



***ESTUDIO DE LAS RELACIONES
ENTRE LOS MICROORGANISMOS
PRESENTES EN LAS
FERMENTACIONES DE LA
ACEITUNA DE MESA***

JESÚS DOMÍNGUEZ MANZANO

SEVILLA, 2013



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE LA GRASA

***ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE
LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN
LAS FERMENTACIONES DE LA ACEITUNA
DE MESA***

Memoria que presenta

D. Jesús Domínguez Manzano,

Licenciado en Biología,

Para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado

Interdepartamental “Estudios avanzados en Alimentos”,

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2013



Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

Facultad de Química

D^a. Patricia Isabel Paneque Macías, Doctora y Profesora Contratada del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla, en calidad de Tutora,

AUTORIZA:

La presentación ante la comisión de doctorado de la Tesis,

“Estudio de las relaciones entre los microorganismos presentes en las fermentaciones de la aceituna de mesa”

Realizada por el Licenciado en Biología D. Jesús Domínguez Manzano en el Instituto de la Grasa (CSIC), y dirigida por el Doctor D. Rufino Jiménez Díaz.

La tutora de la Tesis Doctoral

Dra. D^a. Patricia Isabel Paneque Macías

El Doctor D. Rufino Jiménez Díaz, Investigador del CSIC, director de la Tesis Doctoral, y adscrito al Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC),

CERTIFICA:

Que el Licenciado en Biología D. Jesús Domínguez Manzano ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al Grado de Doctor, titulado,

“Estudio de las relaciones entre los microorganismos presentes en las fermentaciones de la aceituna de mesa”

Y para que conste, firmo la presente certificación en Sevilla, a 10 de Septiembre de 2013.

El director de la Tesis Doctoral,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Jiménez Díaz', is centered on the page.

Dr. D. Rufino Jiménez Díaz

De la presente **Tesis Doctoral** se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a Congresos y Cursos:

Publicaciones:

Domínguez-Manzano, J., León-Romero, Á., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A. and Jiménez-Díaz, R., 2012. Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **157**: 230-238.

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A. and Jiménez-Díaz, R., 2012. Formation of lactic acid bacteria-yeast communities on the olive surface During Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiology*, **32**: 295-301.

Domínguez-Manzano, J. and Jiménez-Díaz, R., 2012. Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. *Food Control*, **30**: 474-479.

Comunicaciones a congresos:

Congreso: XXI Congreso Nacional de Microbiología

Autores: J. Domínguez Manzano, J. L. Ruiz Barba, A. Maldonado, R. Jiménez Díaz*

Título: Interferencia en la producción de bacteriocinas entre especies de *Lactobacillus* aisladas de fermentaciones de alimentos.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Sevilla

Fecha: 17-20 de Septiembre de 2007

Congreso: II Jornadas Internacionales de las aceitunas de mesa

Autores: J. L. Ruiz Barba, B. Caballero Guerrero, J. Domínguez Manzano, A. Maldonado Barragán and R. Jiménez Díaz

Título: Quorum-sensing control of bacteriocin production in olive fermentations.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Dos Hermanas (Sevilla) **Fecha:** 26-27 de Marzo de 2008

Congreso: Ninth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Health, Evolution and Systems Biology

Autores: J. L. Ruiz Barba, B. Caballero Guerrero, J. Domínguez Manzano, A. Maldonado Barragán and R. Jiménez Díaz

Título: Quorum sensing controls bacteriocin production by and survival of *Lactobacillus plantarum* in olive fermentations.

Tipo de participación: Póster.

Lugar celebración: Egmond aan Zee, Holanda **Fecha:** 31 de Agosto - 4 de Septiembre de 2008

Congreso: XXXIII Asamblea del Instituto de la Grasa.

Autores: J. L. Ruiz Barba, A. Maldonado Barragán, J. Domínguez Manzano, Á. León Romero, B. Caballero Guerrero, C. Olmo Ruiz y R. Jiménez Díaz.

Título: Biotecnología de Bacterias Lácticas. Departamento de Biotecnología de Alimentos.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Sevilla **Fecha:** 27-28 de Noviembre de 2008

Congreso: 4ª Reunión de la Red Temática: Participación de las Bacterias Lácticas en la Salud Humana y en la Calidad Alimentaria.

Autores: J. Domínguez Manzano y R. Jiménez Díaz

Título: Biofilms en fermentaciones de aceitunas.

Tipo de participación: Resumen

Lugar celebración: Granada **Fecha:** 12-13 de Noviembre de 2009

Congreso: III Jornadas Internacionales de la aceituna de mesa.

Autores: J. Domínguez Manzano, Á. León Carrasco, B. Caballero Guerrero, Ca. Olmo Ruiz y R. Jiménez Díaz

Título: Comunidades polimicrobianas en fermentaciones de aceituna de mesa.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Sanlúcar la Mayor (Sevilla) **Fecha:** 10-11 de Marzo de 2010

Congreso: XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos.

Autores: J. Domínguez Manzano y R. Jiménez Díaz

Título: Comunidades polimicrobianas en las fermentaciones de aceitunas: introducción al estudio de los biofilms mixtos bacterias lácticas-levaduras.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Valladolid **Fecha:** 19-22 de Septiembre de 2010

Congreso: XXXIV Asamblea del Instituto de la Grasa.

Autores: R. Jiménez Díaz, J. Domínguez Manzano, Á. León Romero y C. Olmo Ruíz.

Título: Biotecnología de Bacterias Lácticas. Departamento de Biotecnología de Alimentos.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Sevilla **Fecha:** 18-19 de Noviembre de 2010

Congreso: Second European Congress on Microbial Biofilms-Basic and Clinical Aspects.

Autores: J. Domínguez-Manzano, C. Olmo-Ruiz and R. Jiménez-Díaz.

Título: Characterization of polimicrobial communities associated with the surface of Spanish-style green olives.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Copenhagen (Dinamarca) **Fecha:** 5-8 de Julio de 2011

Congreso: 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria.

Autores: R. Jiménez-Díaz, Á. León-Romero, C. Olmo-Ruiz y J. Domínguez-Manzano.

Título: *Characterization of polimicrobial communities associated with the surface of Spanish-style green olives.*

Tipo de participación: Póster

Autores: R. Jiménez-Díaz, J. Domínguez-Manzano, Á. León-Romero, C. Olmo-Ruiz, P. García, J. Bautista, F. Arroyo y A. Garrido.

Título: *Functional and probiotic attributes of Lactobacillus pentosus strains isolated from olive fermentations.*

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Egmond aan Zee (Holanda) **Fecha:** 28 de Agosto – 1 de Septiembre de 2011

Congreso: III Workshop probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica.

Autores: A. León-Romero, J. Domínguez-Manzano, C. Olmo-Ruiz, J. Bautista, N. Arroyo, A. Garrido, E. Fernández, A. Pérez y R. Jiménez-Díaz.

Título: *Aceitunas fermentadas al estilo español o sevillano: fuente y vehículo de nuevos microorganismos potencialmente probióticos.*

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Castelldefels (Barcelona) **Fecha:** 15 y 16 de diciembre de 2011.

Congreso: 6ª Reunión de la Red Temática: Participación de las Bacterias Lácticas en la Salud Humana y en la Calidad Alimentaria.

Autores: J. Domínguez Manzano, Á. León Romero, O. Cruz Gómez y R. Jiménez Díaz

Título: Diversidad genética de las cepas de “Lactobacillus pentosus” que pueblan los biofilms de la epidermis de aceitunas verdes estilo sevillano.

Tipo de participación: Resumen

Lugar celebración: Tarragona

Fecha: 28-29 de Julio de 2012

Congreso: 23rd International ICFMH symposium. FoodMicro 2012.

Autores: F. N. A. López, J. Bautista Gallego, J. Domínguez Manzano, C. Olmo Ruiz, V. Romero Gil, F. Rodríguez Gómez, A. Garrido Fernández, R. Jiménez Díaz y P. García García.

Título: Potential probiotic lactic acid bacteria forming biofilms on the olive surface.

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Estambul (Turquía) **Fecha:** 3-7 de septiembre de 2012.

Congreso: VII Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Autores: R. Jiménez-Díaz, J. Domínguez Manzano, J. Bautista Gallego, F. N. Arroyo López y A. Garrido Fernández.

Título: Caracterización de comunidades polimicrobianas asociadas a la superficie de aceitunas fermentadas al estilo español o sevillano.

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: Córdoba **Fecha:** 12-14 de junio de 2013

Cursos de formación:

Curso de formación continua “Microscopía Electrónica de Barrido. Capacitación en el manejo del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6460LV. Impartido por el Centro de Formación Permanente (CFP) de la Universidad de Sevilla, con una asignación de 2,5 créditos europeos (ECTS).

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
<u>1.- INTRODUCCIÓN.....</u>	7
1.1.- LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS.....	7
1.1.1.- FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.....	9
1.1.2.- MICROBIOLOGÍA DE LAS FERMENTACIONES DE VEGETALES.....	10
1.2.- LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL).....	13
1.2.1.- EL GÉNERO <i>Lactobacillus</i>.....	15
1.2.2.- EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>.....	16
1.2.3.- HÁBITATS DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	18
1.2.4.- IMPORTANCIA DE LAS BAL EN LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS.....	18
1.2.5.- LAS BACTERIOCINAS.....	21
1.3.- LAS LEVADURAS.....	23
1.3.1.- HÁBITATS DE LAS LEVADURAS.....	24
1.3.2.- IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS.....	24
1.3.3.- PAPEL DE OTROS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA.....	25
<u>2.- LA ACEITUNA DE MESA: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA</u>	26
2.1.- CLASIFICACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA.....	29
2.2.- ELABORACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA.....	30
2.2.1.- ACEITUNAS DE MESA AL ESTILO ESPAÑOL O SEVILLANO.....	32
2.2.1.1.- BAL ASOCIADAS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA.....	32
2.2.1.2.- LEVADURAS ASOCIADAS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA.....	34
2.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN.....	36
2.3.1.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y OLEOSÍDICOS PRESENTES EN LA ACEITUNA.....	38
2.4.- SELECCIÓN Y USO DE CULTIVOS INICIADORES.....	39

<u>3.- ECOLOGÍA MICROBIANA</u>	44
3.1.- RELACIONES ENTRE MICROORGANISMOS	44
3.2.- LOS BIOFILMS	45
3.2.1.- CONCEPTO DE BIOFILM	45
3.2.2.- ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE UN BIOFILM	46
3.2.3.- LA MATRIZ EXTRACELULAR	47
3.2.4.- DIVERSIDAD MICROBIANA EN LOS BIOFILMS	48
3.2.5.- BIOFILMS Y COMUNICACIÓN CELULAR	50
3.2.6.- BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO Y BIOFILMS	51
3.2.7.- IMPORTANCIA DE LOS BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA ..	52
3.3.- QUORUM SENSING (QS)	54
3.4.- QUORUM QUENCHING (QQ)	57
III. OBJETIVOS	59
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	63
<u>1.- MICROORGANISMOS</u>	65
<u>2.- MEDIOS DE CULTIVO</u>	65
<u>3.- ANTIBIÓTICOS</u>	70
<u>4.- ENZIMAS</u>	71
<u>5.- REACTIVOS Y PRODUCTOS</u>	71
<u>6.- SOLUCIONES Y TAMPONES</u>	72
6.1.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	72
6.2.- TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON NITRATO DE PLATA	73
6.3.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	74
6.4.- OBTENCIÓN, ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DEL ADN	75
6.5.- EXTRACCIÓN DE BIOFILMS	77
6.6.- OTRAS SOLUCIONES O TAMPONES	77

7.- MÉTODOS.....	77
7.1.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL.....	77
7.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN CULTIVOS MIXTOS (COCULTIVOS)	78
7.2.1.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN CON SEPARACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE MEMBRANAS DE 0,2 μm.....	79
7.2.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS CON SEPARACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE UNA MEMBRANA DE DIÁLISIS.....	80
7.3.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PRESENCIA DE SOBRENADANTES DE COCULTIVOS.....	80
7.4.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PRESENCIA DE CÉLULAS INACTIVADAS POR CALOR.....	81
7.5.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVO EN FUNCIÓN DEL pH DEL MEDIO.....	82
7.5.1.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH NO REGULADO.....	82
7.5.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH REGULADO.....	82
7.6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).....	83
7.7.- PURIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS.....	84
7.8.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS FERMENTACIONES DE ACEITUNAS.....	85
7.8.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR BAL EN SUPERFICIES ACONDICIONADAS.....	86
7.8.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR BAL EN PRESENCIA DE BACTERIOCINAS Y EXOPOLISACÁRIDOS.....	88
7.9.- FORMACIÓN DE BIOFILMS MIXTOS.....	89
7.9.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-BAL.....	89
7.9.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-LEVADURAS.....	89
7.9.2.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-LEVADURAS EN PORTAOBJETOS.....	89
7.9.2.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR LEVADURAS EN PRESENCIA DE SLC OBTENIDOS DE CULTIVOS MIXTOS BAL-LEVADURAS.....	90

7.9.2.3.- FORMACIÓN DE BIOFILMS MIXTOS BAL-LEVADURAS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	91
7.10.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS ESTILO ESPAÑOL O SEVILLANO: ESTUDIOS EN PLANTA PILOTO.....	91
7.11.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	93
7.12.- EXTRACCIÓN DE LOS BIOFILM DE LA EPIDERMIS DE LAS ACEITUNAS.....	95
7.13.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS DE MUESTRAS DE SALMUERA A LO LARGO DEL PROCESO FERMENTATIVO.....	95
7.14.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	96
7.15.- METODOLOGÍA DEL ADN.....	96
7.15.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO O CROMOSÓMICO DE BAL...	96
7.15.2.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PRESENTE EN LOS BIOFILMS DE LOS FRUTOS.....	97
7.15.3.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PRESENTE EN LOS EXOPOLISACÁRIDOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE LAS SALMUERAS DE FERMENTACIÓN.....	97
7.15.4.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	98
7.15.4.1.- AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE FRAGMENTOS DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD-PCR).....	99
7.15.5.- ELECTROFORESIS DEL ADN.....	101
7.15.6.- EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	102
7.15.7.- DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	102
V. RESULTADOS.....	105
<u>1.- SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVOS.....</u>	107
1.1.- INTERFERENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVO.....	108
1.1.1.- DISMINUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR <i>L. plantarum</i> NC8-C EN COCULTIVO CON OTRAS BAL.....	113
1.1.2.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR <i>L. plantarum</i> NC8-C EN COCULTIVO.....	113

1.1.2.1.- DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS COCULTIVOS.....	113
1.1.2.2.- INACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS POR CALOR.....	116
1.1.2.3.- CONTACTO CÉLULA-CÉLULA.....	117
1.1.2.4.- EFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE COCULTIVOS EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR <i>L. plantarum</i> NC8-C.....	119
1.1.2.5.- SINERGIA O ANTAGONISMO ENTRE DIFERENTES BACTERIOCINAS.....	121
1.1.2.6.- EFECTO DEL pH.....	121
1.1.2.6.a.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH NO REGULADO....	122
1.1.2.6.b.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH REGULADO.....	125
1.1.2.7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) DE LOS SLC DE COCULTIVOS Y CULTIVOS PUROS DE BAL.....	128
<u>2.- BIOFILMS</u>	130
2.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS <i>IN VITRO</i> POR BAL.....	130
2.2.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA FORMACIÓN DE BIOFILMS POR CEPAS DE BAL.....	131
2.2.1.- INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA SUPERFICIE DE ADHESIÓN..	131
2.2.2.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	132
2.2.3.- INFLUENCIA DEL ACONDICIONAMIENTO DE LAS SUPERFICIES DE ADHESIÓN.....	133
2.2.3.1.- ACONDICIONAMIENTO BIOLÓGICO.....	134
2.2.3.2.- ACONDICIONAMIENTO FÍSICO.....	138
2.2.4.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES NO ACONDICIONADAS.....	139
2.2.5.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PRESENCIA DE BACTERIOCINAS.....	140
2.2.6.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN SUPERFICIES SATINIZADAS CON DIFERENTES BACTERIOCINAS.....	142
2.2.7.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PRESENCIA DE EXOPOLISACÁRIDO....	144
2.2.8.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR CULTIVOS MIXTOS DE BAL.....	145

2.2.9.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN CULTIVOS MIXTOS <i>L. pentosus</i> -LEVADURAS.....	147
2.2.10.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA FORMACIÓN DE BIOFILMS MIXTOS <i>L. pentosus</i> -LEVADURAS.....	151
2.2.10.1.- INFLUENCIA DE LA CAPACIDAD DE COAGREGACIÓN DE <i>L. pentosus</i>	151
2.2.10.2.- INFLUENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES: TIROSOL, HIDROXITIOSOL, HIDROXITIOSOL-OH Y OLEUROPEÍNA.....	155
2.2.10.3.- INFLUENCIA DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS PROCEDENTES DE COCULTIVOS <i>L. pentosus</i> -LEVADURAS.....	162
2.2.10.4.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PORTAOBJETOS.....	162
2.3.- ESTUDIO SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA. PLANTA PILOTO.....	164
2.3.1.- DESARROLLO MICROBIANO DURANTE LA FERMENTACIÓN.....	164
2.3.1.1.- DESARROLLO MICROBIANO EN LAS SALMUERAS DE FERMENTACIÓN.....	165
2.3.1.2.- DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN LA SUPERFICIE DE LOS FRUTOS.....	166
2.3.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES ABIÓTICAS.....	167
2.3.3.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES BIÓTICAS.....	168
2.3.4.- CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE LA EPIDERMIS DE LOS FRUTOS POR CULTIVOS INICIADORES.....	172
2.3.5.- DETECCIÓN POR PCR DE MICROORGANISMOS Y GENES DE INTERÉS EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS AISLADOS DE LOS BIOFILMS.....	179
VI. DISCUSIÓN.....	185
<u>1.- SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVOS.....</u>	187
<u>2.- BIOFILMS.....</u>	194
VII. CONCLUSIONES.....	207

VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	211
IX. PUBLICACIONES.....	261

I. ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BAL	Bacterias del ácido láctico
Da	Dalton
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
g	Gramo
g	Fuerza de gravedad, según contexto
h	Hora
kb	Kilobase
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PM	Peso molecular
pM	Picomolar
p/v	Peso/volumen
QQ	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SBE	Sample Buffer Saline
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SLC	Sobrenadante libre de células
t	tonelada
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	N', N', N', N' tetrametiletilendiamina
UA	Unidades de actividad
UB	Unidades de bacteriocinas
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
μl	Microlitro
μm	Micrometro
°C	Grados Celsius

II. INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Es el método de conservación más antiguo que se conoce. Tradicionalmente, la manera de aumentar la vida media de muchos alimentos ha consistido en fermentarlos. Para ello, se manipulaba la materia prima de tal forma que se propiciara el desarrollo de una microbiota formada, preferentemente, por bacterias del ácido láctico (Daeschel y *col.*, 1987; Krockel y *col.*, 2003; Panagou y *col.*, 2008; Hurtado y *col.*, 2008; 2010). Hoy en día, aún se sigue este patrón tradicional de producción de alimentos por fermentación debido, principalmente, a su bajo coste económico y a las características sensoriales peculiares que confiere al producto terminado.

Existe una gran variedad de alimentos fermentados, cuya materia prima puede tener origen animal o vegetal, siendo los más comunes el pan, la cerveza, el vino, el vinagre, los derivados lácteos (queso, yogur, kéfir), los productos vegetales (pepinillos, zanahorias, aceitunas, alcaparrones, alcachofas, berenjenas de Almagro, el chucrut o col ácida), los embutidos (pepperoni, salami, mortadela), etc. (Campbell-Platt, 1994; Di Cagno y *col.*, 2013).

La fermentación incrementa a menudo el contenido de nutrientes de los alimentos, tales como el de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas, favorece la digestibilidad de proteínas y fibras, puede aumentar la biodisponibilidad de los micronutrientes y favorece también la degradación de factores antinutricionales (Caplice y Fitzgerald, 1999). Además, durante la fermentación se puede producir una fuente adicional de calorías, al convertir sustratos no asimilables por el organismo en otros que sí lo son. También se produce una gran diversidad de nuevos sabores, aromas y texturas, lo que sin duda tiene un efecto enriquecedor del alimento de cara al consumidor (Giraffa, 2004). Además de esto, durante la fermentación se minimizan algunos componentes tóxicos de los alimentos como aflatoxinas y cianógenos y se facilita la inhibición y/o eliminación de microorganismos patógenos y alterantes mediante la producción de factores antibacterianos (bacteriocinas, ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol, entre otros).

El consumo de alimentos fermentados ha experimentado un aumento considerable desde los años 70, especialmente en lo que respecta a alimentos de uso común tales como los productos lácteos, embutidos fermentados, bebidas alcohólicas fermentadas, vegetales, frutas y salsas, así como, alimentos étnicos como el kéfir y el kumis. El aumento del consumo de este tipo de alimentos se debe fundamentalmente a que el consumidor los considera sanos y naturales (Campbell-Platt, 1994; Steinkraus, 2002; Giraffa, 2003; Navarrete-Bolaños, 2012), existiendo además un interés positivo hacia la ingestión de microorganismos vivos beneficiosos, siendo así incluso entre aquellos consumidores más preocupados por la seguridad alimentaria (Hansen, 2002). De hecho, apenas se les ha asociado con procesos patológicos en el hombre, sino más bien con procesos terapéuticos, lo que ha contribuido a la designación de las bacterias lácticas como bacterias “seguras” (GRAS, Generally Recognized As Safe).

En la industria de la fermentación, los microorganismos se utilizan para la producción de metabolitos específicos, tales como ácidos, alcoholes, enzimas, antibióticos e hidratos de carbono. La mayor parte de estas fermentaciones incluyen bacterias del ácido láctico (BAL), hongos y levaduras. En particular, las BAL representan la microbiota más importante de las fermentaciones de productos lácteos y vegetales y forman parte de los cultivos iniciadores (principalmente lactobacilos y pediococos) utilizados en fermentaciones de carnes para producir ácidos y sabores deseables. El control industrial de los procesos de fermentación requiere la puesta al día de los conocimientos sobre la fisiología, metabolismo y genética de tales microorganismos. Igual de importante es el conocimiento de su impacto en la calidad del alimento, como su seguridad y su vida útil. Sin embargo, las características de las fermentaciones de los alimentos son más complejas. Las materias primas de origen animal o vegetal son fermentadas, bien por la microbiota inicial, bien por cultivos iniciadores añadidos de forma específica (Oyewole, 1997; Wood, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Holzapfel, 2002; Hansen, 2002, Giraffa, 2003; Navarrete-Bolaños y *col.*, 2007; Navarrete-Bolaños, 2012).

1.1.1.- FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

La fermentación de los vegetales la pueden llevar a cabo numerosos grupos de microorganismos, aunque el método de bioconservación de vegetales más utilizado implica casi siempre una fermentación láctica. Se cree que fue el pueblo chino, en la Prehistoria, el que utilizó por primera vez la fermentación láctica de los vegetales. Hoy en día, debido al desarrollo de sistemas eficaces de esterilización por calor y refrigeración, la fermentación del ácido láctico ha perdido, en cierta medida, su importancia como método de conservación en los países industrializados, pero se utiliza con asiduidad en países en vías de desarrollo, donde ha ganado importancia en los últimos años. Esto es debido al hecho de que las fermentaciones en las que las materias primas son de origen vegetal no son meros sistemas de conservación, sino que además se emplean con diversos fines, tales como (Huis in't Veld y *col.*, 1990):

- Conseguir el desarrollo de características sensoriales apropiadas, por ejemplo, sabor, aroma y textura.
- Destruir de forma natural toxinas y componentes indeseables que puedan aparecer en los materiales de partida.
- Mejorar la digestibilidad, especialmente de algunas legumbres.
- Enriquecer los productos con metabolitos microbianos útiles o beneficiosos, por ejemplo L-(+)-láctico o aminoácidos.
- Crear productos nuevos para mercados nuevos.
- Mejorar el valor dietético.

En una publicación del Programa COST de la Unión Europea (Buckenhüskes y *col.*, 1990) se recoge una lista de diferentes vegetales fermentados de interés comercial, tales como alcachofas, alcaparras, zanahorias, coliflores, aceitunas, melones, remolachas, pepinillos, etc. Además, en el mercado existe un número indeterminado de mezclas de vegetales con composiciones variables, así como extractos de vegetales fermentados procedentes de col, zanahoria, apio, tomates, remolacha y nabo. Sin embargo, hasta el momento sólo las aceitunas, la col ácida y los pepinillos en vinagre, destacan por su mayor importancia económica.

1.1.2.- MICROBIOLOGÍA DE LAS FERMENTACIONES DE VEGETALES

Cada tipo de vegetal proporciona un ambiente único en términos de tipo, disponibilidad y concentración de sustratos, capacidad tamponante, microorganismos competidores y, quizás, antagonismo natural de los componentes de la planta (Daeschel y *col.*, 1987; Di Cagno y *col.*, 2013).

El material vegetal fresco alberga a numerosos y variados tipos de microorganismos, bacterias estrictamente aerobias como *Bacillus*, *Flavobacterium* spp., *Pseudomonadaceae* y hongos, anaerobios facultativos como *Enterobacteriaceae* y BAL, y levaduras. Aunque las poblaciones de BAL son extremadamente bajas respecto a las de otros microorganismos, se sabe que las plantas son el hábitat natural para algunas especies de este grupo bacteriano. Un análisis de 30 muestras diferentes de col blanca tomadas en cuatro épocas de crecimiento de la planta demostró que la microbiota predominante estaba formada por bacterias aerobias, anaerobias y levaduras, donde las BAL representaban del 0,15 al 1,5% del total de la población bacteriana (Schneider, 1988). Los métodos tradicionales utilizados por la industria se basan en la fermentación llevada a cabo por la microbiota epifita existente en el producto (Etchells y *col.*, 1975).

La caracterización de BAL responsables de la fermentación de vegetales viene siendo estudiada desde hace bastantes años en productos tales como las aceitunas (González-Cancho, 1963; Vaugh, 1982, Ruiz-Barba y *col.*, 1994a; Garrido-Fernández y *col.*, 1997, Hurtado y *col.*, 2012), los pepinillos (Fleming, 1984) y la col ácida (Pederson y Albury, 1969), en los cuales *L. mesenteroides*, *L. brevis*, *Pediococcus pentosaceus* y *L. plantarum* son las especies aisladas con más frecuencia, pero no las únicas. Aunque la composición de la microbiota se ve afectada por los métodos de preparación de los vegetales para la fermentación, esto no parece tener ningún efecto significativo en los procesos fermentativos.

Tabla 1. Especies de bacterias del ácido láctico aisladas a partir de vegetales crudos o fermentados espontáneamente (Di Cagno y *col.*, 2013).

BAL	Origen	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Calabacines, zanahorias, pepinos, berenjenas, remolachas rojas, alcaparras, hinojos, coles.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a, 2008b, 2010, 2011a, 2011b; Plenghvidhya y <i>col.</i> , 2007; Pulido y <i>col.</i> , 2012; Sánchez y <i>col.</i> , 2000a; Tamminen y <i>col.</i> , 2004.
<i>L. pentosus</i>	Alcaparras, berenjenas, pepinos.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2011a; Pulido y <i>col.</i> , 2012; Sánchez y <i>col.</i> , 2000a; Tamminen y <i>col.</i> , 2004.
<i>L. fermentum</i>	Judías verdes, remolachas rojas, alcaparras, berenjenas.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a; Offonry y Achi, 1998; Pulido y <i>col.</i> , 2012; Sánchez y <i>col.</i> , 2000a; Seseña y Palop, 2007.
<i>L. curvatus</i>	Pimientos.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2009.
<i>L. brevis</i>	Alcaparras, berenjenas, coles, pepinos.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008b; Offonry y Achi, 1998; Plenghvidhya y <i>col.</i> , 2007; Pulido y <i>col.</i> , 2012; Sánchez y <i>col.</i> , 2000a; Seseña y Palop, 2007.
<i>L. paraplantarum</i>	Coles, alcaparras.	Plenghvidhya y <i>col.</i> , 2007; Pulido y <i>col.</i> , 2012.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i>	Coles blancas, zanahorias, pimientos, pepinos, berenjenas, lechugas.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a, 2009, 2011b; Lee y <i>col.</i> , 2011; Plenghvidhya y <i>col.</i> , 2007; Sánchez y <i>col.</i> , 2000a.
<i>Weissella soli</i>	Zanahorias.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a.
<i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i>	Pimientos.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008b, 2009, 2011a.
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Judías verdes, alcaparras.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a; 2008b; Offonry y Achi, 1998; Pulido y <i>col.</i> , 2012.
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Judías verdes, pepinos, alcaparras, coles.	Di Cagno y <i>col.</i> , 2008a, 2008b, 2011b; Plenghvidhya y <i>col.</i> , 2007; Pulido y <i>col.</i> , 2012; Tamminen y <i>col.</i> , 2004.

