transforma las gotitas en partículas sólidas, en forma de polvo, que se separan del aire de manera continua gracias a un ciclón localizado a la salida de la cámara de secado (Mafart y Beliard, 1994).

La calidad del producto tratado no se altera mucho debido a que la intensa evaporación protege el producto del efecto que tendría la elevada temperatura del aire caliente (el proceso de evaporación absorbe buena parte del calor aportado). En realidad la energía aportada en forma de calor cede al producto el calor latente de vaporización haciendo que el incremento de temperatura de las partículas (debido al calor sensible) sea muy bajo. Además, la tasa de reacciones degradativas disminuye a bajos contenidos de humedad, y eso favorece que el corto tiempo de exposición de la partícula seca a temperaturas elevadas (entre 4 y 6 segundos si se utiliza un nebulizador a presión y hasta 30 segundos si el nebulizador es centrífugo) no comporte un deterioro importante del producto (Mafart y Beliard, 1994).

La atomización se presenta como un método alternativo de deshidratación de cultivos relativamente nuevo y más económico frente a la liofilización que es el método más utilizado hasta el momento para estos fines.

Los objetivos concretos fueron:

- a) Determinar el agente crioprotector más adecuado para obtener un elevado porcentaje de recuperación de células viables en los cultivos liofilizados.
- b) Estudiar las características del medio de suspensión (composición y pH) y los parámetros de proceso más adecuados para obtener una buena recuperación de células viables en cultivos deshidratados por atomización.
- c) Comparar dos condiciones de almacenamiento para mantener la viabilidad de los cultivos deshidratados: temperatura ambiente (20°C) y refrigeración (5°C).
- d) Evaluar y comparar la estabilidad de los cultivos congelados y deshidratados mediante liofilización y atomización durante un periodo de almacenamiento de 60 días.

5. 2 MATERIAL y MÉTODOS

5.2.1 Bacterias ácido lácticas

Las 12 BAL utilizadas en los ensayos de este capítulo fueron las seleccionadas en los capítulos anteriores en función a su potencial antagonista en placa e *in situ* frente a microbiota habitual contaminante de sangre. 5 de ellas (TA20, TA43, TA73, TA75 y TA76) provenían de la colección de BAL mesófilas las cuales demostraron su capacidad de inhibir a *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* a 30°C. Las 7 cepas restantes (Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95, Ps99) provenían de la colección de BAL psicrótofas, que demostraron su potencial antagonista frente a los mismos indicadores pero a temperaturas más bajas (15°C).

5.2.2 Diseño experimental

En la figura 5.1 se observa el esquema del diseño experimental planteado en este estudio. Los ensayos se llevaron a cabo en dos etapas principales. La primera etapa (I) correspondió a las pruebas que se realizaron para establecer las condiciones para liofilizar y atomizar los cultivos y en la segunda etapa (II) se realizó la comparación de los tres métodos de conservación que se pretendían evaluar.

En la etapa I se trabajó únicamente con dos cepas, una proveniente de la colección de BAL mesófilas (TA73) y otra proveniente de la colección de BAL psicrótofas (Ps7).

Para el caso de la liofilización el objetivo fue la determinación del agente crioprotector y la temperatura de almacenamiento de los cultivos deshidratados más adecuadas. Se probó glucosa al 10%, lactosa al 12% y leche desnatada al 20% (Costa *et al.*, 2000). Todos los cultivos fueron almacenados a 2 temperaturas (5 y 20°C) y se realizaron recuentos poblacionales a los 0, 5, 15, 30 y 60 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En función de los valores de viabilidad conseguidos se eligió el agente crioprotector y la temperatura de almacenamiento para realizar la comparación de los tres sistemas de conservación con el resto de las cepas seleccionadas.

En cuanto a la atomización se realizaron pruebas preliminares para establecer las condiciones de trabajo: medio de resuspensión de los cultivos, el pH del medio, parámetros del proceso de atomización (temperatura de entrada y de salida del equipo). Se probó resuspender las BAL en caldo MRS y en leche en polvo descremada reconstituida al 20%. Se evaluaron diferentes condiciones de temperatura de proceso y pH del medio.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo en función de los valores de viabilidad y el porcentaje de humedad, los dos cultivos se atomizaron y se almacenaron a 20°C y 5°C. Se realizaron recuentos a los 0, 5, 15, 30 y 60 días. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

En la etapa II se compararon los tres métodos de conservación utilizados en función de la estabilidad de los cultivos. Se trabajó con el resto de cepas en el caso de la liofilización y la atomización, y con la totalidad de cepas en el caso de la congelación. Se atomizaron y liofilizaron las 10 cepas restantes a las condiciones de trabajo y almacenamiento determinadas en la etapa I. Se realizaron recuentos poblacionales a los 0, 30 y 60 días. Se congelaron las 12 cepas a -80°C y se realizaron recuentos a los 0, 15, 30 y 60 días.

5.2.3 Obtención del cultivo de BAL

A partir de cultivos puros conservados en congelación se sembraron las diferentes cepas en superficie por agotamiento en agar MRS y se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante 48-72h a 30°C. Transcurrido este tiempo, de cada una de las placas se tomó una colonia aislada, se sembró en caldo MRS, y se incubó durante 24h a 30°C.

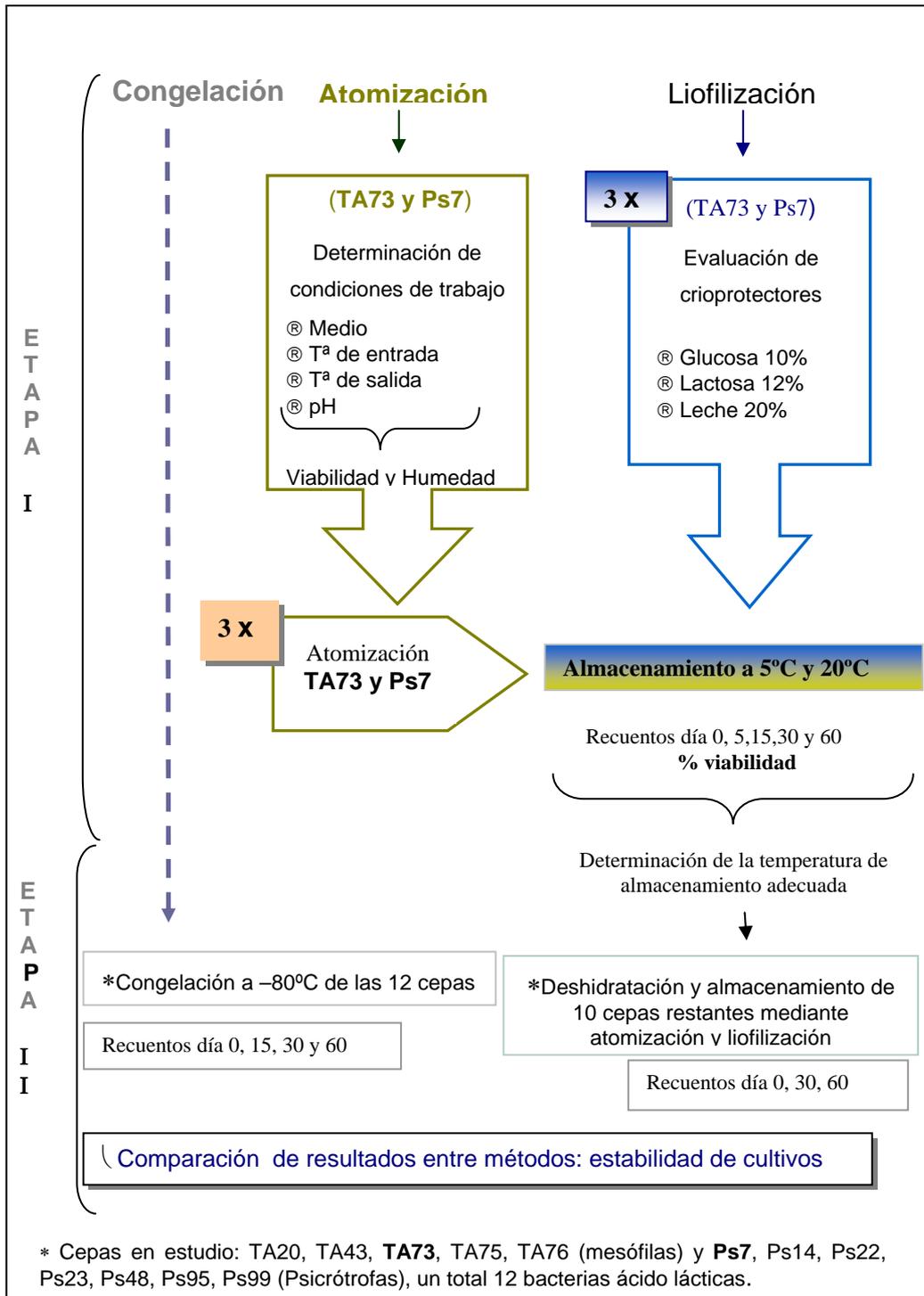


Figura 5.1 Esquema del diseño experimental

5.2.4 Liofilización

La liofilización se realizó con un equipo Virtis Unitop SQ (figura 5.2) (The Virtis Co., New York, USA). Este equipo tiene un mecanismo de refrigeración que contiene de 1-5 estantes móviles unido a un VirTis Freezemobile de 12 litros. Los estantes tienen bandejas de dimensiones 25,4 x 50,8 cm y su temperatura puede ser regulada entre -50 y +65°C.

Se trabajó a una temperatura de congelación de -80°C. La cámara de liofilización tenía unas condiciones de temperatura de -15°C en la primera desecación y de 15°C en la segunda desecación. El vacío fue de 40 Pa, y la temperatura de la trampa de vacío fue de -50°C.

• Etapa I

Las cepas utilizadas en la etapa I (Diseño experimental apartado. 5.2.2) fueron TA73 y PS7. Se sembró 1 mL del inóculo de cada BAL obtenido según el apartado 5.3.3 en tres recipientes de 45mL de caldo MRS y se incubaron durante 24h a 30°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm a una temperatura 20-25°C durante 20 minutos. Seguidamente, los sobrenadantes se reemplazaron por los diferentes agentes crioprotectores: leche desnatada en polvo (Scharlau, ref. 06.619) al 20%, glucosa (Panreac, ref. 141341) al 10% y lactosa (OXOID L70) al 12% (la glucosa y lactosa se esterilizaron en un autoclave a 121°C durante 15 minutos y la leche descremada se pasteurizó a 90°C durante 30 minutos).

Los 45 mL de muestra con cada uno de los crioprotectores se homogeneizaron y se repartieron en 10 viales de vidrio estériles de 2 mL de capacidad, un recipiente de cristal de 24 mL que se destinó a la determinación de la humedad y 1mL al recuento de la población de células viables iniciales. Era importante que todas las muestras tuvieran una altura semejante con el fin de conseguir que la transferencia de calor fuera homogénea a través de las bandejas del liofilizador y así obtener valores iguales de humedad. Se congelaron las muestras y seguidamente los viales y los recipientes de cristal se depositaron en el interior de la cámara de desecación del liofilizador donde tuvo lugar la sublimación del agua (figura 5.2).

De las 10 muestras liofilizadas con cada crioprotector, 5 viales se almacenaron a 5°C y 5 viales a 20-25°C.

Para realizar los recuentos se rehidrataron los cultivos con 2 mL de agua estéril y, una vez homogenizados, se procedió a realizar un banco de diluciones en agua de triptona para la posterior siembra en profundidad en MRS agar e incubación a 30°C en anaerobiosis durante 24-48h.

Se calculó la viabilidad según el apartado 5.2.5 para cada agente crioprotector y temperatura de almacenamiento.

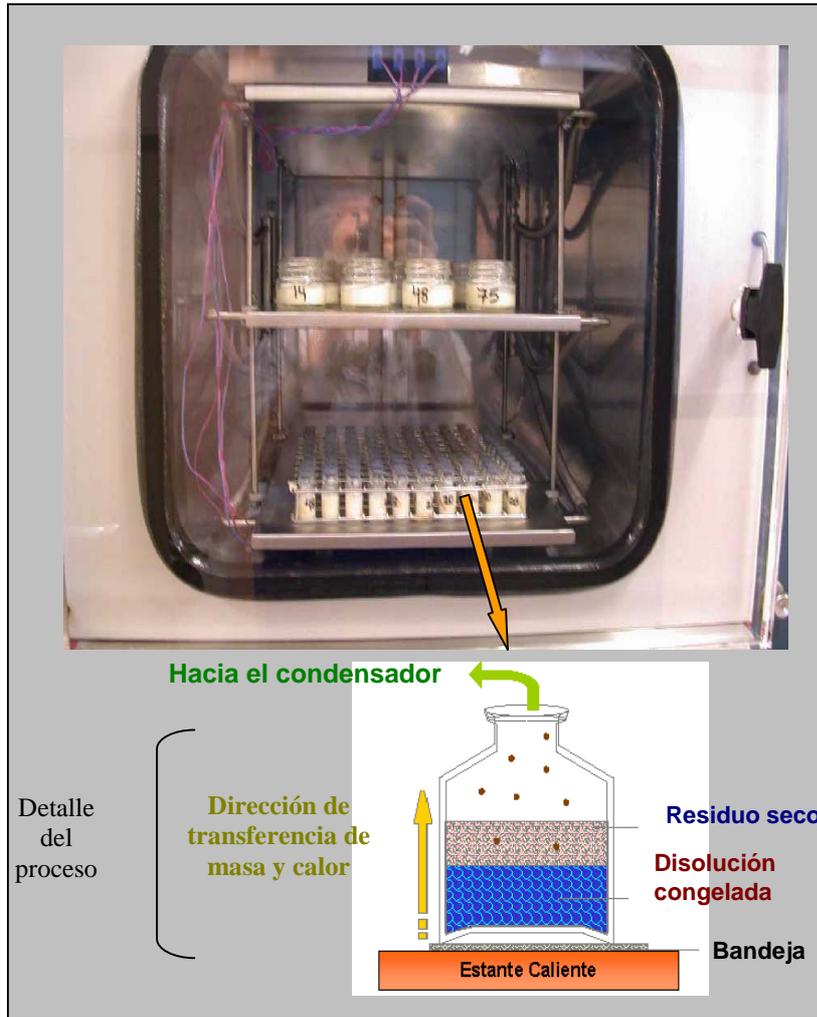


Figura 5.2 Deshidratación de la muestra mediante el método de la liofilización. Equipo de liofilización modelo VirTis Unitop SQ Drying Chamber + VirTis Freezemobile.

A partir de los resultados obtenidos se determinó el crioprotector y la temperatura de almacenamiento más adecuados.

• Etapa II

En la etapa II (Diseño experimental apartado 5.2.2) se liofilizaron el resto de cepas con el crioprotector más adecuado:

- Mesófilas: TA20, TA43, TA75 y TA76.
- Psicrótrofas: Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 y Ps99.

Las muestras se almacenaron a la temperatura determinada en la etapa I como la más adecuada.

5.2.5 Determinación de la viabilidad

El porcentaje de supervivencia de los diferentes cultivos se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\frac{X_f}{X_o} \times 100 \quad \text{-----} \quad (1)$$

Donde,

X_f corresponde al número de ufc/mL después del proceso de liofilización y posterior reconstitución.

X_o corresponde al número de ufc/mL antes de la deshidratación.

La estabilidad o viabilidad de los cultivos durante el almacenamiento se expresa como la relación entre el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) después del tiempo transcurrido en almacenamiento (X_f) y el número de unidades formadoras de colonias por mililitro en el momento inicial (X_o).

X_f y X_0 se calculó a partir del ajuste por regresión lineal de los recuentos de supervivientes según la expresión:

$$\log_{10}X_f = \log_{10}X_0 - K t \quad (2)$$

Asumiendo que la mortalidad bacteriana sigue una cinética exponencial de 1^{er} orden:

$$X_f / X_0 = e^{(-Kt)}$$

Donde,

K corresponde al valor de la pendiente de la recta de regresión de la representación gráfica del logaritmo de la población (\log_{10} ufc/mL) en función del tiempo.

t corresponde al valor del tiempo transcurrido en almacenamiento.

En los casos de disminución de la población o pendiente negativa se calculó el tiempo de reducción decimal (valor D) que se define como el tiempo necesario para que una población microbiana disminuya en un 90% o un orden logarítmico a una cierta temperatura y que matemáticamente es equivalente a la inversa de la pendiente de la recta de regresión ($1/K$).

5.2.6 Atomización

El equipo de atomización utilizado fue un Büchi Mini Spray Dryer, modelo B191 (figura 5.3) (Büchi Labortechnik AG, Switzerland). En este equipo el producto atomizado y el aire de desecación circulan en el mismo sentido. Tiene una potencia de 2900 Watt. La pulverización se consigue por aplicación de presión. El rendimiento óptimo de pulverización se consigue mediante aire comprimido con una presión de 5-8 bar. La temperatura máxima es 220°C, y la máxima potencia de secado es de 1,5 kg agua/hora y el rendimiento máximo del aire es aproximadamente de 60 m³/hora. Está equipado con un limpiador neumático de la tobera que funciona con aire comprimido a una presión de 4,5 bar.

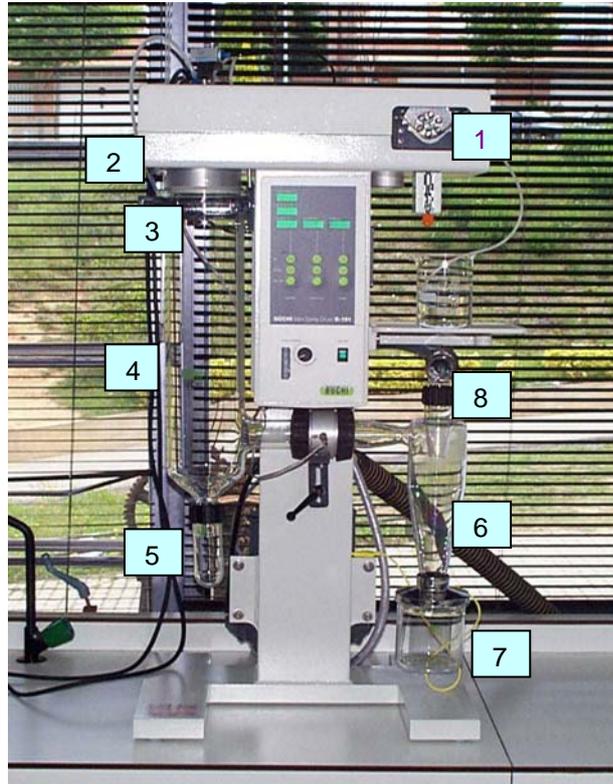


Figura 5.3 Equipo de atomización Büchi Mini Spray Dryer B-191 y sus componentes:

- (1) Bomba de alimentación.
- (2) Entrada de aire caliente.
- (3) Inyector-atomizador.
- (4) Cámara de deshidratación o atomización. Se da la transferencia de calor y materia.
- (5) Tubo colector.
- (6) Ciclón separador. Es un equipo de separación que permite separar el producto deshidratado en forma de partículas de polvo del flujo de aire húmedo.
- (7) Recipiente de recogida de producto en polvo.
- (8) Conducción de salida del aire y vapor de agua.

5.2.6.1 Preparación de la muestra

- **Caldo MRS**

La primera prueba consistió en atomizar el cultivo de la cepa TA73. Se sembró el inóculo de BAL obtenido según el apartado 5.2.3 en caldo MRS y se incubó durante 24h a 30°C. Seguidamente se atomizó en las condiciones especificadas en el cuadro 5.1.

- **Leche en polvo**

El inóculo de BAL obtenido según el apartado 5.2.3 se centrifugó a 4000 rpm a temperatura ambiente (20-25°C) durante 20 minutos. El sobrenadante se reemplazó por 1mL de agua de triptona, de esta forma el inóculo se concentró 10 veces.

La leche en polvo descremada se reconstituyó a una concentración del 20% y se complementó con extracto de levadura (OXOID, L21) al 0.5%, el cual se añadió para estimular el crecimiento de las BAL. La leche se preparó según la metodología de Gardiner *et al.* (2000). Se pausterizó a 90°C durante 30 minutos. Se prepararon 400mL de leche y se repartieron en dos alícuotas de 200mL cada una. La leche fue inoculada con el cultivo concentrado a una concentración final del 1% e incubó a 37°C durante 4-5h, ya que anteriormente se había determinado que sería el tiempo necesario para que no se produjera coagulación. Posteriormente se sometió al proceso de deshidratación.

5.2.6.2 Proceso de atomización

- **Etapa I**

5.2.6.2.1 Pruebas preliminares

Se realizaron diferentes pruebas con el objetivo de definir los parámetros adecuados de trabajo (cuadro 5.1). Éstos debían permitir obtener un producto deshidratado con una humedad suficientemente baja para garantizar la

estabilidad de los cultivos y un máximo porcentaje de recuperación de células viables.

Se probó utilizar los parámetros recomendados por Gardiner *et al.* (2000) con una temperatura de entrada de 170°C.