La población microbiana en general, así como la población de BAL, experimentan cambios considerables durante el transcurso de la fermentación, diferenciándose una serie de etapas sucesivas:

- 1.- Fase de iniciación, dominada por bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- 2.- Fermentación primaria, dominada por BAL y levaduras.
- 3.- Fermentación secundaria, llevada a cabo por levaduras fermentativas mientras existan azúcares fermentables. La microbiota responsable de la alteración de la fermentación, como son propionibacterias y clostridios, se pueden desarrollar en esta etapa y degradar el ácido láctico, sobre todo si el pH es demasiado alto o la concentración de sal y ácido es demasiado baja.
- 4.- Finalmente, puede tener lugar una etapa de post-fermentación, en la que pueden desarrollarse levaduras oxidativas, hongos y bacterias, sobre todo en productos que se almacenan en envases abiertos (Fleming, 1991; Arroyo-López y *col.*, 2008).

La población inicial y la tasa de crecimiento de los microorganismos, así como la tolerancia a la sal y al ácido, son factores importantes que influyen en el desarrollo secuencial de las poblaciones de BAL en fermentaciones de vegetales.

En las fermentaciones con baja concentración de sal, *Leuconostoc mesenteroides* es la primera BAL en dominar debido a su corto tiempo de generación (Stamer, 1988). En encurtidos, las levaduras fermentativas juegan un papel crucial en la conservación, ya que eliminan los sustratos fermentables. Por el contrario, las levaduras oxidativas están asociadas con la alteración de la fermentación por la degradación de ácidos orgánicos, lo que origina un incremento en el pH y aumenta la presencia de organismos sensibles al ácido que inician fermentaciones desfavorables (Nout y Rombouts, 1992; Arroyo-López y *col.*, 2008).

1.2.- LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL)

Las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo, tanto morfológica como fisiológicamente, cuya característica más significativa es la capacidad de producir ácido láctico como principal producto del metabolismo de los carbohidratos (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Orla-Jensen, 1919, Segunda Edición, Volumen 3; Sharpe, 1979). Este grupo incluye a bacterias Gram positivas, generalmente inmóviles, no esporulantes, de morfología cocoide o bacilar, anaerobias facultativas o microaerófilas y que carecen de ciertas actividades enzimáticas como catalasa, citocromo oxidasa y nitrato reductasa. Las BAL poseen una capacidad biosintética limitada y son muy exigentes desde el punto de vista nutricional, necesitando para su crecimiento aminoácidos, vitaminas y bases púricas y pirimidínicas (Dellaglio y *col.*, 1994; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 1994a; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 1995).

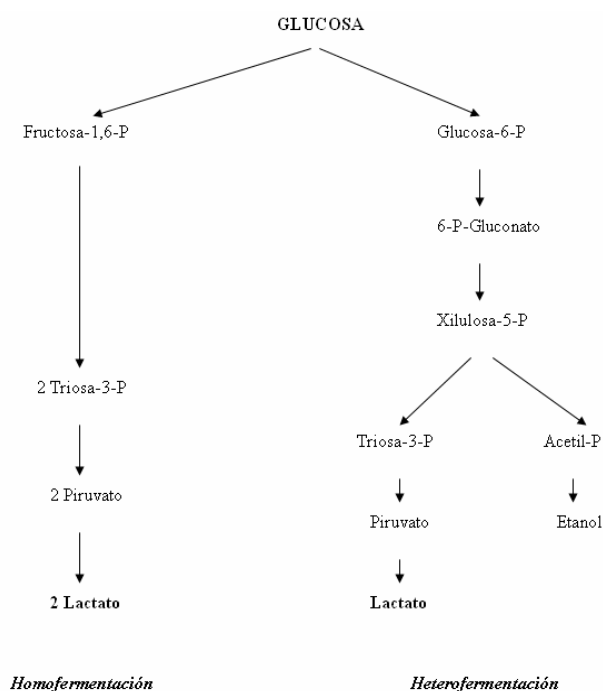


Figura 1. Esquema de las principales vías de fermentación de glucosa en las BAL (Liu, 2003).

Fisiológicamente se diferencian dos grupos, atendiendo a los productos finales de la fermentación de los azúcares: las *fermentadoras homolácticas* y las *heterolácticas*. Las *fermentadoras homolácticas* utilizan la vía glucolítica y reducen directamente casi

todo el piruvato a lactato gracias a la enzima lactato deshidrogenasa. Las *fermentadoras heterolácticas* utilizan la vía de la fosfoacetolasa, convirtiendo la glucosa en lactato y etanol o acético y CO₂ (Liu, 2003).

Desde el punto de vista taxonómico, las BAL constituyen un grupo polifilético (Makarova y Koonin, 2007). Se encuentran en la subdivisión de eubacterias Gram positivas conocida como subdivisión *Clostridial* (contenido en G+C inferior al 55%). La clasificación de las BAL en distintos géneros responde fundamentalmente a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Así, en su clasificación se han utilizado tradicionalmente criterios como la morfología celular, el crecimiento a distintas temperaturas, en diferentes concentraciones de cloruro sódico o distintos pHs, el patrón de fermentación de los carbohidratos y la configuración del ácido láctico producido (Orla-Jensen, 1919; Sharpe, 1979; Axelsson, 1993). Posteriormente se utilizaron otros criterios adicionales para su clasificación, como el estudio de las relaciones filogenéticas entre ellas atendiendo a las secuencias de ARN ribosómico 16S (Collins y *col.*, 1991; Schleifer y Ludwig, 1995; Vandamme y *col.*, 1996; Stiles y Holzapfel, 1997).

En base a las revisiones bibliográficas sobre la taxonomía de las BAL (Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson, 1998), se considerarán como tales aquellas pertenecientes a los géneros *Atopobium*, *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Los miembros de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, tienen un contenido en G+C similar, existiendo poca variación entre especies. El género *Lactobacillus*, en cambio, posee miembros con contenidos de G+C muy diversos y por ello constituye un grupo muy heterogéneo. Por último, el género *Bifidobacterium*, que aunque también produce ácido láctico junto con acetato en la fermentación de los azúcares, posee un porcentaje de G+C que oscila entre el 42-67% y filogenéticamente se sitúa en la subdivisión *Actinobacterial*.

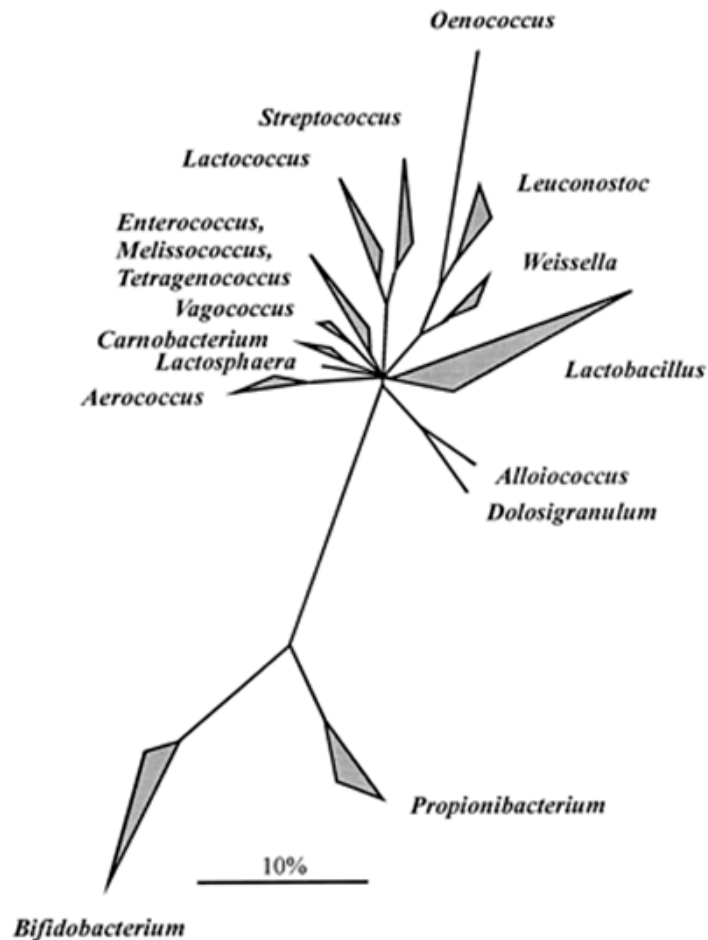


Figura 2. Árbol de consenso, basado en el análisis comparativo de secuencias de ARNr 16S, que muestra los principales grupos filogenéticos de bacterias del ácido láctico (Holzapfel y col., 2001).

1.2.1.- EL GÉNERO *Lactobacillus*

Los lactobacilos son bacilos Gram positivos no esporulantes e inmóviles, aunque su morfología varía ampliamente desde bacilos largos o bacilos ligeramente curvados a cocobacilos corineformes. Son bacterias anaerobias aerotolerantes, quimiorganotrofas, con metabolismo fermentativo y catalasa negativas, aunque algunas cepas pueden presentar una pseudocatalasa (Felis y Dellaglio, 2007). Fermentan los hidratos de carbono produciendo como principal producto final, ácido láctico. Tienen requerimientos nutricionales complejos, dependiendo de la especie, necesitan ser suplementadas con carbohidratos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas (Tannock, 2004).

El género *Lactobacillus* incluye más de 100 especies (Felis y Dellaglio, 2007). Filogenéticamente se encuentra próximo a los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* y más alejado de los *Streptococcus*, *Carnobacterium* y las especies aerobias de *Bacillus*. Taxonómicamente es un grupo muy heterogéneo, con un contenido variable de G+C que oscila entre 32 y 54% (Schleifer y Ludwig, 1995). Uno de los principales problemas en la taxonomía de este género es la ausencia de correlación entre las propiedades metabólicas y la posición filogenética (Sheleifer y Ludwig, 1995). Las técnicas moleculares como la hibridación ADN-ADN o la secuenciación del gen ribosómico 16S ha llevado a la reclasificación de numerosas especies de BAL.

A pesar de la presencia frecuente de lactobacilos en los alimentos, son muy raros los casos documentados de infecciones, casos que se han producido principalmente en pacientes con una enfermedad severa previa (Bernardeu y col., 2008). Entre las principales propiedades de seguridad asociadas a los lactobacilos, y que podrían expresarse en el tubo digestivo, se encuentran algunas actividades enzimáticas como la descarboxilación de la tirosina, la actividad desconjugasa de las sales biliares, otras actividades diversas (como nitroreductasa, β -glucuronidasa y glicosidasa, que podrían tener efectos toxicológicos), la degradación de ácido hialurónico, la actividad de agregación del complemento y la producción de metabolitos tóxicos (Bernardeu y col., 2006). Entre los efectos negativos se podría incluir la cariogénesis, habiéndose atribuido a ciertas cepas de lactobacilos su implicación en algunos tipos de caries debido a su capacidad acidificante (Bernardeu y col., 2006).

1.2.2.- EL GÉNERO *Enterococcus*

Los enterococos son cocos Gram positivos con bajo contenido en G+C (menos del 50%), catalasa negativos (aunque algunas especies pueden presentar una pseudocatalasa) y que se agrupan en parejas o en cadenas cortas. No forman endosporas y algunos pueden ser móviles. Algunas especies son pigmentadas como *E. mundtii*, *E. casseliflavus* y *E. sulfureus*. Son anaerobios aerotolerantes, quimiorganotrofos, con un metabolismo homofermentativo. El principal producto de la fermentación es el ácido L-láctico y, además, pueden producir pequeñas cantidades de ácido acético, fórmico y

etanol. No producen gas. El número de especies adscrito a este género no ha parado de aumentar en los últimos años, pasando de las 19 especies descritas en 2002 (Giraffa, 2002) a las 41 especies depositadas actualmente en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH*).

La taxonomía clásica de los enterococos es vaga y en muchos casos confusa, ya que no hay características fenotípicas inequívocas que permitan distinguirlos de otras bacterias cocoideas Gram positivas y catalasa negativas (Devriese y *col.*, 1993).

Debido a la gran capacidad de los enterococos de sobrevivir a tratamientos térmicos y a condiciones ambientales adversas, se pueden encontrar en multitud de alimentos, tanto de origen animal como vegetal (Murray, 1990; Muller y *col.*, 2001; Foulquié-Moreno y *col.*, 2006). Incluso se ha encontrado que *E. faecium* es uno de los microorganismos predominantes en la leche cruda (Franz y *col.*, 1999), con las consecuentes implicaciones para la industria láctea. Además juegan un papel importante en la fabricación de distintos productos vegetales, cárnicos y lácteos, como las aceitunas, las salchichas o los quesos (Franz y *col.*, 2003; Hugas y *col.*, 2003; Giraffa, 2003). Adicionalmente, los enterococos se pueden emplear para alargar la vida media de los alimentos por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Incluso, se pueden emplear como probióticos para humanos y animales (Franz y *col.*, 1999). Entre las características ideales a la hora de considerar a una cepa de enterococo como probiótico o como cultivo iniciador se encuentran la ausencia de genes de virulencia y sensibilidad a los antibióticos (Franz y *col.*, 2003).

La presencia de enterococos en numerosos alimentos artesanales es causa de gran debate, debido a su reciente aparición como patógenos emergentes (McBride y *col.*, 2007). Foulquié-Moreno y colaboradores (2006) señalan la división de los investigadores en pro y contra de los enterococos debido a la controversia que existe sobre la conveniencia o no de que este grupo de microorganismos estén presentes en los alimentos. Los enterococos han sido asociados con infecciones nosocomiales y pueden estar presentes en pacientes inmunodeprimidos, además de haberse detectado la

presencia de cepas resistentes a vancomicina. Pero a pesar de todo, su incidencia en enfermedades humanas no se ha podido correlacionar con su presencia en alimentos (Franz y *col.*, 1999).

1.2.3.- HÁBITATS DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO

La fuente originaria de las BAL son las plantas verdes, si bien, gracias a los procesos de adaptación metabólica y selección natural han sido capaces de colonizar hábitats muy diversos (Stiles y Holzappel, 1997). Así, las podemos encontrar asociadas a las superficies vegetales, donde crecen a expensas de los nutrientes liberados tras la descomposición de los tejidos. Por ello también se encuentran en prácticamente todos los alimentos o bebidas en los que la materia prima sea de origen vegetal.

Del mismo modo, las BAL constituyen parte de la microbiota natural de muchos animales, incluido el hombre, formando parte de la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal y las mucosas (cavidad oral, vagina, etc.), donde desempeñan un papel beneficioso en el mantenimiento de la integridad intestinal y en procesos de inmunomodulación y resistencia a patógenos (Klaenhammer y *col.*, 2005; Giraffa, 2012). Los efectos beneficiosos de muchos lactobacilos ha conducido a su designación como probióticos (Claesson y *col.*, 2007). Además, se aíslan y se emplean como cultivos iniciadores en numerosos alimentos fermentados como productos lácteos, encurtidos, carnes fermentadas y panes fermentados (Tannock, 2004). En estos alimentos suelen tener un efecto positivo al mejorar las características organolépticas del producto final, aunque algunas especies pueden producir efectos negativos y alterarlos.

1.2.4.- IMPORTANCIA DE LAS BAL EN LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Como se dijo anteriormente, Las bacterias del ácido láctico son responsables de la fermentación de una gran variedad de alimentos con destino al consumo humano y animal. Su uso en alimentación es muy frecuente, ya que intervienen en el desarrollo de

las características sensoriales de los alimentos que fermentan, contribuyendo a la textura, sabor, color y aroma típicos de éstos (Smith y Palumbo, 1981; Kandler, 1983; Daeschel y Fleming, 1984; Hounhouigan y *col.*, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994; Holzapfel, 2002).

Las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados se deben fundamentalmente a la producción de agentes texturantes y moléculas aromáticas. Así, las BAL excretan exopolisacáridos (EPS) que mejoran la textura y viscosidad del alimento, confiriéndoles un aspecto cremoso (De Vuyst y *col.*, 2001; Laws y Marshall, 2001). Ésta, por ejemplo, es una cualidad muy apreciada en la elaboración de ciertos derivados lácteos como el queso o el yogur (Broadbent y *col.*, 2003). Además, bajo ciertas condiciones ambientales, algunas BAL sufren procesos de autólisis. La autólisis ha sido muy estudiada en cepas de *L. lactis* relacionadas con la elaboración de quesos.

Entre las moléculas aromatizantes producidas por las BAL se encuentran el diacetilo, el glioxal y el metilglioxal. El diacetilo, aparte de ser una molécula con actividad antimicrobiana (Jay, 1982), es responsable del olor a mantequilla de los productos lácteos fermentados (Fox y Wallace, 1997). El glioxal y el metilglioxal producido por ciertos lactobacilos son los responsables de la gran variedad de aromas que presentan ciertos tipos de quesos, que se producen como consecuencia de su interacción con aminoácidos (Kowalewska y *col.*, 1985).

Las BAL pueden tener actividad proteolítica, dando lugar a la producción de péptidos y aminoácidos que enriquecen el medio desde el punto de vista nutricional, aparte de contribuir a las propiedades organolépticas del producto final. La actividad proteolítica de las BAL ha sido muy estudiada en relación con la elaboración de quesos y yogures, y en especial en *L. lactis*.

Otra de las actividades beneficiosas de las BAL es la hidrólisis del almidón mediante amilasas, lo que mejora notablemente la digestibilidad de los alimentos fermentados por estas bacterias.

Algunas BAL son capaces de producir bioconservantes que contribuyen a la bioseguridad de los alimentos y otras muchas se pueden incluir en la categoría de los microorganismos probióticos (O'Sullivan y *col.*, 2002; Cotter y *col.*, 2005; Ammor y *col.*, 2006; Reid y *col.*, 2007; Lebeer y *col.*, 2008). Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que al ser ingeridos en un determinado número, ejercen beneficios para la salud del consumidor adicionales a los derivados de la nutrición general” (Guarner y Schaafsma, 1998). Entre las propiedades probióticas de las BAL cabe mencionar la disminución de la intolerancia a la lactosa, de la diarrea asociada a la ingesta de ciertos antibióticos o causadas por rotavirus, de la colonización por *Helicobacter pylori*, del colesterol LDL, de los efectos de enfermedades inflamatorias intestinales, de la recurrencia del cáncer superficial de vejiga, la prevención de la alergia, la modulación del sistema inmune y la mejora de la vacunación oral (Ouweland y *col.*, 2002). Las especies de BAL más utilizadas como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus* (Charteris, y *col.*, 1997; Sanz, 2007), si bien, también se utilizan algunas especies de *Enterococcus*.

Por otro lado, los alimentos fermentados pueden contener prebióticos o “componentes de los alimentos no digeribles que actuarían de manera beneficiosa en el hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de especies bacterianas en el colon”, según la definición propuesta por Gibson y Roberfroid (1995). Los oligosacáridos producidos en las fermentaciones de los derivados de la leche son un ejemplo típico de prebióticos, ya que afectan selectivamente al desarrollo de bifidobacterias en el colon humano (Gibson y *col.*, 1995).

Finalmente, una de las cualidades más importantes de las BAL es su capacidad para producir compuestos antimicrobianos, lo que les permite desplazar a otros microorganismos competidores presentes en las fermentaciones.

1.2.5.- LAS BACTERIOCINAS

Existen procesos inespecíficos de interferencia microbiana común a todos los ecosistemas microbianos, incluidos los alimentos. Dichos mecanismos incluyen la competición por los nutrientes, la formación de ambientes inadecuados o la competencia por los sitios de adhesión o colonización. Pero, además, existen procesos de amensalismo mediados por la producción de sustancias antagonistas tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, antibióticos y bacteriocinas (Caplice y Fitzgerald, 1999). Las BAL liberan multitud de sustancias inhibitoras al medio, impidiendo el desarrollo de microorganismos no deseados, entre las que destacan por su actividad antimicrobiana las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosómica que inhiben el desarrollo de cepas y/o especies bacterianas, bien sean relacionadas filogenéticamente con la cepa productora, bien que compartan los mismos requerimientos nutricionales con ella (Klaenhammer, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994; Jack y col., 1995; Cotter y col., 2005), pero no el de la propia bacteria productora, que presenta inmunidad específica a la bacteriocina secretada. En el caso de algunas de estas bacteriocinas, su actividad inhibitora se dirige a cepas patógenas cuyo vehículo pueden ser los alimentos, como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium paraperfringens*. Son especialmente los enterococos (*E. faecium* y *E. faecalis*) los que producen una mayor variedad de bacteriocinas con una actividad inhibitora muy fuerte, cuyo espectro de acción incluye a numerosos patógenos humanos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.

La producción de bacteriocinas es una característica muy frecuente entre las bacterias Gram positivas (Jack y col., 1995), si bien en los últimos años las investigaciones se han centrado particularmente en las bacteriocinas producidas por las BAL, dado su uso potencial como bioconservantes alimentarios y que están producidas por bacterias con status GRAS (Nes y Johnsborg, 2004). Dada la frecuencia con la que se aíslan estas BAL productoras de bacteriocinas de los diferentes alimentos, parece claro que éstas han sido consumidas durante décadas sin representar riesgos para la

salud, por lo que su introducción como cultivos iniciadores no debería suponer problema alguno para los consumidores (O'Sullivan y *col.*, 2002).

Las bacteriocinas presentan una serie de características que las convierten en candidatas adecuadas para ser utilizadas como conservadoras de los alimentos (Gálvez y *col.*, 2007):

1. Se consideran sustancias seguras.
2. No son activas ni tóxicas frente a células Eucariotas.
3. Por su naturaleza proteica, son inactivadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal.
4. Generalmente, sobre todo las bacteriocinas de pequeño tamaño, son termorresistentes y tolerantes a amplios rangos de pH.
5. Muchas de ellas presentan un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones frente a la mayoría de las bacterias Gram positivas patógenas, toxigénicas o saprófitas más frecuentes en los alimentos.
6. La acción bactericida se produce al actuar frente a la membrana citoplasmática bacteriana, por lo que no se producen resistencias cruzadas con antibióticos.
7. En muchos casos, los determinantes genéticos están localizados en plásmidos, lo que facilita su manipulación genética y la obtención de cepas mejoradas genéticamente.

Actualmente la nisina (aditivo E-234) es la única bacteriocina aprobada para su uso alimentario en más de 50 países (Guinane y *col.*, 2005). El otro gran campo de aplicación de las bacteriocinas lo constituye su posible uso médico y veterinario, como se ha puesto de manifiesto en el tratamiento y prevención de la mastitis mediante la lactocina 3147 (Guinane y *col.*, 2005). Además, su empleo en el ganado podría convertirse en una alternativa al uso de antibióticos en ganadería (Díez-González, 2007).

Por todo ello, muchos investigadores han propuesto el uso de las bacteriocinas, especialmente las de las BAL, como conservantes para aumentar la vida útil e incrementar la calidad higiénica de diferentes alimentos.

1.3.- LAS LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos Eucariotas unicelulares clasificados dentro del reino Fungi, estando descritas unas 1.500 especies (Kurtzman y Fell, 2006). Su crecimiento vegetativo se produce en su mayoría a partir de la gemación o fisión binaria y sus esporas sexuales no se forman en el interior de cuerpos fructíferos (Kurtzman y Fell, 1998). La mayor parte de las levaduras se consideran unicelulares, con un solo núcleo y una estructura de pared celular variable, lo que ha permitido su clasificación en Ascomycetos y Basidiomycetos. Algunas especies se caracterizan por formar pseudohifas o incluso hifas verdaderas. Las células vegetativas pueden presentar morfologías muy variadas, determinándose en algunas especies la formación de esporas asexuales. Muchas levaduras presentan reproducción sexual, formando ascas o basidios, estructuras donde tiene lugar la meiosis y que definen el estado perfecto (teleomórfico) de la levadura. Pueden tener ciclos de vida muy complejos, además de ser muy variables en cuanto a sus capacidades fisiológicas.

La gran mayoría de las levaduras son mesófilas, teniendo una temperatura óptima de crecimiento entre 24 y 48 °C. Sólo unas pocas (2%) son psicrófilas, con una temperatura óptima de crecimiento por debajo de 24 °C, algunas incluso se pueden desarrollar cerca de los 0 °C (Déak y Beuchat, 1996).

Las levaduras toleran un rango de pH que oscila entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5 (Déak y Beuchat, 1996). Son organismos aerobios, existiendo especies fermentadoras. *Saccharomyces* y unos pocos géneros más fermentan rápidamente los azúcares, pero detienen pronto su crecimiento y multiplicación por falta de oxígeno. *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces bailii*, entre otros, fermentan glucosa más rápidamente bajo condiciones aerobias que anaerobias (Rodrigues y col., 2001). Sólo unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y oligosacáridos, pueden ser fermentados por las levaduras, pero el rango de compuestos que pueden asimilar es mucho más amplio incluyendo además, pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y glicósidos (Déak y Beuchat 1996).

1.3.1.- HÁBITATS DE LAS LEVADURAS

Las levaduras se caracterizan por tener una amplia distribución en hábitats naturales, siendo muy frecuente su aislamiento a partir de substratos ricos en azúcares. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas, tracto digestivo de animales hervívoros y omnívoros, algunas están asociadas con insectos, pero el suelo es su mayor reservorio (Deák y Beuchat, 1996).

Son muchas las especies que han sido capaces de adaptarse a diferentes entornos o nichos ecológicos proporcionados por la actividad humana. En algunos casos, estas levaduras han sido inconscientemente seleccionadas por los seres humanos durante miles de años por sus espléndidas propiedades en la elaboración de los diferentes alimentos, en un proceso conocido como "domesticación" (Barrio y *col.*, 2006). Por ello, las levaduras son reconocidas por su enorme importancia en la producción de alimentos y bebidas.

1.3.2.- IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Las levaduras están consideradas como el grupo más importante de microorganismos implicados en la fermentación de alimentos y han sido utilizadas durante siglos por el hombre por su interés comercial en la producción de pan, vino, cerveza, sidra y otros vegetales. El metabolismo de las levaduras permite la producción de alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos y gases, dando lugar al desarrollo de sabores y aromas característicos (Deák y Beuchat, 1996). La fermentación de los azúcares por las levaduras es una tecnología antigua y bien conocida, mediante el cual los carbohidratos son transformados en diferentes compuestos tales como agua, etanol, dióxido de carbono, etc. (Arroyo-López y *col.*, 2008). Sin embargo, también son importantes como microorganismos descomponedores, especialmente en alimentos y bebidas con bajo pH, altas concentraciones de sal y bajas temperaturas (Stratford, 2006). Además, estas propiedades son a menudo específicas de la cepa, por lo que su uso en procesos de producción de alimentos fermentados es esencial para mantener la calidad y consistencia del producto (Deák, 1995; Tornay-Lehoczki y Dlačny, 2000). Su uso se

ha incrementado en la producción de otros alimentos fermentados, como carnes y quesos, y en la producción de diferentes productos metabólicos, incluyendo enzimas, lípidos y vitaminas (Deák, 1991). Recientemente se ha vuelto a reconsiderar la influencia positiva de las levaduras en la fermentación de la aceituna de mesa (Psani y Kotzekidou, 2006; Hernández y *col.*, 2007; Arroyo-López y *col.*, 2008; Bautista-Gallego y *col.*, 2011).

Por otro lado, las levaduras constituyen la causa más probable de alteración de productos tales como frutas y bebidas sin alcohol, las cuales contienen azúcares fermentables, siendo substratos donde la elevada acidez, la baja actividad del agua o la presencia de etanol, reducen el desarrollo bacteriano. Entre las levaduras comúnmente asociadas con el deterioro de las frutas secas se incluyen *Zygosaccharomyces rouxii* y especies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Pichia* (Brackett, 1997).

1.3.3.- PAPEL DE OTROS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA

El papel que desempeñan otros microorganismos diferentes a las levaduras y las BAL en la fermentación de la aceituna de mesa es siempre perjudicial para el proceso. Los tres principales problemas causados por estos microorganismos son: ablandamiento de las aceitunas, bolsas de aire en su interior o burbujas en la piel debido a la acumulación de gases y las fermentaciones pútridas. Los microorganismos asociados a estos problemas son, respectivamente, *Bacillus*, bacterias Gram negativas (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Aeromonas*) y *Clostridium*. Al inicio de la fermentación pueden aparecer miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, ya que poseen una alta tasa de crecimiento a pH neutro, produciendo ácidos como acético y fórmico y dióxido de carbono, pero se inhiben a pH inferiores a 5,5 por el desarrollo de BAL (Nout y Rombouts, 1992). Por último, la aparición de *Propionibacterium* es causante de incrementos de pH que permiten el posterior desarrollo de *Clostridium*, con los problemas asociados al crecimiento de este otro microorganismo (Garrido-Fernández y *col.*, 1997).

2.- LA ACEITUNA DE MESA: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA

El fruto del olivo es una drupa carnosa que posee un componente amargo (oleuropeína), una baja concentración de azúcares (2,6-6%, comparado con otras drupas), y un alto contenido en aceite (12-30%) dependiendo de la estación y variedad. Estas características hacen que no pueda ser consumida directamente del árbol y que necesite ser procesada para dotar al producto final de unas características organolépticas adecuadas (Garrido-Fernández y *col.*, 1997).

Según la Norma Comercial vigente del Consejo Oleícola Internacional, la aceituna de mesa es “el producto preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europaea L.*), elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservado mediante fermentación natural o tratamiento térmico, con o sin conservantes, y envasado con o sin líquido de gobierno”.

A pesar de que la mayor proporción de la producción mundial de aceituna se dedica a la obtención de aceite de oliva (54% en la campaña 2012/13, COI-2013), la cantidad de aceituna de mesa que se produce a nivel mundial está en permanente crecimiento (Tabla 2), situándola a la cabeza de los productos vegetales fermentados del mundo occidental y presentando una importante trascendencia económica y social. Además, es uno de los pocos productos cuya tasa de consumo en los últimos años suele ser mayor que la de producción, fenómeno en gran medida asociado a la revalorización que ha tenido este alimento como sano y natural. El mayor conocimiento del producto, una presentación más cuidada y su mayor calidad, han contribuido a incrementar el consumo mundial y, por consiguiente, el comercio internacional de la aceituna de mesa. Al igual que en el caso del consumo, las exportaciones de aceitunas de mesa han registrado un progresivo aumento, representando en la campaña 2012/2013 un 27% de la producción mundial.

Tabla 2. Cifras de mercado mundial de aceituna de mesa de los últimos 10 años (en 1.000 t).

CAMPAÑA	PRODUCCIÓN	CONSUMO	EXPORTACIÓN	IMPORTACIÓN
2003/2004	1602	1670	462	441
2004/2005	1853	1832	480	480
2005/2006	1762	1829	503	495
2006/2007	2089	2079	598	522
2007/2008	2152	2131	607	583
2008/2009	2083	2110	585	546
2009/2010	2369	2199	693	628
2010/2011	2563	2466	659	594
2011/2012*	2526	2439	661	587
2012/2013**	2315	2510	625	583

* Cifras provisionales. **Cifras previstas.

Observando los datos de mercado de los principales países oleícolas para la campaña 2012/2013 (Tabla 3), se aprecia que el principal productor de aceitunas de mesa del mundo es la UE con el 28,8% de la producción mundial, seguida de Turquía, con un algo más del 17%, y en tercer lugar Egipto, con casi un 13%. En el sector de la aceituna de mesa, la participación de los distintos países en la producción está menos concentrada que en el caso del aceite de oliva, aún cuando la UE y Turquía representan el 46% del total mundial, llegándose al 60% si se tiene en cuenta a Egipto.

En general, se trata de un mercado de autoconsumo, donde los propios países productores son, a su vez consumidores. EE.UU., Israel e Irán presentan un consumo superior a su producción. Marruecos y Argentina destacan por su elevado nivel de exportación en relación a su producción. EE.UU. es claramente el principal importador de aceitunas de mesa del mundo. Cabe destacar que, junto a EE.UU., la gran mayoría de importaciones mundiales son absorbidas por la UE, Rusia, Brasil, Arabia Saudí y Canadá. A los seis va destinado casi el 80% de las exportaciones mundiales.

Tabla 3. Producción, consumo, exportación e importación (extracomunitarias) de aceituna de mesa de los principales países oleícolas (en miles de t). Campaña 2012/2013, cifras previstas.

PAÍS	PRODUCCIÓN	CONSUMO	EXPORTACIÓN	IMPORTACIÓN
UE	666	628	246	97
Turquía	410	350	70	0
Egipto	300	300	80	0
Siria	172	132	35	0
Argelia	157	155	0	0
Marruecos	100	32	70	0
EE.UU.	85	215	5	135
Perú	85	50	30	0
Irán	66	71	0	5
Argentina	60	35	65	0
Jordania	38	31	8	1
Chile	34	32	6	5
Túnez	24	22	2	0
Israel	14	20	1	6

La situación del mercado de la aceituna de mesa en los países de la UE viene reflejada en la Tabla 4. España es el principal productor, representando el 68% de la producción total de la UE (alrededor del 19% de la producción mundial), seguido de Grecia e Italia. Los países productores de la UE son también consumidores. En el caso de Francia e Italia, el consumo es muy superior a su producción, por lo que son importadores netos. España y Grecia destinan una parte importante de su producción para la exportación siendo España la responsable del 27% de las exportaciones mundiales.

Tabla 4. Producción, consumo, exportación e importación (extracomunitarias) de aceituna de mesa de algunos países de la UE (en miles de t). Campaña 2012/2013. Cifras previstas.

PAÍS	PRODUCCIÓN	CONSUMO	EXPORTACIÓN	IMPORTACIÓN
España	450	185	170	2
Grecia	130	20	51	2
Italia	74	148	4	6
Portugal	8	8	15	0
Chipre	3	4	0	0
Francia	1	56	2	28
Alemania	-	68	1	14

Todos estos datos evidencian el papel clave que desempeña nuestro país en la producción mundial de la aceituna de mesa, así como en el mercado internacional. Es importante destacar a la comunidad autónoma de Andalucía dentro de la producción española, representando el 80% de la producción nacional en la campaña 2011/2012 según los datos de la Agencia para el Aceite de Oliva, seguida por Extremadura con un 19%. En dicha campaña, dentro de Andalucía, Sevilla fue la provincia con una mayor producción, representando un 57% del total nacional, seguida de Córdoba con un 12% y Málaga con un 9%.

2.1.- CLASIFICACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI), organismo que agrupa a los países oleícolas dependiente de la ONU y encargado de la regulación del comercio internacional, existen tres tipos de aceitunas en función del grado de madurez de los frutos frescos:

1. **Aceitunas verdes:** frutos recogidos durante el ciclo de maduración, antes del envero, cuando han alcanzado su tamaño normal.
2. **Aceitunas de color cambiante:** frutos recogidos antes de su completa madurez, durante el envero.
3. **Aceitunas negras:** frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella.



Aceitunas verdes



Aceitunas color cambiante



Aceitunas negras

Como veremos más adelante, existen diferentes preparaciones comerciales elaboradas a partir de estos tres tipos de aceitunas.

2.2.- ELABORACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

A partir de los distintos tipos de aceitunas (verdes, de color cambiante y negras) se pueden llevar a cabo una gran variedad de tipos de elaboración (Figura 3). Los más importantes se pueden clasificar en:

A) Elaboración sin tratamiento alcalino:

- Aceitunas al natural: Obtenidas a partir de cualquiera de los tipos de aceitunas colocadas directamente en salmuera.

B) Elaboración con tratamiento alcalino:

B.1) Sin fermentación:

· *Con esterilización:*

- Aceitunas negras oxidadas estilo californiano (“Black ripe olives”): Obtenidas a partir de aceitunas verdes o de color cambiante sometidas a un tratamiento alcalino, ennegrecidas por oxidación y conservadas mediante tratamiento térmico (esterilización) en salmuera o cualquier otra solución.

- Aceitunas verdes estilo californiano (“green ripe olives”): Obtenidas a partir de aceitunas verdes sometidas a tratamiento alcalino y conservadas mediante tratamiento térmico (esterilización) en salmuera.

· *Sin esterilización:*

- Aceitunas estilo Picholine, Castelvetro y Campo Real: Obtenidas a partir de aceitunas verdes sometidas a tratamiento alcalino y conservadas en salmuera con algún tipo de aliño.

B.2) Con fermentación:

- Aceitunas estilo español o sevillano: Obtenidas a partir de aceitunas verdes sometidas a tratamiento alcalino, fermentación y conservadas en salmuera.

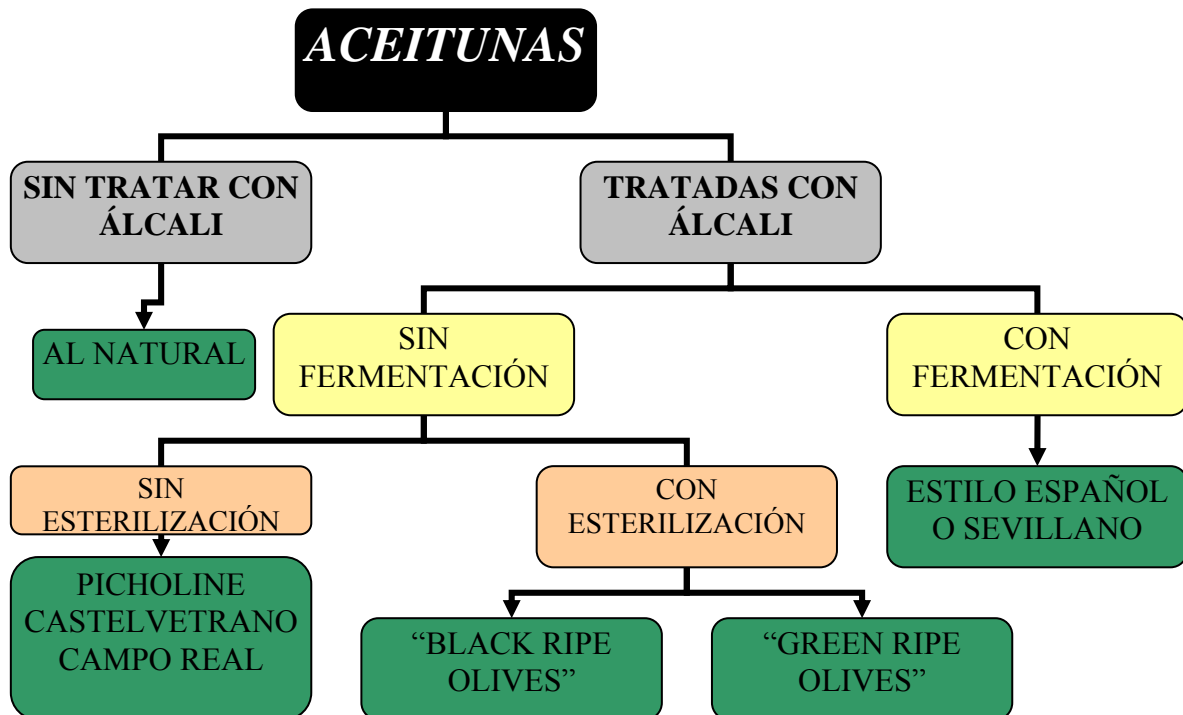


Figura 3. Principales sistemas de elaboración de aceitunas de mesa.

De los diferentes sistemas de elaboración de aceitunas citados anteriormente, los de mayor importancia económica a nivel mundial son las aceitunas verdes estilo español y las aceitunas negras oxidadas estilo californiano o “black ripe olives” (Fernández-Díez y *col.*, 1985). Las otras elaboraciones que incluyen un tratamiento alcalino presentan un consumo más localizado en países concretos: estilo Castelvetro en Italia (Marsilio, 1993), estilo Picholine en Francia (COI, 2004), estilo Campo Real en España

(De Lorenzo y *col.*, 2000) y las verdes estilo californiano o “green ripe olives” en EE.UU. (USDA, 1983).

2.2.1.- ACEITUNAS DE MESA AL ESTILO ESPAÑOL O SEVILLANO

Con el fin de eliminar la oleuropeína hidrosoluble, las aceitunas se someten a un tratamiento alcalino con NaOH (1,8-3,0%, p/v, dependiendo de la variedad), tras lo cual se realizan uno o varios lavados con agua con objeto de eliminar el exceso de álcali (Borbolla y Alcalá y Rejano, 1978). Posteriormente se colocan en salmuera con un 5-10% (p/v) de NaCl, que debido al intercambio osmótico se convierte en un caldo de cultivo donde crecen los microorganismos a expensas de la materia fermentable de los frutos (glucosa, fructosa, manitol y sacarosa) (Fernández-Díez, 1983). Sin embargo, el tratamiento con NaOH destruye gran parte de la microbiota presente en las aceitunas (Garrido-Fernández, 1990), por lo que en muchos casos es casi imprescindible añadir *L. pentosus* como cultivo iniciador. La utilización de sal y la progresiva bajada del pH selecciona a la microbiota láctica, que aumenta desde un 1% del total de la microbiota en la salmuera fresca hasta el 80% tras unos pocos días (Robinson, 1988; Sánchez-Gómez y *col.*, 2006). En condiciones normales, como consecuencia de esta fermentación ácido-láctica, se obtiene un producto de características sensoriales únicas con un valor de pH menor o igual a 4,2 unidades, el cual, junto con un incremento adicional de la concentración de sal hasta niveles de 8-9%, permite la buena conservación de las aceitunas hasta el momento del envasado.

2.2.1.1.- BAL ASOCIADAS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA

El principal género de BAL aislado de aceitunas de mesa es *Lactobacillus*. En menor proporción se han aislado especies de los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Durante bastante tiempo se creyó que *L. plantarum* era la especie predominante en la fermentación de aceitunas estilo español o sevillano (Fernández-Díez y *col.*, 1985), pero desde la descripción de *L. pentosus* como nueva especie (Zanoni y *col.*, 1987), muchas cepas de *L. plantarum* aisladas de fermentaciones de

aceitunas han sido reidentificadas como *L. pentosus* (Montaño y col., 2000; Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 2012).

Aunque nos referimos a este grupo microbiano como BAL, las reacciones que producen, tanto por el número de sustratos generados como por las vías metabólicas que utilizan, son más complejas de lo que se desprende del nombre del grupo. A pesar de esta complejidad metabólica, la base de la fermentación láctica de la aceituna de mesa se centra en la capacidad del microorganismo para producir ácido, reduciendo el pH y aumentando la acidez libre (Battcock y Azam-Ali, 1998; Sánchez y col., 2000b; Montaño y col., 2003). El ácido láctico que producen es efectivo inhibiendo el desarrollo de otras bacterias que podrían alterar y estropear la aceituna. Mientras *Streptococcus* y *Leuconostoc* son las especies que menos ácido producen, los miembros del grupo *Lactobacillus* son homofermentativos y producen las mayores cantidades de ácido. En un estadio intermedio se sitúan los pediococos (Battcock y Azam-Ali, 1998).

Otro de los metabolitos producidos por las bacterias del ácido láctico aisladas de fermentaciones de aceitunas que más interés despiertan entre los investigadores son las bacteriocinas. Estos compuestos poseen un espectro de acción antimicrobiana que abarca tanto patógenos (como *Listeria monocytogenes*), como bacterias Gram positivas que deterioran alimentos (Yoneyama y col., 2004). Las bacteriocinas también actúan frente a competidores en el nicho ecológico de la propia cepa productora. Por ejemplo, la plantaricina S, producida por cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentaciones de aceituna estilo español o sevillano, es activa frente a diversos competidores de esta BAL (otras cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*), así como frente a bacterias que alteran las aceitunas una vez fermentadas, como *Propionibacterium* y *Clostridium* (Jiménez-Díaz y col., 1993). La producción de bacteriocinas suele estar ligada al crecimiento y, tanto la producción como su acción posterior, suelen ser óptimas en las condiciones de fermentación (Delgado y col., 2007).

El empleo de cepas productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores en las fermentaciones de aceitunas es un procedimiento muy interesante puesto que no sólo se aumentan las posibilidades de implantación del inóculo, sino que éste, además, incrementará la calidad y la seguridad del producto final (Ruiz Barba y col., 1994b;

Delgado y *col.*, 2005), ya que permiten el control y/o eliminación de poblaciones de bacterias indeseables, alterantes o incluso patógenas (Cogan, 2002; Johnson y Lucey, 2006). La patente española 9900740 sobre el “Procedimiento de fermentación de productos vegetales” (Jiménez-Díaz y *col.*, 1999) y las mejoras introducidas en la patente principal por “Procedimiento de obtención de productos vegetales mediante la adición de cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas” (Jiménez-Díaz y Ruiz-Barba, 2004) se basa en el uso combinado de dos cepas de *L. plantarum* (actualmente clasificadas como *L. pentosus*), una productora de bacteriocinas y otra con una rápida tasa de crecimiento.

A lo largo de la fermentación, las BAL autóctonas cambian espontáneamente. Al inicio predominan especies Gram positivas de los géneros *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* que compiten con el resto de la microbiota Gram positiva. Esta microbiota desaparece en varios días, quedando sólo especies de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Por último, al final del proceso de fermentación (desde el día 20, hasta el día 120 aproximadamente) las especies involucradas son del género *Lactobacillus*, principalmente *L. plantarum* (Fernández-González y *col.*, 1993; Harris, 1998) (reclasificada actualmente como *L. pentosus*), además de coexistir con algunas especies de levaduras. Sin embargo, las características físico-químicas, como la concentración de sal, temperatura externa, etc., son las responsables de los cambios de la microbiota durante la fermentación.

2.2.1.2.- LEVADURAS ASOCIADAS A LA FERMENTACIÓN DE LA ACEITUNA DE MESA

El papel beneficioso de las levaduras en las fermentaciones de aceituna de mesa al natural o aderezadas está fuera de dudas (Kotzekidou, 1997; Marquina y *col.*, 1997). Aún así, es necesario evaluar cada especie presente en los distintos procesos, puesto que algunas de ellas son también causantes del deterioro del fruto (Asehraou y *col.*, 2000).

Las especies de levaduras identificadas de forma recurrente en diferentes elaboraciones de aceitunas de mesa han sido *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotolura glutinis* y

Saccharomyces cerevisiae (Oliveira y col., 2004; Coton y col., 2005; Arroyo-López y col., 2006; Hernández y col., 2007). Dentro de los géneros *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Torulaspora* también se han identificado diferentes especies pero o bien de forma minoritaria o bien asociadas a una determinada variedad y/o forma de preparación (Arroyo-López y col., 2008). Gracias al uso de técnicas moleculares la identificación de levaduras es ahora más rápida y precisa que con el uso de métodos bioquímicos y se elimina la subjetividad que puede acompañar a la interpretación de estas pruebas (Coton y col., 2005; Arroyo-López y col., 2008).

Uno de los defectos causados en las aceitunas por la acción de levaduras son las deformaciones de la estructura del fruto debido a la formación de bolsas de dióxido de carbono. La formación de gas también puede llevar a una fermentación muy tumultuosa con pérdidas de salmuera. *P. anomala* y *S. cerevisiae* se han asociado a este problema (Arroyo-López y col., 2008). También hay algunas especies que poseen actividad poligalacturonasa que contribuye a degradar la pared de los frutos, volviéndolos demasiado blandos (Hernández y col., 2007). Diversas especies de *Rhodotorula* asociadas a la piel de la aceituna antes de la recolección han mostrado esta actividad aunque, actuando en las primeras etapas de la fermentación, un pequeño deterioro de la pared celular del fruto favorecería la liberación de nutrientes al medio colaborando con la fermentación (Vaughn y col., 1969). Aunque no se ha podido relacionar con ninguna especie en concreto, es posible que algunas levaduras también sean causantes de producir defectos en el aroma y sabor de la aceituna (Arroyo-López y col., 2008).

Durante la fermentación y el almacenamiento, las levaduras pueden producir etanol, ácidos orgánicos, glicerol, alcoholes superiores, ésteres y otros compuestos volátiles que contribuirán significativamente a la textura y el aroma y, a su vez, a la aceptación del producto por parte del consumidor (Garrido-Fernández y col., 1997; Montaña y col., 2003; Sabatini y col., 2008). Las levaduras pueden mostrar diversas actividades enzimáticas importantes durante el desarrollo de la fermentación de la aceituna de mesa. Por ejemplo, la actividad β -glucosidasa puede influir en la hidrólisis de la oleuropeína facilitando la implantación de las bacterias lácticas (Psani y Kotzeidou, 2006), actividades estereasa y lipasa, que pueden incrementar el contenido en ácidos grasos libres en las salmueras de fermentación (Hernández y col., 2007;

Arroyo-López y *col.*, 2008) y compuestos antioxidantes, siendo hasta ahora *P. anomala* la que ha mostrado una mayor actividad antioxidante en medio sintético (Arroyo-López y *col.*, 2008).

Uno de los papeles más relevantes que se otorga a las levaduras es la posibilidad de inhibir el crecimiento de otras levaduras gracias a su actividad “killer” y/o micogénica (Asehraou y *col.*, 2000; Psani y Kotzeidou, 2006). *P. anomala*, *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxinus* y *P. membranaefaciens* han sido las especies de levaduras que mayor actividad killer han mostrado (Asehraou y *col.*, 2000; Arroyo-López y *col.*, 2008; Hernández y *col.*, 2008).

El papel que juegan las levaduras en esta fermentación siempre se ha considerado secundario, creyéndose que sólo contribuyen a las propiedades organolépticas del producto (Fernández-Díez y *col.*, 1985). Sin embargo, la especie bacteriana predominante en la fermentación, *L. plantarum* (reclasificada actualmente como *L. pentosus*), es auxótrofa para varios aminoácidos y vitaminas (Rosen y Fabian, 1953; Rogosa y *col.*, 1961; Koser, 1968; Ledesma y *col.*, 1977; Morishita y *col.*, 1981; Kandler y Weiss, 1982; Roissart, 1983; Ruíz-Barba, 1991), encontrándose algunas de estas deficiencias en cepas salvajes aisladas de fermentaciones de aceitunas (Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 1994a), que no son capaces de sintetizar vitaminas de grupo B. Se ha comprobado que algunas de las levaduras asociadas a *L. pentosus* en esta fermentación producen este tipo de vitaminas, por lo que tales levaduras serían de vital importancia para la correcta fermentación de las aceitunas verdes (Ruiz-Barba y Jiménez Díaz, 1995).

2.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN

El objetivo final de una fermentación es tanto preservar las características de la aceituna como mejorar las propiedades del producto final (Panagou y Tassou, 2006). Existen varios factores que influyen en el correcto desarrollo de la fermentación y que se deben evaluar para controlar el ecosistema fermentativo (Rejano-Navarro, 1977;

Durán-Quintana y *col.*, 1999; Spyropoulou y Nynchas, 1999; Spyropoulou y *col.*, 2001; Tassou y *col.*, 2002; Chammen y *col.*, 2005):

- El pH del fruto: en aceitunas aderezadas hay que tener en cuenta el hidróxido sódico residual y los lavados que las aceitunas han sufrido.
- La cantidad de cloruro sódico de la salmuera y su influencia sobre la actividad de agua.
- La temperatura de fermentación.
- La disponibilidad de nutrientes y su difusión a través de la epidermis de la aceituna.
- La aireación.

Uno de los parámetros que se controlan de forma rutinaria para evaluar el éxito de una fermentación es la acidez, tanto libre como combinada (Panagou y Tassou, 2006). Además de los ácidos liberados por los frutos y los generados durante la fermentación, está permitido adicionar en cualquier momento del proceso ácido acético, ascórbico, benzoico, cítrico, láctico y sórbico (Norma del COI, 2004). El empleo de ácido acético en el envasado de aceitunas negras o de ácidos láctico y cítrico en el caso de las verdes sería un buen ejemplo de esta práctica (Rodríguez-Borbolla y González-Pellísó, 1972; de Castro y *col.*, 2007). También se han empleado ácidos para reducir el pH inicial de las salmueras en aceitunas aderezadas estableciendo así un pH inicial óptimo para las bacterias del ácido láctico en aceitunas al natural (Panagou y Tassou, 2006).

La concentración de sal de las salmueras es otro de los parámetros más importantes a tener en cuenta. No sólo se trata de favorecer una correcta fermentación desde el inicio, sino que debiera mantenerse una concentración constante y renovarla si fuese preciso (Bobillo y Marshal, 1991; Özyay y Borcakli, 1995; Montaña y *col.*, 2003). Tassou y *col.* (2002) demostraron que una concentración baja de sal favorece el crecimiento de las BAL mientras que valores elevados estimulan el crecimiento de levaduras. Debido al coste medioambiental que acarrea el vertido de las salmueras, también se están realizando estudios para desarrollar salmueras con menor concentración de sal sin poner en riesgo la seguridad alimentaria del proceso ni la calidad del producto.

Tassou y *col.*, (2002) también pusieron de manifiesto la importancia de la temperatura en los procesos de fermentación. El tipo de fermentador utilizado influye directamente en la temperatura, de forma que cuanto más pequeño es el fermentador, menos inercia tiene. Por ello, al analizar barriles de 200 litros se observa que la distribución de la microbiota es muy irregular. Como resultado, se obtienen barriles con frutos estropeados mientras que otros contienen aceitunas de gran calidad (Amelio y De Muro, 2000).

La variedad de la aceituna también es determinante, especialmente en aceitunas elaboradas al natural. Por ejemplo, mientras que se ha encontrado desarrollo de lactobacilos en aceitunas al natural de las variedades Conservolea, Gordal o Aloreña (García y *col.*, 1992; Durán y *col.*, 1993; Panagou y *col.*, 2003), éstos no se han detectado en las variedades Hojiblanca y Manzanilla (Rodríguez-Borbolla y *col.*, 1971; Garrido-Fernández y *col.*, 1997).

2.3.1.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y OLEOSÍDICOS PRESENTES EN LA ACEITUNA

A principios del Siglo XX se describió en aceitunas y hojas de olivo la presencia de un compuesto amargo al que se denominó oleuropeína, con propiedades químicas parecidas a las de los taninos (Bourquelot y Vintilesco, 1908). Sin embargo, no fue hasta mediados del Siglo XX cuando se descubrió la estructura completa de dicha sustancia (Panizzi y *col.*, 1960).

La oleuropeína se considera el compuesto polifenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas (Amiot y *col.*, 1986), aunque su concentración disminuye con la maduración de los frutos a la vez que aumenta la de hidroxitirosol 4-glucósido, que llega incluso a ser mayoritario en aceitunas negras maduras (Romero y *col.*, 2002).

En aceitunas verdes al estilo español, negras oxidadas y negras naturales envasadas se han encontrado como polifenoles más representativos en el jugo de los frutos, hidroxitirosol, tirosol, salidrósido y verbascósido (Romero y *col.*, 2004). Por otra

parte, en la fase oleosa de estas aceitunas los polifenoles más importantes son hidroxitirosol, tirosol, catecol, vanillina, ácido vanílico, hidroxitirosol acetilado, pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol.

2.4.- SELECCIÓN Y USO DE CULTIVOS INICIADORES

La utilización de cultivos iniciadores para fermentar las aceitunas verdes no está muy extendida en Europa. Sin embargo, el interés y el desarrollo de dichos cultivos iniciadores está aumentando, debido al estudio de cepas con capacidad de degradar la oleuropeína (Ciafardini y *col.*, 1994; Leal-Sánchez y *col.*, 2003), producir bacteriocinas (Ruiz-Barba y *col.*, 1994b), crecer en salmueras de aceitunas maduras (Durán-Quintana y *col.*, 1994), fermentar a bajas temperaturas (Durán-Quintana y *col.*, 1999) o desarrollarse a valores de pH elevados (Sánchez y *col.*, 2001; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012).

Reutilizar las salmueras de fermentación es la forma más simple de usar un inóculo. Panagou y Tassou (2006) pusieron de manifiesto que de este modo se reduce el tiempo de supervivencia de las enterobacterias.

El uso de cultivos iniciadores no sólo ayuda a disminuir el riesgo de deterioro, sino que facilita una rápida y mayor acidificación de la salmuera, contribuyendo también a disminuir la energía requerida durante el proceso (Fernández-Díez y *col.*, 1985; Garrido-Fernández y *col.*, 1997; Spyropoulou y *col.*, 2001; Panagou y Tassou, 2006).

Un cultivo iniciador ideal debe cumplir las siguientes características (Fernández-Díez y *col.*, 1985; Buckenhüskes y *col.*, 1990; Jiménez-Díaz y *col.*, 1993; Garrido-Fernández y *col.*, 1997; Durán-Quintana y *col.*, 1999; Jiménez-Díaz y Ruiz-Barba, 2012):

- a) Tener un crecimiento rápido y predominante
- b) Poseer un metabolismo homofermentativo, tasa de acidificación elevada y un rápido consumo de los sustratos fermentables

- c) Presentar tolerancia a la sal, a los ácidos orgánicos y a los polifenoles del medio
- d) Tener requisitos nutricionales mínimos
- e) Tener capacidad de crecer a baja temperatura
- f) Ser productor de bacteriocinas
- g) Ser tolerante a la congelación o liofilización en el caso de que vaya a ser usado comercialmente

Del mismo modo, el medio de fermentación debe cumplir los requisitos complementarios al cultivo seleccionado (Garrido-Fernández y *col.*, 1997):

- a) Disponibilidad de sustratos fermentables
- b) Concentración tolerable de sal
- c) Poseer los requisitos nutricionales mínimos
- d) Tener pH y temperatura apropiados
- e) Ausencia de sustancias inhibidoras
- f) Utilizar la variedad de aceituna adecuada

Los estudios de comparación entre fermentaciones espontáneas y fermentaciones inoculadas se han llevado a cabo desde los comienzos de la investigación moderna sobre la aceituna de mesa, durante la década de los 40 (Garrido-Fernández y *col.*, 1997). Desde entonces muchos son los autores que recomiendan la inoculación de las salmueras.