Cuadro 5.1
Diferentes condiciones evaluadas en las pruebas preliminares de atomización

| BAL | Medio | T ^o _E | T ^o _s | pH | Flujo |
|-------------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|---------|----------|
| TA 73 | Caldo MRS | 170°C | 90-91°C | - | 553 mL/h |
| TA 73 | Leche | 170°C | 90-91°C | 5,5-5,8 | 553 mL/h |
| TA 73 | Leche | 160°C | 80-85°C | 6,7-7 | 433 mL/h |
| TA 73, PS 7 | Leche | 170°C | 80-85°C | 6,7-7 | 670 mL/h |

Una vez obtenida la leche fermentada líquida se realizaron los recuentos en agar MRS para conocer la población de cada BAL y se calculó el porcentaje de humedad.

El porcentaje de supervivencia de los diferentes cultivos después del proceso de atomización se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ supervivencia} = (X_f / X_0) \times 100$$

Donde X₀ es el número de ufc/g de extracto seco antes de la deshidratación y X_f es el número de ufc/g de extracto seco en el polvo obtenido después del proceso de atomización (Gardiner *et al.*, 2000).

El porcentaje de humedad se determinó como el porcentaje de peso perdido por desecación de la muestra a 102°C durante 24h (ISO R-1442).

En función de la supervivencia de los cultivos y el porcentaje de humedad se eligieron las condiciones de trabajo más aceptables.

5.2.6.2.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento

Se atomizaron las muestras (TA73 y Ps7) a las condiciones determinadas anteriormente. El polvo obtenido de cada deshidratación se repartió en dos recipientes de polietileno estériles que fueron almacenados a 5°C y a temperatura ambiente (20-25°C). Seguidamente se determinó la humedad de cada muestra.

El primer recuento del fermento en polvo se realizó a las 24h de haber realizado la atomización. Se diluyó 0,1 g de polvo en 9,9mL de agua de triptona, y se dejó reposar durante una hora para que se rehidratare totalmente (dilución de 10^{-2}) (Gardiner *et al.*, 2000). Transcurrido este tiempo, se realizó un banco de diluciones decimales en agua de triptona y se sembró en profundidad en agar MRS. Se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 24-48h a una temperatura de 30°C.

Se realizaron recuentos y se calculó la supervivencia de células viables después del proceso y la viabilidad correspondiente a cada período de tiempo (0, 5, 15, 30 y 60 días) a partir de las fórmulas (1) y (2) del apartado 5.3.6 en ufc/g extracto seco.

- **Etapa II**

5.2.6.3 Atomización de la totalidad de las cepas

El resto de cepas en estudio, mesófilas (TA20, TA43, TA75 y TA76) y psicrótrofas (Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 y Ps99) se deshidrataron en las condiciones establecidas según los resultados de la etapa anterior. Se almacenaron y se hicieron recuentos del número de células viables a los 0, 30 y 60 días (figura 5.1).

5.2.7 Congelación

Con el fin de evaluar la estabilidad de los cultivos de BAL (TA20, TA43, TA73, TA75, TA76, Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95 y Ps99) utilizando la congelación como método de conservación, se sembró 1mL del cultivo

obtenido (apartado 5.2.3) en 9mL de caldo MRS. Nuevamente se incubó a 30°C durante 24h. Los cultivos conseguidos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Se eliminó el sobrenadante y se le añadió al pellet 5mL de una solución compuesta por glicerol al 40%, como agente crioprotector y caldo MRS en proporción 1:1. La mezcla se homogenizó y fue distribuida en crioviales de congelación estériles de 2mL de capacidad.

5.2.7.1 Almacenamiento

Los crioviales fueron guardados a -80°C para posteriormente determinar la viabilidad de los cultivos después de diferentes periodos de almacenaje: 0, 15, 30 y 60 días (figura 5.1).

El equipo utilizado fue un congelador Sanyo Ultra-Low Temperatura Freezer modelo MDF-U5186S (Sanyo Electric Co., Ltd.).

5.2.7.2 Determinación de la población de BAL

La población contenida en el criovial en cada período de tiempo se determinó por medio de recuento en placa, para lo cual se realizó un banco de diluciones decimales de la muestra descongelada en agua de triptona y posterior siembra en profundidad en agar MRS. La incubación se realizó en condiciones de anaerobiosis a 30°C durante 24-48h. Posteriormente se calculó la viabilidad correspondiente a cada período de tiempo a partir de las fórmulas (1) y (2) del apartado 5.2.5.

5.4 Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete de aplicaciones estadísticas SPSS versión 11.5.

Se realizó el análisis de variancia (ANOVA) según el modelo lineal general univariante y se consideraron significativos valores de probabilidad inferiores a 0,05. Se evaluaron los efectos de la cepa y de la temperatura de almacenamiento (5 y 20°C) sobre los porcentajes de recuperación de células

viables después del proceso y sobre los porcentajes de viabilidad al final del período de almacenamiento (60 días), para cada uno de los sistemas de deshidratación estudiados. En el caso de los cultivos liofilizados se determinó también el efecto del crioprotector utilizado (glucosa, lactosa y leche desnatada). Las interacciones entre las distintas fuentes de variación fueron incluidas también en el modelo (cepa*temperatura; crioprotector*cepa; crioprotector*temperatura).

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov (KS) para comprobar la distribución normal de los residuos y el test de Levene para comprobar la homocedasticidad de los datos y, cuando fue necesario, se trabajó con la raíz cuadrada de los porcentajes.

Los estudios de separación de medias se realizaron mediante el test de Bonferroni de comparaciones múltiples *post hoc* con un nivel de significación de 0,05.

5.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.4.1 Liofilización

- **Etapa I**

5.4.1.1 Determinación del crioprotector y temperatura de almacenamiento

El índice de supervivencia de los cultivos liofilizados suele estar relacionado con el número inicial de células y con la edad de los cultivos (Nakamura, 1996). En general, cuanto mayor es el recuento inicial, mayor es el porcentaje de recuperación obtenido y los cultivos muy jóvenes o muy viejos son más susceptibles a tratamientos a bajas temperaturas que aquellos que se encuentran al final de la fase de crecimiento exponencial o al inicio de la fase estacionaria. En este estudio se utilizaron cultivos de las cepas TA43 y Ps7 que se encontraban al inicio de la fase estacionaria y la concentración de los cultivos después de la resuspensión con cada uno de los agentes crioprotectores, antes de ser sometidos a liofilización, era de 10^8 - 10^9 ufc/mL. Las dos cepas fueron sensibles a este método de deshidratación ya que en general se produjo la pérdida de parte de la población en todos los ensayos, tal como se observa en el cuadro 5.2, donde se presentan los porcentajes de recuperación de células viables después del proceso.

En la liofilización la muerte celular puede ocurrir durante la congelación la deshidratación y posteriormente durante el almacenamiento y rehidratación de los cultivos (Spekman *et al.*, 1973). En nuestro caso los resultados muestran que la congelación a -80°C y la deshidratación en conjunto tuvieron una influencia directa sobre la muerte de parte de la población. No obstante, después del proceso se mantenían aun recuentos elevados, entre 8 y 9 unidades logarítmicas, del mismo orden que la suspensión inicial. Sólo en algunas de las repeticiones la concentración de células viables disminuyó en un orden logarítmico.

Cuadro 5.2

Porcentajes de recuperación de células de los cultivos de BAL después de la liofilización

| | Cepa 73 | Cepa 7 | |
|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| LACTOSA | 1 | 21,67 | 46,77 |
| | 2 | 81,25 | 14,47 |
| | 3 | 100 | 51,82 |
| | * | 67,64±40,90 | 37,69±20,26 |
| GLUCOSA | 1 | 37,50 | 21,05 |
| | 2 | 30,56 | 100 |
| | 3 | 15,33 | 96,67 |
| | * | 27,80±11,34 | 72,57±44,65 |
| LECHE | 1 | 13,04 | 73,33 |
| | 2 | 57,50 | 80 |
| | 3 | 73,81 | 90,91 |
| | * | 48,12±31,45 | 81,41±8,87 |

* Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar

En un estudio realizado por Costa *et al.* (2000) se comparó la eficacia de distintos agentes crioprotectores en el proceso de liofilización del agente de biocontrol en frutas *Pantoea agglomerans* CPA-2. En el trabajo se utilizaron azúcares (trehalosa, glucosa, fructosa, sacarosa y lactosa), aminoácidos (glutamato de sodio y cistina), polímeros (dextrano y polietilenglicol), glicerol, leche desnatada en polvo reconstituida, tampón fosfato (pH 6,5) y agua. Se demostró que los azúcares eran los que permitían la máxima recuperación de células viables y se concluyó que con los disacáridos se obtenía un mayor porcentaje de supervivientes (60%) que cuando se utilizaban monosacáridos (30-50%). Los cultivos liofilizados con leche descremada al 10 % dieron valores de viabilidad menores (aprox 15%) que cuando se utilizaron azúcares. En base a estos resultados en el presente estudio decidimos evaluar el efecto crioprotector de la glucosa, la lactosa y la leche desnatada. En ninguna de las dos cepas se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los porcentajes de supervivientes al proceso en función del agente crioprotector utilizado. Probablemente la gran variabilidad obtenida para las distintas repeticiones del proceso fue la causa de que no se hayan podido confirmar estadísticamente los efectos del agente crioprotector sobre el porcentaje de recuperación de células viables, aunque sí sobre la estabilidad de las cepas liofilizadas, como se comentará más adelante.

Los porcentajes de humedad de las BAL TA73 y Ps7 liofilizados se presentan en el cuadro 5.3. Este parámetro tiene particular importancia sobre la estabilidad durante el almacenamiento. Según Hunter y Belt (1996) un contenido de humedad residual del 2-3%, bastante inferior a los obtenidos en nuestro estudio, sería el óptimo para mantener la estabilidad de microorganismos liofilizados.

Cuadro 5.3
Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL después de la liofilización

| LACTOSA | Cepa 73 | Cepa 7 |
|---------|------------------|------------------|
| | 1 | 7,30 |
| 2 | 8,5 | 7,48 |
| 3 | 6,12 | 5,68 |
| * | 7,31±1,20 | 6,43±0,94 |

| LECHE | Cepa 73 | Cepa 7 |
|-------|------------------|------------------|
| | 1 | 6,79 |
| 2 | 5,52 | 5,68 |
| 3 | 7,62 | 8,20 |
| * | 6,64±1,06 | 7,07±1,28 |

*Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

En la figura 5.4 se muestran fotografías de las muestras liofilizadas con cada uno de los agentes crioprotectores. Se puede apreciar que las que contenían lactosa y leche desnatada eran visualmente aceptables (figuras 5.4B.a y 5.4B.c) mientras que en los cultivos con glucosa el producto liofilizado quedó adherido a las paredes del vial (figura 5.4B.a). Esta apariencia indicaba que las condiciones del proceso probablemente no habían sido las adecuadas para una correcta sublimación, tal como se observa en la figura 5.4A.b. Es posible que las condiciones de secado no permitieran sublimar a condiciones por debajo del punto eutéctico de la mezcla con glucosa. Es por esta razón que no se pudo realizar la determinación del contenido en humedad de los cultivos con glucosa aunque no se ha descartado la posibilidad de ensayar en futuros trabajos otras concentraciones y temperaturas de proceso para muestras que contengan glucosa considerando sus características termo-físicas. A pesar de

ello, se decidió continuar el estudio de estabilidad con las muestras liofilizadas con los tres crioprotectores.

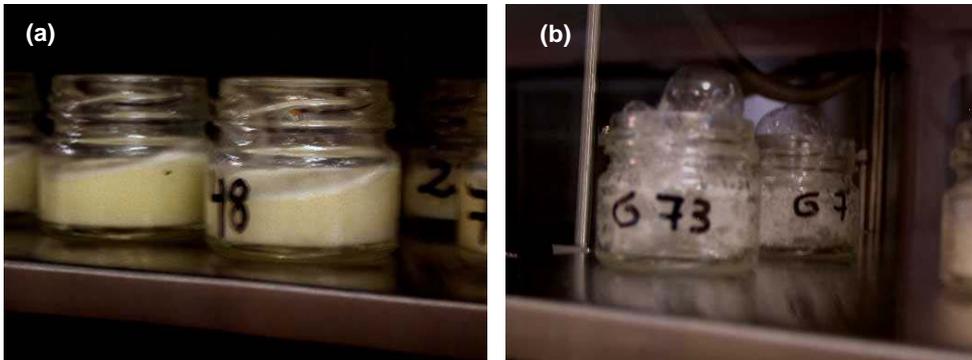


Figura 5.4A Etapa de desecación de la liofilización de cultivos con (a) leche desnatada al 20%, (b) glucosa al 10%

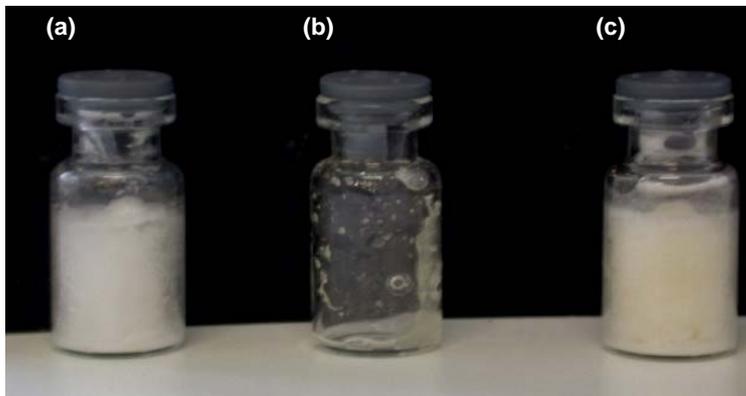


Figura 5.4B Cultivos liofilizados con los diferentes crioprotectores: (a) lactosa al 12%, (b) glucosa al 10% y (c) leche desnatada al 20%.

Existen estudios donde se pone de manifiesto que, además de la mortalidad provocada por el proceso, la liofilización puede causar daños sub-letales que afectan a la capacidad de resistencia de las células bacterianas supervivientes. En este sentido, Brennan *et al.* (1986) evaluaron el efecto de la liofilización sin agentes crioprotectores sobre la sensibilidad de cultivos de *Lactobacillus acidophilus* a diferentes sustancias: oxgall (contenido biliar de bóvidos), lisozima (100 µg/mL) y NaCl (8%). El resultado mostró que, mientras que las células no deshidratadas no eran sensibles al oxgall y lisozima, más de un 90% de células deshidratadas eran sensibles al tratamiento con estos dos

componentes y que la sensibilidad al NaCl pasó del 32 al 61% después del proceso. Se concluyó que la liofilización provocaba daños sobre algunos enlaces débiles de las macromoléculas de la membrana citoplasmática debido a la pérdida de agua ligada. El principal objetivo de los agentes crioprotectores es precisamente minimizar los daños celulares y disminuir tanto los efectos letales como los sub-letales, que afectarán a la supervivencia durante el almacenamiento de las células recuperadas después del proceso.

En la figura 5.5 se presentan los recuentos poblacionales de las dos cepas (TA73 y Ps7) a lo largo de 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración.

Se puede observar que cuando el agente crioprotector era **glucosa** al 10%, el comportamiento de las dos cepas fue prácticamente idéntico. Los recuentos poblacionales realizados a los cinco días de la deshidratación muestran ya una tendencia a la disminución a ambas temperaturas de almacenamiento. Esta disminución fue mucho más significativa en los cultivos mantenidos a temperatura ambiente, donde se observa un descenso de 2 unidades logarítmicas en los recuentos, mientras que los cultivos conservados en refrigeración, pese a disminuir, se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud que los recuentos iniciales.

La reducción más importante en el número de viables en los cultivos mantenidos a temperatura ambiente se produjo en los cinco primeros días y alcanzó un mínimo a los 30 días de almacenamiento. Entre el día 30 y 60 se mantuvieron los recuentos y al final del periodo estudiado se obtuvo una reducción media de 4 unidades logarítmicas. En refrigeración se observa un descenso progresivo de los recuentos a lo largo del periodo de almacenamiento, que supuso una reducción media de una unidad logarítmica a los 60 días.

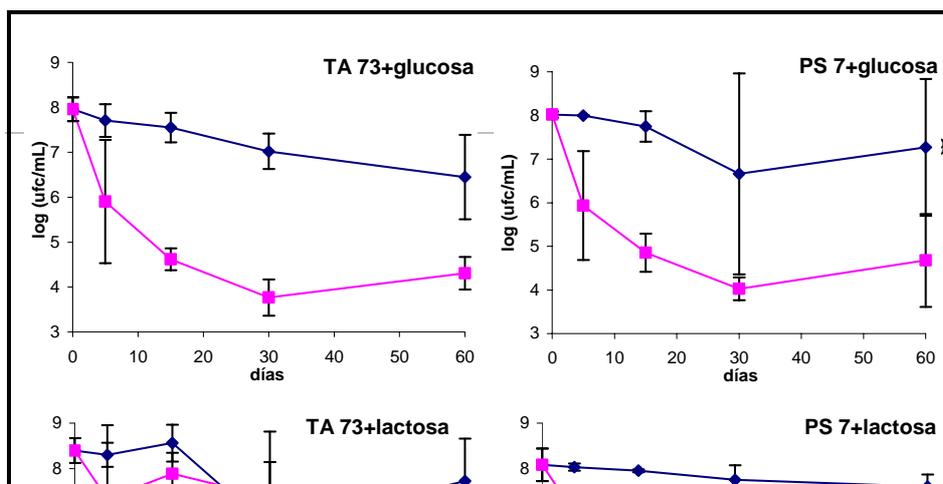


Figura 5.5 Recuentos de los cultivos liofilizados con glucosa 10%, lactosa 12% y leche 20% de las BAL TA73 y Ps7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.

Cuando el agente crioprotector utilizado era **lactosa** al 12% y la temperatura de almacenamiento de 20°C se obtuvo una reducción más importante de los recuentos en la cepa psicrótrófa Ps7 (4-5logs) que en la mesófila (aprox. 2 logs). La refrigeración, sin embargo, permitió mantener el orden de magnitud de los recuentos a lo largo de los 60 días de almacenamiento en ambas cepas.

Cuando se utilizó **leche** como crioprotector los resultados fueron muy alentadores para ambas cepas y a ambas temperaturas. Se observa que los

recuentos poblacionales se mantuvieron en el mismo orden inicial, alrededor de 10^8 ufc/mL.

Si se realiza el análisis desde el punto de vista de la viabilidad (figura 5.3) los resultados confirman que la leche (20%) es el mejor agente crioprotector de los tres evaluados en este estudio. Se ve como la viabilidad se mantuvo en un 100% en el caso de la BAL TA73 a lo largo de los 60 días a ambas temperaturas y de Ps7 incluso a temperatura ambiente. Si se realiza un análisis paralelo de las figuras 5.5 y 5.6, a pesar que los porcentajes de viabilidad de Ps7 disminuyeron gradualmente a partir de los 15 días a 20°C, los recuentos en este período se mantienen en valores del orden de 8 unidades logarítmicas, igual que los recuentos iniciales.

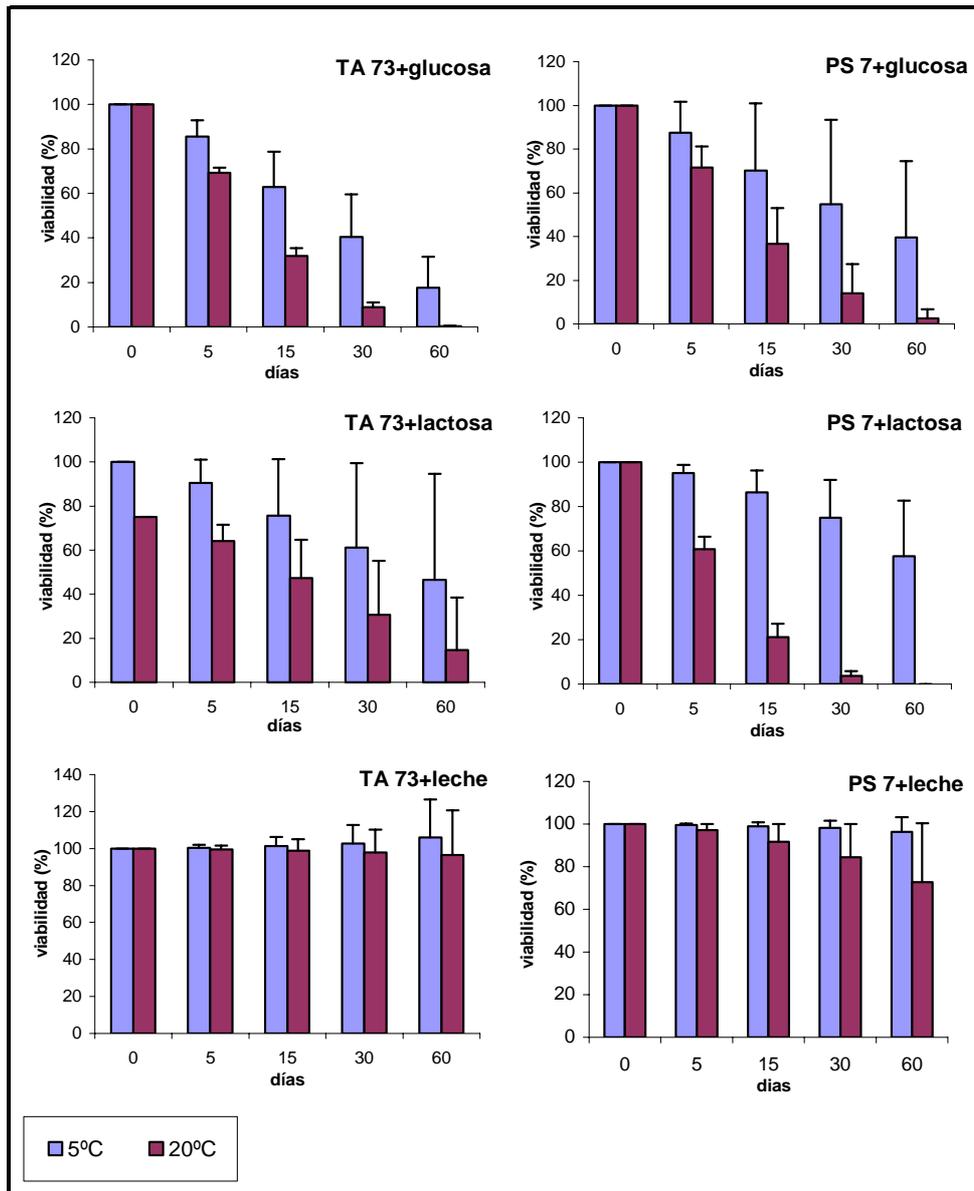


Figura 5.6 Porcentaje de viabilidad de los cultivos liofilizados con glucosa 10%, lactosa 12% y leche 20% de las BALTA73 y BALPs7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.