Del mismo modo que las especies de lactobacilos se asocian a una variedad de aceituna o a un método de preparación de una variedad, se ha estudiado el uso de diferentes cultivos iniciadores para cada proceso. La mayoría de estudios actuales se han centrado en el uso de *L. pentosus* y *L. plantarum* como principales especies asociadas a los procesos de fermentación de aceitunas de mesa. En la Tabla 5 se recogen los principales estudios de uso de cultivos iniciadores de los últimos años.

Tabla 5. Principales estudios de uso de cultivos iniciadores de los últimos años.

Especie inoculada	Variiedad de aceituna y método de procesamiento	Referencia
<i>L. plantarum</i>	<i>Bella di Cerignola</i> , aceitunas verdes naturales	Perriocone y col., 2010
	<i>Moresca y Kalamata</i> , aceitunas negras naturales	Sabatini y col., 2008
	<i>Conservolea</i> , aceitunas verdes tratadas	Chorianopoulos y col., 2005
	<i>Picholine</i> , aceitunas verdes tratadas	Lamzira y col., 2005
	<i>Ascolana y Ternera</i> , aceitunas verdes tratadas	Marsilio y col., 2005
	<i>Manzanilla</i> , aceitunas verdes tratadas	Leal-Sánchez y col., 2003
	<i>Gemlik</i> , aceitunas negras naturales	Borcakli y col., 1995
	<i>Manzanilla</i> , aceitunas verdes tratadas	Ruiz-Barba y col., 1994
<i>L. pentosus</i>	<i>Azeiteira</i> , aceitunas verdes tratadas	Peres y col., 2008
	<i>Manzanilla</i> , aceitunas verdes tratadas	Medina y col., 2008; De Castro y col., 2002
	<i>Lecino</i> , aceitunas negras naturales	Servili y col., 2006
	<i>Conservolea</i> , aceitunas verdes naturales	Panagou y col., 2003
<i>L. pentosus, L. plantarum</i> (cultivos simples y coinoculación)	<i>Arbequina</i> , aceitunas verdes naturales	Hurtado y col., 2010
<i>L. pentosus, L. plantarum</i>	<i>Conservolea</i> , aceitunas negras naturales	Panagou y col., 2008
	<i>Conservolea</i> , aceitunas verdes tratadas	Panagou y Tassou, 2006
	<i>Manzanilla</i> , aceitunas verdes tratadas	Sánchez y col., 2001
<i>L. plantarum, L. paracasei</i>	Aceitunas verdes tratadas	Saravanos y col., 2008
<i>L. paracasei</i>	<i>Bella di Cerignola</i> , aceitunas verdes tratadas	De Bellis y col., 2010
<i>L. pentosus, L. pentosus/L. coryniformis</i> (co-inoculación)	<i>Nocellara del Belice</i> , aceitunas verdes tratadas	Aponte y col., 2012
<i>L. plantarum, L. casei</i>	<i>Nocellara Etnea</i> , aceitunas verdes naturales	Randazzo y col., 2011
<i>L. plantarum, L. plantarum/P. pentosaceus</i> (co-inoculación), <i>L. plantarum/L. faecium</i> (co-inocoulación)	Aceitunas verdes tratadas	Ruiz-Barba y col., 2010
<i>L. brevis, Ln. Cremoris, Ln. Paramesenteroides, L. plantarum</i>	<i>Gemlik</i> , aceitunas negras naturales	Kumral y col., 2009
<i>L. plantarum, L. casei y L. pentosus</i>	Aceitunas verdes tratadas y naturales (diferentes cultivos)	Caggia y col., 2004
<i>E. casseliflavus/L. pentosus</i> (co-inoculación)	Aceitunas verdes tratadas	De Castro y col., 2002
<i>L. pentosus</i> (co-inoculación)	Aceitunas verdes tratadas	Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012
<i>L. plantarum, L. brevis, P. cerevisiae, Ln. mesenteroides</i>	<i>Manzanillo</i> , aceitunas verdes tratadas	Etchells y col., 1966

Jiménez-Díaz y Ruiz-Barba (2004) recogieron en su patente el uso conjunto de dos cepas de *L. plantarum* como cultivos iniciadores en productos vegetales. Así, la alta tasa de crecimiento en condiciones naturales mostrada por *L. plantarum* LP R JL3 permitía que esta cepa se desarrollase con rapidez en las salmueras de fermentación de aceitunas, provocando una rápida bajada del pH de las mismas y propiciando así las condiciones ambientales para que se desarrollase de forma eficaz la cepa *L. plantarum* LP R JL2. Además, la cepa LP R JL3 es productora, en condiciones naturales de fermentación, de un polisacárido extracelular que contribuye de manera eficaz a potenciar las características organolépticas del producto final. Por el otro, la capacidad de la cepa *L. plantarum* LP R JL2 de producir plantaricina S, le confiere una gran ventaja ecológica para imponerse a la microbiota bacteriana natural de estos productos y sobre aquella que pudiera contaminar el producto fermentado posteriormente y causar alteraciones que lo hicieran no apto para su consumo y/o comercialización (Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012).

Panagou y col., (2008) inocularon con cepas de *L. pentosus* y *L. plantarum* aceitunas de la variedad Conservolea negras al natural, observando niveles muy similares de acidificación e implantación de las cepas. Los mismos autores comprobaron en otro estudio que una cepa comercial de *L. pentosus* ofrecía mejores resultados en cuanto a acidificación, reducción del pH y del tiempo de supervivencia de las enterobacterias que una cepa de *L. plantarum* aislada de las propias aceitunas (Panagou y Tassou, 2006). Este estudio se realizó con aceitunas Conservolea verdes aderezadas.

Hurtado y col. (2010) estudiaron el uso de dos especies de lactobacilos y de una levadura como iniciadores, tanto solos como combinados entre ellos, durante la fermentación de la aceituna de mesa de la variedad Arbequina. Observaron que el uso de *L. pentosus* como cultivo iniciador, tanto en cultivo puro como en asociación con la levadura *C. diddensiae*, constituía un método rápido y apropiado para la fermentación de esta variedad de aceituna de mesa. Diversos estudios avalan el uso de levaduras como co-inóculos puesto que, por un lado son capaces de inhibir el crecimiento de otras cepas de levaduras y flora autóctona patógena que podrían alterar las aceitunas y su

salubridad (Psani y Kotzekidou, 2006) y, por otro, estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas (Ruiz-Barba y *col.*, 1994a; Arroyo-López y *col.*, 2008).

Aponte y *col.* (2012) buscaron cepas autóctonas de la fermentación de la variedad “Nocellara del Belice” para utilizarlas como cultivos iniciadores. Entre las cepas encontradas eligieron una perteneciente a la especie *L. pentosus* con buenas características bioquímicas y con una alta capacidad para acidificar las salmueras. La cepa mostró una adaptación óptima al medio y observaron que la fermentación espontánea necesitaba 14 días más para llegar al mismo nivel de población que los ensayos con el inóculo, por lo que el uso del mismo disminuía el riesgo de desarrollo de microorganismos perjudiciales para la fermentación. Además, las aceitunas elaboradas con el cultivo iniciador presentaban mejores propiedades sensoriales que a las de una fermentación espontánea.

También se han inoculado aceitunas con otras especies de bacterias del ácido láctico. Etchells y *col.* (1966) compararon los perfiles de fermentación de *L. plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus cerevisiae* y *Leuconostoc mesenteroides* cuando se inoculaban en aceitunas manzanilla verdes. *L. plantarum* fue con diferencia la especie que ofreció mejores valores de pH y acidificación cuando fue co-inoculada con otra de las especies, mientras que *L. brevis* fue incapaz de implantarse. En el estudio de Castro y *col.* (2002) se utilizó con éxito *Enterococcus casseliflavus* conjuntamente con *L. pentosus*, intentando simular el desarrollo de una fermentación espontánea de aceitunas al estilo español. Kumral y *col.* (2009) inocularon aceitunas negras al natural de la variedad Gemlik, con *L. brevis*, *Leuconostoc cremoris* y *Leuconostoc paramesenteroides*, además de con una cepa comercial de *L. plantarum*. A temperatura controlada y con una concentración salina baja, fue *L. cremoris* el microorganismo que ofreció mejores condiciones para la inoculación.

Una de las más recientes vías de investigación es el uso de inóculos con características probióticas con el objetivo de utilizar a la aceituna de mesa como alimento portador de tales microorganismos. Se ha observado que *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* son capaces de colonizar la epidermis de la aceituna (Lavermicocca y *col.*, 2005). También se ha usado

la cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 como cultivo iniciador en una fermentación de aceitunas de mesa “Bella di Cerignola” comprobando que la cepa se encuentra en la epidermis al final del proceso de elaboración, actuando al mismo tiempo como cultivo iniciador y como cepa probiótica (De Bellis y *col.*, 2010).

También se comprobó que la cepa probiótica *L. paracasei* LMGP22043 colonizó satisfactoriamente el intestino humano, influyendo positivamente en los parámetros bioquímicos de la microbiota intestinal (Valerio y *col.*, 2011). La asociación de esta cepa con alimentos ricos en fibras, como es el caso de la aceituna, representa una nueva estrategia para proporcionar un suministro diario de probióticos y para atraer a los consumidores hacia alimentos vegetales ricos en ellos.

3.- ECOLOGÍA MICROBIANA

3.1.- RELACIONES ENTRE MICROORGANISMOS

Desde los inicios de la microbiología se ha considerado que las bacterias eran organismos independientes, sin que tuvieran una necesidad aparente de organización ni de comunicación. Al principio, la comunicación bacteriana se contempló como un fenómeno raro y de dudosa credibilidad (Dunny y Winans, 1999b) pero los numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años han demostrado que las bacterias pueden comunicarse entre sí, utilizando para ello sistemas sofisticados que implican la secreción de moléculas de señalización de distinta naturaleza (Dunny y Winans, 1999a; Miller y Bassler, 2001). Como consecuencia, las bacterias se comportan como comunidades pluricelulares, lo que implica fenómenos de actuación conjunta (*quorum sensing*) que afectan a la formación de biofilms, la producción de bacteriocinas, la expresión de factores de virulencia, etc.

3.2.- LOS BIOFILMS

3.2.1.- CONCEPTO DE BIOFILM

Un biofilm se define como una comunidad microbiana que se caracteriza porque las células que lo componen están adheridas irreversiblemente a un sustrato, a una superficie de contacto, o entre ellas mismas (Agle, 2007; Costerton, 2007). Los microorganismos que forman el biofilm suelen estar embebidos en una matriz polimérica extracelular, producida por uno o más de sus integrantes, y compuesta de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras macromoléculas (Branda y *col.*, 2005; Battin y *col.*, 2007). Dichos integrantes pueden pertenecer a una única especie o bien a un abanico de especies diferentes, siendo muy comunes los biofilms formados por múltiples especies de bacterias y levaduras (Davey y O'Toole, 2000; O'Toole y *col.*, 2000).

Los biofilms se consideran comunidades complejas y dinámicas en las que tiene lugar una diversificación fenotípica muy importante, lo que permite a los microorganismos adaptarse a diferentes ambientes (Battin y *col.*, 2007). Por ejemplo, las condiciones hidrodinámicas y la disponibilidad de un sustrato y de nutrientes influyen en la arquitectura del biofilm, ya que ciertos genes son esenciales para regular la producción de las sustancias poliméricas extracelulares que forman la matriz. Por otro lado, y a diferencia de los individuos aislados, los microorganismos que forman parte de un biofilm presentan un notable aumento de su resistencia frente a diferentes agresiones ambientales tales como a los daños causados por la luz ultravioleta, la desecación y los gradientes de pH, estando mejor adaptados a sobrevivir en periodos de estrés ambiental (Costerton y *col.*, 1999; Kubota y *col.*, 2008; Moons y *col.*, 2009). En definitiva, los microorganismos que forman los biofilms exhiben fenotipos diferentes a los de las células platónicas, lo que significa que existen funciones específicas de biofilm, determinadas por el fenotipo de los microorganismos que los componen. Finalmente, la comunicación célula-célula juega un papel muy importante en el control del desarrollo y la arquitectura del biofilm (Parsek y Greenberg, 2005). Además, dirige la diferenciación celular en los biofilms maduros e interviene en la dispersión de las células para ir a otro lugar de colonización y formar un nuevo biofilm. Es tal el grado de coordinación en el

comportamiento multicelular de un biofilm que se los ha llegado a considerar como *ciudades de microorganismos* (Watnick y Kolter, 2000).

3.2.2.- ETAPAS DE LA FORMACIÓN DE UN BIOFILM

En la formación de un biofilm podemos distinguir varios estadios (Figura 4):

1. Adhesión inicial o colonización de una nueva superficie. Las primeras células que se asientan se denominan *células pioneras* (Parsek y Fuqua, 2004; Nobile y Mitchell, 2007).

2. Fase de anclaje. Las células se adhieren a una superficie. Esta fase se puede dividir en dos estadios, denominados reversible e irreversible, ya que la adhesión inicial es generalmente débil y para la transición a una asociación más estable se necesitan mecanismos activos por parte de las células (Monds y O'Toole, 2009).

3. Proliferación celular y agregación. Se forma una capa basal de microcolonias ancladas a la superficie. La colonización y la formación de microcolonias dependen de estructuras diferentes dependiendo de si la especie microbiana es móvil o no. De esta forma, en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida*, que poseen flagelos, el anclaje inicial de las células está determinado por la motilidad celular. La posterior colonización y formación de microcolonias depende de una estructura diferente, denominada pilus tipo IV, que es indispensable para la unión inicial a la superficie (Nobile y Mitchell, 2007). Efectivamente, la movilidad flagelar en dichas bacterias es importante para la interacción célula-superficie, mientras que los pili tipo IV lo son para la interacción célula-célula.

Por el contrario, bacterias que carecen de flagelos, como *Staphylococcus epidermidis*, utilizan un mecanismo de anclaje célula-superficie completamente diferente, desconocido hasta el momento. En este microorganismo, la agregación célula-célula requiere de un polisacárido intercelular adhesina (PIA) y de una autolisina/adhesina (Aae).

4. Formación de macrocolonias. Las microcolonias aumentan de tamaño y se unen entre sí. El arquetipo es generalmente en forma de seta aunque existen también estructuras planas donde las células se mantienen embebidas en una matriz polimérica extracelular (Monds y O'Toole, 2009).

5. Dispersión de las células. Las macrocolonias se pueden disolver total o parcialmente, liberando células que vuelven a la fase plantónica, lo que completa el esquema ideal del ciclo de desarrollo de un biofilm.

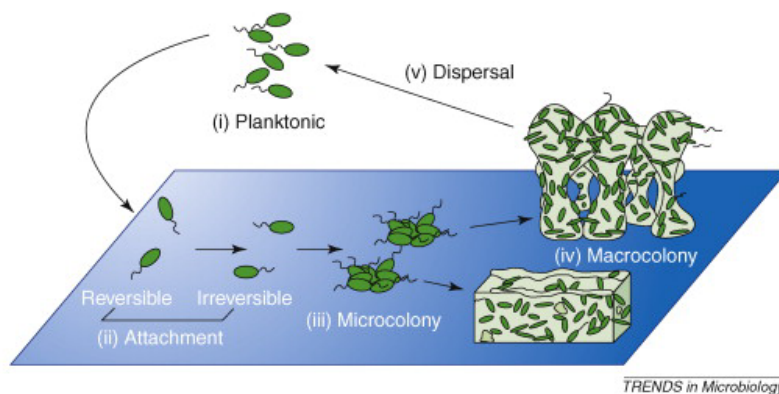


Figura 4. Estadios de la formación de un biofilm (Monds y O'Toole, 2009)

3.2.3.- LA MATRIZ EXTRACELULAR

Una vez que se han unido un número suficiente de células para formar microcolonias, éstas comienzan a producir una matriz extracelular, conocida también con el nombre de sustancias exopoliméricas extracelulares (EPS) (Parsek y Fuqua, 2004; Branda y *col.*, 2005; Nobile y Mitchell, 2007).

La **composición** de esta matriz es muy variable, ya que depende de los microorganismos presentes y de las condiciones ambientales. En la mayoría de los biofilms, la matriz está formada principalmente por polisacáridos extracelulares. La **celulosa** es un componente esencial de las matrices de algunos biofilms bacterianos, cuya función es muy diversa dependiendo de la especie. En unos casos contribuye a aumentar la resistencia del biofilm a los agentes antimicrobianos y en otros, protege a los microbios del entorno ambiental. Otro componente clave de las matrices son las **proteínas**, aunque éstas son generalmente menos abundantes. Tanto las proteínas de

superficie como las secretadas contribuyen a las propiedades adhesivas de la matriz, como es el caso de ciertas proteínas de superficie de la levadura *Candida albicans*. En otras especies microbianas, la formación de la matriz depende de otros tipos de moléculas, como en el caso de *Mycobacterium smegmatis*, que necesita ácidos micólicos. Finalmente, ciertas matrices están formadas, además, por el **ADN** que se libera en la lisis celular, contribuyendo también a la integridad del biofilm (Nobile y Mitchell, 2007; Thomas y *col.*, 2009).

Las **funciones** de la matriz que envuelve un biofilm son tan diversas como sus estructuras pero parece ser que juega un papel importante en la adhesión de las células y en la protección de la comunidad microbiana (Nobile y Mitchell, 2007). La función de adherencia de la matriz implica el mantenimiento de las interacciones célula-célula y célula-superficie de adhesión, protegiendo así la arquitectura del biofilm. La función de protección incluye la degradación de agentes antimicrobianos.

3.2.4.- DIVERSIDAD MICROBIANA EN LOS BIOFILMS

Como se dijo anteriormente, en los ambientes naturales son muy raros los biofilms formados por una sola especie microbiana, siendo mucho más frecuentes los constituidos por múltiples especies de organismos procariotas y eucariotas, aunque normalmente siempre hay un tipo de microorganismo que predomina sobre los demás (Rickard y *col.*, 2003; Parsek y Fuqua, 2004; Manuzon y Woang, 2007; Hardie y Heurlier, 2008).

Los diferentes microorganismos que componen los biofilms mixtos se asocian los unos a los otros mediante un proceso de adhesión que se denomina **coagregación** (Rickard y *col.*, 2003; Parsek y Fuqua, 2004; Parsek y Greenberg, 2005). Este proceso es altamente específico y normalmente se lleva a cabo mediante la unión de una proteína “adhesina” de un microorganismo, con un sacárido “receptor” de otro microorganismo. La coagregación se ha podido observar entre bacterias aisladas de biofilms procedentes de diferentes ecosistemas, lo que indica que la adhesión entre cepas genéticamente diferentes podría ser un fenómeno muy común y de gran

importancia para el desarrollo de biofilms mixtos complejos (Rickard y *col.*, 2003; Manuzon y Woang, 2007).

La formación de un biofilm constituido por múltiples especies microbianas se lleva a cabo mediante una sucesión de eventos de adhesión y multiplicación (Figura 5) (Rickard y *col.*, 2003):

- Los primeros organismos que se adhieren a la superficie se denominan *colonizadores primarios* y dicha colonización se lleva a cabo mediante interacciones físico-químicas inespecíficas con los componentes de una película orgánica “debidamente acondicionada” localizada sobre la superficie de anclaje (van Loodsrecht y *col.*, 1990; Dang y Lovell, 2000) (Figura 5a).

- Si las condiciones son propicias, los colonizadores primarios se multiplican en el sustrato formando microcolonias (Figura 5b).

- A medida que las condiciones ambientales cambian en el joven biofilm y el sustrato comienza a cubrirse de microorganismos, los *colonizadores secundarios* son capaces de unirse a los colonizadores primarios (Figura 5c)

- El biofilm comienza a convertirse en una comunidad multimicrobiana (Figura 5d).

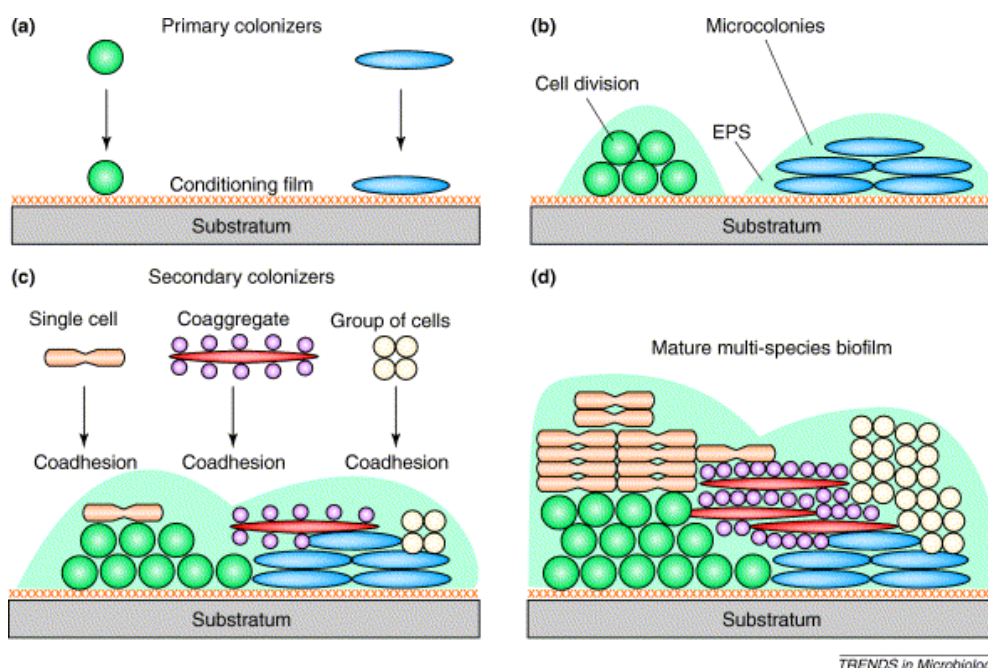


Figura 5. Posibles etapas de congregación en el desarrollo de biofilms multispecies (Rickard y *col.*, 2003).

Se piensa que las interacciones de coagregación contribuyen al desarrollo de los biofilms por dos rutas diferentes:

1º: Una célula individual en suspensión reconoce y se adhiere a células del biofilm genéticamente diferentes.

2º: Coagregación de los colonizadores secundarios en suspensión, y adhesión de este coagregado al biofilm en crecimiento.

En ambos casos, las células en suspensión (células platónicas) se adhieren específicamente a las células del biofilm mediante un proceso denominado coadhesión. De esta forma, las células coadheridas forman parte de la comunidad del biofilm (Bos y *col.*, 1994; Busscher y *col.*, 1995).

3.2.5.- BIOFILMS Y COMUNICACIÓN CELULAR

Puesto que la mayoría de los biofilms están formados por múltiples especies de organismos Procariotas y Eucariotas, la presencia de un gran número de especies y su estrecha proximidad va a tener consecuencias importantes para sus integrantes (Parsek y Fuqua, 2004; Parsek y Greenberg, 2005; Moons y *col.*, 2009). Ello se traduce en complejas relaciones de competición y cooperación entre los microorganismos que los forman (Watnick y Kolter, 2000; Parsek y Fuqua, 2004; Siewwerts y *col.*, 2008; Nadell y *col.*, 2009). Aunque existe una cierta controversia respecto a que los biofilms estén regulados por un sistema global de comunicación celular (*quorum sensing*) (Nadell y *col.*, 2009), se acepta que éstos son el resultado neto de muchas interacciones microbianas particulares, por lo que el éxito de la formación y subsistencia de una comunidad multicelular microbiana depende en mayor o menor medida de la comunicación célula-célula (incluido el *quorum sensing*), ya que de esa forma se coordina la expresión de los genes apropiados para tal fin (Battin y *col.*, 2007; Diggle y *col.*, 2007; Nobile y Mitchell, 2007; Hardie y Heurlier, 2008; Ryan y Dow, 2008; Sank y Kolter, 2009).

Con objeto de sobrevivir y proliferar en estos consorcios tan complejos, las bacterias han desarrollado una intensa interactividad con las especies vecinas, que van

desde la más feroz de las competiciones por los nutrientes hasta la guerra química, pasando por la colaboración mutua para protegerse y alimentarse (Moons y *col.*, 2009; Wimpenny, 2009). Muchas de estas interacciones están reguladas por fenómenos de *quorum sensing*, mientras que en otras se produce la interferencia de dicho fenómeno (*quorum quenching*) (Hibbing y *col.*, 2010).

3.2.6.- BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO Y BIOFILMS

Poco se sabe acerca de la formación de biofilms por las BAL pero los escasos estudios publicados hasta el momento aportan una información muy valiosa para intentar comprender la importancia de dichas formaciones en la ecología de las BAL. Algunos de estos estudios se han centrado más en la detección de los biofilms en las superficies del equipamiento y utensilios de manipulación de los alimentos que en los procesos fermentativos en sí (Zottola y Sasahara, 1994; Kumar y Anand, 1998; Somers y *col.*, 2001). Una de las conclusiones más interesantes a las que se ha llegado con estos trabajos es que el hecho de que las bacterias sobrevivan en las plantas de procesado durante meses, incluso después de la limpieza y tratamiento con agentes antimicrobianos, indica que dichos biofilms constituyen una fuente de contaminación ambiental del alimento.

Dado su carácter probiótico, se ha estudiado la formación de biofilms en *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. plantarum* WCFS1 y *L. reuteri* 100-23 (Sturme y *col.*, 2005; Tannock y *col.*, 2005; Lebeer y *col.*, 2007a; Lebeer y *col.*, 2007b). Estas tres especies de *Lactobacillus* son capaces de formar biofilms, tanto en superficies abióticas (cristal) como en el epitelio intestinal de ratas. También se ha relacionado la capacidad de formación de biofilms con la resistencia al estrés ambiental (ácido acético y etanol) en tres especies de *Lactobacillus*, lo que demuestra la importancia de estudiar los biofilms en la industria alimentaria (Kubota y *col.*, 2008; Kubota y *col.*, 2009).

La formación de biofilms mixtos no es un fenómeno ajeno a las BAL (Viljoen, 2001). En un estudio reciente se ha comprobado que varias cepas de *Lactobacillus* aisladas de fermentaciones de vino de arroz son incapaces de formar biofilms en

monocultivo pero sí lo hacen en presencia de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada del mismo producto, dando lugar a un biofilm mixto en el que se encuentran ambas especies (Kawarai y col., 2007). La presencia de BAL en el mismo medio de cultivo provoca la aparición en la pared celular de la levadura de una serie de protuberancias, lo que parece contribuir a su adherencia a una superficie sólida, facilitando así la formación del biofilm.

En los últimos años se ha ampliado de forma considerable el conocimiento que tenemos acerca de las BAL, de sus interrelaciones con otros microorganismos, tanto Procariotas como Eucariotas, del papel que desempeñan en la producción de alimentos por fermentación y de cuáles son los beneficios que proporciona su consumo. Sin embargo, en el caso de ciertas especies de BAL (y a pesar de que su papel en la industria alimentaria es muy relevante), estos estudios se han centrado sobre todo en aspectos meramente tecnológicos, obviando en la mayoría de los casos cuestiones básicas importantes tales como su capacidad de interrelación con otras especies de microorganismos y su contribución al desarrollo del proceso fermentativo, cuyo conocimiento ayudaría de manera considerable a entender y mejorar esos procesos en los que están involucradas. Este es el caso de *L. pentosus*. Esta bacteria se encuentra formando parte de una microbiota muy diversa que comparte con ella nicho ecológico en las salmueras de fermentación de vegetales (otras bacterias lácticas y levaduras). Puesto que se trata generalmente de fermentaciones abiertas y sin control microbiológico alguno, necesariamente sus conexiones e interrelaciones con los otros microorganismos van a ser determinantes a la hora de asegurar su predominio sobre éstos, así como su subsistencia a lo largo del proceso fermentativo para obtener un producto final aceptable.

3.2.7.- IMPORTANCIA DE LOS BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Es bastante conocido que muchos microorganismos patógenos forman biofilms en los alimentos y en sus superficies bajo las condiciones ambientales adecuadas. La adhesión de *Salmonella* a la superficie de alimentos fue el primer trabajo publicado sobre biofilms bacterianos en alimentos (Duguid y col., 1966). Desde entonces hay

numerosos estudios que describen la capacidad de los patógenos inherentes a los alimentos para unirse a ellos o a las superficies en contacto con los alimentos, incluyendo *L. monocytogenes* (Herald y Zoottola, 1988b; Frank y Koffi, 1990; Mafu y col., 1990), *Yersinia enterocolitica* (Herald y Zoottola, 1988a), *Campylobacter jejuni* (Kuusela y col., 1989) y *Escherichia coli* O157:H7 (Dewanti y Wong, 1995). La unión de microorganismos patógenos a las superficies de los alimentos puede provocar problemas higiénicos, ya que los biofilms de patógenos pueden constituir un reservorio de contaminación. No existen dudas de que los biofilms que contienen patógenos aumentan el riesgo de contaminación microbiana en las plantas de alimentos.

Más recientemente, se ha descrito la composición de los biofilms microbianos formados sobre las superficies de los equipos de procesamiento de varias industrias alimentarias (Sharma y Anand, 2002; Bagge-Ravn y col., 2003; Goubjornsdottir y col., 2005; Gunduz y Tuncel, 2006). Estas investigaciones demostraron que los biofilms formados sobre las superficies de los equipos de la línea de producción estaban formados por diversos tipos de microorganismos. Además, estos estudios indicaron que los biofilms que contenían agentes patógenos como *L. monocytogenes* se convirtieron en una de las principales causas de contaminación de los productos alimenticios o de transmisión de enfermedades. Por lo tanto, es muy importante desarrollar métodos de limpieza, desinfección y sistemas de control en las plantas de procesamiento de alimentos.

No obstante, la presencia de biofilms en la industria alimentaria no está siempre asociada a efectos negativos en ésta. Así, Lavermicocca y col. (2005) intentaron utilizar la micro-arquitectura de los biofilms formados sobre la superficie de aceitunas como portadoras de cepas probióticas, tales como *B. longum*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei*. Sin embargo, la mayoría de las cepas evaluadas no fueron capaces de sobrevivir en las aceitunas, probablemente debido a una mala adaptación a las duras condiciones que prevalecen en las salmueras. Por el contrario, algunas cepas de *B. bifidum* y de *B. longum* mostraron una buena tasa de crecimiento junto con una adhesión importante a la superficie de los frutos. Estos resultados confirmaron por primera vez la idoneidad de la epidermis de las aceitunas como portadora de cepas probióticas (Peres y col., 2012). También se ha demostrado que la unión de los microorganismos a la superficie vegetal

contribuye a la integridad celular microbiana y a su estabilidad durante el tránsito en el tracto gastrointestinal hasta su liberación en el colon (Lavermicocca, 2006).

3.3.- *QUORUM SENSING* (QS)

El término *quorum sensing* (detección de *quorum*) (Fuqua y col., 1994) describe la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante toda un repertorio de mecanismos moleculares. La detección de *quorum* tiene como resultado un cambio en la expresión génica en respuesta a fluctuaciones en la densidad de la población e implica la producción y secreción de moléculas de señalización conocidas con el nombre de autoinductores. La concentración de estas moléculas en el medio aumenta en función de la densidad celular, permitiendo a la bacteria censar su propia población a través de sistemas de detección específicos de dichas moléculas. La detección de cierta concentración umbral del autoinductor indicaría que hay *quorum*, desencadenándose la expresión de los fenotipos necesarios mediante cambios en la expresión génica (Miller y Bassler, 2001).

El primer sistema de detección de *quorum* identificado al completo fue descubierto en la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* (Nealson y Hastings, 1979; Nealson, 1999). Se observó que cuando estas bacterias viven en forma planctónica, son incapaces de emitir luz. Sin embargo, estas bacterias son las responsables de la luminiscencia observada en los órganos especializados productores de luz de ciertos peces y calamares, con los que mantiene una relación simbiótica. En el laboratorio se descubrió que la emisión de luz por *V. fischeri* sólo ocurría a altas densidades celulares y en respuesta a la concentración de una molécula autoinductora secretada al medio. Hoy en día se conocen numerosos casos de bacterias que regulan la expresión génica en función de la densidad celular. Los procesos regulados mediante este mecanismo pueden ser tan diversos como la bioluminiscencia, el desarrollo de competencia, la conjugación, la patogénesis, la virulencia, la producción de antibióticos y bacteriocinas, la simbiosis con plantas, etc. (Dunny y Winans, 1999a; Miller y Bassler, 2001). En su momento este fenómeno se consideró como anómalo y, en general, no se creía posible que las bacterias utilizaran sistemas de comunicación intercelular. Casi 10 años más

tarde se descubrió que un mecanismo similar, mediado por distintas moléculas señal estaba implicado en la regulación genética de procesos tan diversos como la producción de antibióticos, la liberación de factores de virulencia o la transferencia de plásmidos por conjugación, lo que inició una serie de innumerables descubrimientos que han cambiado la visión del mundo microbiano. Hoy en día se sabe que los sistemas de QS intervienen además en el control de muchas otras funciones fisiológicas bacterianas, entre las que se encuentra el crecimiento en “enjambre” (“swarming”), formación de endosporas, maduración de biofilms, etc. (Swift y *col.*, 2001, Williams *col.*, 2007).

Las moléculas de señalización empleadas en los sistemas de detección de *quorum* son de distinta naturaleza, según el grupo taxonómico al que pertenezca la bacteria (Federle y Bassler, 2003). En términos generales, existen tres tipos de señales implicados en la detección de *quorum*:

1. Moléculas de la familia de las *N-acyl homoserin lactonas (AHLs)*, producidas por bacterias Gram negativas. Se trata de moléculas con un anillo lactona al que se une mediante un enlace amida un ácido graso, el cual constituye una cadena lateral. Poseen una elevada diversidad conformacional, difiriendo en la longitud de la cadena (entre 4 y 18 átomos de carbono), la saturación o insaturación y la presencia o ausencia de sustituciones oxo- o hidroxil- en el tercer carbono (Whitehead y *col.*, 2001).
2. Péptidos de pequeño tamaño o *autoinductores peptídicos (AIPs)* producidos por bacterias Gram positivas. El tamaño de los péptidos oscila entre 5 y 34 residuos aminoácidos y generalmente poseen una arquitectura compleja. Se conocen tres familias diferentes de AIPs: (i) los oligopéptidos lantibióticos, como la nisina de lactococos, caracterizados por la presencia de tioéteres macrocíclicos y aminoácidos deshidrogenados (Quadri, 2002); (ii) péptidos de tiolactona, como el AIP-1 de estafilococos (Chan y *col.*, 2004); y (iii) los péptidos de triptófano isoprenilado, en los que ComX y sus variantes de *Bacillus subtilis* y otras especies de *Bacillus* son los únicos miembros conocidos (Okada y *col.*, 2005).

3. Moléculas del tipo *AI-2*, producidas tanto por bacterias Gram negativas como Gram positivas. Su estructura es un diéster furanosil borato.

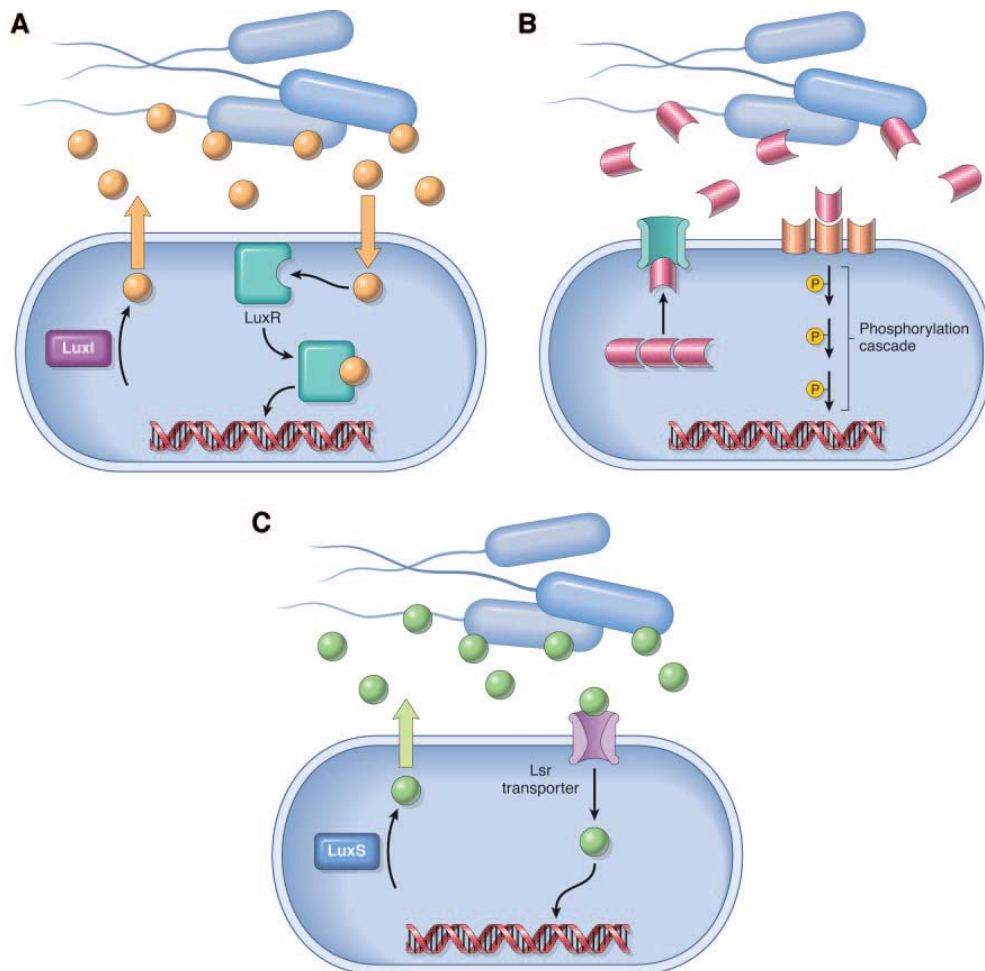


Figura 6. Representación esquemática de las tres rutas de señalización en el *quorum sensing*. A. Mediada por AHLs. B. Mediada por AIPs. C. Mediada por AI-2 (Raffa y col., 2005).

Tanto las AHLs como los AIPs son muy específicos y se utilizan, al parecer, para la comunicación intercelular entre los individuos de una misma especie o de una misma cepa bacteriana. Por el contrario, el tipo AI-2 es universal y puede ser reconocido por distintas especies bacterianas (Miller y Bassler, 2001; Federle y Bassler, 2003).

3.4.- QUORUM QUENCHING (QQ)

El término *quorum quenching* (QQ) fue acuñado para describir todos los procesos que interfieren con el *quorum sensing* (QS) (Dong y col., 2001). En teoría, cualquier mecanismo que pueda interferir de forma efectiva con cualquiera de los procesos clave de detección de *quorum sensing* podrían ser utilizadas para la detección del QQ y la prevención de enfermedades producidas por microorganismos.

Las estrategias de QQ no tienen por objeto matar las bacterias o limitar su crecimiento, sino que más bien afectan a la expresión de una función específica. Mientras que los agentes antimicrobianos tradicionales dan lugar a la muerte celular del patógeno, la utilización de sistemas que interfieren con la comunicación bacteriana adopta una estrategia menos agresiva y que no estaba disponible hasta el momento: atenuar la virulencia del patógeno de modo que no sea capaz de adaptarse al ambiente del huésped y pueda ser eliminado por las defensas innatas de éste. La identificación de sistemas que inactiven el sistema de QS sería importante en el caso de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*, cuyo éxito depende de la organización de un “ataque” coordinado que supere las defensas del huésped (Finch y col., 1998; de Kievit y Iglewski, 2000; Zhang, 2003; Hentzer y Givskov, 2003).

En los últimos años, se han identificado varios grupos de enzimas y compuestos químicos del QQ, incluidos derivados halogenados de furanonas producidas por las algas *Delisea pulchra*, derivados sintéticos de las dianas de proteínas R (Givskov y col., 1996; Hentzer y col., 2003), sintéticos de AHLs, y análogos del AIP que pueden competir con las señales de QS correspondientes (Lyon y col., 2000; Smith y col., 2003) y enzimas del QQ, incluyendo AHL-lactonasa, AHL-acilasa y paraoxonasas (PONs) que degradan las señales de AHL (Dong y col., 2000; Lin y col., 2003; Draganov y col., 2005; Ozer y col., 2005; Yang y col., 2005). Se han descrito también mecanismos más sofisticados, como es la incorporación por parte de una bacteria a su medio interno de la molécula o moléculas de señalización que utilizan otras competidoras para comunicarse entre sí (Taga y Bassler, 2003; Xavier y Bassler, 2005; Taga, 2007). Así, algunas bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* poseen transportadores específicos de AI-2 que actúan bombeándolo al interior celular como respuesta a altos niveles de

autoinductor en el medio, provocando así la eliminación de la señal. Esta capacidad permite a las bacterias consumidoras de AI-2 interferir con la habilidad de otras especies para determinar su densidad celular, evitando así que éstas puedan responder adecuadamente a los cambios poblacionales (Xavier y Bassler, 2005). De cualquier forma, no está claro que la interrupción de la señalización conlleve una ventaja competitiva para la especie que la realiza.

III. OBJETIVOS

Con el presente trabajo se inicia una línea de investigación sobre los fenómenos de comunicación celular entre bacterias lácticas y/o levaduras que se desarrollan en las fermentaciones de vegetales y sus implicaciones en el comportamiento socio-microbiológico de las comunidades microbianas que forman, lo que sin duda tendrá un papel fundamental en la producción de dichos alimentos fermentados. Los objetivos específicos que se persiguen son los siguientes:

Estudio de los fenómenos de interferencia en la producción de bacteriocinas por bacterias del ácido láctico (BAL) en cocultivos: posibles causas que intervienen en dicha producción.

Ensayos sobre la capacidad de formación de biofilms a nivel de laboratorio de BAL en superficies abióticas: formación y desarrollo de biofilms mixtos *L. pentosus*-levaduras-otras bacterias lácticas. Estudio de algunos factores que influyen en la formación de estas comunidades microbianas.

Investigaciones acerca de la formación de biofilms en fermentaciones de vegetales: análisis de las etapas de formación de biofilms en fermentaciones realizadas en plantas piloto e industria. Estudio de la adhesión en ambientes naturales de la microbiota espontánea y aquella procedente de cultivos iniciadores.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 6. Todos ellos se cultivaron en los medios y condiciones indicadas en dicha tabla, salvo que se especifiquen otras.

Para su conservación, los microorganismos se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en su propio medio de cultivo, al que se añadió glicerol estéril a una concentración final del 20% (v/v).

2.- MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de los diferentes microorganismos empleados en este trabajo, se utilizaron los medios que se citan a continuación. Los medios de cultivos sólidos y semisólidos se obtuvieron añadiendo al medio líquido correspondiente agar al 1,5 y 0,75%, respectivamente. Antes de su uso, dichos medios de cultivo se esterilizaron en autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atmósfera de presión) durante 15 min.

- MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra): el preparado comercial se reconstituyó a razón de 52 g/L en agua destilada.

- BHI (Brain-Heart-Infusion, Oxoid): se disolvió a razón de 37 g/L en agua destilada.

- GM17: para obtener el medio de cultivo GM17, el preparado comercial de M17 (Oxoid) se disolvió a razón de 37,5 g/L en agua destilada y se suplementó, tras su esterilización en autoclave, con glucosa previamente esterilizada por filtración a una concentración final del 1% (p/v).

Tabla 6.- Microorganismos utilizados.

Bacterias del ácido láctico

Cepa	Especie	Procedencia	Medio	T° (°C)
CECT 968	<i>Enterococcus avium</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 969	<i>E. casseliflavus</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 411	<i>E. durans</i>	CECT	MRS, BHI	37
OG1X	<i>E. faecalis</i>	IG	MRS, BHI	30
JH2-2	<i>E. faecalis</i>	IG	MRS, BHI	30
JH2-2 paMβ1	<i>E. faecalis</i>	IG	MRS, BHI	30
C901	<i>E. faecalis</i>	IG	MRS, BHI	30
EF	<i>E. faecalis</i>	IG	MRS, BHI	30
(CNRZ137=ATCC19433)	<i>E. faecalis</i>	INRA	MRS, BHI	30
PB1	<i>E. faecalis</i>	HRC	MRS, BHI	37
CECT 481	<i>E. faecalis</i>	CECT	MRS, BHI	37
1	<i>E. faecalis</i>	IARN	MRS, TSB	37
23	<i>E. faecalis</i>	IARN	MRS, TSB	37
11262	<i>E. faecalis</i>	IARN	MRS, TSB	37
11279	<i>E. faecalis</i>	IARN	MRS, TSB	37
T138	<i>E. faecium</i>	IG	MRS, BHI	30
CTC492	<i>E. faecium</i>	IG	MRS, BHI	30
6T1a	<i>E. faecium</i>	IG	MRS, BHI	30
LP6T1a-20	<i>E. faecium</i>	IG	MRS, BHI	30
AE9	<i>E. faecium</i>	HRC	MRS, BHI	37
AE12	<i>E. faecium</i>	HRC	MRS, BHI	37
AE23	<i>E. faecium</i>	HRC	MRS, BHI	37
CECT 410	<i>E. faecium</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 4481	<i>E. flavescens</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 970	<i>E. gallinarum</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 279	<i>E. hirae</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 971	<i>E. malodoratus</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 972	<i>E. mundtii</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 4075	<i>E. pseudoavium</i>	CECT	MRS, BHI	37
CECT 4311	<i>E. sulfureus</i>	CECT	MRS, BHI	37
ATCC 4356	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	UO	MRS	30
2539	<i>L. acidophilus</i>	UO	MRS	30
NCDO 1748	<i>L. acidophilus</i>	IG	MRS	37
LB9	<i>L. brevis</i>	IG	MRS	30
Lb40	<i>L. brevis</i>	UV	MRS	30
NCDO 393	<i>L. casei</i>	IG	MRS	30
NCDO 161 (ATCC 393)	<i>L. casei</i>	IG	MRS	30
ATCC 334	<i>L. casei</i>	ATCC	MRS	37
IPLA 616 dex ⁺	<i>L. citreum</i>	IPLA	MRS	30
IPLA 616 dex ⁻	<i>L. citreum</i>	IPLA	MRS	30
IPLA 616	<i>L. citreum</i>	IPLA	MRS	30
NCFB 2739	<i>L. curvatus</i>	IG	MRS	30
MMH(2A)3	<i>L. curvatus</i>	UV	MRS	30
CNRZ 229 (ATCC14933)	<i>L. fermentum</i>	IG	MRS	37
NCDO 1750	<i>L. fermentum</i>	IG	MRS	37
ATCC 9338	<i>L. fermentum</i>	ATCC	MRS	37
2459	<i>L. gasserii</i>	UO	MRS	30
ATCC 15009	<i>L. helveticus</i>	ATCC	MRS	42
LB76	<i>L. hilgardii</i>	IG	MRS	30
Lb464	<i>L. hilgardii</i>	UV	MRS	30
2967	<i>L. jensenii</i>	UO	MRS	30
IPLA 838	<i>L. lactis ssp. diacetylactis</i>	IG	GM17	30
IPLA 972	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	IG	GM17	30
1AB10	<i>L. paraplantarum</i>	UJ	MRS	30
IPLA C23	<i>L. paraplantarum</i>	IPLA	MRS	30
PO10	<i>L. paraplantarum</i>	UJ	MRS	30

Tabla 6.- (Continuación).

Cepa	Especie	Procedencia	Medio	T ^a (°C)
CNRZ 1885	<i>L. paraplantarum</i>	IG	MRS	30
LPS1	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
LPD5	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
CECT 4023	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
55/1	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
LPS26	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
144/1	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
LPS2005	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
LPCO10	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
128/2	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
49445	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
LPP3	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
209	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
13S15	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
251	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
13B4	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
194	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
2	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
13	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
43	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
57	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
173	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
137	<i>L. pentosus</i>	IG	MRS	30
NC8 del 7	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS+Ery+Lyn*	30
WCFS1 bac ⁺	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS+Ery+Lyn*	30
P1/q	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L2441	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
CA2A3	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb42	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb5q	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
P16	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb5p	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb25	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
C3.8	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L6	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
BE5	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
VII	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb23	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb26	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb27	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb30	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
CECT 748	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
NC8	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
MC33	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
MC24	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
LB6	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
CECT 4185	<i>L. plantarum</i>	CECT	MRS	30
RP1	<i>L. plantarum</i>	UAM	MRS	30
37/A	<i>L. plantarum</i>	ITQB	MRS	30
CECT 748	<i>L. plantarum</i>	CECT	MRS	30
57/2	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
10241	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
4916	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
ATCC 8014	<i>L. plantarum</i>	ATCC	MRS	30
NCDO 1193	<i>L. plantarum</i>	NCDO	MRS	30
57/1	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
14931	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
44/1	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30

Tabla 6.- (Continuación).

Cepa	Especie	Procedencia	Medio	Tª (°C)
34/1	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
70/3	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
NC8-C	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS+Ery+Lyn*	30
CLC17	<i>L. plantarum</i>	UAM	MRS	30
14431	<i>L. plantarum</i>	IG	MRS	30
L14g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L11g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
P4	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
P7	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb3g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb35	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb12g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
P21	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
P11G	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L4	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb46	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb31g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L12p	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L11g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L3p	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb38p	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
Lb20g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L12g	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
L10	<i>L. plantarum</i>	UJ	MRS	30
WCFS1	<i>L. plantarum</i>	UG	MRS	30
MTD5	<i>L. plantarum</i>	UV	MRS	30
DSM 20016	<i>L. reuteri</i>	EC-Target Strains	MRS	37
NCFB 2714	<i>L. sakei</i>	IG	MRS	30
MMH(2)19	<i>L. sakei</i>	UV	MRS	30
RYF3	<i>L. sakei</i>	UV	MRS	30
NCFB 2747	<i>L. salivarius</i>	NCFB	MRS	37
MG1363	<i>Lactococcus lactis</i>	IG	GM17	30
1403	<i>L. lactis</i>	INRA	MRS	30
IPLA C270	<i>Leuconostoc sp.</i>	IG	MRS	30
DB 1275	<i>L. cremoris</i>	EC-Target Strains	MRS	25
CNRZ 117	<i>L. cremoris</i>	INRA	MRS	25
MTA7	<i>L. mesenteroides</i>	UV	MRS	30
RMB12	<i>L. mesenteroides</i>	UV	MRS	30
705	<i>Oenococcus oeni</i>	UV	MRS	30
P339	<i>Pediococcus parvulus</i>	IG	MRS	30
FBB63	<i>P. pentosaceus</i>	IG	MRS	30
P56	<i>P. pentosaceus</i>	IG	MRS	30
PC 1	<i>P. pentosaceus</i>	TNO	MRS	30
ST 20	<i>Streptococcus thermophilus</i>	TNO	MRS	42
ST 112	<i>Streptococcus thermophilus</i>	TNO	MRS	42

Levaduras

TOMCY13	<i>Candida boidinii</i>	IG	YMGP	30
TOMCY24	<i>Debaryomyces etchellsii</i>	IG	YMGP	30
TOMCY3	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	IG	YMGP	30
TOMCY31	<i>Pichia membranifaciens</i>	IG	YMGP	30
TOMCY4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IG	YMGP	30
TOMCY2	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	IG	YMGP	30

Tabla 6.- (Continuación).

Cepa	Especie	Procedencia	Medio	Tª (°C)
Otros				
BC	<i>Bacillus cereus</i>	EC-Target Strains	BHI	37
CS	<i>Clostridium sporogenes</i>	EC-Target Strains	DRCM	37
NCDO 1754	<i>C. tyrobutyricum</i>	EC-Target Strains	DRCM	30
BL 86/26	<i>Listeria innocua</i>	EC-Target Strains	BHI	30
P6	<i>Propionibacterium sp.</i>	EC-Target Strains	LEMCO	30
P 563	<i>P. acidipropioni</i>	EC-Target Strains	LEMCO	30
INIA 724	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	INIA	Agar Nutritivo	37
INIA 745	<i>Serratia liquefaciens</i>	INIA	Agar Nutritivo	37
MC 1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	TNO	BHI	37

Abreviaturas: IG, Instituto de la Grasa, CSIC, (Sevilla); UO, Universidad de Oviedo; IPLA, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, (Oviedo); UJ, Universidad de Jaén; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot); ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, Md., EEUU); NCFB, National Collection of Food Bacteria (Aberdeen, Escocia, Reino Unido); TNO, Nutrition and Food Research Institute (Zeist, Holanda); UV, Universidad de Valencia; INRA, Institut National de la Recherche Agronomique (Jouy-en-Josas, Francia); INIA, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Madrid); NCDO, National Collection of Dairy Organism (Reading, Reino Unido); IARN, Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales (Universidad de Pamplona, Navarra); HRC, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; ITQB, Instituto de Tecnología Química y Biológica (Oeiras, Portugal); UAM, Universidad Autónoma de Madrid; UG, Universidad de Groningen, Holanda; EC-Target Strains, cepas de estudio del proyecto BRIDGE de la Unión Europea; TOMC, Table Olive Microorganism Collection, Instituto de la Grasa, CSIC, (Sevilla).

* MRS+Ery+Lin: antibióticos utilizados a una concentración final de 10 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

- TSB (Tryptone-Soy-Broth, Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España): se disolvió a razón de 30 g/L en agua destilada.

- DRCM (Differential Reinforced Clostridial Medium, Merck, Darmstadt, Alemania): se reconstituyó el preparado comercial a razón de 27,5 g/L en agua destilada.

- LEMCO. Se preparó mezclando los siguientes ingredientes:

peptona (Oxoid)	10 g
extracto de carne (Oxoid)	10 g
NaCl (Panreac)	5 g
D-glucosa (Panreac)	5 g
extracto de levadura (Oxoid)	3 g
agua destilada	1 L

A continuación, se ajustó el pH a 7,0.

- YMGP agar (Yeast-Malt-Glucose-Peptide, Difco, Le Pont de Claix, Francia): se disolvió el preparado comercial a razón de 41 g/L en agua destilada.

- Agar nutritivo: se preparó mezclando los siguientes ingredientes:

extracto de carne (Oxoid)	1 g
extracto de levadura (Oxoid)	2 g
peptona (Oxoid)	5 g
NaCl (Panreac)	5 g
agua destilada	1 L

- LB (Luria-Bertani): se disolvieron en agua destilada los siguientes ingredientes:

bactotripton (Oxoid)	10 g
extracto de levadura (Oxoid)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g
agua destilada	1 L

3.- ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos utilizados en este estudio, así como su concentración final en el medio de cultivo, se detallan a continuación. Todos ellos se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y se mantuvieron como soluciones concentradas a 4 °C, previamente esterilizadas por filtración.

Antibiótico	Solución concentrada	<i>L. plantarum</i>	<i>E. coli</i>
Ampicilina	100 mg/ml en H ₂ O		150 µg/ml
Eritromicina	20 mg/ml en EtOH	10 µg/ml	
Lincomicina	20 mg/ml en EtOH	100 µg/ml	
Rifampicina	10 mg/ml en EtOH	20 µg/ml	
Estreptomicina	200 mg/ml en H ₂ O	500 µg/ml	
Oxitetraciclina	100 mg/ml en H ₂ O	100 µg/ml	

4.- ENZIMAS

Las enzimas, lisozima, ARNasa, lipasa, β -galactosidasa y α -glucosidasa se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich, y la ADN polimerasa procedía de Biotools B&M Labs, S.A. (Valle de Tobalina, Madrid, España).