Según los resultados del análisis estadístico (Anexo 3), los resultados de viabilidad a los 60 días de almacenamiento en las dos cepas dependen tanto del agente crioprotector ($P < 0,05$) como de la temperatura de almacenamiento ($P < 0,05$). En la figura 5.7 se presenta el resultado del test de separación de

medias. Se puede observar que los resultados de viabilidad obtenidos con glucosa y lactosa pertenecen a un mismo grupo y son significativamente inferiores a los obtenidos en muestras que contienen leche desnatada. El almacenaje en refrigeración permite obtener porcentajes de viabilidad significativamente más altos que los de las muestras almacenadas a temperatura ambiente.

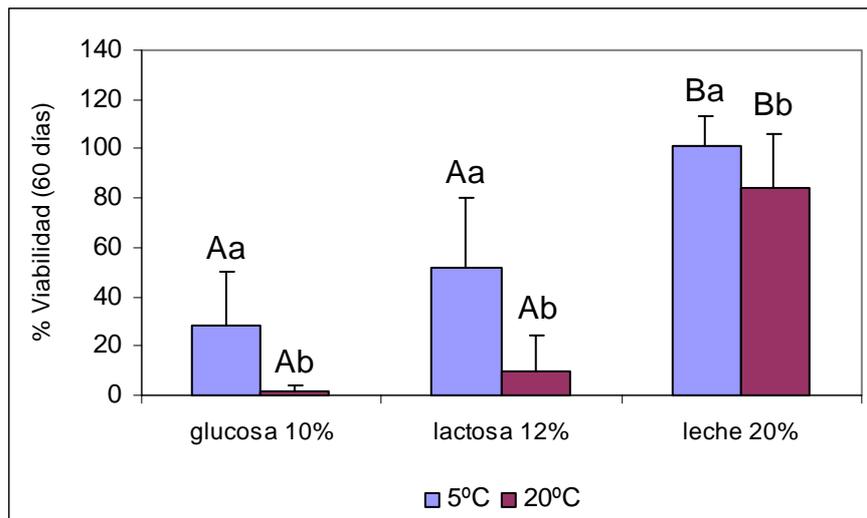


Figura 5.7 Promedio de los porcentajes de viabilidad a los 60 días de almacenamiento de los cultivos de las BALTA73 y BALPs7 liofilizados con los diferentes crioprotectores. Las barras de error muestran los intervalos de confianza de las medias ($P=95\%$). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) por efecto del crioprotector (mayúsculas) y la temperatura (minúsculas).

Como se ha mencionado anteriormente diferentes autores confirman que el crioprotector utilizado en un cultivo liofilizado puede tener un efecto directo sobre la estabilidad celular y como consecuencia sobre la viabilidad. Por esta razón es importante el estudio del uso de diferentes sustancias sobre un determinado microorganismo. Se podría decir que no existe una fórmula universal para todos los casos. Existen antecedentes de trabajos publicados sobre *Streptococcus* iniciadores de la fermentación de queso tipo *Cheddar* y *Cottage* (Speckman *et al.*, 1973) y sobre *Lactobacillus acidophilus* (Conrad *et al.*, 2000) en los cuales se ha visto como la combinación de diferentes sustancias como crioprotector, así como el control del pH, pueden mejorar los porcentajes de viabilidad de los cultivos liofilizados. Ambos aspectos deberán

ser considerados en estudios posteriores si se pretenden optimizar los métodos de preservación de las cepas interesantes por su potencial de aplicación.

A partir de la disminución de viabilidad de los cultivos durante el almacenamiento se procedió a calcular los tiempos de reducción decimal (valores D) de cada una de las muestras y se utilizaron como indicadores de la vida útil aproximada de los cultivos deshidratados (cuadro 5.4). Los valores D de las muestras conservadas en leche indican que la vida útil de estos cultivos liofilizados sería más larga que si se utilizara lactosa o glucosa.

El conjunto de los resultados permitió deducir que el mejor crioprotector para las dos cepas sometidas a estudio fue la leche desnatada (20%) y que el uso de ésta como agente crioprotector minimizaba la pérdida de viabilidad que se produce cuando se conservan las cepas liofilizadas a temperatura ambiente.

Cuadro 5.4
Tiempo de reducción decimal (días) de los cultivos de BAL liofilizados mantenidos a dos temperaturas de almacenamiento

| GLUCOSA | Cepa 73 | | Cepa 7 | |
|---------|---------|-------|--------|--------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| | 1 | 68,03 | 20,79 | 113,64 |
| 2 | 50,76 | 17,83 | 196,08 | 19,31 |
| 3 | 25 | 23,47 | 19,45 | 18,38 |

| LACTOSA | Cepa 73 | | Cepa 7 | |
|---------|---------|-------|--------|-------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| | 1 | 27,62 | 113,64 | 64,93 |
| 2 | 5000 | 29,24 | 333,33 | 10,65 |
| 3 | 73,53 | 28,49 | 166,67 | 16 |

| LECHE | Cepa 73 | | Cepa 7 | |
|-------|---------|--------|--------|--------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| | 1 | 416,67 | — | — |
| 2 | — | 227,27 | 1666,7 | 144,93 |
| 3 | — | 1250 | 714,29 | — |

— No se obtuvo disminución en los recuentos.

Aunque los resultados no difirieron significativamente entre las dos cepas liofilizadas en la etapa I del estudio ($P > 0,05$) se consideró que no necesariamente debía darse el mismo caso con el resto de cepas de BAL. Se ha demostrado que, al igual que ocurre con la mayoría de las técnicas de preservación, la supervivencia que se obtiene con la liofilización varía entre cepas de la misma especie (Godinez *et al.*, 2002).

A partir de las conclusiones derivadas de esta fase del estudio se decidió evaluar la eficacia de la liofilización como método de conservación del resto de cepas lácticas utilizando leche desnatada como agente crioprotector y realizar el seguimiento de los cultivos a las dos temperaturas de conservación.

5.4.2 Atomización

- **Etapas I**

5.4.2.1 Pruebas preliminares

La finalidad de estos ensayos preliminares fue definir los parámetros de trabajo que permitieran obtener un producto deshidratado con la mínima humedad y un buen porcentaje de recuperación de células del cultivo láctico.

Diferentes autores coinciden en que los resultados finales estarán en función del medio utilizado así como de las condiciones del proceso de atomización. En este sentido, Metwally *et al.* (1989) confirman que los parámetros de la atomización que pueden tener un efecto directo sobre la supervivencia de los microorganismos son el tipo de atomizador utilizado y las temperaturas de entrada y de salida, siendo esta última la que tiene un efecto mucho mayor en la destrucción de microorganismos.

La primera prueba consistió en atomizar el cultivo TA73 en el medio selectivo (caldo MRS) que se había utilizado para el crecimiento de las bacterias. En este caso no se obtuvo cultivo deshidratado ya que el producto provocó la obstrucción del equipo. Se interpretó que la causa podía haber sido la caramelización del medio, ya que la presencia de glucosa y sales de amonio en la composición del caldo MRS junto con la temperatura elevada podían favorecer reacciones de Maillard (Ordóñez *et al.*, 1998). Se concluyó por tanto

que el caldo MRS no era un medio adecuado para atomizar los cultivos lácticos.

Algunos estudios recomiendan la inoculación de las cepas de BAL en leche desnatada en polvo antes de deshidratarlas porque este producto tiene un efecto protector sobre los microorganismos cuando son sometidos a un tratamiento por calor (Mauriello *et al.*, 1999; Gardiner *et al.*, 2000). Por tanto se decidió probar la deshidratación por atomización de cultivos de BAL crecidos en leche.

En el primer ensayo en leche se determinó que después del proceso de atomización utilizando una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida del producto de 90-91°C la población disminuía de 10^8 ufc/mL en la leche líquida a 10^6 ufc/mL en la leche atomizada reconstituida. Con estos parámetros se obtenía pues una viabilidad del 1%, un valor inferior a los obtenidos por otros autores (Mauriello *et al.*, 1999, Gardiner *et al.*, 2000).

Varios investigadores que han trabajado en este campo (Abd El Gawad *et al.*, 1989; Gardiner *et al.*, 2000) recomiendan neutralizar los cultivos antes de atomizarlos. La neutralización de los cultivos ayuda enormemente a la supervivencia de las células durante la atomización ya que el efecto del calor sobre los microorganismos puede intensificar el del pH ácido del medio donde han crecido las bacterias fermentativas. En el presente estudio al finalizar la incubación de los cultivos de BAL el pH era de 5,5-5,8 y se neutralizó hasta alcanzar un pH de 6,7-7. Cuando se trabajó a una temperatura de entrada de 160°C y una temperatura de salida de 80-85°C y cultivos neutralizados, la población se mantuvo igual antes y después de la atomización (10^8 ufc/mL), con una viabilidad del 100%. De esta manera se confirma la existencia de una relación directa entre pH cercanos a la neutralidad y la viabilidad conseguida después del proceso.

Las muestras deshidratadas con estos parámetros contenían porcentajes de humedad entre 10 y 11%. Gardiner *et al.* (2000) recomiendan que la humedad expresada en porcentaje no sea superior a 5% para así prolongar la vida útil y la estabilidad del producto deshidratado durante el almacenamiento, por lo que se ensayó la atomización a una temperatura de entrada de 170°C y un pH de 6,7-7. Al aumentar la temperatura de entrada a 170°C los porcentajes de humedad obtenidos disminuyeron a valores entre 5-7% y se determinaron porcentajes de supervivencia del 100% para ambas cepas en estudio (TA73 y

Ps7). En este caso la temperatura de salida se mantuvo en 80-85°C regulando el flujo del producto a atomizar.

Por lo tanto las condiciones más adecuadas para la atomización de las cepas lácticas fueron: leche como medio de crecimiento de las BAL, neutralización del pH (6,7-7) y temperatura de entrada y salida de 170°C y 80-85°C, respectivamente.

En estos resultados preliminares también se pudo apreciar la existencia de una relación inversa entre la temperatura de salida y la supervivencia, lo cual también concuerda con la experiencia de Metwally *et al.* (1989) quienes comprobaron que el índice de supervivencia de tres BAL decreció enormemente cuando la temperatura de salida aumentó de 70-72°C a 88-90°C. Las células viables de *Streptococcus lactis* decrecieron del 22% al 2%, las de *Streptococcus thermophilus* del 47% al 9% y las de *Lactobacillus bulgaricus* del 20% al 4%.

Espina *et al.* (1979) estudiaron la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* en un proceso de atomización utilizando también diferentes temperaturas de salida: 85, 80 y 75°C pero las relacionó con la viabilidad después de 30 días de los cultivos almacenados a 4°C. La temperatura de salida óptima fue de 75°C, ya que resultó en una viabilidad más alta, de 4,17% frente a 1,58% de los atomizados a una temperatura de salida de 80°C y a 0,27% de los atomizados a una temperatura de 85°C. Sin embargo, Metwally *et al.* (1989) y Gardiner *et al.* (2000) recomiendan no utilizar temperaturas de salida más bajas de 70°C porque podrían incrementar el contenido de humedad del polvo deshidratado por encima del 5% y esto podría ser perjudicial para mantener la calidad y la actividad de los microorganismos durante el almacenamiento.

Mauriello *et al.* (1999) atribuyen la disminución de la supervivencia a la temperatura de entrada ya que al mantener la temperatura de salida constante a 68°C y trabajando a diferentes temperaturas de entrada: 160, 180 y 200°C, obtuvieron los máximos valores de supervivencia a una temperatura de entrada de 160°C.

En el cuadro 5.5 se presentan los valores de humedad de los cultivos (TA73 y Ps7) atomizados bajo las condiciones determinadas en los ensayos preliminares, los mismos que se destinaron al almacenamiento a las dos

temperaturas (5°C y 20°C) y al estudio de estabilidad durante un periodo de 60 días.

Cuadro 5.5

Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL después de la atomización

| ATOMIZACIÓN | Cepa TA73 | Cepa Ps7 |
|-------------|------------------|------------------|
| | 1 | 5,79 |
| 2 | 6,02 | 3,68 |
| 3 | 8,30 | 7,65 |
| * | 6,70±1,39 | 5,75±1,99 |

* Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Se ha comprobado que adicionando ciertas sustancias previamente a la atomización, como puede ser el glicerol, las muestras quedan protegidas del efecto de las altas temperaturas y así se obtienen índices de supervivencia mayores (To y Etzel,1997). Aún así, no se consideró necesario adicionar otras sustancias protectoras al cultivo antes de la atomización ya que los porcentajes de recuperación de células viables conseguidos era de 100%, probablemente por el efecto protector de la leche utilizada como medio de crecimiento.

Existe también la posibilidad de utilizar aditivos en el cultivo una vez deshidratado, con el fin de mejorar su estabilidad durante el almacenamiento. Abd El Gawad *et al.* (1989) probaron adicionar sacarosa y dextrina al 10%. La sacarosa no dio buenos resultados pero en el caso de la dextrina los índices de viabilidad variaron de un 22% a un 30% para *Streptococcus lactis*, de un 46% a un 76% en cultivos de *S. thermophilus* y de un 19% a un 31% para *Lactobacillus bulgaricus*.

5.4.2.2 Determinación de la temperatura de almacenamiento

Según el diseño experimental (figura 5.1) el objetivo final de esta primera etapa fue conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los cultivos atomizados a las condiciones determinadas previamente.

En la figura 5.8 se muestran la evolución de la población durante el periodo de almacenamiento de las cepas estudiadas (TA73 y Ps7) almacenadas a 5°C y 20°C. Se observa que los recuentos fueron más altos a temperatura de refrigeración. Se ve además que se mantuvieron constantes con una concentración de 10^9 ufc/mL. Si se establece una comparación entre las dos muestras almacenadas a 20°C se ve como la población de TA73 muestra una tendencia a la disminución aunque se mantiene dentro del mismo orden durante los 60 días de almacenamiento. Por el contrario, la cepa Ps7, que al inicio del experimento tenía una población del orden de 10^9 ufc/g extracto seco, a los 60 días disminuyó a una concentración del orden de 10^7 ufc/g extracto seco.

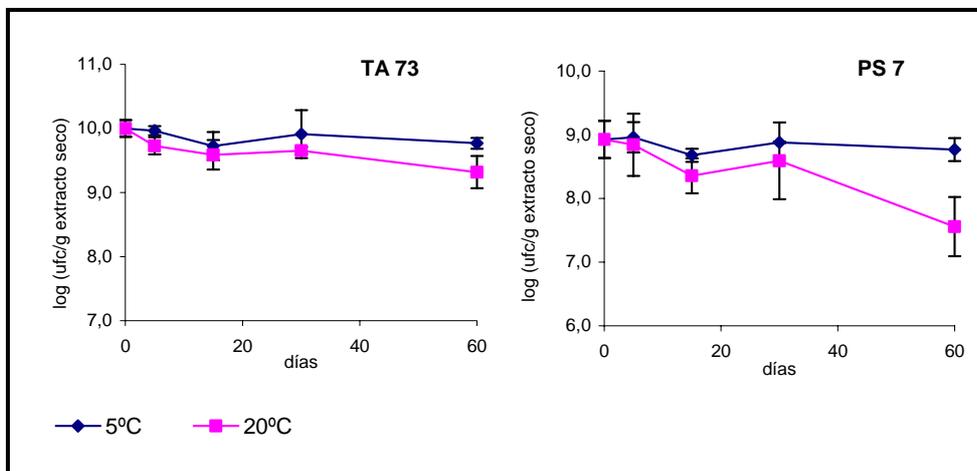


Figura 5.8 Recuentos de los cultivos atomizados de las BAL TA73 y BAL PS7 durante el almacenamiento a 5 y 20°C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.

Si se observan los resultados de viabilidad en la figura 5.9 éstos indican que ambas BAL se mantuvieron bastante estables a 5°C. Ambas cepas mantuvieron la máxima viabilidad (100%) hasta pasados los 5 días, a partir de este momento comenzaron a disminuir los valores hasta alcanzar mínimos de 83,40% y 86,36% a los 60 días para TA73 y Ps7, respectivamente.

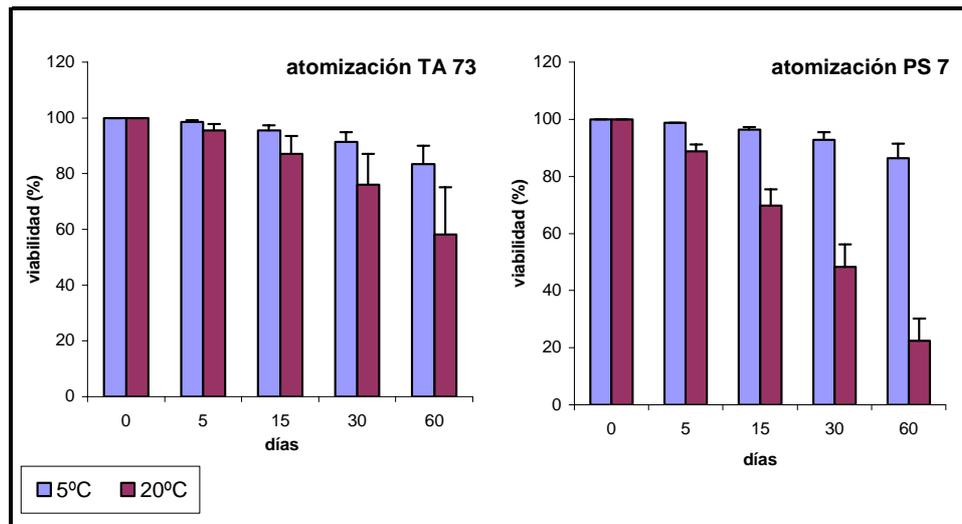


Figura 5.9 Porcentaje de viabilidad de los cultivos atomizados de la BAL TA73 y la BAL PS7 almacenadas a 5 y 20°C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 3 repeticiones.

Los resultados correspondientes a la viabilidad corroboraron que la cepa psicrótrofa Ps7 fue la más sensible al almacenamiento a 20°C, lo cual se muestra claramente en términos de pérdida de células viables ya que la viabilidad decreció del 100% al 22,4%, mientras que la de la cepa TA73 disminuyó del 100% hasta el 58,2% a los 60 días. El análisis de variancia confirmó que las muestras almacenadas a 5°C presentaban una viabilidad significativamente superior ($P < 0,05$) a la de las almacenadas a temperatura ambiente. Además, existía una interacción significativa ($P < 0,05$) entre las variables cepa y temperatura, dado que, como ya se ha comentado, la cepa psicrótrofa Ps7 fue mucho más susceptible al almacenamiento a 20°C que la cepa mesófila TA73 (figura 5.10).

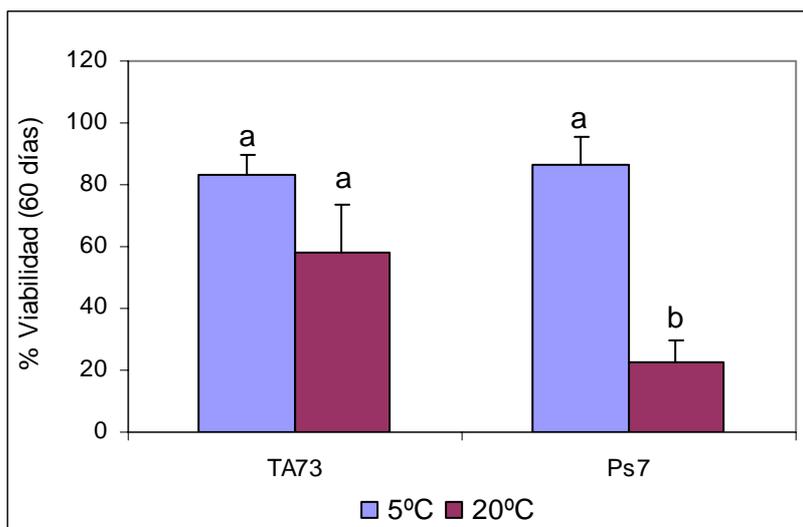


Figura 5.10 Porcentaje de viabilidad a los 60 días de almacenamiento de TA73 y Ps7. Las barras de error muestran los intervalos de confianza de las medias ($P=95\%$). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) por efecto de la temperatura.