5.- REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos y productos empleados fueron los siguientes:

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
Etanol, isopropanol, metanol, cloroformo	Romil (The Source, Convent Drive, Waterbeach, Cambridge, Inglaterra)
Azul de bromofenol, Orange G, β -mercaptoetanol, glutaraldehído, sodio dodecil sulfato (SDS), tricina, formaldehído, bromuro de etidio, EDTA, KCl, bromuro de etidio, ácido cítrico, azida sódica, trizma base, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	Sigma-Aldrich
APS, TEMED, Acrilamida/bisacrilamida	Bio-Rad (Alfred Nobel Dr., Hercules, California, EEUU)
Nitrato de plata, glicerol, Na_2HPO_4 , ácido acético glacial, amoníaco, 2-metil-2-propanol, NaCl	Panreac
dNTPs	Roche (Madrid, España)
Marcador 1 kb	Invitrogen (Avenida de la Vega, Alcobendas, Madrid, España)
Agarosa	Lonza (Suiza)
Ácido tricloroacético	Merck

Fenol	Amresco (Madrid, España)
Glicógeno	Appligen-Oncor (Watford, Inglaterra)
NaOH, NaH ₂ PO ₄ , KH ₂ PO ₄ , manosa, sacarosa, acetato sódico, acetato potásico, 8-hidroxiquinoleína	Fluka (Steinheim, Alemania)

6.- SOLUCIONES Y TAMPONES

6.1.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Gel de separación (running gel, 18% de poliacrilamida):

Solución de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v)	5,03 ml
Tris-HCl 2,5 M (pH 8,45)	4,06 ml
SDS 10% (p/v)	105 µl
H ₂ O desionizada	1,92 ml
APS 10% (p/v)*	60 µl
TEMED	7,5 µl

Gel de concentración (stacking gel, 5% de poliacrilamida):

Solución de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v)	0,5 ml
Tris-HCl 2,5 M (pH 8,45)	1,24 ml
SDS 10% (p/v)	50 µl
H ₂ O desionizada	3,19 ml
APS 10% (p/v)*	60 µl
TEMED	10 µl

* Recién preparado

Tampón de carga desnaturizante (sample buffer):

Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	1 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10% (p/v)	1,6 ml
H ₂ O desionizada	4 ml
2-β-mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de bromofenol 0,05% (p/v)	0,2 ml

Tampón de electroforesis pH 8,45:

Tricina 0,1 M	17,92 g
SDS 10% (p/v)	10 ml
H ₂ O desionizada	1 L

Ajustar el pH antes de añadir el SDS

6.2.- TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON NITRATO DE PLATA

Las soluciones y tampones empleados se preparaban en el momento de usarlos.

Solución metanol/acético/agua: se preparó mezclando metanol con ácido acético y agua en proporción 25:5:20.

Tampón tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇): se añadieron 19 g de Na₂B₄O₇ × 10 H₂O en 960 ml de agua Milli-Q.

Solución de glutaraldehido al 20%: se añadieron 2 ml de glutaraldehido al 20% por cada 50 ml de tampón Na₂B₄O₇.

Solución de nitrato de plata: se añadieron 0,92 ml de NaOH 1 N y 0,98 ml de NH₄OH a 9,5 ml de agua Milli-Q. Lentamente y en agitación, se añadían 2 ml de nitrato de plata al 20%, completando hasta 50 ml con agua Milli-Q.

Revelador: se mezclaron 5 ml de etanol absoluto con 0,3 ml de ácido cítrico al 1% y 12,5 µl de formaldehído al 37% y se completó con agua Milli-Q hasta 50 ml.

6.3.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Tampón PBS:

Agua desionizada	1 L
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Una vez disueltos los componentes, el pH se ajustó a 7,2.

Tampón fosfato 100 mM (pH 7,0):

Solución A: 31,2 g/l de NaH₂PO₄ × 2H₂O (0,2 M) en agua destilada.

Solución B: 71,65 g/l de Na₂HPO₄ × 12H₂O (0,2 M) en agua destilada.

El tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) se obtuvo mezclando 19 ml de la solución A, con 81 ml de la solución B y 100 ml de agua destilada.

Tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) con 5% de glutaraldehído: se añadieron 5 ml de glutaraldehído por cada 100 ml de tampón.

6.4.- OBTENCIÓN, ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DEL ADN

Tampón TAE (50×)

Trizma base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml

Se completó hasta 1 L con agua desionizada.

Tampón de carga SBE (6×):

Azul de Bromofenol	0,025 g
Sacarosa	4 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 μ l

La mezcla se disolvió en 10 ml de agua desionizada, se esterilizó a 121 °C durante 15 min y a continuación se repartió en alícuotas, conservándose a 4 °C.

Este tampón de carga se utiliza cuando los fragmentos de ADN a analizar son de gran tamaño, ya que se sitúa a una altura de unas 800 pb.

Tampón de carga SBE Orange (6×):

Orange G	40 mg
Sacarosa	4 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 μ l
Tris 100 mM (pH 8,0)	1 ml

Tras disolverse la mezcla en 10 ml de agua desionizada, se esterilizó a 121 °C durante 15 min y se repartió en alícuotas, conservándose a 4 °C.

Cuando los fragmentos de ADN son de pequeño tamaño se utiliza este tampón puesto que se localiza a la altura de unas 300 pb.

Fenol:

El fenol se utilizó saturado, equilibrado y estabilizado. Para ello, se partió de 500 ml de fenol comercial, el cual se equilibró mediante la adición de 26 ml de Trizma base 2,5 M que se proporciona junto con dicho fenol comercial. A continuación, se estabilizó mediante la adición de 8-hidroxiquinoleína al 0,1%, adquiriendo éste un color amarillo, lo que permite, además, diferenciar bien las fases. Tras ello, se agitó bien y se dejó reposar en oscuridad durante 24-48 h a 4 °C hasta que las fases se hubieran separado completamente.

Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (F:C:I):

Esta mezcla se preparó utilizando fenol saturado, equilibrado y estabilizado, más cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, respectivamente. Tras la mezcla, se agitó bien y se dejó reposar en oscuridad a 4 °C hasta que las fases se separaron correctamente.

Cloroformo/Alcohol isoamílico (C:I):

Se obtuvo mezclando ambos en una proporción 24:1, respectivamente.

Fenol saturado en sal:

Partiendo de fenol puro, se añadió un volumen de una solución de NaCl al 3% en agua desionizada, se mezcló bien y se dejó decantar hasta que aparecieron dos fases bien definidas. A continuación se recogió el fenol (fase inferior) y se eliminó el agua. Se volvió a repetir el proceso 5 veces, consiguiendo así saturar el fenol en sal. Finalmente, se dejó reposar en oscuridad a 4 °C hasta que las fases se separaron correctamente.

TER (Tris-EDTA-ARNasa):

Se realizó una dilución 1:200 de ARNasa en tampón TE (Tris-EDTA, 50 mM, pH 8,0), se repató en alícuotas y se conservó a -20 °C hasta su uso.

6.5.- EXTRACCIÓN DE BIOFILMS

PBS-cóctel:

Lipasa	14,8 mg
β -galactosidasa	12,8 mg
α -glucosidasa	21 μ l
PBS 1 \times	1 L

Se disolvieron los componentes con agitación suave y se utilizó inmediatamente.

6.6.- OTRAS SOLUCIONES O TAMPONES

Tampón citrato fosfato 50 mM, pH 5,0:

Ácido cítrico (0,1 M)	243 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M)	257 ml
Agua destilada	500 ml

7.- MÉTODOS

7.1.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL

Para obtener un sobrenadante libre de células (SLC), se inoculaba 1 ml de MRS con 10^7 UFC/ml de la cepa a estudiar y se incubaba a 30 °C durante 6 h, tras lo cual, se centrifugaba el cultivo varias veces (16.000 \times g, 5 min, 4 °C).

Para la detección de la actividad antimicrobiana en los sobrenadantes se utilizó el test de difusión en agar (Jiménez-Díaz y *col.*, 1993). Para ello, en una placa con medio MRS se depositó un césped de una bacteria indicadora vertiendo en la misma 4 ml de MRS semiblando atemperado a 48 °C, previamente inoculado con

aproximadamente 10^6 UFC/ml, dejándolo secar durante 15 min en la cabina de flujo laminar. Sobre el césped se depositaron 10 μ l de SLC, se dejaban secar durante 20 min y finalmente se incubaba la placa durante toda la noche a 30 °C. La actividad antimicrobiana de los SLC se determinaba por la aparición de halos de inhibición sobre el césped de la bacteria indicadora, midiendo el diámetro de los mismos y expresándolos en mm.

Para cuantificar la actividad antimicrobiana de un SLC se siguió el método de diluciones seriadas descrito por Geis y *col.*, (1983), ligeramente modificado por nosotros. Para ello, se utilizaba una placa de microtitulación en la que se depositaban 50 μ l de medio de cultivo líquido en cada pocillo, inoculándolos después con 10^6 UFC/ml de la bacteria indicadora en fase exponencial de crecimiento. A continuación, se añadían 50 μ l del SLC a cuantificar al primer pocillo de una fila determinada, haciéndose entonces diluciones seriadas en base 2 del mismo, utilizando para ello el resto de pocillos de la misma fila y siguientes si era necesario. Como control se utilizaba un pocillo que contenía la cepa indicadora y agua en vez de bacteriocina. Las placas se incubaban durante 16 h a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa indicadora utilizada. Una unidad de bacteriocina (UB) se definió arbitrariamente como la cantidad de bacteriocina que inhibía el crecimiento de la cepa indicadora al menos en un 50% respecto del pocillo control sin bacteriocina. Este cálculo se expresó como el inverso de la dilución más alta que presentaba al menos un 50% de inhibición de la cepa indicadora por ml (UB/ml).

7.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN CULTIVOS MIXTOS (COCULTIVOS)

Para la detección de la producción de bacteriocinas en cultivos mixtos, se realizaron cocultivos en medio líquido MRS de cada una de las cepas de BAL descritas en la Tabla 6 con cada una de las otras, inoculando aproximadamente 10^7 UFC/ml de cada una de ellas. Dichos cocultivos se incubaron a 30 °C durante 6 h y a continuación se centrifugaron 3 veces (16.000 $\times g$, 5 min, 4 °C), depositándose 10 μ l de estos SLC sobre céspedes de *L. pentosus* 128/2 y *P. pentosaceus* FBB63. Las placas se incubaron a 30 °C durante 16 h, al cabo de las cuáles se midió el halo de inhibición producido.

Como controles, se siguió el mismo procedimiento con cada una de las cepas del cocultivo por separado.

7.2.1.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN CON SEPARACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE MEMBRANAS DE 0,2 μm

Se realizaron cultivos mixtos en placas de microtitulación con un sistema que permitía separar cada cepa de la otra mediante una membrana con un diámetro de poro de 0,2 μm (Nunc tissue culture inserts, eight-well strip, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) (Figura 7), siguiendo el método descrito por Yoshida y *col.* (2005). El compartimiento inferior se inoculó con una de las cepas y el superior con la otra y viceversa, cada una de ellas a una concentración final de 10^7 UFC/ml. Después de incubar a 30 °C durante 6 h, se centrifugaron las muestras de los compartimentos superiores e inferiores hasta obtener SLCs, de los cuales se depositaron 10 μl sobre un césped de la bacteria indicadora apropiada, midiendo el halo de inhibición después de incubar 16 h a 30 °C.



Figura 7. Placa de microtitulación con el sistema de separación de cepas.

7.2.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS CON SEPARACIÓN DE LAS CEPAS MEDIANTE UNA MEMBRANA DE DIÁLISIS

Se inocularon 10^7 UFC/ml de una de las cepas (concentración final) en un matraz con 300 ml de MRS. Por otro lado, una membrana de diálisis, cuyo corte molecular oscilaba entre 12.000 y 16.000 Da (Sigma-Aldrich) se llenó con 20 ml de MRS y se inoculó con 10^7 UFC/ml de la otra cepa (concentración final). Una vez cerrada la membrana de diálisis, ésta se introdujo en el matraz, sumergiéndose en el medio de cultivo e incubándose a 30 °C durante 6 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras de los medios de cultivo del matraz y de la membrana, respectivamente, y se centrifugaron para obtener SLCs. Entonces, se depositaron 10 μ l de cada uno de los sobrenadantes obtenidos tanto del interior de la membrana de diálisis como del exterior sobre un césped indicador, midiendo el halo de inhibición después de incubar 16 h a 30 °C. Como control, se puso cada una de las cepas en monocultivo, bien en la membrana de diálisis, bien en el matraz, mientras que en el medio contrario no se inoculaba ninguna cepa.

7.3.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PRESENCIA DE SOBRENADANTES DE COCULTIVOS

Se inoculaban 900 μ l de MRS con la bacteria productora a una concentración final de 10^7 UFC/ml y a la vez se añadían 100 μ l de un SLC procedente de un cocultivo previo de ella misma con otras BAL. Como control se puso cada una de estas cepas por separado, a la que se le añadieron 100 μ l de MRS. Tras 6 h de incubación a 30 °C, se centrifugaron los cultivos y se depositaron gotas de 10 μ l de SLC sobre un césped de una bacteria indicadora, midiendo el diámetro del halo de inhibición después de incubar 16 h a 30 °C.

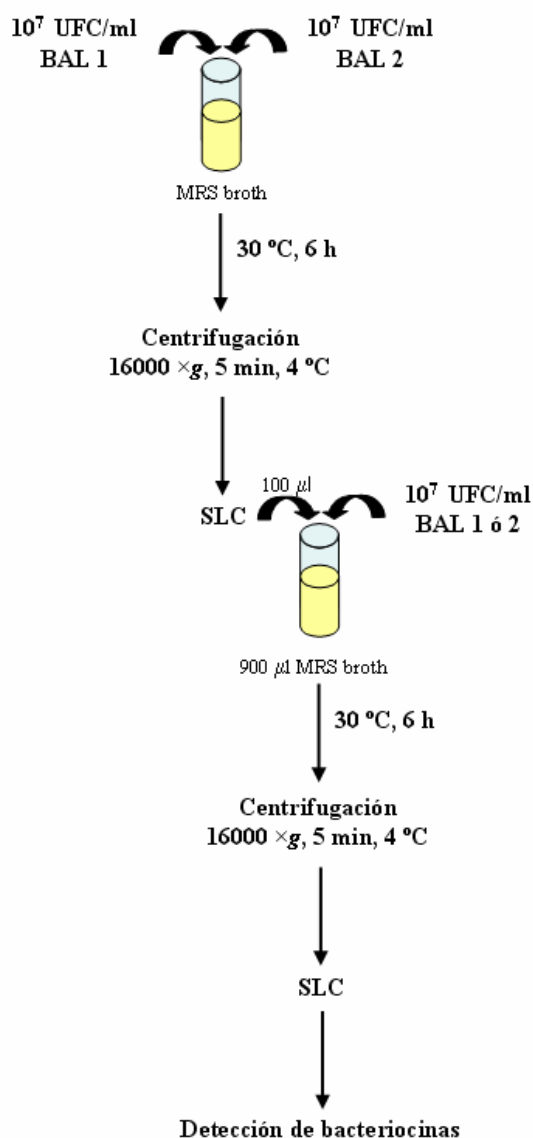


Figura 8. Esquema del ensayo de producción de bacteriocinas en presencia de SLC.

7.4.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN PRESENCIA DE CÉLULAS INACTIVADAS POR CALOR

Se calentaron cultivos de cada cepa en medio líquido a 65 °C durante una hora. Para comprobar que no quedaban células viables, se sembraba parte del cultivo en placas de MRS. A continuación, se inoculaba la cepa productora de bacteriocina en medio líquido, con cada una de las cepas inactivadas por calor, incubándose a 30 °C durante 6 h. Finalmente, los cultivos se centrifugaban hasta obtener un SLC del cual se depositaban 10 µl sobre un césped de *L. pentosus* 128/2, incubándose a 30 °C durante 16 h y midiendo entonces el diámetro de los halos de inhibición.

7.5.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVO EN FUNCIÓN DEL pH DEL MEDIO

7.5.1.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH NO REGULADO

Para ello se prepararon matraces con 20 ml de MRS a diferentes pH en los que se inoculó cada cepa a una concentración final de 10^7 UFC/ml, poniendo como control cada una de ellas por separado. Los cultivos se incubaron a 30 °C y a las 6 y 24 h se tomaron muestras de cada matraz y se midió el pH, se cuantificó la actividad antimicrobiana y se determinaron las UFC/ml de cada una de las bacterias del ensayo, utilizando el sembrador en espiral modelo dwScientific (Don Whitley Scientific Ld., Shirpley, Inglaterra).



Figura 9. Sembrador de placas en espiral dwScientific.

7.5.2.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH REGULADO

Se realizaron cocultivos con las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a en 1,5 L de MRS en un fermentador Biostat MD (B. Braun-Biotech, Melsungen, Alemania), manteniendo el pH constante a 6,1 o a 5,0. Del mismo modo, se procesaron cada una de las cepas por separado en monocultivo. Los cultivos se mantuvieron en el fermentador durante 30 h, tomándose muestras cada dos horas. En cada muestra se determinó el número de UFC/ml y se cuantificó la actividad antimicrobiana usando tres

cepas indicadoras diferentes: *L. pentosus* 128/2, que es sensible tanto a las plantaricinas producidas por la cepa NC8-C como a las enterocinas producidas por la cepa 6T1a, *L. pentosus* 55/1, con sensibilidad únicamente a las plantaricinas y *L. plantarum* VII, sensible sólo a las enterocinas (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas indicadoras con sensibilidad diferencial a las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a. (+) Inhibición de la cepa indicadora, (-) ausencia de inhibición.

Cepa indicadora	<i>L. plantarum</i> NC8-C		<i>E. faecium</i> 6T1a
	Plantaricina NC8	Plantaricinas EF y JK	Enterocinas L50A y L50B
<i>L. pentosus</i> 128/2	+	+	+
<i>P. pentosaceus</i> FBB63	-	+	+
<i>L. pentosus</i> 55/1	+	+	-
<i>L. plantarum</i> VII	-	-	+

7.6.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon siguiendo el método de Laemmli (1970), en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Para la separación de proteínas o péptidos de pequeño tamaño, se utilizaron geles de poliacrilamida al 18% (gel de separación). El gel de concentración (stacking gel) se preparó al 5% de poliacrilamida.

Para la preparación de las muestras, se añadieron a los SLC procedentes de los cocultivos tampón de carga en proporción 1:4. A continuación, se calentó la mezcla a 100 °C durante 4 min, se centrifugó a 16.000 ×g durante 5 min y se cargaron 4-8 µl de muestra en cada pocillo. Una vez cargadas las muestras, las proteínas se separaron a 30 mA por gel en una cubeta de electroforesis vertical MINIPROTEAN 3 (Bio-Rad).

Para la detección de las bandas de proteína, los geles se sumergieron durante 30 min en una solución de fijación compuesta por metanol/acético/agua (25:5:20), lavándolo seguidamente dos veces con agua desionizada (20 min cada lavado). A continuación, los geles se trataron durante 15 min en la solución de glutaraldehído

descrita en Materiales y posteriormente se lavaron 3 veces con agua desionizada (20 min cada lavado). Para el revelado de las proteínas se añadió la solución de nitrato de plata y se mantuvo en agitación durante 20 min, tras lo cual el gel se lavó con agua desionizada durante 5 min. Finalmente, se añadió la solución de revelado. El gel se mantuvo en agitación en esta solución hasta que aparecieron bandas de proteínas, tras lo cual se retiró dicha solución y se lavó con agua desionizada varias veces.

Para detectar la actividad antimicrobiana asociada a las bandas de proteínas separadas en los geles, se utilizó el método de Bhunia y *col.* (1987) con algunas modificaciones. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se introdujeron en una solución fijadora durante 1 h con agitación. La solución fijadora estaba compuesta de isopropanol, ácido acético glacial y agua desionizada (2:1:7). A continuación se lavó el gel con agua desionizada durante 2 h, cambiando el agua cada 30 min, al cabo de los cuales se depositaron sobre placas de MRS y se cubrieron con una capa de MRS agar semiblando, previamente inoculado con 10^6 UFC/ml de la cepa indicadora empleada en cada caso. Las placas se incubaron durante 24 h a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa indicadora y a continuación se examinó la presencia de halos de inhibición.

7.7.- PURIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS

Para purificar las bacteriocinas, se inocularon 10^7 UFC/ml de un cultivo de 16 h de la cepa productora en 2 L de MRS, incubándose a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8, utilizando para su medida un espectrofotómetro SmartSpect™ 3000 (Bio-Rad). A continuación, se centrifugaba el cultivo ($9.300 \times g$, 10 min, 4 °C) y se recogía el sobrenadante, al que se le añadían 40 g (20 g/l) de la resina de intercambio iónico Amberlite XAD-16 (Sigma-Aldrich), manteniéndose al menos 2 h en agitación suave a 4 °C. Después, se retiraba el sobrenadante y se lavaba la resina con 100 ml de agua desionizada. Una vez eliminado el sobrenadante, la resina se lavaba con 75 ml de etanol al 40% en agua desionizada, volviendo a eliminarse el sobrenadante. Finalmente, la bacteriocina se eluía de la resina aplicando 200 ml de isopropanol al 70% (pH 2,0). Posteriormente, el eluido se aplicaba a una columna SP-Sepharose fast flow (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway,

Nueva Jersey, EEUU) de 30 ml de capacidad. Previamente, la columna se equilibraba con 100 ml de HCl 1 N, aplicándose entonces la bacteriocina extraída con Amberlite. A continuación, se lavaba la columna con 10 volúmenes de tampón citrato-fosfato (pH 5,0) y finalmente se eluía la bacteriocina aplicando el mismo tampón con NaCl 1 M.

7.8.- DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS FERMENTACIONES DE ACEITUNAS

Para la detección y la cuantificación de la formación de biofilms *in vitro*, se siguió el procedimiento descrito por Toledo-Arana y *col.* (2001). En nuestro caso, se ensayó la capacidad de producción de biofilms tanto por células en fase exponencial (10^8 UFC/ml), como en fase estacionaria ($>10^9$ UFC/ml). Para ello, se inoculaba la cepa a estudiar en su medio de crecimiento habitual y se incubaba a su temperatura óptima de crecimiento. En el caso de las bacterias en fase exponencial, cuando el cultivo alcanza dicha fase se hacía una dilución 1:40 del mismo (5 μ l en 200 μ l de medio), previamente depositados en cada pocillo de una placa de microtitulación. En el caso de las células en fase estacionaria, se esperó a que el cultivo llegase a dicho estadio y se añadieron directamente 200 μ l de dicho cultivo en cada pocillo. A continuación, se incubaron las placas a la temperatura óptima de crecimiento de las cepas durante 24-48 h. Transcurrido ese tiempo, se aspiró el sobrenadante, se lavaron los pocillos dos veces con PBS estéril y se dejó secar la placa en posición invertida.

Para cuantificar el biofilm, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una solución acuosa de cristal violeta al 0,8% y se dejó durante 15-30 min a temperatura ambiente. Tras ello, se lavaron los pocillos dos veces con PBS estéril y se extrajo el cristal violeta utilizando 100 μ l de una mezcla de etanol y acetona (80:20). Finalmente se midió la $DO_{595\text{ nm}}$ con un lector de placas iMarkTM de Bio-Rad.

De cada una de las cepas a ensayar se hicieron al menos 6 réplicas. Las $DO_{595\text{ nm}}$ mayores de 2 indicaban una alta capacidad de formación de biofilms, entre 1 y 2, capacidad media, entre 0,5 y 1, capacidad baja y por debajo de 0,5, nula. Para establecer estos rangos se utilizaron varias cepas de enterococos cuya capacidad de formación de

biofilms había sido ya descrita (Toledo-Arana y *col.*, 2001). Así, la cepa *E. faecalis* 1 forma un biofilm fuerte, *E. faecalis* 11262 y *E. faecalis* 11279 medio y bajo, respectivamente, y *E. faecalis* 23 no forma biofilms.

Además de detectar y cuantificar la producción de biofilms sobre placas de microtitulación fabricadas en poliestireno, se estudió también la capacidad de las cepas de BAL para formar biofilms sobre los materiales de los que están fabricados de los fermentadores utilizados en la industria, que son de dos tipos: de fibra de vidrio con poliéster y de polietileno. Para ello se siguió el mismo procedimiento que el descrito para las placas de microtitulación.

7.8.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR BAL EN SUPERFICIES ACONDICIONADAS

Con objeto de reproducir *in vitro* aquello que ocurre naturalmente en los fermentadores durante el proceso de elaboración de la aceituna de mesa, se procedió al *acondicionamiento* previo de las superficies en las que se ensayaría la capacidad de formación de biofilms por cepas de diferentes BAL. Dicho *acondicionamiento* se llevó a cabo de dos formas: mediante microorganismos y con salmueras de fermentación.

Para el *acondicionamiento* por microorganismos, se cultivaron distintas cepas de *Pediococcus* en placas de microtitulación en el mismo medio y condiciones descritas para la cuantificación de los biofilms. Las cepas empleadas fueron *P. pentosaceus* FBB63, *P. parvulus* P339 y *P. pentosaceus* P56. Tras incubar a 30 °C durante 16 h, se lavaron los pocillos dos veces con PBS estéril, se esterilizaron con etanol al 70% y se volvieron a cultivar las cepas de *Pediococcus* en los mismos pocillos, repitiéndose varias veces el mismo procedimiento hasta que se hacía visible una fina película translúcida (Figura 10). Finalmente, se añadieron 200 µl de MRS en cada pocillo y se inocularon con 5 µl de distintas cepas de BAL en fase exponencial, cuantificándose la formación de biofilms como se describe en el punto 7.8 de este apartado de Métodos. El *acondicionamiento* con *L. pentosus* 128/2 se realizó siguiendo el mismo procedimiento.

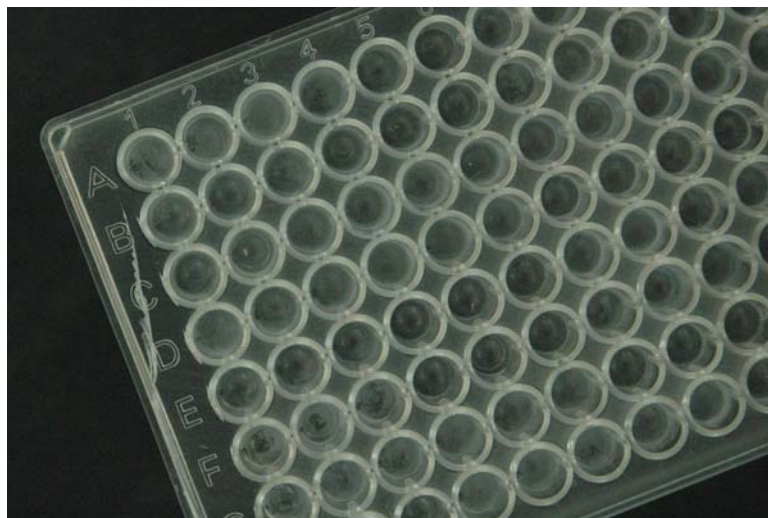


Figura 10. Placa de microtitulación con pocillos *aconicionados* con distintas cepas de *Pediococcus*.

Para el *acondicionamiento* de superficies con salmuera, se sumergieron portaobjetos de cristal durante 3, 10, 15 y 30 días en salmuera filtrada procedente de un fermentador industrial en pleno proceso fermentativo, incubándose a 30 °C. Tras cada uno de dichos periodos de tiempo, se inocularon las salmueras con diferentes cepas de BAL y se incubaron a la misma temperatura durante 3, 6 y 10 días, determinándose a continuación las UFC/ml en la salmuera y procesando los portaobjetos para MEB según lo descrito en el punto 7.11 para la determinación del número de bacterias que quedaban adheridas a los mismos, expresado en UFC/cm².

Siguiendo el mismo procedimiento, se *acondicionaron* portaobjetos en MRS durante 3 días, inoculándose entonces con *Pediococcus parvulus* P339 e incubándose 3 días más a 30 °C. Transcurrido ese tiempo, los portaobjetos se lavaron con agua estéril, se introdujeron en medio MRS fresco y se inocularon con distintas cepas de BAL, incubándose durante 3 días a 30 °C. Finalmente, se determinaron las UFC/ml presentes en el medio de cultivo y las BAL adheridas a la superficie (expresadas en UFC/cm²), como se describe más arriba.

7.8.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR BAL EN PRESENCIA DE BACTERIOCINAS Y EXOPOLISACÁRIDOS

Con objeto de evaluar la influencia de sustancias excretadas naturalmente por los microorganismos responsables de la fermentación de las aceitunas sobre la capacidad de las cepas de BAL para formar biofilms, se ensayaron distintas bacteriocinas así como el exopolisacárido extraído de las propias salmueras de fermentación. Para ello, se repartieron 150 μ l de medio MRS por pocillo en placas de microtitulación, añadiendo al primer pocillo 150 μ l de bacteriocina o de exopolisacárido purificado. Se utilizaron las siguientes bacteriocinas y concentraciones: mundticina (20.480 UB/ml), enterocina L50A y L50B (40.960 UB/ml), plantaricina S (40 UB/ml), plantaricinas NC8, EF y JK (160 UB/ml), bacteriocina RC714 (2.560 UB/ml) y enterocina A (1.280 UB/ml). El exopolisacárido, purificado como se describe en el punto 7.13 de este apartado de Métodos, se utilizó a una concentración final del 1% (p/v). Seguidamente, se hicieron diluciones seriadas en base dos, inoculando finalmente todos los pocillos con un cultivo en fase exponencial de la cepa indicadora a una dilución de 1:40 (5 μ l) e incubando posteriormente durante 24 h a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa estudiada. Transcurrido ese tiempo, se determinaba el número de UFC/ml en cada pocillo y se cuantificaba el biofilm formado en cada caso.