Los valores D (cuadro 5.6) indican que a la temperatura de almacenamiento de 5°C ambas cepas tendrían una vida útil mucho más prolongada que a 20°C, siendo la diferencia entre las dos temperaturas mucho mayor en el caso de la cepa psicrótrofa.

Cuadro 5.6
Tiempo de reducción decimal (días) de los cultivos de BAL atomizados mantenidos a dos temperaturas de almacenamiento

| Atomización | Cepa 73 | | Cepa 7 | |
|-------------|---------|--------|--------|-------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 1 | 625 | 119,05 | 2500 | 50,51 |
| 2 | 294,12 | 212,77 | 370,37 | 38,17 |
| 3 | 250 | 70,42 | 277,78 | 57,8 |

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la temperatura de almacenamiento fue uno de los parámetros que determinó la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los de un estudio homólogo realizado por Gardiner

et al. (2000) donde se determinó la viabilidad que alcanzaban dos cepas de BAL, *Lactobacillus paracasei* (NFBC 338) y *Lactobacillus salivarius* (UCC118), inoculadas en leche en polvo desnatada reconstituida al 20% complementada con 0,5% de extracto de levadura, después de haber pasado por un proceso de atomización. Los cultivos deshidratados se almacenaron durante dos meses a diferentes temperaturas: 4, 15 y 30°C. En los resultados obtenidos se apreció claramente que la viabilidad de los cultivos decrecía más rápidamente durante el almacenamiento a 15 y 30°C. Después de dos meses de almacenamiento se vio que la máxima viabilidad se obtenía a la temperatura de 4°C y fue de 92% para NFBC 338 y de 13% para UCC118.

En otros estudios revisados sobre atomización de BAL el índice de supervivencia también ha sido superior a bajas temperaturas. Teixeira *et al.* (1995) determinaron la viabilidad que alcanzaba la cepa *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* inoculada en leche en polvo descremada después de atomizada y mantenerla a 4, 8, 15 y 20°C durante 60 días y obtuvieron resultados muy semejantes a los del presente estudio.

Abd El Gawad (1989) también estudió el efecto de la temperatura de almacenamiento en la supervivencia de los microorganismos atomizados. Trabajó a tres temperaturas de almacenamiento: 20-25°C, 5-7°C y -15°C. Las muestras se almacenaron durante 30 días. Las temperaturas de 20-25°C y 5-7°C dieron viabilidades de 3,60% y 50% en *S. lactis*, 7% y 50% en *S. thermophilus* y 1,18% y 16,30% en 30 días. Los resultados obtenidos reflejan, al igual que en este estudio, que la mejor temperatura de almacenamiento fue la temperatura inferior a la cual se trabajó, en este caso sería la de -15°C con unos porcentajes de 57% en el caso de *S. lactis*, 75% en *S. thermophilus* y 54,50% en *L. bulgaricus*, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos con las cepas TA73 y Ps7 se concluyó que ambas temperaturas (5°C y 20°C) permitían mantener recuentos bastante altos durante el periodo de almacenamiento estudiado, por lo que se decidió evaluar el efecto de la atomización sobre el resto de cultivos de BAL y realizar el seguimiento de los cultivos deshidratados a las dos temperaturas de conservación.

• **Etapa II**

5.4.3 Comparación de liofilización, atomización y congelación

Siguiendo con el diseño experimental planteado (apartado 5.2.2) se liofilizaron el resto de cepas con el mejor crioprotector (leche al 20%) y se atomizaron a las condiciones determinadas en la etapa I para realizar finalmente la comparación global de estos métodos con la congelación a -80°C.

En el cuadro 5.7 se muestran los porcentajes de recuperación de células viables de los cultivos liofilizados, atomizados y congelados inmediatamente después del proceso de conservación.

Los resultados de supervivencia del cuadro 5.7 reflejan la sensibilidad de cada cepa a cada uno de los tres procesos. Se ve como los cultivos se mostraron mayoritariamente más sensibles al proceso de liofilización, seguido de la congelación y como fueron más resistentes a la atomización.

Cuadro 5.7
Porcentajes de recuperación de células viables de los cultivos de BAL liofilizados, atomizados y congelados

| CEPAS | LIOFILIZACIÓN | ATOMIZACIÓN | CONGELACIÓN |
|---------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| TA 20 | 100 | 100 | 100 |
| TA 43 | 66,67 | 100 | 100 |
| TA 73* | 48,12 | 100 | 75 |
| TA 75 | 100 | 64,21 | 88,89 |
| TA 76 | 61,33 | 100 | 88,66 |
| Ps 7* | 81,41 | 100 | 100 |
| Ps 14 | 100 | 100 | 100 |
| Ps 22 | 3,3 | 100 | 89,69 |
| Ps 23 | 100 | 100 | 89,39 |
| Ps 48 | 3,9 | 100 | 79,17 |
| Ps 95 | 100 | 100 | 100 |
| Ps 99 | 100 | 55,56 | 79,1 |

* Se han incluido los resultados correspondientes a TA73 y Ps7 obtenidos en la etapa I .

La supervivencia microbiana durante la congelación, liofilización y atomización depende del tipo de microorganismo, de las condiciones de crecimiento, de la naturaleza del medio de suspensión y de las condiciones del proceso.

En cuanto a la congelación la pérdida de células puede ocurrir en diferentes etapas como en el enfriamiento de las células en el medio de suspensión desde temperatura ambiente hasta el punto de congelación, debido entre otros factores a la formación de hielo intra y extracelular o al incremento gradual de la concentración de solutos en el agua que todavía no se ha congelado, o bien durante la etapa de almacenamiento y descongelación (Johnson y Etzel, 1995). La pérdida de células durante la liofilización puede ocurrir durante la etapa de congelación y en la deshidratación. Además, la etapa de la congelación puede desestabilizar las células y hacerlas más susceptibles a la deshidratación (Johnson y Etzel, 1995). Nuestros resultados reflejan esta posibilidad ya que el número de supervivientes al proceso de liofilización ha sido para la mayoría de cepas inferior al número de supervivientes al proceso de congelación, indicando probablemente el efecto aditivo de las dos etapas incluidas en la liofilización.

En la atomización la pérdida de células puede suceder a causa de la deshidratación e inactivación térmica debido a las temperaturas que alcanzan las células durante el proceso (To y Etzel, 1997). Según nuestros resultados este proceso ha supuesto menores efectos letales sobre las células de BAL que la congelación o la liofilización.

En cuanto al grado de deshidratación conseguido vemos como los cultivos liofilizados en general contenían un porcentaje de humedad menor que en el caso de los cultivos atomizados (cuadro 5.8). Como se discutirá más adelante, este es un factor que determinará de manera importante la estabilidad de los cultivos deshidratados.

Cuadro 5.8
Porcentajes de humedad de los cultivos de BAL liofilizados y atomizados

| CEPAS | LIOFILIZACIÓN | ATOMIZACIÓN |
|--------------|----------------------|--------------------|
| TA 20 | 8,86 | 8,09 |
| TA 43 | 5,95 | 6,85 |
| TA 73 | 6,64 | 6,70 |
| TA 75 | 8,58 | 5,40 |
| TA 76 | 5,95 | 8,19 |
| Ps 7 | 7,07 | 5,75 |
| Ps 14 | 6,02 | 7,50 |
| Ps 22 | 5,67 | 8,16 |
| Ps 23 | 4,36 | 5,76 |
| Ps 48 | 5,85 | 4,82 |
| Ps 95 | 5,18 | 6,55 |
| Ps 99 | 4,23 | 5,18 |

En las gráficas de la figuras 5.11a y 5.11b se muestra la evolución de los recuentos correspondientes a cada cepa durante el almacenamiento. Se observa el efecto de los diferentes métodos utilizados sobre la población de cada BAL.

Si se realiza una apreciación global de los resultados se ve como en la etapa II la liofilización y la atomización tuvieron el mismo efecto sobre la población de los cultivos que en la etapa I cuando se evaluaron únicamente 2 cepas. Se observa nuevamente como 5°C fue la temperatura de almacenamiento más favorable, en la que se obtuvieron los recuentos poblacionales más altos si se comparan con los almacenados a 20°C.

Los recuentos de los cultivos congelados fueron muy variables en función de la cepa utilizada. Si observamos las gráficas se ve como las cepas, TA20, TA73, TA76, Ps14, Ps22 y Ps99 descendieron 1 orden logarítmico a lo largo de los 60 días en cambio el resto de cepas mantuvieron el mismo orden poblacional durante todo el tiempo de evaluación.

Los resultados de viabilidad (figura 5.12a y 5.12b) también reflejan que la liofilización y conservación a 5°C fue el método más aceptable para la mayoría

de BAL (TA20, TA73, TA76, Ps7, Ps22, Ps23, Ps99). Pero existen algunas cepas que mantienen porcentajes muy altos de viabilidad aún después de 60 días de ser almacenadas en congelación a -80°C (TA43, TA75, PS48, Ps95), muy próximos a los valores obtenidos mediante liofilización y conservación a 5°C . En el caso de la cepa Ps95 la tendencia de los valores de la viabilidad es muy similar a los obtenidos al atomizarla y conservarla a 5°C . Sólo se observa una cepa (Ps14) en que la atomización y conservación a 5°C es el método que registra una viabilidad más alta en comparación con los otros dos métodos.

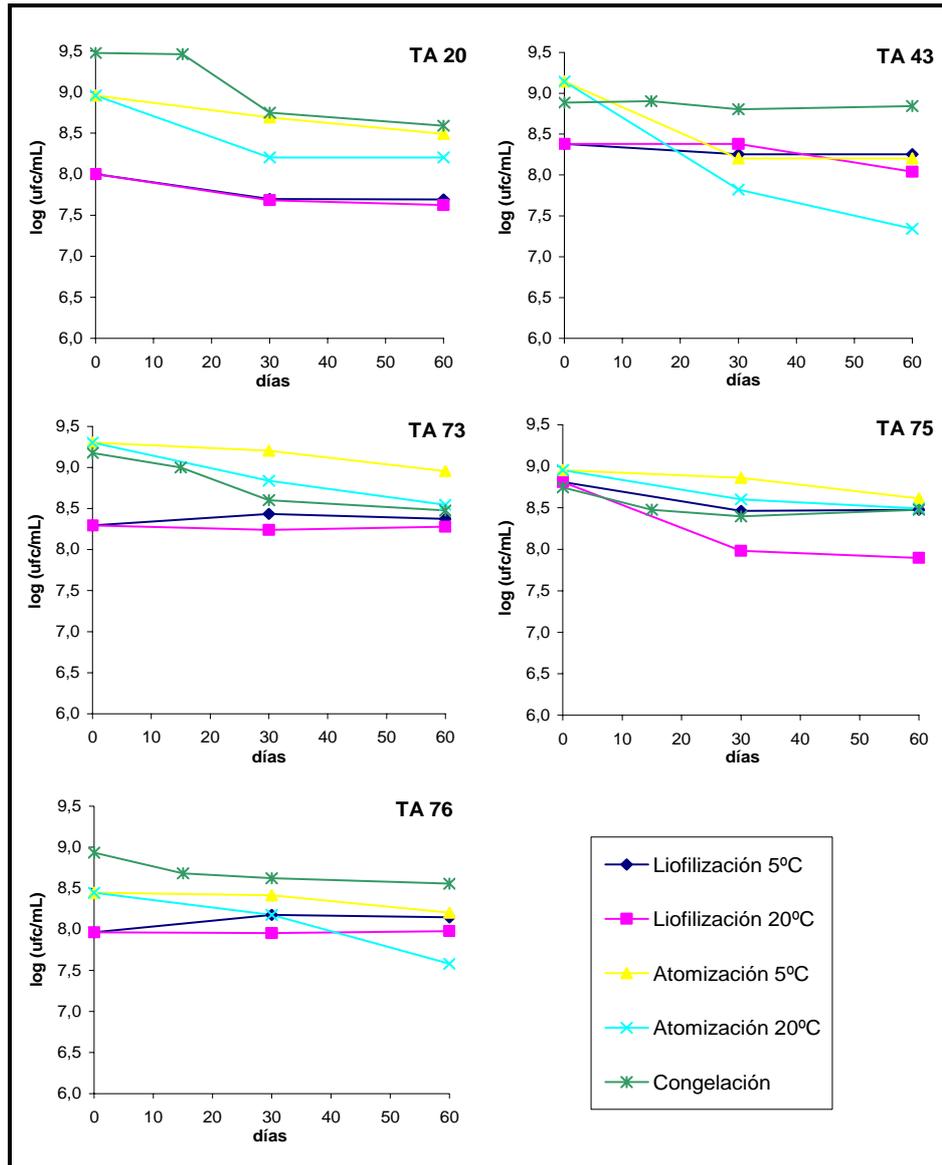


Figura 5.11a Recuentos de los cultivos de las BAL mesófilas congelados a -80°C , liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C .

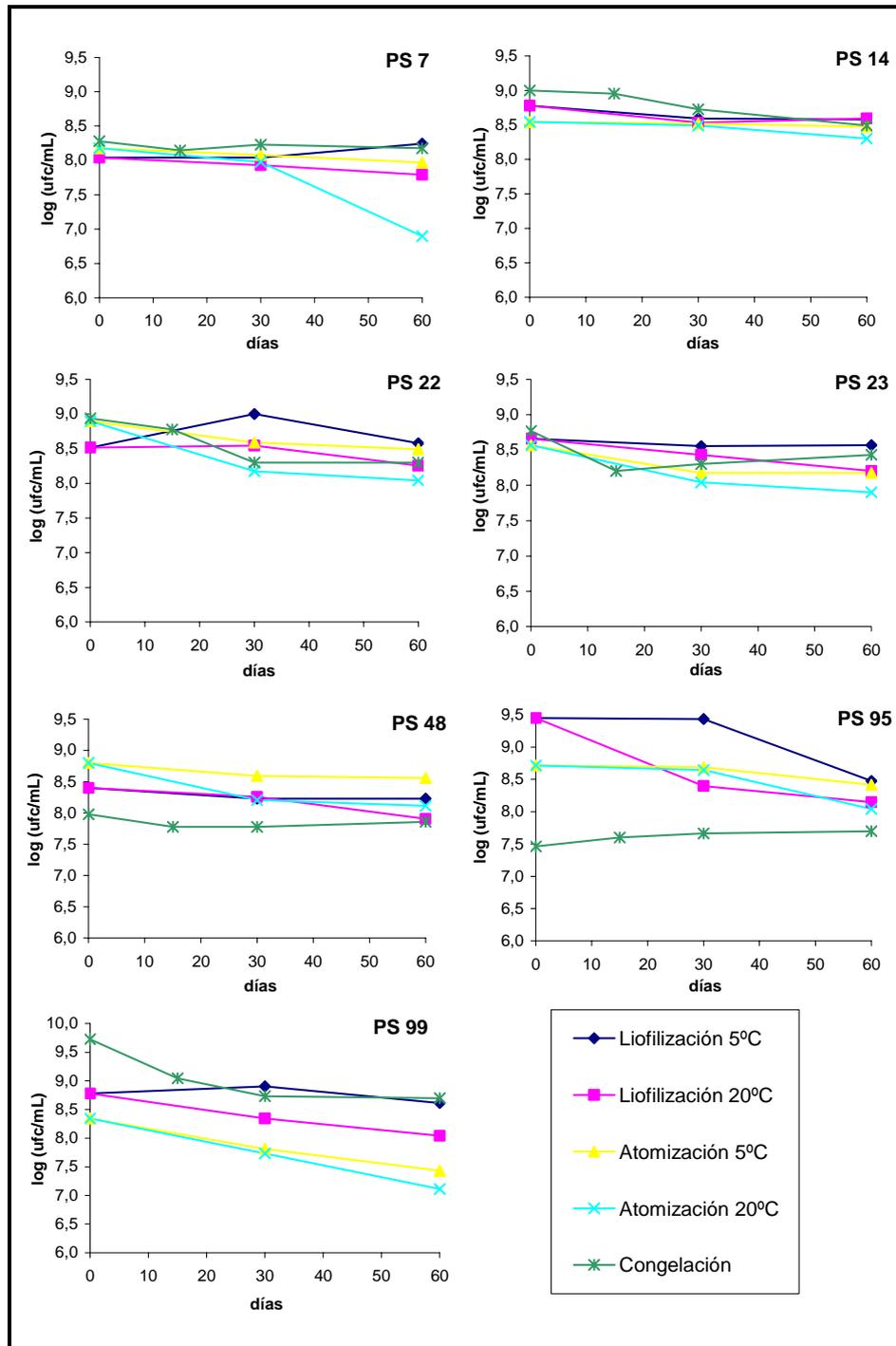


Figura 5.11b Recuentos de los cultivos de las BAL psicrótrofas congelados a -80°C, liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C.

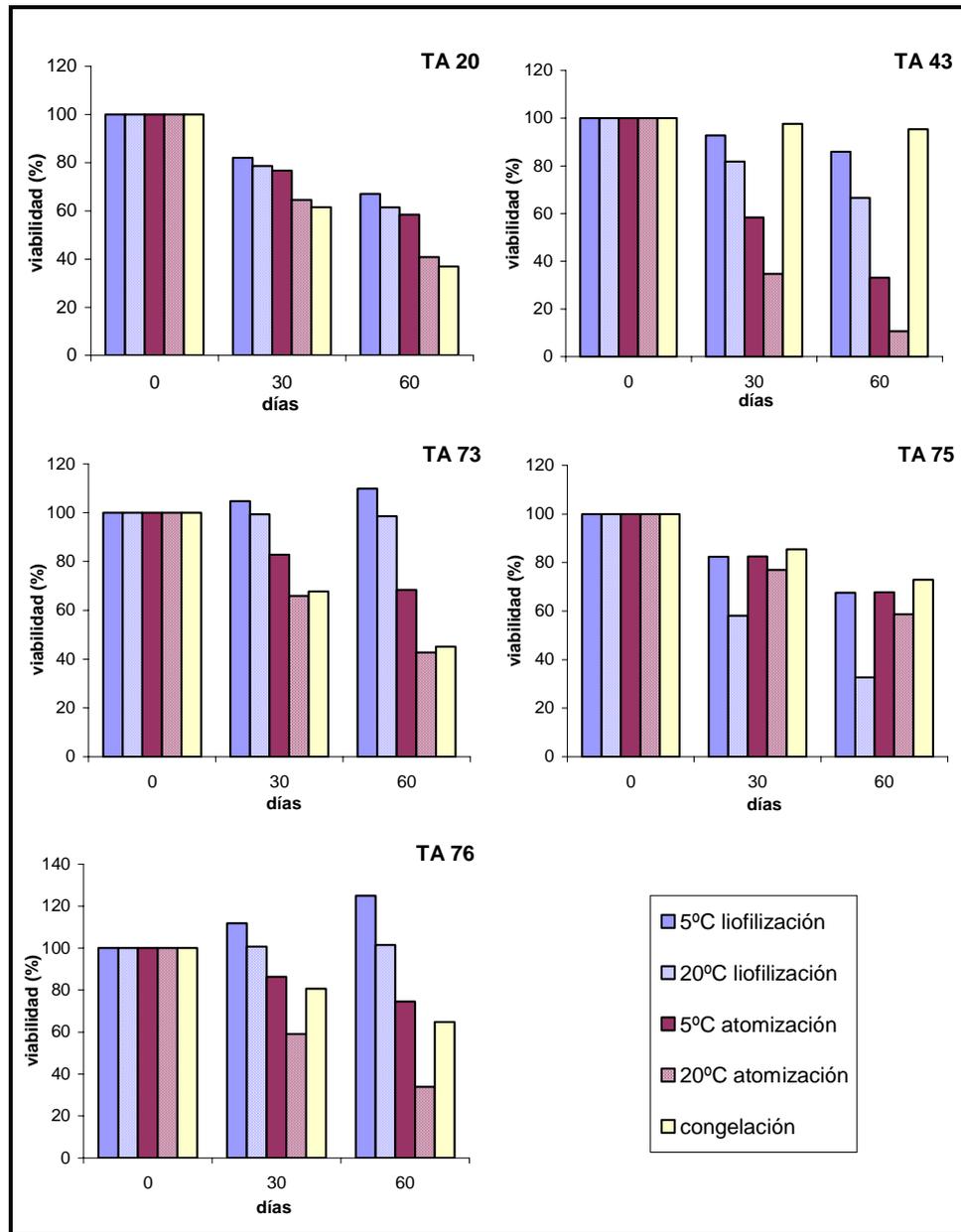


Figura 5.12a Porcentajes de viabilidad de los cultivos de las BAL mesófilas congelados a -80°C , liofilizados y atomizados almacenados a 5 y 20°C .

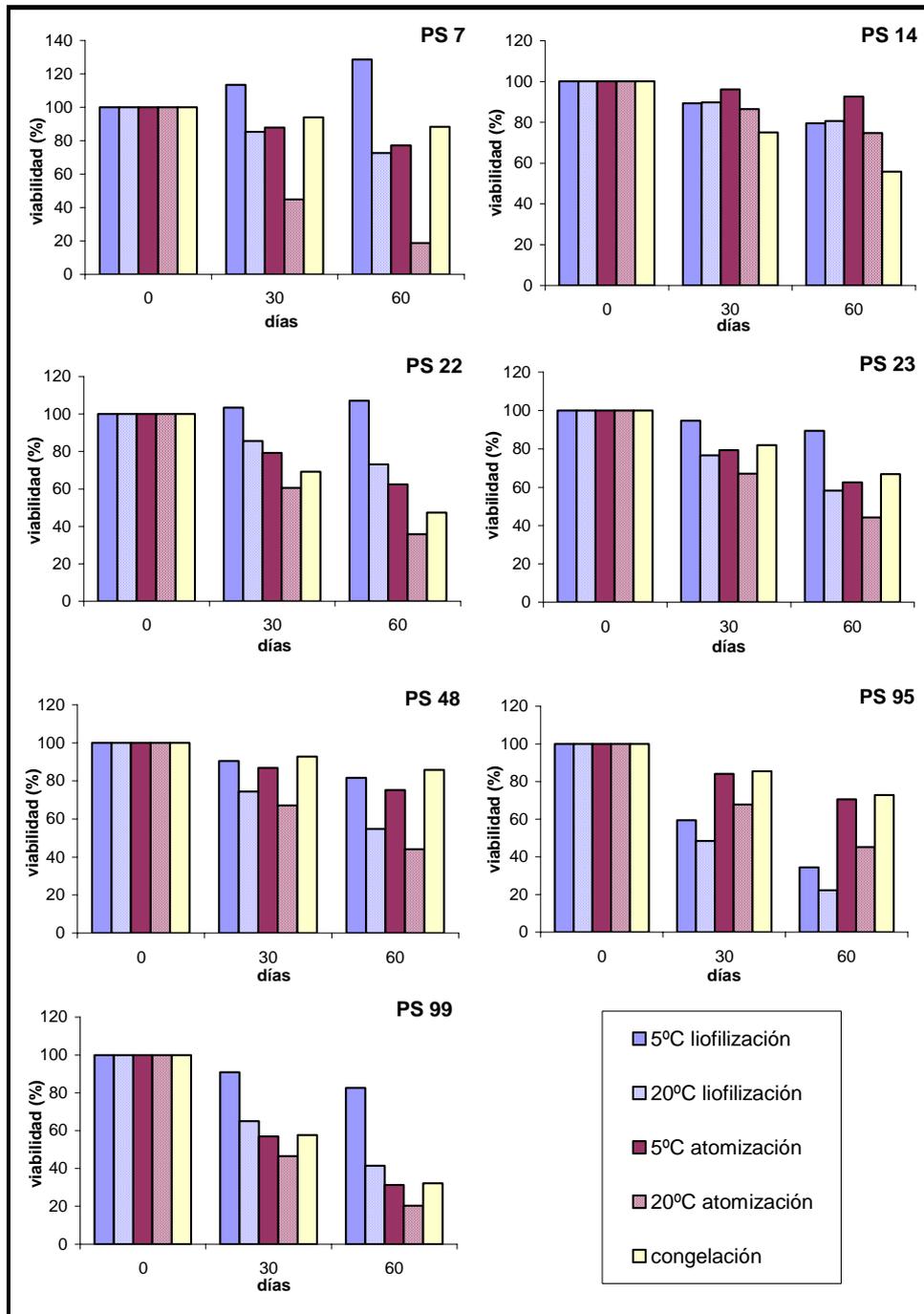


Figura 5.12b Porcentajes de viabilidad de los cultivos de las BAL psicrótrofas congelados a -80°C , liofilizados y atomizados almacenados a 5°C y 20°C .

Los valores D (cuadro 5.9) reflejan nuevamente como a la temperatura de almacenamiento de 5°C todas las cepas tendrían una vida útil más prolongada que a 20°C. De todas maneras los valores D deben considerarse como una estimación o aproximación de la duración de los cultivos, pero el hecho que se cumpla esta predicción estará en función directa de la humedad y ésta a su vez estará relacionada directamente con el tipo de envase utilizado.

Cuadro 5.9
Valores D de los cultivos de BAL liofilizados, atomizados y congelados expresados en días

| CEPAS | Liofilización | | Atomización | | Congelación |
|--------------|---------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C | |
| TA 20 | 192,31 | 158,73 | 128,20 | 79,36 | 67,57 |
| TA 43 | 476,19 | 178,57 | 63,69 | 33,22 | 1428,57 |
| TA 73 | — | 5000 | 172,41 | 79,36 | 86,21 |
| TA 75 | 178,57 | 65,36 | 175,44 | 129,87 | 222,22 |
| TA 76 | — | — | 243,90 | 68,96 | 158,73 |
| Ps 7 | — | 238,09 | 285,71 | 46,95 | 588,23 |
| Ps 14 | 303,03 | 322,58 | 909,09 | 243,90 | 117,65 |
| Ps 22 | — | 227,27 | 147,06 | 69,93 | 94,34 |
| Ps 23 | 625 | 131,58 | 153,85 | 90,09 | 175,44 |
| Ps 48 | 357,14 | 121,95 | 243,90 | 87,72 | 500 |
| Ps 95 | 61,73 | 46,08 | 200 | 89,29 | 256,41 |
| Ps 99 | 357,14 | 81,30 | 65,79 | 48,78 | 58,48 |

— No se obtuvo disminución en los recuentos.

De los tres métodos se ha observado que la congelación fue el que condujo a una mayor variabilidad de las cepas ensayadas. De todas maneras solamente se ha realizado el estudio a una temperatura (-80°C) y con glicerol como agente crioprotector. Las 12 cepas evaluadas proceden de una colección de un total de 150 BAL confeccionada hace cuatro años y hasta el momento se han excluido 13 que no sobrevivieron a la congelación después de aproximadamente tres meses a -20 y -80°C. Esto pudo deberse la hecho de que, según afirman algunos autores, para algunas cepas lácticas el glicerol no

siempre es efectivo como agente crioprotector (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998). En relación con la conservación de cultivos iniciadores en congelación, según Chavarri *et al.*, (1988), los mejores resultados en cuanto al mantenimiento de viabilidad de *L. lactis* ha sido la aplicación de temperaturas de -40°C a -70°C y la adición de 5% de lactosa o sacarosa, como agentes crioprotectores. Asimismo, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* puede conservarse sin descensos apreciables de actividad a -20°C durante un mes y a -85°C durante 4-6 meses.

La variabilidad de los resultados del efecto de la congelación sobre las BAL y la pérdida de cepas de la colección son factores que se deben considerar con el fin de mejorar el protocolo de congelación utilizado hasta el momento.

Es conocido que las bacterias lácticas se exponen al estrés por frío durante la congelación de cultivos iniciadores o de productos lácteos. No obstante, algunos autores han comprobado que después de la congelación y durante la maduración posterior en el caso de quesos, su evolución es normal (Didienne *et al.*, 1978). Epstein *et al.* (1978), citados por Lamúa, (2000), observaron en queso Quarg, que aunque la congelación y descongelación del mismo reducía la flora total del queso y alargaba su fase de latencia, el desarrollo microbiano posterior era el esperado y no afectaba a las características sensoriales del producto final. Sin embargo, otros autores como Alichanidis *et al.* (1981), Resmini *et al.* (1973) y Kim y Yu (1988; citados por Lamúa, 2000), han demostrado un aumento del pH en quesos elaborados a partir de cuajada congelada atribuible al descenso de bacterias lácticas durante la conservación en el estado congelado.

Si la congelación se realiza en el momento adecuado, la velocidad de congelación ha sido rápida, la temperatura de conservación suficientemente baja y el tiempo de conservación no muy prolongado, se provocan menores destrucciones de microorganismos con el consiguiente beneficio en la calidad del producto (Lamúa, 2000).

Actualmente existe muy poca información disponible en que se compare específicamente los efectos de varios métodos en las propiedades celulares de un mismo microorganismo. Muchas de las investigaciones realizadas utilizan un solo método para diferentes microorganismos. Incluso cuando se disponen de datos de dos laboratorios distintos que utilizan el mismo microorganismo pero diferente método, las comparaciones son difíciles de hacer porque el tipo

de cultivo, las condiciones de crecimiento y las condiciones de trabajo varían significativamente (Johnson y Etzel, 1995).

Al igual que en el presente estudio Johnson y Etzel (1995) caracterizaron y compararon directamente los efectos de la congelación, la liofilización y la atomización en las propiedades celulares de un BAL, *Lactobacillus helveticus* (CNRZ-32). Los cultivos fueron congelados a una temperatura de -20°C , liofilizados y atomizados a una temperatura de entrada de 220°C y de salida de 82°C y de 120°C . Los porcentajes de humedad fueron de 6,49%, 2,4%, 4,56% para las muestras atomizadas a una temperatura de salida de 82°C , las muestras atomizadas a una temperatura de salida de 120°C y las muestras liofilizadas, respectivamente. Las muestras congeladas dieron unos porcentajes de supervivencia de 54% después de dos semanas. La supervivencia celular fue de 48% para las muestras liofilizadas, de 15% para las muestras atomizadas a una temperatura de salida de 82°C y de 0,8% para las muestras atomizadas a una temperatura de salida de 120°C . Esta experiencia corrobora los resultados de las pruebas preliminares en que el porcentaje de supervivencia se vio afectado a temperaturas más altas de salida del equipo.

Así también los resultados de viabilidad a través del tiempo obtenidos en este estudio mostraron la misma tendencia que en el estudio de Johnson y Etzel (1995) en el que fueron más altos los valores de viabilidad para las muestras congeladas y liofilizadas que para las atomizadas. Aunque en nuestro estudio se obtuvo la mayor estabilidad en las muestras liofilizadas que las congeladas. Los porcentajes de viabilidad después de 60 días de almacenamiento a 5°C fueron más elevados que los obtenidos por Johnson y Etzel (1995). Las muestras liofilizadas dieron unos porcentajes de viabilidad entre 67-100% en los cultivos mesófilos y de 34-100% en los cultivos psicrótrofos, las congeladas dieron unos porcentajes de 37-95% en los mesófilos y de 55-89% en los psicrótrofos y las atomizadas dieron porcentajes de 33-74% en los mesófilos y de 32-90% en los psicrótrofos (figuras 5.11 y 5.12).

To y Etzel (1997) también compararon a gran escala la atomización, liofilización y congelación como métodos para conservar la bacteria *Brevibacterium linens* (ATCC 9174). Atomizaron los cultivos a una temperatura de entrada de 220°C y varias temperaturas de salida: 80°C , 75°C , 70°C y 57°C . Los cultivos fueron congelados a una temperatura de -20°C . Las muestras atomizadas y liofilizadas fueron almacenadas a una temperatura de 4°C durante 71 días. La

máxima viabilidad en los cultivos atomizados (100%) se dio a una temperatura de salida de 57°C, ya que el porcentaje de viabilidad decrecía al aumentar la temperatura de salida. En las muestras liofilizadas y congeladas también se obtuvo un 100% de células viables. La viabilidad de las muestras se mantuvo constante en la primera semana de almacenamiento a 4°C en ausencia de oxígeno y humedad, pero fue decreciendo gradualmente a lo largo del tiempo.

Pese a que To y Etzel (1997) obtuvieron porcentajes de viabilidad mayores a los de este estudio, llegaron a misma conclusión de que los tres métodos de conservación de cultivos bacterianos eran aceptables.

Según Mäyrä-Mäkinen y Bigret (1998) los métodos más eficientes y ampliamente utilizados para la conservación a largo plazo de cultivos de bacterias lácticas son la congelación rápida de concentrados de células en nitrógeno líquido o la liofilización.

Si se considerara solamente la supervivencia de células viables inmediatamente después de someter los cultivos a cada uno de los tres procesos, la atomización sería el método más aceptable, seguido de la congelación y la liofilización (cuadro 5.7). En el momento de tomar una decisión sobre cual es el método más adecuado para cada una de las cepas ensayadas se debe valorar la suma del efecto del proceso y la estabilidad del cultivo en almacenamiento durante el tiempo de evaluación.

Si bien es cierto que la mayoría de cultivos fueron más susceptibles al proceso de liofilización, reflejado por el porcentaje de supervivencia en el cuadro 5.7, se ve también como fue el método mediante el cual se obtuvieron cultivos deshidratados más estables, con valores de viabilidad más altos después de los 60 días de almacenamiento (figuras 5.11 y 5.12).

De este estudio y en base a los resultados obtenidos podemos deducir que la liofilización es el método de conservación de BAL más aceptable desde el punto de vista de mantenimiento de viabilidad. En segundo lugar tendríamos la congelación y en tercer lugar la atomización.

La mayor pérdida de viabilidad de los cultivos atomizados puede estar relacionada con los valores de humedad del polvo, ya que mayoritariamente estos porcentajes son más altos en cultivos atomizados que en los liofilizados (cuadro 5.8)

En el cuadro 5.10 se presentan los resultados del mejor método de conservación para cada uno de los cultivos en base al porcentaje de recuperación de células viables totales a los 60 días a 5°C en relación a la población inicial antes de aplicarse cada uno de los métodos. Por tanto, en la tabla se refleja el efecto global del proceso aplicado y de la estabilidad en almacenamiento por un periodo de 60 días. Se podría afirmar que los métodos basados en la deshidratación son mejores que la congelación, siempre que los cultivos deshidratados se mantengan en refrigeración. El método de deshidratación a utilizar varía en función de la cepa sometida a estudio.

Cuadro 5.10

Método de conservación más adecuado para cada una de las cepas láctica

| CEPAS | PROCESO DE CONSERVACIÓN * | % Supervivencia después de 60 días |
|--------------|----------------------------------|---|
| TA 20 | atomización | 100 |
| TA 43 | congelación | 90,91 |
| TA 73 | liofilización o atomización | 65,35 o 75,35 |
| TA 75 | liofilización o congelación | 47,62 |
| TA 76 | liofilización o atomización | 93,33 o 88,89 |
| Ps 7 | atomización | 100 |
| Ps14 | liofilización o atomización | 95 o 100 |
| Ps22 | atomización | 100 |
| Ps23 | liofilización | 80 |
| Ps48 | atomización | 100 |
| Ps95 | atomización o congelación | 100 |
| Ps99 | liofilización | 70,69 |

*Cultivos deshidratados mantenidos a 5°C

Si se tuviera que elegir entre uno de los métodos se tendrían que evaluar otros factores como por ejemplo el aspecto económico y la disponibilidad del equipo. La necesidad del fabricante condicionará la elección entre uno de ellos. La congelación y la refrigeración siempre pueden considerarse como métodos secundarios de conservación de los cultivos una vez se ha resuspendido el producto deshidratado. Cada uno de los métodos evaluados en este estudio presenta ventajas e inconvenientes.

Entre los aspectos más interesantes a tener en cuenta en futuros estudios estaría la evaluación del potencial antagonista de las cepas después de ser liofilizadas o atomizadas, ya que justamente el interés radica en su capacidad de inhibir el crecimiento de microbiota contaminante de sangre de matadero.

Existen estudios que confirman que generalmente la producción de bacteriocinas no queda afectada después de un proceso de deshidratación adecuado. Mauriello *et al.* (1999) comprobaron como después de atomizar cuatro cultivos de BAL diferentes (*Lactococcus lactis* (lactis 140), *L. Lactis* (lactis G35), *Lactobacillus curvatus* 32Y y *Lactobacillus* 8Z), éstos no perdieron la habilidad de producir bacteriocinas.

Con respecto a las BAL del presente estudio, hasta el momento no se han detectado cambios en cuanto al potencial antagonista en placa e *in situ* de las cepas conservadas en congelación (-20°C y -80°C).

En este estudio no se ha evaluado la influencia del envase sobre la conservación de la calidad de los cultivos. Este es un aspecto que debe considerarse en una futura aplicación. Asimismo, no se han evaluado los mecanismos que pueden haber causado la disminución de la viabilidad pero sería importante entender como las propiedades termofísicas de las muestras deshidratadas cambian durante el almacenamiento cuando son expuestas a ambientes húmedos y temperaturas más elevadas (Conrad *et al.*, 2000).

Otro aspecto a tener en cuenta sería también el medio de resuspensión de los cultivos deshidratados y su influencia sobre la estabilidad en almacenamiento (Costa *et al.*, 2000).

5.5 CONCLUSIONES

1. El agente crioprotector que ha permitido mantener una mayor viabilidad en los cultivos liofilizados ha sido la leche en polvo al 20%. Los porcentajes de células viables al final del periodo de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, de los cultivos que contenían leche en polvo ha sido del 72-100%, mientras que los porcentajes de viabilidad con glucosa al 10% y lactosa al 12% han sido del 0,39-39,55% y del 0,04-57,68%, respectivamente.
2. La liofilización con leche al 20% y almacenamiento a 5°C se ha mostrado como un buen método de conservación para las cepas estudiadas.

3. La atomización ha sido el método de conservación que ha permitido obtener un mayor porcentaje de recuperación de células viables después del proceso.
4. La leche en polvo al 20% se ha mostrado más adecuada que el caldo selectivo MRS como medio de crecimiento de los cultivos lácticos que debían someterse a la atomización. Se alcanzaban mayores porcentajes de recuperación cuando el pH del medio se neutralizaba (6,7-7) previamente al proceso de deshidratación.
5. La viabilidad de las cepas atomizadas conservadas en refrigeración ha sido en la mayoría de los casos equiparable a la conseguida en cepas congeladas y mantenidas a -80°C . La conservación de los cultivos atomizadas a temperatura ambiente es el método que ha conducido a cultivos con menores porcentajes de viabilidad al final de los 60 días..
6. Los métodos de conservación basados en la deshidratación (atomización y liofilización) y mantenimiento en refrigeración se han mostrado más eficaces que la congelación.
7. Sin embargo, no existe un sistema de deshidratación eficaz para todas las cepas estudiadas en concreto, sino que se deberá utilizar la atomización o la liofilización en función de la cepa que se pretenda conservar.

1. De las 112 cepas de bacterias lácticas evaluadas en condiciones mesófilas se seleccionaron 5 (TA20, TA43, TA73, TA75 y TA76) en función de su amplio espectro de inhibición en placas de agar frente a indicadores autóctonos y de colección y de su capacidad de crecimiento en sangre.
2. En condiciones mesófilas no se consiguieron reproducir en sangre las actividades inhibitorias demostradas por las cepas de bacterias lácticas en los ensayos realizados en medios de cultivo sólidos. Se obtuvieron reducciones del crecimiento de *S. aureus* NCTC4163 de entre 1 y 2 órdenes de magnitud en presencia de la cepa TA43 y del crecimiento de *S. aureus* autóctono de 1 orden de magnitud en presencia de las BAL TA20 y TA75.
3. La adición de azúcar a la sangre (2% p/v) tuvo un efecto estimulador del crecimiento y del potencial antagonista de las cepas lácticas frente a la totalidad de indicadores autóctonos. Se alcanzaron inhibiciones de 3 y 4 órdenes de magnitud de *E. coli* y *Bacillus* spp., respectivamente; desde 4 reducciones decimales hasta la inhibición total de *P. fluorescens* y 3 de las cepas inhibieron totalmente *S. aureus*.
4. De las 100 cepas de bacterias lácticas evaluadas en condiciones psicrótrofas se seleccionaron 11 en función de su amplio espectro de inhibición en placas de agar frente a indicadores autóctonos y de su capacidad de crecimiento en sangre a 15°C.
5. Todas las BAL psicrótrofas seleccionadas fueron capaces de inhibir en sangre enriquecida con glucosa (2% p/v) a 15°C a *Bacillus* spp. (rif +), *E. coli* y *P. fluorescens*, siendo más interesantes por su potencial antagonista Ps7, Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95, Ps99, ya que inhibían a estos organismos indicadores en órdenes de magnitud superiores al resto de las BAL ensayadas.
6. En condiciones psicrótrofas el microorganismo más sensible a la presencia de bacterias lácticas fue *Bacillus* spp. (rif +) ya que 8 de las 11 BAL redujeron su crecimiento en más de 4 ordenes logarítmicos. Se obtuvo el mismo nivel de inhibición de *P. fluorescens* en el caso de 2 BAL; *E. coli* fue inhibido en un máximo de 3 órdenes de magnitud mientras que *S. aureus* no creció en sangre incluso en ausencia de la cepa láctica.