Se estudió también el efecto de la satinización de superficies con bacteriocinas sobre la formación de biofilms por las cepas de BAL. Para ello, se depositaban 20 μ l de varias bacteriocinas prepurificadas (a las concentraciones indicadas anteriormente) en cada pocillo de una placa de microtitulación y se incubaban a 30 °C hasta que se evaporaban completamente. A continuación, se procedía a estudiar la formación de biofilms por diversas BAL de la misma forma que la descrita en el punto 7.8 de este apartado.

7.9.- FORMACIÓN DE BIOFILMS MIXTOS

7.9.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-BAL

A partir de cultivos en fase exponencial (10^8 UFC/ml) de cada cepa de BAL, se inoculaba una dilución 1:40 de cada una (5 μ l) en 200 μ l de medio MRS, depositados previamente en pocillos de una placa de microtitulación. A continuación, se incubaron las placas a la temperatura óptima de crecimiento de las cepas durante 24-48 h y se cuantificó la formación de biofilms como se describe en el punto 7.8.

7.9.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-LEVADURAS

Para ello, se partió de cultivos de BAL y levaduras en fase estacionaria, utilizando los cultivos de levadura en su medio directamente, mientras que las BAL se centrifugaron y se cambiaron de su medio (MRS) al medio de las levaduras (YM). A continuación, se depositaron 100 μ l del cultivo de cada levadura sobre los pocillos que contenían 50 μ l de los cultivos de BAL, para obtener así una mezcla con una representación similar de ambos microorganismos. Tras ello, las placas de microtitulación se incubaron a 30 °C durante 72 h y se procesaron para la cuantificación del biofilm.

7.9.2.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-LEVADURAS EN PORTAOBJETOS

Para este estudio se utilizaron portaobjetos de cristal recubiertos de una capa de teflón (Immuno Cell, Mechelen, Bélgica), ya que ésta deja huecos con el cristal a modo de pocillos. El teflón tiene carácter hidrófobo, lo que permite que se puedan depositar grandes gotas de líquido que se mantienen gracias a la tensión superficial de las mismas. Para ello, se esterilizaron los portaobjetos con etanol al 70% y se depositaron 30 μ l de un cultivo de 18 h de *C. boidinii* y 15 μ l de cada BAL con las que se había demostrado previamente que co-agregaba dicha levadura (Ángela León Romero, comunicación personal). Los portaobjetos se introdujeron en cajas de Petri en cuyo interior se depositó

otra de menor tamaño que contenía agua. A continuación se cerraron las cajas y se sellaron con PARAFILM MTM (Bemis, Neenah, Wisconsin, EEUU), a fin de evitar la evaporación de las gotas depositadas sobre el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante 72 h a 30 °C y se procesaron para MEB, según lo descrito en el punto 7.11 de este apartado.

7.9.2.2. FORMACIÓN DE BIOFILMS POR LEVADURAS EN PRESENCIA DE SLC OBTENIDOS DE CULTIVOS MIXTOS BAL-LEVADURAS

También se estudió si la formación de biofilms por levaduras se inducía o no en presencia de SLC procedentes de cocultivos previos BAL-levaduras. Para ello, en un matraz con 300 ml de medio YM se inocularon 600 µl de un cultivo de 24 h de *C. boidinii*. Por otro lado, se llenó una membrana de diálisis (corte molecular 12.000-16.000 Da, Sigma-Aldrich) con 50 ml de YM y se inoculó con 100 µl de cada cepa de *L. pentosus* (10^7 UFC/ml) a ensayar (*L. pentosus* 13, *L. pentosus* 209 y *L. pentosus* 13B4, cepas que inducen la formación de biofilms mixtos con esta levadura). Una vez cerrada la membrana de diálisis, ésta se sumergió en el medio de cultivo, incubándose a 30 °C durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras de los medios de cultivo del matraz y de la membrana, se centrifugaron (4.000 rpm, 4 °C, 10 min) y se filtraron utilizando un filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro (ALBET-Hahnemuehle, Sant Joan Despi, Barcelona, España). Como control, se incubó *C. boidinii* en el matraz y se introdujo de nuevo una membrana de diálisis pero sin ningún microorganismos en el interior. Posteriormente, se procedió a estudiar la formación de biofilms por *C. boidinii* en presencia de distintas diluciones de los SLC obtenidos. Para ello, se añadió a cada pocillo de la placa de microtitulación, 150 µl de *C. boidinii* crecida durante 24 h en medio de cultivo YM y a continuación se depositó en el primer pocillo de cada fila de la placa de microtitulación 150 µl de cada SLC a ensayar, haciéndose entonces diluciones seriadas en base dos. Finalmente, la placa se incubó a 30 °C durante 72 h y se procedió a cuantificar la formación de biofilms según lo anteriormente descrito.

7.9.2.3.- FORMACIÓN DE BIOFILMS BAL-LEVADURAS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Con objeto de comprobar si los compuestos fenólicos, cuya presencia en las salmueras de fermentación es elevada, influían en la formación de biofilms mixtos BAL-levaduras, se inocularon dichos microorganismos, en las concentraciones descritas en el apartado anterior, en pocillos de una placa de microtitulación, en un volumen final de 150 μ l. A continuación se añadieron a los primeros pocillos de cada fila 150 μ l de cada compuesto a ensayar y se hicieron diluciones seriadas en base dos, incubando las placas durante 72 h a 30 °C. Los compuestos fenólicos y concentraciones finales utilizadas fueron: oleuropeína (1,73 g/l), tirosol (1,73 g/l), hidroxitirosol (1,73 g/l) e hidroxitirosol-OH (1,73 g/l). Transcurrido el tiempo de incubación, se cuantificaron los biofilms como se describió anteriormente.

7.10.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS ESTILO ESPAÑOL O SEVILLANO: ESTUDIOS EN PLANTA PILOTO

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron aceitunas de la variedad gordal recogidas por ordeño. Tras la recolección de los frutos, se seleccionaron las aceitunas que estaban completamente sanas y se procesaron por el método denominado “estilo español o sevillano” (Garrido-Fernández y *col.* 1997). Para ello, se trataron los frutos con una solución de NaOH al 1,8% hasta que ésta penetró hasta aproximadamente 2/3 de la pulpa (aproximadamente 8 h). A continuación, se lavaron los frutos con agua durante 1 h y finalmente se sumergieron en agua durante 18 h, tras lo cuál, las aceitunas se repartieron en varios fermentadores, a los que se les añadió una salmuera al 10% (p/v) en NaCl, para alcanzar el 5-6% en el equilibrio. Después de 36 h en salmuera, cada fermentador se inoculó con distintas cepas de BAL. Se desarrollaron diferentes experimentos en campañas sucesivas, durante los años 2009 y 2010.

Los pre-inóculos de las distintas cepas utilizadas como cultivos iniciadores se hicieron subcultivándolas varias veces en medio MRS con NaCl al 4% para adaptarlas al medio salino. Tras ello, se centrifugaron (6.000 rpm, 4 °C, 5 min), se tiró el

sobrenadante y se lavaron las células en solución salina, resuspendiéndose finalmente en salmuera al 4% en el mismo volumen inicial del cultivo.

Por otro lado, se estudió la capacidad de las cepas *L. pentosus* LPCO10 y *L. pentosus* 128/2 para formar biofilms durante la fermentación. Dichas cepas se utilizan en la industria aceitunera como cultivo iniciador mixto (Jiménez-Díaz y Ruiz-Barba, 2003; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012). Para ello, se procedió a inocularlas en fermentadores que contenían 5 kg de aceitunas y 4 L de salmuera, cada cepa a una concentración final de 10^5 UFC/ml en cada caso. Una vez inoculadas las salmueras, se introdujeron entre las aceitunas portaobjetos estériles para seguir la evolución de los biofilms por MEB a lo largo del tiempo de fermentación.



Figura 11. Fermentadores en la planta piloto del Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa.

Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras muy frecuentemente en los primeros estadios de la fermentación y más distanciados en el tiempo conforme ésta avanzaba. En cada caso, se tomaban muestras de salmuera para los recuentos de lactobacilos y levaduras, utilizando MRS con azida [MRSa, al 0,02% (p/v)] para los primeros e YMGP con oxitetraciclina (YMGPtet, 100 μ g/ml) para las segundas. A la vez, se extraían portaobjetos y frutos para procesarlos para su observación por MEB. Además, se tomaban 4-5 aceitunas más con objeto de extraer el biofilm adherido a la epidermis. Tras la extracción, se determinaban las UFC/ml tanto de lactobacilos como

de levaduras presentes en los biofilms. A cada tiempo, se escogían 10 colonias de lactobacilos aisladas en MRSA y se conservaban a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 20%. Además, se conservaban el sobrenadante y el precipitado resultante de la extracción del biofilm (apartado 7.12) para analizar la presencia de ADN en los mismos. Este experimento se repitió durante dos años consecutivos para recomprobar los resultados obtenidos. Una vez finalizada la fermentación, se procesó el producto para su consumo, consistiendo en un lavado con agua y envasado con una salmuera al 4% (p/v) en NaCl.

Por otro lado, y con objeto de comprobar la eficacia colonizadora de las cepas inoculadas, se utilizó la cepa *L. pentosus* LPCO10 como cultivo iniciador, previamente seleccionada como doble mutante resistente a rifampicina (Rif^r , $20\text{ }\mu\text{g/ml}$) y estreptomicina (Sm^r , $500\text{ }\mu\text{g/ml}$). Dicho doble mutante se obtuvo mediante selección secuencial en medio MRS con cantidades crecientes de dichos antibióticos. El inóculo inicial en los fermentadores fue de 10^7 UFC/ml. Para estos experimentos se utilizaron fermentadores por triplicado con 850 g de aceitunas y 500 ml de salmuera. En cada muestreo se contabilizaron tanto el número total de UFC/ml presentes en los fermentadores utilizando MRSA y MRS+Rif+Sm. A la vez, se procesaron frutos para su observación mediante MEB y para la extracción del biofilm adherido a su epidermis. Además, de cada muestreo se eligieron 10 colonias al azar aisladas en MRS+Rif+Sm para analizarlas mediante RAPD-PCR. Todas las colonias que crecían en MRSA se repicaban en MRS+Rif+Sm para comprobar su resistencia a dichos antibióticos y aquellas que no lo eran, se determinaba su especie por PCR usando primers específicos, como se describen en la Tabla 8. El perfil de RAPD-PCR de cada una de las colonias se analizó y se comparó mediante el software Bionumerics (Applied Maths [Sint-Martens-Latem, Bélgica]), obteniendo así los dendogramas de similitud entre colonias.

7.11.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Tanto los portaobjetos como los frutos recogidos de los fermentadores a distintos tiempos de fermentación se procesaron para su observación al microscopio electrónico de barrido, según los métodos descritos por Kubota y *col.* (2008) y Kroupitski y *col.*

(2009), respectivamente. Ambos métodos se modificaron ligeramente para adaptarlos a nuestras muestras.

Para su procesado, los portaobjetos se lavaron dos veces durante 15 min cada vez con tampón fosfato 100 mM (pH 7,0), se sumergieron durante 16 h a 4 °C en el mismo tampón con glutaraldehído al 5% y después se lavaron dos veces a temperatura ambiente con tampón fosfato 100 mM (pH 7,0). Posteriormente, las muestras se deshidrataron por inmersión secuencial en soluciones de etanol/agua al 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100% durante 15 min en cada una. A continuación, los portaobjetos se sumergieron tres veces en 2-metil-2-propanol durante 15 min. Finalmente se retiraba el 2-metil-2-propanol y se dejaban secar los portaobjetos.

Para la preparación de los frutos, éstos se lavaron dos veces en tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) y a continuación se fijaron en el mismo tampón con glutaraldehído al 2,5% (v/v) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras ello, se enjuagaron mediante cinco inmersiones de 5 min cada una en tampón fosfato 100 mM (pH 7,0) y después se deshidrataron por inmersión secuencial en soluciones de etanol al 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100% durante 5 min en cada una. Por último, se sumergieron durante 20 min en 2-metil-2-propanol y tras eliminarlo, se dejaron secar las muestras. Para su observación al MEB, se cortaron pequeños trozos de epidermis y se fijaron sobre un portaobjetos utilizando un adhesivo universal.

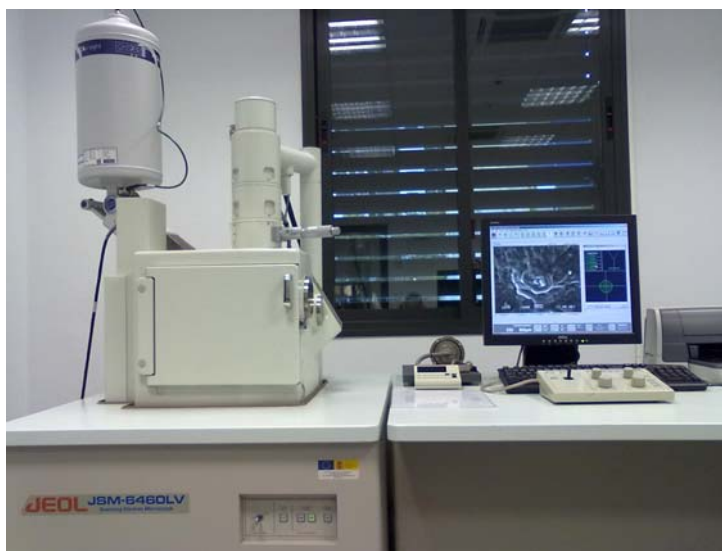


Figura 12. Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6460LV

Las muestras se recubrieron con una capa de oro utilizando un equipo Scancoat Six (Edwards, Crawley, Inglaterra) y se visualizaron en un microscopio JEOL JSM-6460LV (JEOL USA, Inc., Peabody, Massachusetts, EEUU) ubicado en el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

7.12.- EXTRACCIÓN DE LOS BIOFILMS DE LA EPIDERMIS DE LAS ACEITUNAS

Para la extracción del biofilm formado sobre la superficie de las aceitunas durante el proceso de fermentación se siguió la metodología de Böckelmann y *col.* (2003) y Weber y Legge (2010), con modificaciones: se tomaron 200 g de frutos y se lavaron varias veces con agua destilada para eliminar aquellos microorganismos que no estaban adheridos a la epidermis de la aceituna. A continuación, se añadieron 300 ml de PBS (1×) con el cóctel de enzimas descrito en el Apartado 6 y la mezcla se incubó a 20 °C en agitación (150 rpm) durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, se retiraron los frutos y el líquido se centrifugó (10.000 rpm, 4 °C, 10 min), guardando el sobrenadante a -80 °C y resuspendiendo el precipitado en 10 ml de PBS (1×), a partir del cual se realizaron varias diluciones que se sembraron en los diferentes medios de cultivo (MRSa para los lactobacilos, YMGPtet para las levaduras y MRS+Rif+Sm para los lactobacilos dobles resistentes a antibióticos), mientras que al resto se le añadió glicerol al 20% y se guardó a -80 °C.

7.13.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS DE MUESTRAS DE SALMUERA A LO LARGO DEL PROCESO FERMENTATIVO

Los exopolisacáridos son un componente clave de los biofilms puesto que contribuyen a formar la matriz que envuelve a los microorganismos que los componen (Parsek y Fuqua, 2004; Branda y *col.*, 2005; Nobile y Mitchell, 2007). Para su extracción y purificación se siguió el método descrito por Sánchez y *col.* (2006), procediendo del siguiente modo: a distintos tiempos de fermentación se tomaron 100 ml de salmuera, a los que se añadió ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), agitándose a 4 °C durante 30 min. A continuación se centrifugaron las muestras (10.000 ×g, 10 min,

4 °C) y se guardó el sobrenadante, al que se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto, manteniéndose en agitación a 4 °C durante 24 h. Tras ello, se centrifugó a 10.000 ×g durante 10 min y el precipitado se resuspendió en agua destilada en una proporción 1/10 del volumen inicial. Finalmente, se dializó en membranas de diálisis (corte molecular de 12.000-16.000 Da) en 5 L de agua destilada a 4 °C en agitación durante 48 h, cambiando el agua veces. Las muestras se congelaron a -80 °C y a continuación se procedió a su liofilización (Christ Alpha 1-4, B. Braun-Biotech).

7.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software “Statistica 7.0” (StatSoft Iberica, Lisboa, Portugal). Para la comparación de los datos se empleó un análisis de varianza simple (ANOVA) aplicando el test Scheffé y representando gráficamente los datos obtenidos. La representación gráfica de los datos obtenidos permitió comprobar la existencia de diferencias significativas entre los datos analizados mediante el no solapamiento de los límites de confianza.

7.15.- METODOLOGÍA DEL ADN

7.15.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO O CROMOSÓMICO DE BAL

El aislamiento de ADN plasmídico se llevó a cabo por el método de Anderson y McKay (1983).

Para obtener de una forma rápida el ADN total de las BAL, se siguió el método de Ruiz-Barba y *col.*, 2005. Para ello, se tomó con la punta de una pipeta de plástico una colonia aislada en una placa de MRS y se resuspendió en 100 µl de H₂O destilada estéril, añadiendo a continuación un volumen de C:I (24:1). La mezcla se agitó en el vórtex durante 5 s y se centrifugó a 13.200 rpm (4 °C, 5 min). Para las reacciones PCR se utilizaron 5 µl de dicho sobrenadante.

7.15.2.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PRESENTE EN LOS BIOFILMS DE LOS FRUTOS

A distintos tiempos de fermentación, el ADN presente en el sobrenadante del cóctel de extracción del biofilm se purificó como sigue: a 10 ml de dicho sobrenadante se le añadió un volumen de F:C:I, se agitó y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min (4 °C). A continuación, se añadió el mismo volumen de C:I, se agitó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones durante 1 min. Tras ello, se precipitó el sobrenadante con 1 ml de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 9 ml de isopropanol, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70%. Tras secar el precipitado en un concentrador a vacío (B. Braun-Biotech), se añadieron 50 µl de TER y se resuspendió suavemente el precipitado, incubándose a 37 °C durante 20 min, guardando las muestras a -20 °C hasta su uso.

En otros casos se utilizó el kit “*QIAamp DNA Mini Kit*” (Quiagen, Las Matas, Madrid, España) y el protocolo “*DNA Purification from Tissues*”.

7.15.3.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN PRESENTE EN LOS EXOPOLISACÁRIDOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE LAS SALMUERAS DE FERMENTACIÓN

Las muestras de exopolisacárido liofilizado, extraídos a distintos tiempos de fermentación, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada, añadiéndose el mismo volumen de F:C:I. La mezcla se agitó y se centrifugó (13.000 rpm, 4 °C, 5 min), recuperándose el sobrenadante al que se le añadió 1 ml de C:I, tras lo cual se agitó y se centrifugó de nuevo. Se recogió el sobrenadante y el ADN se precipitó añadiendo 100 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 900 µl de isopropanol, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min, se tiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70%, tras lo cuál se secó en el concentrador a vacío. El precipitado se resuspendió en 10 µl de TER y se incubó a 37 °C durante 20 min. Finalmente, el ADN se conservó a -20 °C hasta su uso.

7.15.4.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Saint Bruno de Monterville, Canadá). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se describen en la Tabla 8, todos ellos suministrados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Las condiciones utilizadas en las PCRs variaron en función del tamaño del fragmento a amplificar así como de la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos empleados. Las mezclas de reacción se hicieron generalmente en un volumen final de 25 μ l, tal como se muestra a continuación:

Solución inicial	Cantidad añadida	Concentración final
dNTPs 1,25 mM*	4 μ l	200 μ M de cada dNTP
Tampón 10 \times	2 μ l	1 \times
Oligonucleótido 1 (10 μ M)	1 μ l	0,4 μ M
Oligonucleótido 2 (10 μ M)	1 μ l	0,4 μ M
Taq polimerasa 5 UA/ μ l	0,1 μ l	0,02 UA/ μ l
ADN molde	X μ l	5-10 ng
Agua desionizada	Completar hasta 25 μ l	

*Se utilizó una mezcla equimolar de los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, Roche) a una concentración de 1,25 mM cada uno.

Condiciones generales de la PCR:

1. Desnaturalización inicial: 94 $^{\circ}$ C, 3 min
2. Desnaturalización: 94 $^{\circ}$ C, 30 s
3. Hibridación: 30 s a la temperatura consenso de fusión (T_m) de los oligonucleótidos empleados
4. Extensión: 72 $^{\circ}$ C. El tiempo de extensión varió según el tamaño del fragmento a amplificar. Por lo general se seleccionó un tiempo de extensión de un minuto por cada kb de ADN a amplificar
5. Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron un total de 30 veces o ciclos
6. Extensión final: 72 $^{\circ}$ C, 5 min

7.15.4.1.- AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE FRAGMENTOS DE ADN POLIMÓRFICO (RAPD-PCR)

Con el fin de tipificar genéticamente los diferentes aislados bacterianos, se aplicó la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR) descrita por Williams y *col.* (1990), que permite generar un patrón de bandas característico de cada cepa. El oligonucléotido utilizado para ello fue OPL5 (Rodas y *col.*, 2005). La mezcla de la reacción de amplificación fue la siguiente:

Solución inicial	Cantidad añadida	Concentración final
dNTPs 1,25 mM*	4 μ l	200 μ M de cada dNTP
Tampón 10 \times	2 μ l	1 \times
OPL5 25 pM	1 μ l	0,4 μ M
Taq polimerasa 5 UA/ μ l	0,1 μ l	0,02 UA/ μ l
ADN molde	X μ l	5-10 ng
Agua desionizada	Completar hasta 25 μ l	

*Se utilizó una mezcla equimolar de los 4 dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, Roche) a una concentración de 1,25 mM cada uno.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min
2. Desnaturalización: 94 °C, 30 s*
3. Hibridación: 30 °C, 30 s
4. Extensión: 72 °C, 1 min*
5. Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron un total de 15 veces o ciclos
6. Desnaturalización: 94 °C, 30 s*
7. Hibridación: 30 °C, 30 s
8. Extensión: 72 °C, 1 min incrementándose en 25 s por cada nuevo ciclo*
9. Los pasos 6, 7 y 8 se repitieron un total de 25 veces o ciclos

* La temperatura se alcanzó mediante rampas de 20 °C/min

Tabla 8. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación empleadas en este estudio.

ESPECIFICIDAD	OLIGONUCLEÓTIDOS Secuencia 5' → 3'	TAMAÑO DEL AMPLICIÓN	CONDICIONES DE PCR	REFERENCIA
<i>Enterococcus</i>	Enterol: CCCGGCTCAACCGGG Enterol2: CTCTAGAGTGGTCAA	404 pb	94° 1', (94° 1', 47° 1', 72° 1')x30, 72° 5'	Deasy y col., 2000
Exopolisacárido	G ^T PRIMF: TGGAATATAGTGGGATAATTCAAAAACAAT G ^T PRIMR: TTAATATGCTCCATTGGCCATAACATAATTTAATGG	668 pb	94° 4', (94° 30", 59° 45", 72° 2')x30, 72° 4'	Dra. Ana Rodríguez (comunicación personal)
<i>Lactobacillus</i>	Lp dnak-500F3: CCGTTCTTRTCRATRTCR Lp dnak-1710R5: GAAAYYCAAGTYGGHGAAAGT	1100 pb	94° 5', (94° 1', 58° 1', 72° 2')x35, 72° 7'	Huang y col., 2010
<i>Lactobacillus</i>	R16-1F: CTTGTACACACCGCCCGTCA LbMA1-R: CTCAAAACATAAAACAAGTTTC	200-250 pb	94° 3', (94° 30", 55° 30", 72° 30")x30, 72° 5'	Dubernet y col., 2002
<i>L. pentosus/plantarum/ paraplantarum</i>	par aF: GTCACAGGCATTAGCAAAAAC pentF: CAGTGGCGCGGTTGATATC plantF: CCGTTTATGGCGGAACACCTA pREV: TCGGGATTACCTAAACATCAC	218 pb (pent.) 318 pb (plant.) 107 pb (paraplant.)	94° 3', (94° 30", 58° 10", 72° 30")x30, 72° 5'	Torriani y col., 2001
<i>Leuconostoc</i>	Leucgrp: GCGGCTGCGGCGTACCTAG LeucWeissrev: GGNTACCTTGTTACGACTTC	1200 pb	94° 2', (94° 1', 56° 1', 72° 90")x33, 72° 5'	Schillinger y col., 2008
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ppe: CGAACTTCCGTTAATTGATCAG Pu: ACCTTGCGGTCTGACTCC	950 pb	94° 2', (94° 1', 55° 45", 72° 1')x30, 72° 5'	Licitra y col., 2007
Plantaricina S	ARI1: TTCTCATGCAAGGAGTGCCCATGC BRI2: TTCAAAAAGAAAAACAATCTTGG	380 pb	94° 4', (94° 30", 55° 1', 72° 45")x30, 72° 4'	Maldonado y col., 2002
RAPD-PCR	OPL5: ACGCAGGCAC	-	94° 3', (94° 30", 30° 30", 72° 1')x15, (94° 30", 30° 30", 72° 1' [+25"/ciclo])x25	Rodas y col., 2005

7.15.5.- ELECTROFORESIS DEL ADN

La separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Éstos se prepararon a distintas concentraciones (desde el 0,7 al 2%, p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE, 1×) según el tamaño de los fragmentos, utilizando geles al 0,7% cuando éstos tenían un tamaño superior a 400 pb y al 2% cuando el tamaño era inferior a 400 pb. Como tampón de carga se utilizó SBE (6×) en proporción de 1 µl por cada 5 µl de muestra. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE (1×) a voltaje constante (80 V), durante un periodo de tiempo variable según el tamaño de los fragmentos de ADN de interés. Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergía en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml en TAE, 1×) durante 15 min y el ADN se visualizaba utilizando un transiluminador emisor de luz ultravioleta ($\lambda_{302 \text{ nm}}$) acoplado a un equipo de captación de imágenes (Bio-Rad).

El marcador de peso molecular utilizado fue de 1 kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), cuyos tamaños de fragmentos oscilan entre 12 kb y 100 pb, teniendo el siguiente patrón de bandas:

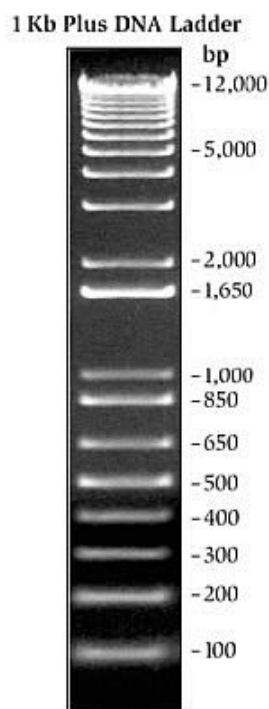


Figura 13. Marcador de 1 Kb.

7.15.6.- EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para la extracción de bandas de ADN de geles de agarosa, se procedió de la siguiente forma:

1. Una vez teñido el gel con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron en el transiluminador UV y se cortó el trozo de gel que contenía el fragmento de ADN de interés
2. El trozo de agarosa se fragmentó parcialmente introduciéndolo en una jeringa estéril (2 ml) sin aguja y, presionando el émbolo suavemente, se depositó en tubos Spin-X (Costar, Sigma-Aldrich) y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.
3. El contenido de los tubos se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. Al filtrado resultante se le añadió un volumen de F:C:I, se agitó y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. Se recogió la fase acuosa y se pasó a otro tubo de microcentrífuga, donde se extrajo con un volumen de C:I, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
6. La fase acuosa se depositó en un nuevo tubo de microcentrífuga y el ADN se precipitó con 1/10 de volumen de acetato potásico 3 M (pH 5,2), 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1 μl de glicógeno, incubando a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min
7. La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el precipitado resultante se lavó con un volumen de etanol 70% (v/v)
8. Se centrifugó de nuevo (13.000 rpm, 1 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), se dejó secar el precipitado y finalmente se resuspendió en 20 μl de agua desionizada

7.15.7.- DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR utilizando los iniciadores específicos del gen *dnak* de *Lactobacillus* y purificados a partir de geles de agarosa, se cortaron con la enzima de restricción TSP509I (New England Biolabs, Hitchin, Inglaterra) para obtener así un patrón de bandas que permitiese la identificación de la especie de *Lactobacillus*.

Para la digestión con la enzima de restricción TSP509I, se realizó utilizando la siguiente mezcla:

TSP509I (10.000 UA/ml)	1 μ l
Tampón I*	2 μ l
ADN	5 μ l
H ₂ O MQ	12 μ l

* Tampón suministrado por Biolabs

Esta mezcla se incubó durante 1 h a 65 °C y a continuación se analizó el total del volumen de la restricción en un gel de agarosa al 3% (p/v).