7. La secuenciación del segmento V1-V3 del 16S DNAr permitió identificar el género y especie de 7 de las 12 BAL que superaron las fases de selección. Las 5 BAL restantes fueron identificadas a nivel de género pero no se pudo discernir entre 2 o 3 especies muy próximas entre sí.
8. Las bacterias que habían mostrado actividad antagonista en condiciones psicrótrofas fueron identificadas como *Lactococcus garvieae* (Ps14, Ps22, Ps23, Ps48, Ps95) y *Enterococcus malodoratus/gilvius/raffinosis* (Ps7 y Ps99).
9. Todas las BAL con actividad antagonista en condiciones mesófilas pertenecían al género *Lactobacillus*. TA73, TA75 y TA76 se identificaron como *Lactobacillus murinus/animalis*. TA43 se identificó como *Lactobacillus reuteri*.
10. La BAL TA20, que demostró capacidad antagonista en condiciones mesófilas y psicrótrofas, se identificó como *Lactococcus garvieae*
11. La leche en polvo al 20% fue el crioprotector más adecuado para cultivos liofilizados en comparación con glucosa (10%) y lactosa (12%) ya que se mantuvieron porcentajes de viabilidad más altos a lo largo de 60 días en almacenamiento a 5°C y 20°C.
12. La liofilización se ha mostrado como un buen método de conservación para todas las cepas estudiadas. Los porcentajes de viabilidad han sido siempre muy superiores en los cultivos mantenidos en refrigeración. En siete de las doce cepas sometidas a estudio el sistema de conservación más eficaz ha sido la liofilización y el almacenamiento de los cultivos liofilizados a 5°C.
13. La atomización ha sido el método de conservación que ha permitido obtener un mayor porcentaje de recuperación de células viables después del proceso. La viabilidad de las cepas atomizadas conservadas en refrigeración ha sido en la mayoría de los casos equiparable a la conseguida en cepas congeladas y mantenidas a -80°C. La conservación de cepas atomizadas a temperatura ambiente es el método que ha conducido a cultivos con menores porcentajes de viabilidad al final del almacenamiento.
14. Los porcentajes de supervivientes al proceso de congelación han sido superiores a los de las cepas liofilizadas. En cuatro de las doce cepas el

mejor resultado en cuanto a estabilidad durante el almacenamiento se ha conseguido mediante la congelación a -80°C .

15. En general, los métodos de conservación basados en la deshidratación (atomización y liofilización) y el mantenimiento en refrigeración (5°C) de las cepas deshidratadas se han mostrado más eficaces que la congelación.

Bibliografía

- A**bd El-Gawad, I.A.; Metwally, M.M.; El-Nockrashy, S.A. y Ahmed, K.E. 1989. Spray Drying of Lactic Acid cultures: The effect of culture conditions and storage on microorganisms survival. Egypt. J. Dairy Sci., 17: 273-281.
- Abriouel, H.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Matínez- Bueno, M. y Valdivia, E. 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. Appl. Environ. Microbiol., marzo: 1473-1477.
- Accolas, J.P.; Veaux, M. y Auclair. 1971. Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pate cuite. Le Lait, 51:249.
- Adams, M. R y Halls, C. J. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. Technol., 23: 287-292.
- Aguirre, M. y Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacteriol., 75: 95-107.
- Ahn, C. y Stiles, M.E. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. J. Appl. Bacteriol., 69: 302-310.
- Alakomi, H. L.; Skytta, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K. y Helander, I. M. 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. Appl. Environ. Microbiol., 66, mayo:2001-2005.
- Alichanidis, E.; Polychroniadou, A.; Tzanetakis, N. y Vafopoulou, A. 1981. Teleme cheese from deepfrozen curd. J. Dairy Sci., 64: 732.
- Anderson, D.G. y Mackay, L.L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol., 46: 549-552.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria. Classification and Physiology. En: Salminen, S. y Von Wright, S. Lactic Acid Bacteria. Microbiol. and Functional Aspects. Segunda edición. Marcel Dekker, INC. 617pp.
- Aymerich, M^a T. y Hugas, M. 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. Eurocarne, 72, diciembre: 39-49.
- Aymerich, T.; Holo, Havarstein, L.S.; Hugas, M.; Garriga, M. y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol., 62: 1676-1682.
- B**achrouri, M.; Quinto, E. J. y Mora, M. T. 2002. Survival of *E. coli* O157:H7 During Storage of Yogurt at Different Temperatures. J. Food Sci., 67: 1899-1903.
- Barbosa-Cánovas, G.V. y Vega-Mercado, H. 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 297pp.
- Barefoot, S.F. y Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1808-1815.
- Batish, V.K.; Roy, U.; La, I R.; y Grover, S. 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria. Crit. Rev. Biotechnol., 17 (3): 209-225.

Bergere .1987. Eliminación de las bacterias de la leche por centrifugación. En: Eck, A. (coord.) 1990. El queso. Ed. Omega. Barcelona. 162-164.

Bergey's manual of systematic bacteriology- volumen 2 1986. Sneath P.; Mair, N. Sharpe, E. y Holt,,J. (Eds). Willians and Wilkins Company Co. Baltimore, Maryland, 969-1599pp

Bermejo Sanz Mª del Val. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Seminario de Liofilización (En línea). Accesible en www.uv.es/mbermejo/Freeze-Drying.pdf (Consulta febrero 2003).

Berthier, F. y Erlich, S.D. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett., 161: 97-106.

Bjorck, L.; Claesson, O. y Schuthess, W. 1979. The lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. Milchwissenschaft, 34: 276.

Bonaterra, A. 1997. Aïllament i Caracterització de fitobacteris Epífits Antagonistes i Control Biològic de *Stemphylium vesicarium*. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona.

Booren, A. M. y Weiss, G. M. 1988. Lean skeletal meat trimmings incidental to slaughter.. En: Pearson, A. M. and Dutson, T. R. Edible meat by-products. Advances in Meat Research, Volume 5. Elsevier Science Publishers LTD. London-New York. 219-230 pp

Borderias, J. 1995. Aplicación de altas presiones en la tecnología de alimentos. Alimentación, Equipos y Tecnología, marzo: 109-111.

Bredholt, S.; Nesbakken, T. y Holk, A. 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum-and gas-packaged meat. Int. J. Food Microbiol., 53: 43-52.

Brennan, J.G. 1996. Spray drying techniques for food dehydration. Process Technology, The European food and drink review-spring, 96: 23-28.

Brennan, M.; Wanismail, B.; Johnson, M.C. y Ray, B. 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Prot., 49: 47-53.

Buncic, S.; Avery, S.M. y Moorhead, S.M. 1997. Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* cultures on long-term stored meats at 4°C. Int. J. Food Microbiol., 34(2): 157-170.

Buyong, N.; Kok, J. y Luchansky, J.B. 1998. Use of Genetically Enhanced, Pediocin-Producing Starter Culture *Lactococcus lactis* subsp. MM217 to Control *Listeria monocytogenes* in Cheddar Cheese. Appl. Environ. Microbiol., diciembre: 4842-4845.

Caldironi, H.A y Ockerman, H.W. 1982. Incorporation of blood Proteins into Sausage. J. Food Science, 47: 405-408.

Carretero, C. y Parés, D. 2000. Improvement of the microbiological quality of blood plasma for human consumption purposes. Recent. Res. Dev. Agricultural and Food Chem.,4: 203-216.

- Casas, I.; Edens, W. y Dobrogosz, W. 1998. *Lactobacillus reuteri*: An effective probiotic for poultry and other animals. En: Salminen, S. y Von Wright, S. Lactic Acid Bacteria. Microbiol. and Functional Aspects. Segunda edición. Marcel Dekker, INC. 617pp.
- Casaus, P.; Nilsen, T.; Cintas, L.M. Nes, I.F.; Hernández, P.E. y Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiol., 143: 2287-2294.
- Casp, A. y Abril, J. 1999. Procesos de conservación de alimentos. Tecnología de alimentos. Editorial AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. 494pp.
- Castro, H.P.; Teixeira, P.M. y Kirby, R. 1997. Evidence of membrana damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. J. Appl. Microbiol., 82: 87-94.
- Chang.Shung, T.; Simpson, J. y Kevin, Y. 2002. All-atom homology model of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit. Nature Structural Biology. Accesible a: chem-faculty.ucsd.edu/joseph/Publications/Tung2002.pdf. (Consulta octubre 2002)
- Chavarri, F.J.; Paz, M. y Núñez, M. 1988. Cryoprotective agents for frozen concentrated Startes from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. Biotechnol. Lett., 10: 11.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J.L. y Lorient, D. 1989. Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. 346pp. Traducción de: Protéines alimentaires. Biochimie- Propiétés fonctionelles - Valeur nutritionelle - Modifications Chimiques. 1985. Technique et Documentation. Lavoisier, París.
- Cheftel, J.; Cheftel, H. y Besançon, P. 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen II. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 404pp.
- Cheftel, J.C. 1991. Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. Actualités des industries alimentaires et agro-alimentaires, marzo: 141-153.
- Cintas, L.M.; Casaus, M.P. y Hernández, P.E. 2000. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. Alimentaria, diciembre: 61-70.
- Cintas, L.M.; Casaus, P.; Havarstein, L.V.; Hernández, P.E. y Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol., 63: 4321-4330.
- Cintas, L.M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernández, P.E. Nes, I.F. y Havarstein, L.S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 are related to staphylococcal hemolysis. J. Bacteriol, 180: 1988-1994.
- Collado, J. 1995. Situación medioambiental de la industria cárnica de Cataluña. Cárnica 2000, julio- agosto 95: 43-47.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Philips, B.A y Kandler, O. 1984. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J. General Microbiol., 129: 3427-3431.

Edwards, C.G.; Reynolds, A.G.; Rodríguez, A.V.; Semon, M.J. y Mills, J.M. 1999. Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentations and inhibition of yeast by *Lactobacillus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50 (2): 204-210.

Eldar, A.; Goria, M.; Ghitino, C.; Zlotkin, A. y Bercovier, H. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, marzo: 1005-1008.

Elliot, J.A.; Collins, M.D.; Pigott, N.E. y Facklam, R.R. 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole -cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2731-2734.

Epstein, L.; Cogan, U. y Calmanovici, B. 1978. Microbiol. and shelflife of soft cheese stored under refrigeration and frozen conditions. XX Int. Dairy Congress, E, 1018.

Espina, F. y Packard, V.S. 1979. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *J. Food Prot.*, 42 (2): 149-152.

Etheridge, P.A.; Hickson, D.W. ; Young, C.R.; Landmann, W.A. y Dill, C.W. 1981. Functional and chemical characteristics of bovine plasma proteins isolated as a metaphosphate complex. *J. Food Sci.*, 46: 1782-1784.

FAO. *FAOSTAT AGRICULTURE DATA*. Accesible a <http://apps.fao.org>. (Consulta 21-8-02).

Farber, J.M.; Warburton, D.W.; Tour, L. y Milling, M. 1990. Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol.*, 7: 327-334.

Felipe, X.; Trujillo, A.J.; Sendra, E. y Guamis, B. 1994. Utilización de los tratamientos por alta presión para la conservación de alimentos. *Alimentaria*, octubre, 94: 35-39.

Fleming, H.P.; Etchells, J.L. y Costilow, R.N. 1975. Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.* 30: 1040-1042.

Fragoso Sousa, L. y Fernández Riusech, M. 2000. Las bacterias lácticas como probióticos y biopreservantes. *Alimentaria*; abril: 89-98.

Franz, C.; Holzapfel, W. y Stiles, M. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 1-24.

Gänzle, M.; Hölzel, A.; Walter, J. Jung, G. y Hammes, W. 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LRH2584. *Appl. Environ. Microbiol.*, octubre: 4325-4333.

Gardiner, G.E.; O'Sullivan, E.; Nelly, J.; Auty, M.A.E.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K.; Ross, R.P. y Stanton, C. 2000. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (6): 2605-2612.

Garriga, M. Hugas M., Gou P., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 1996. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 32: 173-183

Garriga, M.; Hugas, M.; Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from dry sausages. J. Appl. Bacteriol., 75: 142-148.

Garriga, M; Julià A. y Hugas M. 1998. Experiencias piloto para el control de patógenos en embutidos poco acidificados mediante la utilización de cultivos bioprotectores. Eurocarne, 69, septiembre: 61-66.

Garvie, E.I.; Farrow, J.A.E. y Philips, B.A. 1981. A taxonomic study of some strains of streptococci that grow at 10°C but not at 45°C, including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Zentralblatt für bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 1 Abteilung, originale C2: 151-165.

Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87: 175-188.

Gilliland, S.E. y Speck, M.L. 1972. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. J. Milk Food Technol., 35: 307-310.

Godinez, S.; Oviedo, M^a T.; Lorenzo, A.M. y Calderón, M. 2002. Evaluación de cepas de hongos filamentosos conservadas por liofilización. Alimentaria; enero-febrero: 65-67.

Golf, J.H.; Bhunia, A.K. y Jonhson, M.G. 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. J. Food Prot., 59: 1187-1192.

Gombas, D.E. 1989. Biological competition as a preserving mechanism. J. Food Safety, 10: 107-117.

Gourama, H. 1997. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/FST. Vol.30, mayo: 279-283.

Guilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 175-188.

Günter, K.; Pack, A. ; Bonaparte y C. Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 41: 103-125.

Ha, D.M. 1994. Supressionof acidic deterioration of Kimchi during the fermentation process. In The Science of Kimchi, pp 400-413. Korean society of Food Science and Technology, Seoul.

Harper, J.P.; Suter, D.A.; Dill, C.W. y Jones, E.R. 1978. Effect of heat treatment and protein concentration on the rheology of bovine plasma protein suspensions. J. Food Sci., 43: 1201-1209.

Henneberg, W. 1904. Zur kenntnis der milchsäurebakterien der brennereimaische, der milch, des bieres, der presshefe, der sauerkohls, der säuren gurken und des saurteigs, sowie einige bermerkungen über die milchsäurebakterien des menshilshen magens. Zentbl. Bakt. Parasitkde Abt.II, 11:154-170.

Hernández, P.E.; Rodríguez, J.M.; Cintas, L.M.; Wagner, L.; Sobrino, J.; Fernández, M.F. y Bernabé, S. 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. Microbiología SEM, 9: 37-48.

Hill, C. 1996. Bacteriocins: natural antimicrobials from microorganisms. En: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G.W. (Ed). Chapman and Hall Co. 324pp.

Holzappel, W.H.; Geisen, R. y Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 343-362.

Holzappel, W.H.; Schillinger, U. Du Toit, M. y Dicks, L.M.T. 1996. Systematics of probiotic lactic acid bacteria with reference to modern phenotypic and genomic methods. En: *Proceedings of the Symposium Probiotics in Man and Animal*, Berlin, June 20-22, 1996. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft eV., Berlin, p.11.

Hoover, D.G.; Metrick, C.; Papineau, A.M.; Farkas, D.F. y Knorr, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.*, 43: 99-107.

Howell, N.K. y Lawrie, R.A. 1984. Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties. *J. Food Technol.*, 19: 289-295.

Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic Lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.*, 49: 139-150.

Hunter-Cevera, J. y Belt, A. 1996. *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Academic Press Inc. London. 263pp

Hurst, A. 1972. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: The antagonism between *Streptococcus lactis* and spore-forming microbes. *J. Milk Food Technol.*, 35: 418-423.

Hutton, M. T.; Chehak, P. A. y Hanlin, J. H. 1991. Inhibition of botulinum toxin production by *Pediococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods. *J. Food Safety*, 11, enero: 255-267.

International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms. 2001. Minutes of the meetings, 22 y 23 Septiembre 1999, Veldhoven, The Netherlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 259-261.

International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms. 2000. Minutes of the meetings, 4 y 6 julio 1994, Praga, República Checa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1391-1392.

Jay, J. 1997. *Modern Food Microbiol.*. Quinta edición. Ed. Chapman & Hall. 661pp.

Jay, J.M.; Rivers, G.M. y Boisvert, W.E. 1983. Antimicrobial properties of α -dicarbonyl and related compounds. *J. Food Prot.*, 46: 325-330.

Jett, B.D.; Huyke, M.M. y Gilmore, M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462-478.

Johnson, J.A.C. y Etzel, M.R. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 Attenuated by Spray-Drying, Freeze-Drying, or Freezing. *J. Dairy Sci.*, 78 (4): 761-768.

Conrad, P.B.; Millar, D.P.; Cielenski, P.R. y Pablo, J.J. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in *saccharide* matrices. *Cryobiology* 41: 17-24.

Costa, E.; Teixidó, N.; Usall, J.; Fons, E.; Gimeno, V.; Delgado, J. y Viñas, I. 2002. Survival of *Pantoea agglomerans* Strain CPA-2 in a Spray-Drying Process. *J. Food Prot.*, 65 (1): 185-191.

Costa, E.; Usall, J.; Teixidó, N.; Garcia, N. y Viñas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and inicial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 793-800.

Costafreda, V. 1996. El 68% de la Sang dels Escorxadors Catalans es reaprofit. *Subproductes*, junio 96: 17-19.

Crandall, A.D. y Montville, T.J. 1993. Inhibition of *Clostridium botulinum* Growth and Toxigenesis in a model gravy system by coinoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56, junio: 485-488.

Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial Substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives: *Food Technol.*, enero: 164-167.

David, A., Ledward y Ralston A. Lawrie, 1984. Recovery and Utilisation of By-product Proteins of the Meat Industry. *Chem. Tecn. Biotechnol*, 34B: 223-228.

De Las Fuentes, L.; Urkiaga, A.; Berganza, J. y Font, J. 1998. Minimización de vertidos y aprovechamiento de subproductos en mataderos. *Eurocarne* 71; noviembre: 35-43.

De Vuono, M; Penteado, C.; Lalojo, F.M. y Pereira dos Santos, N. 1979. Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 30 (8): 809-815.

De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. En: De Vuyst, I. y Vandamme, E.J. (Eds.). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional, U.K. 221pp

Dewhirst, F.; Chien, C.; Paster, B. Ericson, R.; Orcutt, R.; Schauer, D. y Fox, J. 1999. Phylogeny of the defined murine microbiota: altered schaedler flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, agosto: 3287-3292.

Dhingra, O.D. y Sinclair, J.B. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 355pp.

Didienne, R.; Millet, L. y Verlaquet, C. 1978. Freezing of saint sectaire cheese. XX International Dairy Congress, E, 1011.

DOCE L 273-10/10/02. Reglamento (CE) nº 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.

Donegan, Katherine; Matyac, Carl; Seidler, Ramon y Porteous, Arlene. 1991. Evaluation of Methods for Sampling, Recovery, and numeration of Bacteria Applied to the Phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.*, enero : 51-56.

Julliard, V.; Spinner, H.E.; Desmazeaud, M.J. y Boquien. C.Y. 1987. Phenomenes de cp-operation et d'inhibition entre les bacteries lactiques utilises en industrie laitiere. Le Lait, 67 (2): 149.

Kandler, O. y Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. Bergey's manual of systematic bacteriology- volumen 2. Sneath P.; Mair, N. Sharpe, E. y Holt,,J. (Eds). Willians and Wilkins Company Co. Baltimore, Maryland p: 969-1599

Klein, G.; Pack, A.; Bonaparte, C. y Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 41: 103-125.

Kang J. y Lee M. 1999. Mode of action of bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against Gram negative bacteria. Journal of the Korean Fisheries Societ., marzo, 32 (2): 139-143.

Kilara A.; Shahan, N.K.; Das y Grace, W.R. 1976. Effect of crioprotectiveagents on freeze-drying and storage of lactic cultures. Cultured Dairy Prod. J., 11(2): 8.

Kim, K.S. y Yu, J.H. 1988. Survival and activity of lactic acid bacteria during frozen storage. Korean J. Dairy Sci., 72: 1945. En: Lamúa, M. 2000. Aplicación del frío a los alimentos. Instituto del Frío de Madrid. Editorial AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. 350pp.

King, E.O. ; Ward, M.K. y Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demostration of the pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44: 301-307.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacterocins of acid bacteria. Biochimie, 70: 337-349.

Lamúa, M. 2000. Aplicación del frío a los alimentos. Instituto del Frío de Madrid. Editorial AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. 350pp.

Lee, C.H.1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. Food Control, 8: 259-269.

Lemoigne, M. 1997. Sur le métabolisme du diacetyle, C.R. Soc. Biol., 97: 1479-1481.

Lindgren, S.E. y Dobrogsz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev., 87:149-164.

Lonvaud-Funel, A. y Joyeux, A. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines : inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosacens*. Food Microbiol., Vol. 10, 5: 411-419.

Löhnis, F. 1907. Versuch einer gruppierung der milchsäurebakterien. Zentbl. Bakt. Parasitkde Abt.II, 18: 97-149

Madrid, A. 1999. Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 343pp.

Mafart, P. y Béliard, E. 1994. Ingenieria Industrial Alimentaria. Volumen I. Procesos físicos de conservación. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 277pp.

Marth, E.H., Steele, J.L. 2001. Applied Dairy Microbiol.. (2 ed.). New York: Basel. 744pp.

Martínez, M^a. I.; Martínez, J.M^a.; Herranz, C.; Suárez, A.M^a. y Rodríguez, J.M. 2000. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas: modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. Alimentaria; julio-agosto: 67-74.

Masters, K. 1991. Spray Drying Handbook. Longman Group Limited, UK. En: Barbosa-Cánovas, G.V. y Vega-Mercado, H. 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 297pp.

MSDS (Material Safety Data Sheets). *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (En línea). Accesible en <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/msds-ftss/msds146e.html>. (Consulta marzo, 2003).

Mauriello, G.; Aponte, M.; Andolfi, R.; Moschetti, G. y Villani, F. 1999. Spray-drying of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. J. Food Prot., 62: 773-777.

Mäyra-Mäkinen, A. y Bigret, M. 1998. Industrial Use and Production of Lactic acid Bacteria. En: Salminen, S. y Von Wright, S. 1998. Lactic Acid Bacteria. Microbiol. and Functional Aspects. Marcel Dekker, INC. 617pp.

Metwally, M.M.; Abd El-Gawad, I.A.; El-Nockrashy, S.A. y Ahmed, K.E. 1989. Spray Drying of Lactic Acid culture: The effect of spray drying conditions on the survival of microorganisms. Egypt. J. Dairy Sci., 17: 35-43.

Monfort, J.M.; Hugas, M.; Pages, F. y Garriga, M. 1996. Comparison of different bacteriocin-producing *Lactobacilli* on *Listeria* growth in sausages. Eurocarne, 6: 51-55.

Morgan, P. 1985. Traitement du sang d'abattoir par conservateur biologique. ACTUALITÉ co-produits N° 92. Filiere Viande. p. 21.

Morrison, D.; Woodford, N.; Cookson, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. J. Appl. Microbiol.. Symposium Supplement 83, 89S-99S.

Nakagawa, T.; Shimada, H. Mukai, K.; Asada, I. Kato, K. y Sato, T. 1994. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR . J. Appl. Microbiol., 60: 637-640.

Nakamura, L.K. 1996. Preservation and maintenance of Eubacteria. En: Hunter-Cevera, J. y Belt, A. Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press Inc. London. 263pp

Nakamura, R.; Hayakawa, S.; Yasuda, K. y Sato, Y . 1984. Emulsifying properties of bovine blood globin: a comparison with some proteins and their improvement. J. Food Sci., 49:102-104.

Nour, M. 1998. 16S-23S y 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. Res. Microbiol., 149: 433-448.

O'Riordan, D., Kinsella, J. E., Mulvihill, D. M. y Morrissey, P. A., 1989. Gelation of plasma proteins. Food Chem., 33: 203-214 pp.

Ockerman, H.W. y Hansen, C.L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza. 387pp. Traducción de: Animal by-product Processing. 1988. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.

Okereke, A. y Montville, T.J. 1991. Bacteriocin-Mediated Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic Acid Bacteria at Refrigeration and Abuse Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 12, diciembre: 3423-3428.

Ordoñez, J.A.; Cambero, M.I.; Fernández, L.; García, M.L.; García, G.D.; de la Hoz, L. y Selgas, M.D. 1998. Tecnología de los alimentos. Volumen I.

Componentes de los alimentos y procesos. Editorial Síntesis, S.A., Madrid. 365pp.

Ouwehand, A. 1998. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. En: Salminen, S. y Von Wright, S. Lactic Acid Bacteria. Microbiological. and Functional Aspects. Segunda edición. Marcel Dekker, INC. 617pp.

Parés, D. 1995. Caracterització bioquímica i microbiològica de sang porcina d'escorxadors industrials per determinar la seva aptitud com a matèria primera en l'elaboració d'aliments destinats al consum humà. Trabajo de investigación del programa de doctorado de Microbiología y Bioquímica aplicadas. Universidad de Girona

Parés, D. 1998. Caracterització i Revaloració de la Fracció Plasmàtica de la Sang de Porc procedent d'escorxadors industrials. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona.

Parés, D. y Carretero, C. 1997. La sangre de matadero: subproducto de la industria cárnica. *Cárnica* 2000; agosto –septiembre: 49-54.

Parés, D.; Saguer, E.; Sanchez, E. y Carretero, C. 1998. Estabilidad durante el almacenamiento de las propiedades funcionales del plasma de porcino deshidratado. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, enero/febrero 98: 97-102.

Parés, D.; Saguer, E.; Saurina, J.; Suñol, J.A. y Carretero, C. 1998. Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH. *J. Food Sci.*, 63 (6): 958-961.

Pascual, M.R. 1982. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos y Bebidas. Artes gráficas Gala, Madrid. 311pp.

Pascual, M.R. 1992. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Ed. Diaz de Santos, Madrid. 360pp.

Pearson, A.M. y Dutson, T.R. 1988. Edible meat by-products. *Advances in meat research* Volume 5. Elsevier Science Publishers LTD. London-New York. 439pp.

Perunovic, M., Cavoski, D., Radovanovic, R. y Bojovic, P. 1993. Possibilities of using blood plasma in manufacture of liver paste. *Tehnologia-Mesa*, 34: 132-136 pp.

Piard, J.C. y Desmazeud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 1. Oxigen methabolites and end products from catabolism. *Lait*, 71: 525-541.

Piard, J.C. y Desmazeud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 2. Bacteriocines and other antibacterial substances. *Lait.*, 72: 113-142.

Pinel, M. 1985. Etat des techniques de traitement du sang. *V.P.C.* Vol.6(2), abril 85.

Raccach, M. y Baker, R.C. 1978 Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. *J. Food Prot.* 43, 837-841.

- Raeker, M.Ö. y Johnson, L.A. 1995. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg proteins. *J. Food Sci.*, 60: 685-690.
- Randazzo, C.; Torriani, S.; Akkermans, A.; De Vos, W. y Vaughan, E. 2002. Diversity, Dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, abril:1882-1892.
- Ranken, M. D. 1980. Applications of Blood Proteins. En : Grant, R. A. Ed. *Applied Protein Chemistry*. Applied Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 319-386.
- Real del sol, E. y Martin, M. 1991. Empleo de la Ultrafiltración en la obtención de concentrados de plasma sanguíneo. *Alimentaria*, 21, diciembre: 21-23.
- Reiter, B. y Härnolv, B.G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.*, 47:724.
- Resmini, P.; Volonterio, G.; Piergiovanni, L. y Bernardi, G. 1973. Use of freezing in the manufacture of Provolone cheese. *Latte*, 47: 252.
- Rodríguez, I. 1994. Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Cárnica. *Alimentación: Equipos y Tecnología*, abril 94: 69-73.
- Rodríguez, J.M.; Cintas, L.M.; Casaus, P.; Martínez, M.I.; Suarez, A. y Hernadez, P.E. 1997. Detection of pediocin PA-1-producing *pediococci* by rapid molecular biology techniques. *Food Microbiol.*, 14 (4), 363-371.
- Rudi, K.; Skulberg, O.; Larsen, F. y Jakobsen, K. 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7 y V8. *Appl. Environ. Microbiol.*, julio: 2593-2599.
- Ruíz, I.; Veiga, M. C., De Santiago, P. y Blázquez, R., 1993. Características de los efluentes de matadero. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, setiembre: 77-83.
- S**alminen, S. y Von Wright, S. 1998. *Lactic Acid Bacteria. Microbiol. and Functional Aspects*. Marcel Dekker, INC. New York, USA. 617pp.
- Sanders, J.W.; Venema, G. y Kok, J. 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23: 483-501.
- Schillinger U. y Lücke F. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.*, 4: 199-208.
- Schillinger U. y Lücke F. 1989. Antibacterial activity of lactobacillus sake isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, agosto: 1901-1906.
- Schöder, K.; Clausen, E.; Sandberg, A.M. y Raa, J. 1979. Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances, pp. 480-483. En Conell, J.J.(Ed.) *Adv. in Fish Sci. Technol.*. Fishing News Books, Londres.
- Shaw, D.; Leer, R. y Pouwels, P., inventors. 2001, mayo,16. Oral recombinant lactobacilli vaccines. European patent, 99203056.9
- Skinner, G.E.; Salomon, H.M y Fingerhut, G.A. 1999. Prevention of clostridium botulinum type A, proteolytic B and E toxin in refrigerated pea soup by *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014. *J. Food Sci.*, julio-agosto, 64 (4): 724-727.

Speck, M.L. 1981. Use of microbial cultures: Dairy products. Food Technol., 35, 71-73.

Speckman, C.A.; Sandine, W.E. y Elliker, P.R. 1973. Lyophilized lactic acid starter cultura concentrates: Preparation and use in inoculation of Vat Milk for Cheddar and Cottage Cheese. J. Dairy Sci., 57 (2): 165-173.

Stadhouders, J.; Hup, G. y Jansen, L.A. 1979. A study of the optimum conditions of freezing and storing concentrated mesophilic starters, Neth. Milk Dairy J., 25:229.

St-Amand, L y Lavoie M. 1988. Antibiotic resistance and production of inhibitory substances among bacterial strains isolated from the oral cavities of BALB/c mice. J. Dental Research, diciembre 67(12): 1518-22.

Stanbury, P.F.; Whitaker, A. y Hall, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Elsevier/Pergamon publications. BPC Wheatons Ltd, Exeter. 357pp.

Stiles, M.E. 1989. Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria. In: Doyle, M.P. (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 674-735.

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 331-345.

Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36: 1-29.

Symons, H.W.; Philippon, P.; Muñoz-Delgado, J.A.; Bailey, C. y Gac, A. 1990. Alimentos congelados: procesado y distribución. Instituto Internacional del Frío. Editorial Acibia, S.A. Zaragoza. 184pp.

Tagg, J.R.; Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive-bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. 1991. Yogur: ciencia y tecnología. Editorial Acibia. Zaragoza. 368pp.

Tannock, G.W.; Tilsala-Timisjarvi, S; Rodtong, J; Munro y Alattossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* Isolates from the gastrointestinal tract, silage and Yogurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. Appl. Environ. Microbiol., septiembre: 4264-4267.

Teixeira, P.; Castro, H. y Kirby, R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. J. Appl. Bacteriol., 78 (4): 456-462.

Teixeira, P.C.; Castro, M.H.; Malcata, F.X. y Kirby, R.M. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray-drying. J. Dairy Sci., 78 (5): 1025-1031.

Tilsala-Timisjarvi, A. y Alattossava, T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. Int. J. Food Microbiol., 35:49-56.

To, B.C.S. y Etzel, M.R. 1997. Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after Spray Drying, Freeze Drying, or Freezing. J. Food Sci., 62 (1): 167-170.

Toldrà, M. 2002. Revaloració de la fracció cel.lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. Tesis Doctoral. Departamento de

Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona.

Toldrà, M.; Saguer, E.; Felip, P.; Parés, D. y Carretero, C. 2000. Efecto de la adición de sustancias antioxidantes a la fracción celular de la sangre de cerdo sobre el oscurecimiento producido durante la deshidratación por atomización. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, abril: 53-58.

Toledo, R.T. 1991. *Fundamentals of food process engineering*. Van Nostrand Reinhold. New York. 601pp.

Torres, M. R.; Ramos, A. J. y Soriano, E. 1997. Aspectos funcionales y nutricionales de las proteínas sanguíneas: empleo en la industria cárnica. *Alimentaria*; mayo 97: 63-69.

Torriani, S; Zapparoli, G. y Dellaglio, F. 1999. Use of PCR- based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactics*. *Appl. Environ. Microbiol.*, octubre:4351-4356.

Tritt, W.P. y Schuchardt, F. 1992. Materials flow and possibilities of treating Liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany. A review. *Bioresource Technology*, 41: 235-245.

Tybor, P.T.; Dill, C.W. y Landmann, W.A. 1973. Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray -dried blood protein concentrates. *J. Food Sci.*, 38 (1): 4-7.

Tybor, P.T.; Dill, C.W. y Landmann, W.A. 1975. Functional Properties of Protein Isolated from Bovine by Continuous Pilot Process. *J. Food Sci.*, 40 (1): 155-159.

Tyrrell, G.; Bethune, R.; Willey, B. y Low, D. 1997. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J. Clin. Microbiol.*, mayo, 35: 1054-60.

Tyrrell, G.; Turnbull, L.; Teixeira L.; Lefebvre J.; Carvalho, M.; Facklam, R. y Lovgren, M. 2002. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, abril, 1140-1145.

Vandanjon, L; Jaquen, P. y Quemeneur, F. 1996. Utilisations et potentialités des membranes pour la valorisation du sang d'abattoir. *Ind. Alim. Agric.*, enero/febrero, 11-16.

Villani, F.; Aponte, M.; Blaiotta, G. Mauriello, O. y Moschetti, G. 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from cow's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 430-439.

Werner J. y. Placzeeck, R. 1978. *Conservación de la carne por el frío*. Zaragoza: ACRIBIA, 131 pp.

West, C. y Warner, P.J. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *L. plantarum* NCDO1193. *FEMS microbiol. Lett.*, 49: 16.

Wismer – Pedersen, J. 1979. Utilisation of animal blood in meat by products. *Food Tech.*, 33 (8): 76-80.

Wismer – Pedersen, J. 1988. Use of haemoglobine in foods- A review. *Meat Sci.* 24 (1): 31-45.

Zamora, L. 2000. Aplicación de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector en la bioconservación de sangre de cerdo procedente de matadero industrial. Memoria del trabajo de investigación correspondiente al programa de doctorado de biotecnología de la Universidad de Girona.

Zamora, L.; Carretero, C. y Parés, D. 2003. Aplicación de bacterias ácido lácticas como cultivo bioprotector en sangre de cerdo procedente de matadero industrial. Alimentación, Equipos y Tecnología, enero: 45-50.

Zamora, L.; Piñero, A.; Parés, D. y Carretero, C. 2002. Aplicación de bacterias ácido lácticas psicrótrofas como cultivo bioprotector en sangre de cerdo proveniente de matadero industrial. Libro de Ponencias, Comunicaciones y Posters., XIII Congreso de Microbiología-Bilbao.

Zlotkin, A.; Eldar,A.; Ghitino, C. y Bercovier, H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36: 983-985

Anexos

ANEXO 1

Conservación de las cepas con potencial antagonista

Liofilización

Recuentos de cultivos de TA73 y Ps7 antes (N_0) y después del proceso de liofilización con los tres crioprotectores evaluados

TA73 + GLUCOSA

| t (días) | N_0 (1) : 4E+08 | | N_0 (2) : 6E+08 | | N_0 (3) : 3E+08 | |
|-------------|-------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 1,50E+08 | 1,50E+08 | 1,10E+08 | 1,10E+08 | 4,60E+07 | 4,60E+07 |
| 5 | 2,60E+07 | 6,00E+04 | 1,30E+08 | 2,70E+07 | 3,90E+07 | 3,20E+05 |
| 15 | 1,90E+07 | 3,00E+04 | 8,20E+07 | 8,00E+04 | 2,90E+07 | 3,00E+04 |
| 30 | 1,20E+07 | 1,00E+04 | 2,40E+07 | 1,00E+04 | 4,00E+06 | 2,00E+03 |
| 60 | 1,00E+07 | 8,00E+03 | 9,60E+06 | 4,00E+04 | 2,30E+05 | 2,60E+04 |

Ps7 + GLUCOSA

| t (días) | N_0 (1) : 5,7E+08 | | N_0 (2) : 1,1E+08 | | N_0 (3) : 8,9E+07 | |
|-------------|---------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 1,20E+08 | 1,20E+08 | 1,10E+08 | 1,10E+08 | 8,70E+07 | 8,70E+07 |
| 5 | 1,00E+08 | 2,50E+05 | 1,00E+08 | 2,30E+07 | 1,00E+08 | 1,10E+05 |
| 15 | 9,20E+07 | 2,30E+05 | 8,60E+07 | 4,00E+04 | 2,20E+07 | 4,00E+04 |
| 30 | 9,80E+07 | 2,00E+04 | 9,80E+07 | 1,00E+04 | 1,00E+04 | 6,00E+03 |
| 60 | 3,80E+08 | 4,90E+05 | 5,00E+07 | 6,00E+04 | 3,40E+05 | 3,70E+03 |

TA73 + LACTOSA

| t (días) | N_0 (1) : 6,0E+08 | | N_0 (2) : 3,2E+08 | | N_0 (3) : 1,0E+08 | |
|-------------|---------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 1,30E+08 | 1,30E+08 | 2,60E+08 | 2,60E+08 | 4,60E+08 | 4,60E+08 |
| 5 | 1,00E+08 | 3,00E+05 | 2,50E+08 | 2,30E+08 | 3,20E+08 | 1,50E+08 |
| 15 | 1,60E+08 | 2,80E+07 | 3,00E+08 | 2,30E+08 | 1,00E+09 | 7,00E+07 |
| 30 | 2,00E+04 | 9,20E+07 | 2,80E+08 | 4,40E+07 | 1,90E+07 | 3,00E+06 |
| 60 | 4,60E+06 | 2,00E+06 | 2,50E+08 | 2,80E+06 | 1,30E+08 | 4,00E+06 |

PS7 + LACTOSA

| t (días) | N ₀ (1) : 6,2E+08 | | N ₀ (2) : 7,6E+08 | | N ₀ (3) : 1,0E+08 | |
|-------------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 2,90E+08 | 2,90E+08 | 1,10E+08 | 1,10E+08 | 5,70E+07 | 5,70E+07 |
| 5 | 9,10E+07 | 2,50E+06 | 1,10E+08 | 1,50E+07 | 1,30E+08 | 3,60E+07 |
| 15 | 9,20E+07 | 6,00E+06 | 8,40E+07 | 5,00E+06 | 9,60E+07 | 1,00E+06 |
| 30 | 7,60E+07 | 3,00E+04 | 1,00E+08 | 9,00E+04 | 2,50E+07 | 1,00E+04 |
| 60 | 2,10E+07 | 1,00E+04 | 7,00E+07 | 2,00E+02 | 4,60E+07 | 2,00E+04 |

TA73 + LECHE

| t (días) | N ₀ (1) : 4,6E+08 | | N ₀ (2) : 4,0E+08 | | N ₀ (3) : 4,2E+08 | |
|-------------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 6,00E+07 | 6,00E+07 | 2,30E+08 | 2,30E+08 | 3,10E+08 | 3,10E+08 |
| 5 | 5,70E+08 | 5,00E+07 | 2,60E+08 | 1,00E+09 | 2,60E+08 | 2,00E+08 |
| 15 | 4,20E+08 | 5,50E+07 | 2,10E+08 | 3,20E+08 | 3,50E+08 | 3,90E+08 |
| 30 | 1,00E+08 | 7,00E+07 | 4,00E+08 | 2,50E+08 | 3,60E+08 | 2,00E+08 |
| 60 | 1,50E+08 | 7,50E+07 | 3,30E+08 | 2,50E+08 | 3,40E+08 | 2,60E+08 |

PS7 + LECHE

| t (días) | N ₀ (1) : 1,5E+08 | | N ₀ (2) : 1,5E+08 | | N ₀ (3) : 1,0E+08 | |
|-------------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
| 0 | 1,10E+08 | 1,10E+08 | 1,20E+08 | 1,20E+08 | 1,00E+08 | 1,00E+08 |
| 5 | 1,00E+09 | 1,30E+08 | 8,80E+07 | 1,10E+08 | 1,20E+08 | 8,50E+07 |
| 15 | 1,20E+08 | 8,20E+07 | 1,20E+08 | 1,00E+08 | 1,40E+08 | 9,20E+07 |
| 30 | 1,00E+08 | 7,80E+07 | 1,80E+08 | 7,80E+07 | 5,00E+07 | 1,00E+08 |
| 60 | 3,30E+08 | 3,90E+07 | 8,80E+07 | 4,60E+07 | 1,10E+08 | 1,00E+08 |

Atomización :

Recuentos de cultivos de TA73 y Ps7 atomizadas

Cepa TA73

| t (días) | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0 | 1,06E+10 | 1,06E+10 | 7,20E+09 | 7,20E+09 | 1,30E+10 | 1,30E+10 |
| 5 | 1,10E+10 | 4,00E+09 | 8,90E+09 | 7,40E+09 | 8,00E+09 | 5,20E+09 |
| 15 | 9,30E+09 | 7,00E+09 | 4,50E+09 | 2,50E+09 | 3,50E+09 | 3,30E+09 |
| 30 | 2,20E+10 | 3,90E+09 | 4,90E+09 | 4,70E+09 | 5,00E+09 | 5,00E+09 |
| 60 | 7,20E+09 | 2,40E+09 | 4,90E+09 | 3,40E+09 | 5,70E+09 | 1,10E+09 |

Cepa Ps7

| t (días) | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
|---------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 0 | 4,00E+08 | 4,00E+08 | 9,90E+08 | 9,90E+08 | 1,50E+09 | 1,50E+09 |
| 5 | 4,80E+08 | 2,00E+08 | 1,30E+09 | 9,30E+08 | 1,20E+09 | 1,80E+09 |
| 15 | 4,00E+08 | 1,10E+08 | 6,20E+08 | 3,50E+08 | 4,30E+08 | 3,00E+08 |
| 30 | 7,40E+08 | 5,90E+08 | 7,50E+08 | 8,30E+07 | 7,80E+08 | 1,20E+09 |
| 60 | 3,60E+08 | 1,30E+07 | 7,40E+08 | 3,30E+07 | 7,40E+08 | 1,10E+08 |

ANEXO 2

Conservación de cepas con potencial antagonista

Determinación del porcentaje de viabilidad de los cultivos: Ejemplo de cálculo

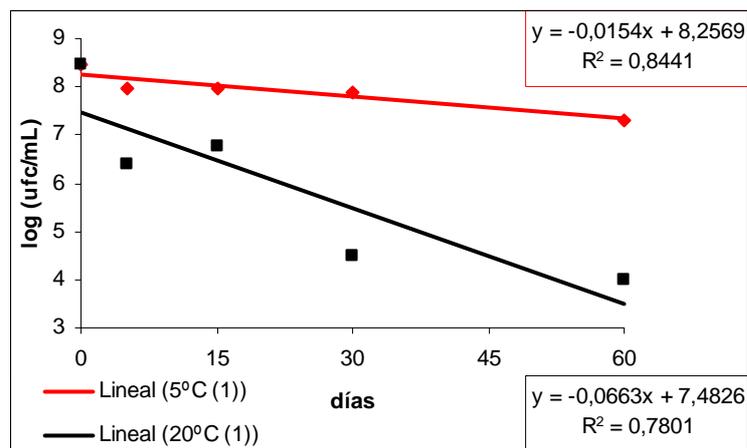
Ps7 + LACTOSA

Logaritmo de recuentos poblacionales realizados a través del tiempo en almacenamiento:

| t (días) | 5°C (1) | 20°C (1) | 5°C (2) | 20°C (2) | 5°C (3) | 20°C (3) |
|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| 0 | 8,46 | 8,46 | 8,04 | 8,04 | 7,76 | 7,76 |
| 5 | 7,96 | 6,40 | 8,04 | 7,18 | 8,11 | 7,56 |
| 15 | 7,96 | 6,78 | 7,92 | 6,70 | 7,98 | 6,00 |
| 30 | 7,88 | 4,48 | 8,00 | 4,95 | 7,40 | 4,00 |
| 60 | 7,32 | 4,00 | 7,85 | 2,30 | 7,66 | 4,30 |

(1), (2) y (3) corresponden a los valores de cada una de las tres repeticiones,

1ra repetición



Cálculo del valor D a partir de las rectas de regresión ($D = 1/K$)

| | 5°C | 20°C |
|----------|------------|--------|
| K | 0,0154 | 0,0663 |
| D | 64,9350649 | 15,08 |

Cálculo de los porcentajes de viabilidad (Materiales y métodos apart.2.4.1) según la expresión (a) ,

$$(a) \quad \log_{10}X_f = \log_{10}X_o - K t$$

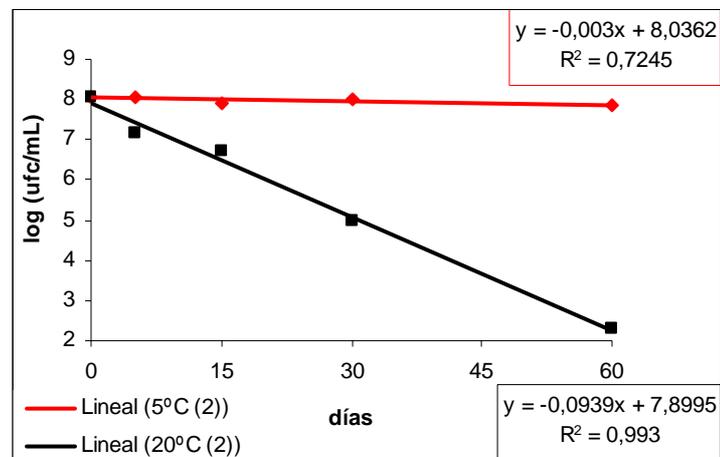
Temperatura 5°C

| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|----------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 8,2569 | 8,2569 | 1,5E+09 | 1,5E+09 | 100,00 |
| 5 | 0,077 | 8,2569 | 8,1799 | 1,5E+09 | 1,3E+09 | 91,06 |
| 15 | 0,231 | 8,2569 | 8,0259 | 1,5E+09 | 1,1E+09 | 75,30 |
| 30 | 0,462 | 8,2569 | 7,7949 | 1,5E+09 | 8,3E+08 | 56,23 |
| 60 | 0,924 | 8,2569 | 7,3329 | 1,5E+09 | 4,5E+08 | 30,52 |

Temperatura 20°C

| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 7,4826 | 7,4826 | 5,5E+08 | 5,5E+08 | 100,00 |
| 5 | 0,3315 | 7,4826 | 7,1511 | 5,5E+08 | 3,5E+08 | 63,56 |
| 15 | 0,9945 | 7,4826 | 6,4881 | 5,5E+08 | 1,3E+08 | 24,02 |
| 30 | 1,989 | 7,4826 | 5,4936 | 5,5E+08 | 2,5E+07 | 4,55 |
| 60 | 3,978 | 7,4826 | 3,5046 | 5,5E+08 | 2,8E+05 | 0,05 |

2da repetición



| | 5°C | 20°C |
|----------|------------|--------|
| K | 0,003 | 0,0939 |
| D | 333,333333 | 10,65 |

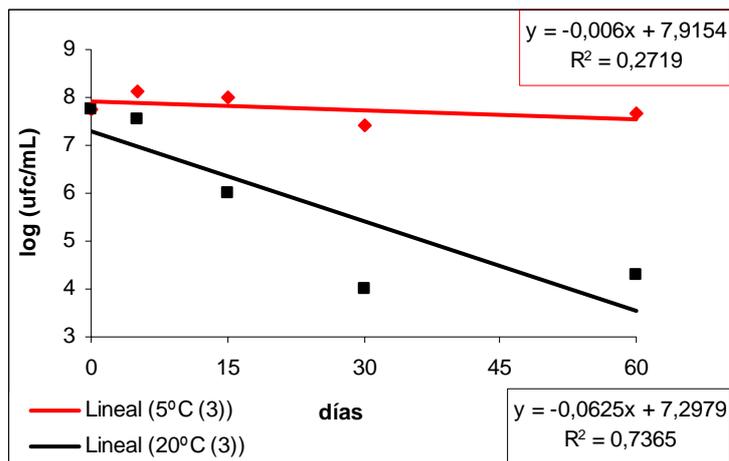
Temperatura 5°C

| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|-------------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 8,0362 | 8,0362 | 1,1E+09 | 1,1E+09 | 100,00 |
| 5 | 0,015 | 8,0362 | 8,0212 | 1,1E+09 | 1,1E+09 | 98,15 |
| 15 | 0,045 | 8,0362 | 7,9912 | 1,1E+09 | 1,1E+09 | 94,54 |
| 30 | 0,09 | 8,0362 | 7,9462 | 1,1E+09 | 1,0E+09 | 89,35 |
| 60 | 0,18 | 8,0362 | 7,8562 | 1,1E+09 | 9,0E+08 | 79,73 |

Temperatura 20°C

| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|-------------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 7,8995 | 7,8995 | 9,5E+08 | 9,5E+08 | 100,00 |
| 5 | 0,4695 | 7,8995 | 7,43 | 9,5E+08 | 5,1E+08 | 54,19 |
| 15 | 1,4085 | 7,8995 | 6,491 | 9,5E+08 | 1,3E+08 | 14,03 |
| 30 | 2,817 | 7,8995 | 5,0825 | 9,5E+08 | 1,2E+07 | 1,22 |
| 60 | 5,634 | 7,8995 | 2,2655 | 9,5E+08 | 3,6E+03 | 0,00 |

3ra repetición



| | 5°C | 20°C |
|----------|------------|--------|
| K | 0,006 | 0,0625 |
| D | 166,666667 | 16,00 |

Temperatura 5°C

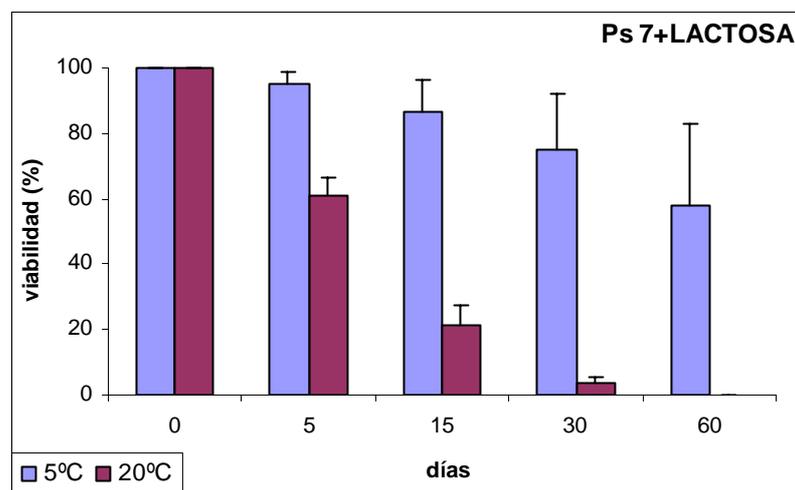
| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|----------|------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 7,9154 | 7,9154 | 9,7E+08 | 9,7E+08 | 100,00 |
| 5 | 0,03 | 7,9154 | 7,8854 | 9,7E+08 | 9,3E+08 | 96,27 |
| 15 | 0,09 | 7,9154 | 7,8254 | 9,7E+08 | 8,6E+08 | 89,19 |
| 30 | 0,18 | 7,9154 | 7,7354 | 9,7E+08 | 7,7E+08 | 79,45 |
| 60 | 0,36 | 7,9154 | 7,5554 | 9,7E+08 | 6,1E+08 | 62,78 |

Temperatura 20°C

| t (días) | kT | LogX o | LogX t | Xo | X t | Xt/Xo(%) |
|----------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|
| 0 | 0 | 7,2979 | 7,2979 | 4,3E+08 | 4,3E+08 | 100,00 |
| 5 | 0,3125 | 7,2979 | 6,9854 | 4,3E+08 | 2,8E+08 | 64,56 |
| 15 | 0,9375 | 7,2979 | 6,3604 | 4,3E+08 | 1,1E+08 | 25,29 |
| 30 | 1,875 | 7,2979 | 5,4229 | 4,3E+08 | 2,2E+07 | 5,13 |
| 60 | 3,75 | 7,2979 | 3,5479 | 4,3E+08 | 3,2E+05 | 0,07 |

A partir de los valores de viabilidad obtenidos en las tres repeticiones se calculó el promedio y la desviación estándar:

| t (días) | Promedio | | Desviación estándar | |
|----------|----------|-------|---------------------|------|
| | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 95,16 | 60,77 | 3,67 | 5,72 |
| 15 | 86,34 | 21,11 | 9,93 | 6,16 |
| 30 | 75,01 | 3,63 | 17 | 2,11 |
| 60 | 57,68 | 0,04 | 25 | 0,04 |



ANEXO 3

Conservación de cepas con potencial antagonista: Análisis estadístico

LIOFILIZACIÓN

1. ANOVA: Efecto del crioprotector y cepa sobre el porcentaje de supervivencia de los cultivos liofilizados

Variable dependiente: raíz cuadrada de la supervivencia

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|------------------|----------------------------|----|------------------|---------|---------------|
| Modelo corregido | ,318(a) | 5 | ,064 | 1,293 | ,330 |
| Intercept | 9,149 | 1 | 9,149 | 185,982 | ,000 |
| CEPA | ,059 | 1 | ,059 | 1,194 | ,296 |
| CRIO | ,043 | 2 | ,021 | ,437 | ,656 |
| CRIO * CEPA | ,216 | 2 | ,108 | 2,198 | ,154 |
| Error | ,590 | 12 | ,049 | | |
| Total | 10,057 | 18 | | | |
| Total corregida | ,908 | 17 | | | |

a R cuadrado = ,350 (R cuadrado corregida = ,079)

2.a ANOVA: Efecto del crioprotector, temperatura y cepa sobre la viabilidad de los cultivos liofilizados a los 60 días de almacenamiento

Variable dependiente: raíz cuadrada de viabilidad

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|------------------|----------------------------|----|------------------|---------|---------------|
| Modelo corregido | 4,374(a) | 9 | ,486 | 11,046 | ,000 |
| Intercept | 11,150 | 1 | 11,150 | 253,432 | ,000 |
| CEPA | ,010 | 1 | ,010 | ,237 | ,631 |
| CRIO | 3,047 | 2 | 1,524 | 34,632 | ,000 |
| CRIO * CEPA | ,084 | 2 | ,042 | ,955 | ,398 |
| TEMP | ,879 | 1 | ,879 | 19,986 | ,000 |
| CRIO * TEMP | ,228 | 2 | ,114 | 2,591 | ,094 |
| CEPA * TEMP | ,125 | 1 | ,125 | 2,838 | ,104 |
| Error | 1,144 | 26 | ,044 | | |
| Total | 16,668 | 36 | | | |
| Total corregida | 5,518 | 35 | | | |

a R cuadrado = ,793 (R cuadrado corregida = ,721)

2.b Test de Bonferroni: Separación de medias de la viabilidad en función del crioprotector utilizado

| (I) CRIO | (J) CRIO | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Significación | Intervalo de confianza al 95%. | |
|----------|----------|-------------------------------|------------|---------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1,00 | 2,00 | ,1356 | ,13843 | 1,000 | -,2186 | ,4899 |
| | 3,00 | -,7887(*) | ,13843 | ,000 | -1,1429 | -,4344 |
| 2,00 | 1,00 | -,1356 | ,13843 | 1,000 | -,4899 | ,2186 |
| | 3,00 | -,9243(*) | ,13843 | ,000 | -1,2786 | -,5701 |
| 3,00 | 1,00 | ,7887(*) | ,13843 | ,000 | ,4344 | 1,1429 |
| | 2,00 | ,9243(*) | ,13843 | ,000 | ,5701 | 1,2786 |

Basado en las medias observadas.

* La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

* Se ha detectado el símbolo ,05 donde se esperaba un paréntesis de cierre en el subcomando TEST

ATOMIZACIÓN

a) ANOVA: Efecto de la temperatura y cepa sobre la viabilidad de los cultivos atomizados durante el almacenamiento a los 60 días

Variable dependiente: no ha fue necesaria la transformación

| Fuente | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F | Significación |
|------------------|----------------------------|----|------------------|---------|---------------|
| Modelo corregido | ,789(a) | 3 | ,263 | 21,595 | ,000 |
| Intercept | 4,703 | 1 | 4,703 | 386,215 | ,000 |
| CEPA | ,081 | 1 | ,081 | 6,627 | ,033 |
| TEMP | ,596 | 1 | ,596 | 48,920 | ,000 |
| CEPA* TEMP | ,112 | 1 | ,112 | 9,238 | ,016 |
| Error | ,097 | 8 | ,012 | | |
| Total | 5,589 | 12 | | | |
| Total corregida | ,886 | 11 | | | |

a R cuadrado = ,890 (R cuadrado corregida = ,849)

b) ANOVA: Efecto de la temperatura sobre la viabilidad a los 60 días de la cepa TA73

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | ,095 | 1 | ,095 | 5,755 | ,074 |
| Intra-grupos | ,066 | 4 | ,017 | | |
| Total | ,161 | 5 | | | |

c) ANOVA: Efecto de la temperatura sobre la viabilidad a los 60 días de la cepa Ps7

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Inter-grupos | ,613 | 1 | ,613 | 78,514 | ,001 |
| Intra-grupos | ,031 | 4 | ,008 | | |
| Total | ,644 | 5 | | | |

ANEXO 4

Etapa II : Comparación de liofilización, atomización y congelación

Recuentos poblacionales de las 12 cepas antes de cada proceso (N_0) y durante los 60 días de almacenamiento

Cepa TA20

| N_0 | 3,00E+09 | 9,00E+07 | 2,30E+08 | | |
|----------|-------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|
| t (días) | congelación | Liofiliz 5°C | Liofiliz 20°C | Atomiz 5°C | Atomiz 20°C |
| 0 | 3,00E+09 | 1,00E+08 | 1,00E+08 | 9,10E+08 | 9,10E+08 |
| 30 | 5,60E+08 | 5,00E+07 | 4,80E+07 | 4,90E+08 | 1,60E+08 |
| 60 | 3,90E+08 | 4,90E+07 | 4,20E+07 | 3,10E+08 | 1,60E+08 |

Cepa TA43

| N_0 | 7,70E+08 | 3,60E+08 | 9,60E+08 | | |
|----------|-------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|
| t (días) | congelación | Liofiliz 5°C | Liofiliz 20°C | Atomiz 5°C | Atomiz 20°C |
| 0 | 7,70E+08 | 2,40E+08 | 2,40E+08 | 1,40E+09 | 1,40E+09 |
| 30 | 6,40E+08 | 1,80E+08 | 2,40E+08 | 1,60E+08 | 6,60E+07 |
| 60 | 7,00E+08 | 1,80E+08 | 1,10E+08 | 1,60E+08 | 2,20E+07 |

Cepa TA73

| N_0 | 2,00E+09 | | | | |
|----------|-------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|
| t (días) | congelación | Liofiliz 5°C | Liofiliz 20°C | Atomiz 5°C | Atomiz 20°C |
| 0 | 1,50E+09 | 1,97E+08 | 1,97E+08 | 2,00E+09 | 2,00E+09 |
| 30 | 4,00E+08 | 2,71E+08 | 1,73E+08 | 1,60E+09 | 6,90E+08 |
| 60 | 3,00E+08 | 2,36E+08 | 1,90E+08 | 9,00E+08 | 3,50E+08 |

Cepa TA75

| N_0 | 6,30E+08 | 6,30E+08 | 1,40E+09 | | |
|----------|-------------|-----------------|------------------|---------------|----------------|
| t (días) | congelación | Liofiliz 5°C | Liofiliz 20°C | Atomiz 5°C | Atomiz 20°C |
| 0 | 5,60E+08 | 6,50E+08 | 6,50E+08 | 9,00E+08 | 9,00E+08 |
| 30 | 2,50E+08 | 2,90E+08 | 9,60E+07 | 7,30E+08 | 4,00E+08 |
| 60 | 3,00E+08 | 3,00E+08 | 7,90E+07 | 4,10E+08 | 3,10E+08 |

Cepa TA76

| N_0 | 9,70E+08 | 1,50E+08 | 1,80E+08 | | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 8,60E+08 | 9,20E+07 | 9,20E+07 | 2,80E+08 | 2,80E+08 |
| 30 | 4,20E+08 | 1,50E+08 | 9,00E+07 | 2,60E+08 | 1,50E+08 |
| 60 | 3,60E+08 | 1,40E+08 | 9,50E+07 | 1,60E+08 | 3,80E+07 |

Ps7

| N_0 | 1,90E+08 | | | | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 1,90E+08 | 1,10E+08 | 1,10E+08 | 1,50E+08 | 1,50E+08 |
| 30 | 1,70E+08 | 1,10E+08 | 8,53E+07 | 1,20E+08 | 9,50E+07 |
| 60 | 1,50E+08 | 1,76E+08 | 6,17E+07 | 9,30E+07 | 7,90E+06 |

Cepa PS14

| N_0 | 1,00E+09 | 4,00E+08 | 2,70E+08 | | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 1,00E+09 | 6,00E+08 | 6,00E+08 | 3,50E+08 | 3,50E+08 |
| 30 | 5,30E+08 | 3,90E+08 | 3,40E+08 | 3,30E+08 | 3,10E+08 |
| 60 | 3,10E+08 | 3,80E+08 | 3,90E+08 | 3,00E+08 | 2,00E+08 |

Cepa PS22

| N_0 | 9,70E+08 | 1,00E+10 | 2,8 E+08 | | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 8,70E+08 | 3,30E+08 | 3,30E+08 | 7,90E+08 | 7,90E+08 |
| 30 | 2,00E+08 | 1,00E+09 | 3,50E+08 | 3,90E+08 | 1,50E+08 |
| 60 | 2,00E+08 | 3,80E+08 | 1,80E+08 | 3,10E+08 | 1,10E+08 |

Cepa PS23

| N_0 | 6,60E+08 | 4,60E+08 | 2,30E+08 | | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 5,90E+08 | 4,60E+08 | 4,60E+08 | 3,70E+08 | 3,70E+08 |
| 30 | 2,00E+08 | 3,60E+08 | 2,70E+08 | 1,50E+08 | 1,10E+08 |
| 60 | 2,70E+08 | 3,70E+08 | 1,60E+08 | 1,50E+08 | 8,00E+07 |

Cepa PS48

| N_0 | 1,20E+08 | 6,40E+09 | | 1,00E+08 | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 9,50E+07 | 2,50E+08 | 2,50E+08 | 6,30E+08 | 6,30E+08 |
| 30 | 6,00E+07 | 1,70E+08 | 1,80E+08 | 3,90E+08 | 1,60E+08 |
| 60 | 7,20E+07 | 1,70E+08 | 8,00E+07 | 3,60E+08 | 1,30E+08 |

Cepa PS95

| N_0 | 2,90E+07 | 2,50E+09 | | 5,20E+08 | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 2,90E+07 | 2,80E+09 | 2,80E+09 | 5,20E+08 | 5,20E+08 |
| 30 | 4,60E+07 | 2,70E+09 | 2,50E+08 | 4,90E+08 | 4,40E+08 |
| 60 | 5,00E+07 | 3,00E+08 | 1,40E+08 | 2,60E+08 | 1,10E+08 |

Cepa PS99

| N_0 | 6,70E+09 | 5,80E+08 | | 3,90E+08 | |
|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| t (días) | congelación | Liofiliz | Liofiliz | Atomiz | Atomiz |
| | | 5°C | 20°C | 5°C | 20°C |
| 0 | 5,30E+09 | 6,00E+08 | 6,00E+08 | 2,20E+08 | 2,20E+08 |
| 30 | 5,40E+08 | 8,00E+08 | 2,20E+08 | 6,50E+07 | 5,40E+07 |
| 60 | 5,00E+08 | 4,10E+08 | 1,10E+08 | 2,70E+07 | 1,30E+07 |

Los valores a liofilización y atomización de las BAL TA73 y Ps7 corresponden a las pruebas preliminares (anexo 1).