V. RESULTADOS

1.- SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVOS

En primer lugar, se procedió a la búsqueda en nuestra colección del Departamento de BAL productoras de bacteriocinas, centrándonos posteriormente en las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a como modelos para el estudio detallado del fenómeno. *L. plantarum* NC8-C cepa es un derivado de *L. plantarum* NC8, productora de tres bacteriocinas diferentes de la clase IIb, denominadas plantaricina NC8 (PLNC8), plantaricina EF y plantaricina JK únicamente cuando se encuentra en presencia de otras BAL (producción por *quorum sensing*), mientras que en cultivo puro no produce ninguna de las tres. Por el contrario, *L. plantarum* NC8-C es productora constitutiva de todas esas plantaricinas, ya que contiene un plásmido donde va clonado el gen que codifica el factor de autoinducción denominado PLNC8IF (Maldonado y col., 2004a; Maldonado, 2005). Por otro lado, la cepa *E. faecium* 6T1a es productora constitutiva de enterocinas I y J (Floriano y col., 1998).

De todas las cepas recogidas en la Tabla 6, sólo las indicadas a continuación mostraron actividad antimicrobiana cuando se ensayaron frente a *L. pentosus* 128/2 como cepa indicadora:

Lactobacillus pentosus LPS2005

Lactobacillus plantarum Lb5q

Lactobacillus plantarum Lb5p

Lactobacillus pentosus LPCO10

Lactobacillus pentosus LPP3

Enterococcus faecium T138

Enterococcus faecium CTC492

Enterococcus faecium 6T1a

Enterococcus faecium AE9

Enterococcus faecium AE12

Enterococcus faecium AE23

Lactobacillus plantarum 57/2

Lactobacillus plantarum 57/1

Lactobacillus plantarum 44/1

Lactobacillus plantarum 70/3

Lactobacillus plantarum NC8-C

Lactobacillus plantarum WCFS1



Figura 14. Halos de inhibición de cepas de BAL productoras de bacteriocinas. **1.-** *L. pentosus* LPS2005; **2.-** *L. plantarum* Lb5q; **3.-** *L. plantarum* Lb5p; **4.-** *L. pentosus* LPCO10; **5.-** *L. pentosus* LPP3; **6.-** *E. faecium* T138; **7.-** *E. faecium* CTC492; **8.-** *E. faecium* 6T1a; **9.-** *E. faecium* AE9; **10.-** *E. faecium* AE12; **11.-** *E. faecium* AE23; **12.-** *L. plantarum* 57/2; **13.-** *L. plantarum* 57/1; **14.-** *L. plantarum* 44/1; **15.-** *L. plantarum* 70/3; **16.-** *L. plantarum* NC8-C; **17.-** *L. plantarum* WCFS1. Césped indicador: *L. pentosus* 128/2.

1.1.- DISMINUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVO

Para el estudio de la disminución de la producción de bacteriocinas se realizaron cocultivos de las cepas productoras con cada una de las 159 cepas de BAL utilizadas en este estudio. Al realizar estos ensayos se pudo comprobar que en todos los casos se producía una disminución de la producción de bacteriocinas respecto al monocultivo de la cepa productora y en ciertos casos se detectaba una inhibición total de dicha producción. Estos fenómenos se producían independientemente de si la otra cepa del cocultivo era a su vez productora o no de bacteriocinas. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Disminución de la producción de bacteriocinas por BAL. En cada casilla se indica el diámetro del halo de inhibición (en mm) de la cepa sensible (*L. pentosus* 128/2). -, No actividad inhibitora; (-) halo de inhibición muy tenue. Las casillas resaltadas en gris representan los casos en los que se abolió completamente la producción de bacteriocinas.

	<i>L. pentosus</i>					<i>L. plantarum</i>											<i>L. sakei</i>	<i>E. faecalis</i>	
	LPD5	55/1	LPS2005	LPCO10	LPP3	Lb5q	Lb5p	CECT4185	57/2	57/1	44/1	Lb31g	L11g	L3p	Lb38p	Lb20g	NC8-C	MWH(2)19	6T1a
6T1a	14 mm	16 mm	17 mm	17 mm	17 mm	13 mm	14 mm	13 mm	13 mm	15mm	13 mm	12 mm	13 mm	13 mm	13 mm	14 mm	14 mm	15 mm	18 mm
MWH(2)19	-	-	9 mm	-	10 mm	-	10 mm	-	11 mm	10mm	(-)	-	-	-	-	-	13 mm	-	
NC8-C	11 mm	10mm	9 mm	10 mm	10 mm	11 mm	10 mm	12 mm	11 mm	10mm	11 mm	11 mm	12 mm	11 mm	13 mm	11 mm	14 mm		
Lb20g	-	-	9 mm	-	10 mm	(-)	10 mm	-	10 mm	11mm	(-)	-	-	-	-	-			
Lb38p	-	-	8 mm	-	10 mm	(-)	10 mm	-	10 mm	10mm	(-)	-	-	-	-				
L3p	-	-	8 mm	-	10 mm	(-)	(-)	-	11 mm	10mm	(-)	-	-	-					
L11g	-	-	8 mm	-	11 mm	-	(-)	-	9 mm	11mm	(-)	-	-						
Lb31g	-	-	8 mm	-	11 mm	(-)	(-)	-	11 mm	10mm	(-)	-							
44/1	(-)	(-)	-	10 mm	-	11 mm	10 mm	-	11 mm	10mm	11 mm								
57/1	(-)	(-)	-	10 mm	-	11 mm	10 mm	(-)	10 mm	11mm									
57/2	(-)	(-)	-	10 mm	-	10 mm	10 mm	(-)	10 mm										
CECT 4185	-	-	9 mm	-	11 mm	-	(-)	-											
Lb5p	(-)	(-)	(-)	10 mm	-	9 mm	10 mm												
Lb5q	(-)	(-)	-	9 mm	-	11 mm													
LPP3	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm														
LPCO10	-	-	11 mm	8 mm															
LPS2005	9 mm	10 mm	8 mm																
55/1	-	-																	
LPD5	-																		

Puesto que la cepa *L. plantarum* NC8-C produce bacteriocinas de forma constitutiva, se escogió dicha cepa como modelo para realizar estudios posteriores sobre los fenómenos de interferencia de dicha producción.

1.1.1.- DISMINUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR *L. plantarum* NC8-C EN COCULTIVO CON OTRAS BAL

Cuando se realizaron cocultivos de la cepa productora constitutiva *L. plantarum* NC8-C con cada una de las cepas recogidas en la Tabla 6 se observó que 18 de ellas producían una disminución de la producción de bacteriocinas por dicha cepa productora, independientemente de si éstas eran a su vez productoras o no de bacteriocinas. Estas cepas fueron las siguientes:

<i>Lactobacillus pentosus</i> LPD5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 57/2
<i>Lactobacillus pentosus</i> 55/1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 57/1
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS2005	<i>Lactobacillus plantarum</i> 44/1
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb5q	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb31g
<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb5p	<i>Lactobacillus plantarum</i> L11g
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPCO10	<i>Lactobacillus plantarum</i> L3p
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPP3	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb38p
<i>Enterococcus faecium</i> 6T1a	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lb20g
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT4185	<i>Lactobacillus sakei</i> MMH(2)19

Como se puede observar en las Figuras 15A y 15C algunas de estas cepas eran productoras de bacteriocinas en monocultivo. En las Figuras 15B y 15D se aprecian las diferencias existentes en cuanto a la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C en cocultivo respecto la producción en monocultivo. Dichas diferencias se hacen evidentes tanto por la disminución del diámetro del halo de inhibición como por la nitidez de los mismos, dependiendo también de la cepa presente en el cultivo mixto, siendo especialmente llamativos los casos de las cepas *L. pentosus* LPD5, *L. pentosus* 55/1, *L. pentosus* LPS2005, *L. pentosus* LPCO10, *E. faecium* 6T1a, *L. plantarum* 57/2 y

L. plantarum 57/1, en los que la disminución de la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C es muy acusada. El resto de cepas interfieren también en dicha producción pero en menor medida.

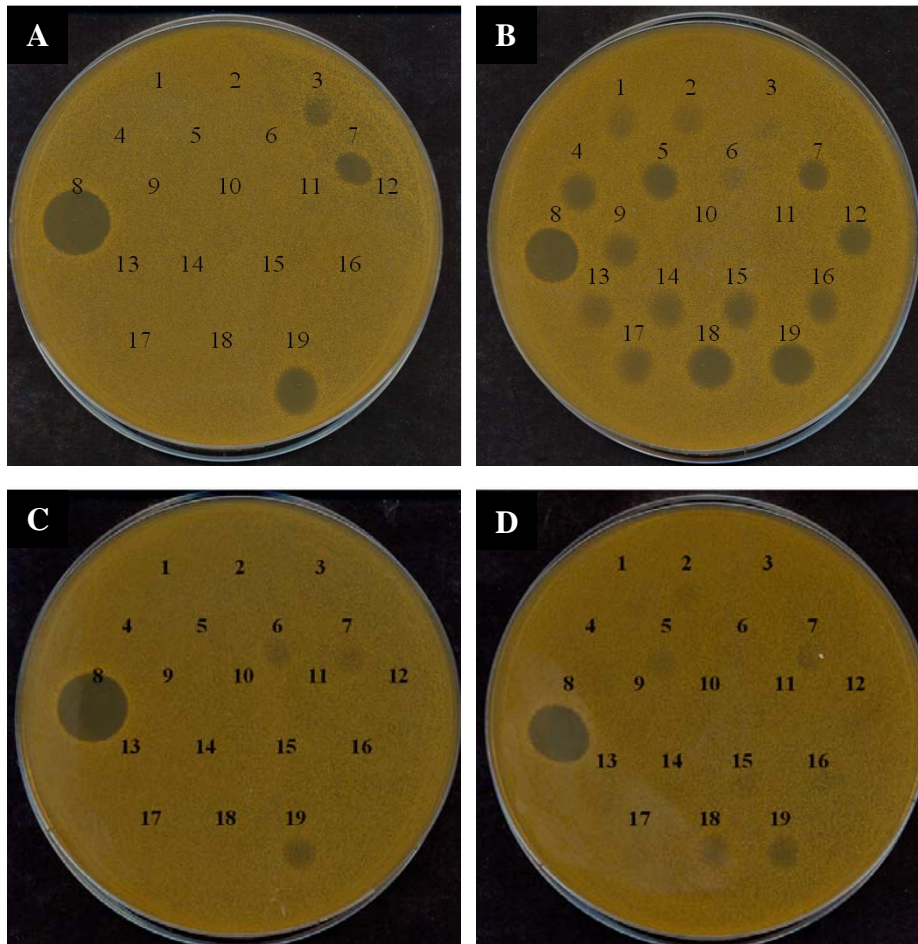


Figura 15. Producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C en cocultivo a las 6 h (A y B) y a las 24 h (C y D). **A y C.** Cultivos puros de las cepas cocultivadas con NC8-C: 1.- *L. pentosus* LPD5; 2.- *L. pentosus* 55/1; 3.- *L. pentosus* LPS2005; 4.- *L. plantarum* Lb5q; 5.- *L. plantarum* Lb5p; 6.- *L. pentosus* LPCO10; 7.- *L. pentosus* LPP3; 8.- *E. faecium* 6T1a; 9.- *L. plantarum* CECT4185; 10.- *L. plantarum* 57/2; 11.- *L. plantarum* 57/1; 12.- *L. plantarum* 44/1; 13.- *L. plantarum* Lb31g; 14.- *L. plantarum* L11g; 15.- *L. plantarum* L3p; 16.- *L. plantarum* Lb38p; 17.- *L. plantarum* Lb20g; 18.- *L. sakei* MMH(2)1; 19.- NC8-C. **B y D.** Cultivos mixtos de NC8-C con: 1.- *L. pentosus* LPD5; 2.- *L. pentosus* 55/1; 3.- *L. pentosus* LPS2005; 4.- *L. plantarum* Lb5q; 5.- *L. plantarum* Lb5p; 6.- *L. pentosus* LPCO10; 7.- *L. pentosus* LPP3; 8.- *E. faecium* 6T1a; 9.- *L. plantarum* CECT4185; 10.- *L. plantarum* 57/2; 11.- *L. plantarum* 57/1; 12.- *L. plantarum* 44/1; 13.- *L. plantarum* Lb31g; 14.- *L. plantarum* L11g; 15.- *L. plantarum* L3p; 16.- *L. plantarum* Lb38p; 17.- *L. plantarum* Lb20g; 18.- *L. sakei* MMH(2)19; 19.- NC8-C en cultivo puro. Bacteria indicadora: *L. pentosus* 128/2.

Cuando se cuantificó la actividad antimicrobiana de todos los sobrenadantes procedentes de los cultivos mixtos a las 6 y 24 h de incubación, así como la de sus respectivos monocultivos, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 16.

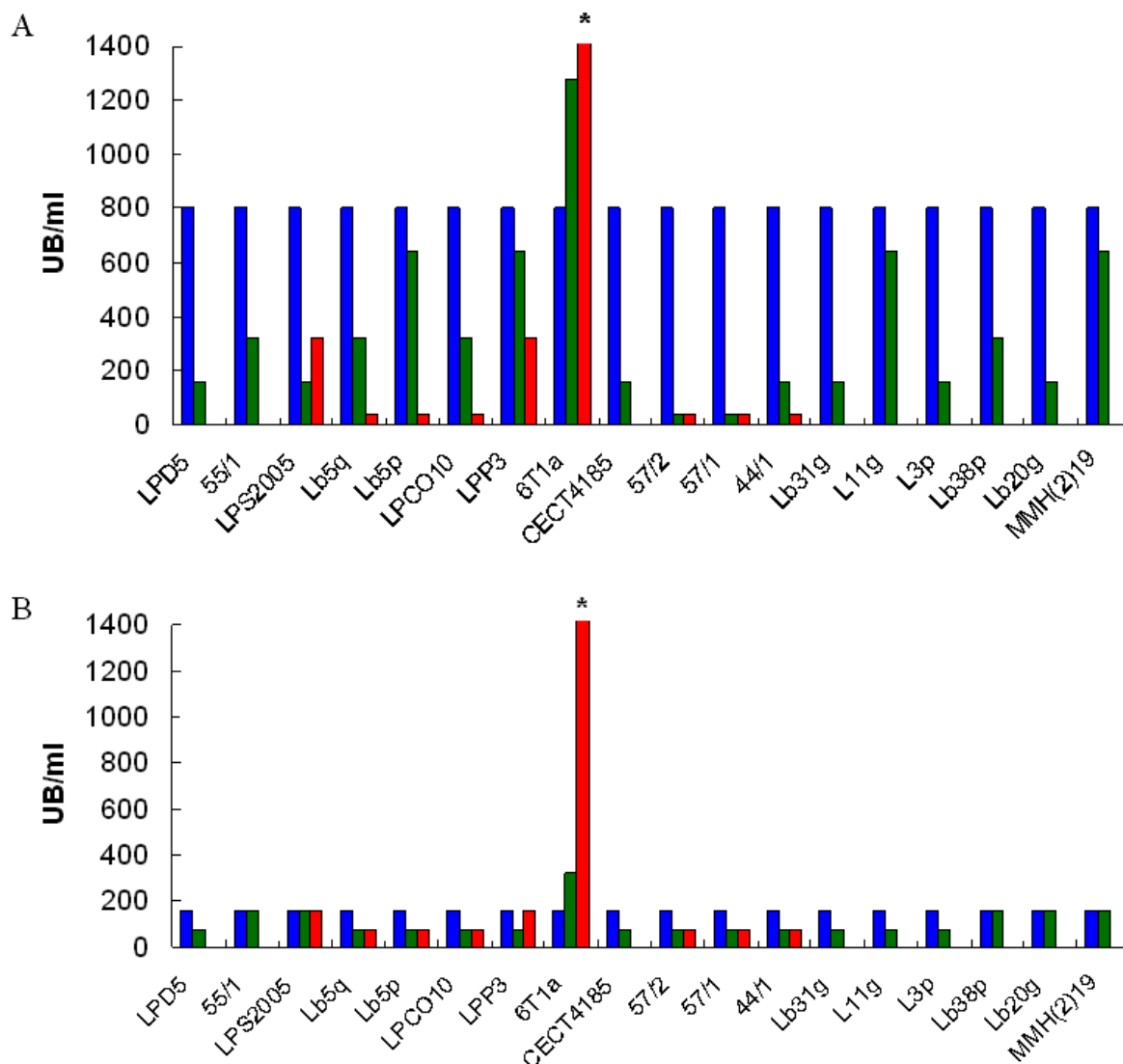


Figura 16. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivos mixtos de diferentes BAL con *L. plantarum* NC8-C. **A.** Actividades de los sobrenadantes a las 6 horas de cultivo: (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo mixto con la cepa indicada; (■) actividad de cada una de las otras cepas en cultivo puro. **B.** Actividades de los sobrenadantes a las 24 horas de cultivo: (■) actividad de *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (■) actividad en cultivo mixto con la cepa indicada; (■) actividad de cada una de las cepas indicadas en cultivo puro. Bacteria indicadora: *L. pentosus* 128/2. * En A y B, fuera de la escala. En A se corresponde con 20.480 UB/ml y en B con 5.120 UB/ml.

A las 6 horas de incubación se observa cómo disminuye notablemente la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con prácticamente todas las cepas ensayadas, aunque el fenómeno es menos evidente en los casos de las

cepas *L. plantarum* Lb5p, *L. pentosus* LPP3, *L. plantarum* L11g y *L. sakei* MMH(2)19 (Figura 16A). En el caso del cocultivo con *E. faecium* 6T1a, dicha disminución queda enmascarada por la presencia de las enterocinas producidas por la cepa 6T1a. Del mismo modo, la cepa *E. faecium* 6T1a se ve notablemente afectada por la presencia de la cepa *L. plantarum* NC8-C, pasando de producir 20.480 UB/ml en cultivo puro a tan sólo 1.280 UB/ml en cocultivo.

A las 24 horas de incubación se sigue observando disminución de la producción en todos los casos, aunque éstos son menos evidentes (Figura 16B). Sigue siendo llamativa la diferencia entre la producción de bacteriocinas por *E. faecium* 6T1a en cultivo mixto respecto a la del cultivo puro, pasando en este caso de producir 5.120 UB/ml a 320 UB/ml. En ambos casos se redujo la producción de bacteriocinas del orden de 16 veces.

1.1.2.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR *L. plantarum* NC8-C EN COCULTIVO

1.1.2.1.- DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS COCULTIVOS

La baja tasa de producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C en los cocultivos podría deberse a un menor crecimiento de las cepas productoras, debido a fenómenos de competencia por los nutrientes entre cepas, lo cual podría llevar a una disminución drástica en el crecimiento de una, otra, o ambas cepas y, por consiguiente, a la disminución de la producción de bacteriocinas. Para comprobar dicha hipótesis, se realizaron los cocultivos de *L. plantarum* NC8-C con las cepas que se habían caracterizado previamente como inhibidoras de la producción de bacteriocinas. En dichos cocultivos, además de cuantificar la actividad antimicrobiana, se determinó el número de UFC/ml a lo largo del tiempo de incubación de los cocultivos.

Figura 17. Crecimiento a las 6 h de cocultivo, de cada una de las cepas presentes en el mismo: (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (▨) *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con la cepa indicada; (■) cultivo puro de la cepa indicada en el eje X; (▨) cocultivo con *L. plantarum* NC8-C de la cepa indicada en el eje X.

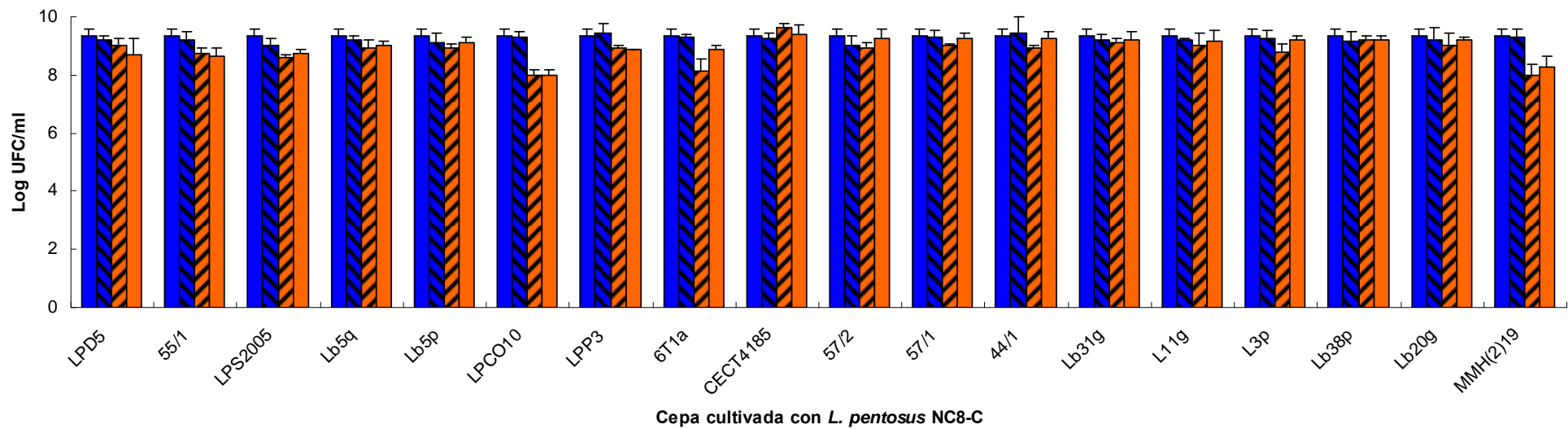
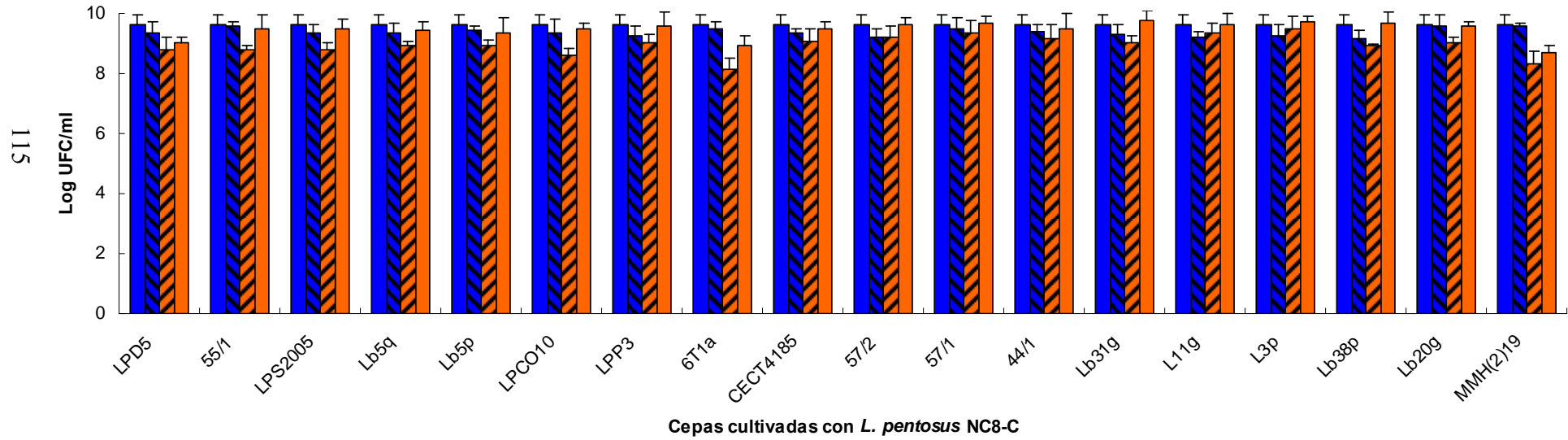


Figura 18. Crecimiento a las 24 h de cocultivo, de cada una de las cepas presentes en el mismo: (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (■) *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con la cepa indicada; (■) cultivo puro de la cepa indicada en el eje X; (■) cocultivo con *L. plantarum* NC8-C de la cepa indicada en el eje X.



Tal y como muestran los datos, no aparecen diferencias significativas en el número de UFC/ml de ninguna de las cepas implicadas en el cocultivo, ni a las 6 horas (Figura 17) ni a las 24 horas (Figura 18).

1.1.2.2.- INACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS POR CALOR

Con el fin de determinar si era necesario que las cepas que interferían la producción de bacteriocinas en *L. plantarum* NC8-C estuviesen metabólicamente activas, se procedió a inactivarlas por calor. Como se puede observar en la Figura 19, no existen diferencias significativas en la producción de bacteriocinas cuando *L. plantarum* NC8-C se encuentra en presencia de las cepas tratadas por calor o cuando crece en cultivo puro.

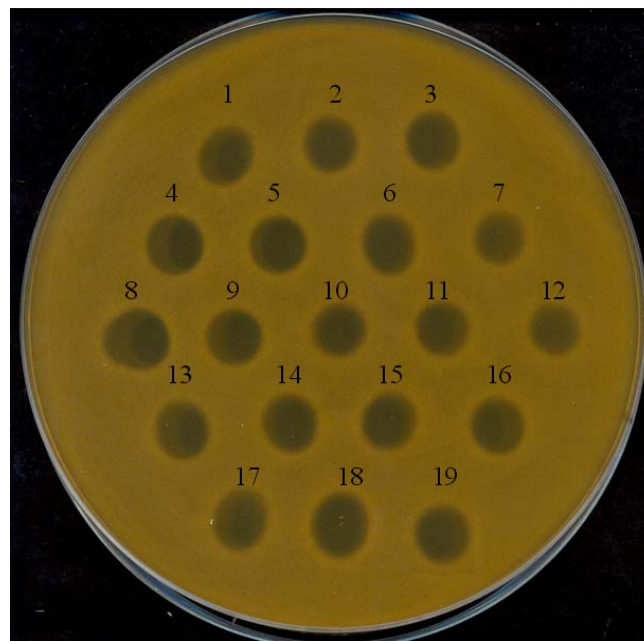


Figura 19. Actividad antimicrobiana de *L. plantarum* NC8-C en presencia de células inactivadas por calor. Cultivos mixtos de *L. plantarum* NC8-C con cepas inactivadas de: **1.-** *L. pentosus* LPD5; **2.-** *L. pentosus* 55/1; **3.-** *L. pentosus* LPS2005; **4.-** *L. plantarum* Lb5q; **5.-** *L. plantarum* Lb5p; **6.-** *L. pentosus* LPCO10; **7.-** *L. pentosus* LPP3; **8.-** *E. faecium* 6T1a; **9.-** *L. plantarum* CECT4185; **10.-** *L. plantarum* 57/2; **11.-** *L. plantarum* 57/1; **12.-** *L. plantarum* 44/1; **13.-** *L. plantarum* Lb31g; **14.-** *L. plantarum* L11g; **15.-** *L. plantarum* L3p; **16.-** *L. plantarum* Lb38p; **17.-** *L. plantarum* Lb20g; **18.-** *L. sakei* MMH(2)19; **19.-** *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro. Césped indicador: *L. pentosus* 128/ 2.

1.1.2.3.- NECESIDAD DEL CONTACTO CÉLULA-CÉLULA

Otra de las hipótesis que se planteó fue si era necesaria una interacción física entre las cepas para que se produjera la interferencia de la producción de bacteriocinas. Para ello, se hicieron cocultivos usando placas de microtitulación con un sistema de dos compartimentos separados por una membrana de 0,2 μm de diámetro de poro, lo cual evitaba el contacto físico entre cepas pero permitía el flujo de moléculas entre ambos cultivos. En la Figura 20A se pueden observar los halos de inhibición producidos por todas las cepas en cultivo puro. Mientras, en los cocultivos se aprecia una disminución de la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C (Figura 20B), ya que el diámetro del halo de inhibición es mucho más pequeño y difuso puesto que al perder eficacia las bacteriocinas, el césped indicador crece en velo. El mayor grado de inhibición de la producción los producen las cepas *L. pentosus* 55/1, *L. pentosus* LPS2005, *L. pentosus* LPCO10, *L. pentosus* LPP3 y *E. faecium* 6T1a.

En el caso particular del cocultivo de *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a, usando distintos céspedes indicadores se pudo diferenciar entre la inhibición debido a las plantaricinas producidas por la cepa *L. plantarum* NC8-C y las enterocinas que produce la cepa *E. faecium* 6T1a (Tabla 7, Materiales y Métodos). En la Figura 20C se puede observar cómo la actividad antimicrobiana de la cepa *E. faecium* 6T1a disminuye en el cocultivo (halo 1). En la Figura 20D, donde la cepa indicadora es sensible únicamente a las plantaricinas producidas por la cepa *L. plantarum* NC8-C, se observa de nuevo inhibición de la producción en el cocultivo (halo 1).

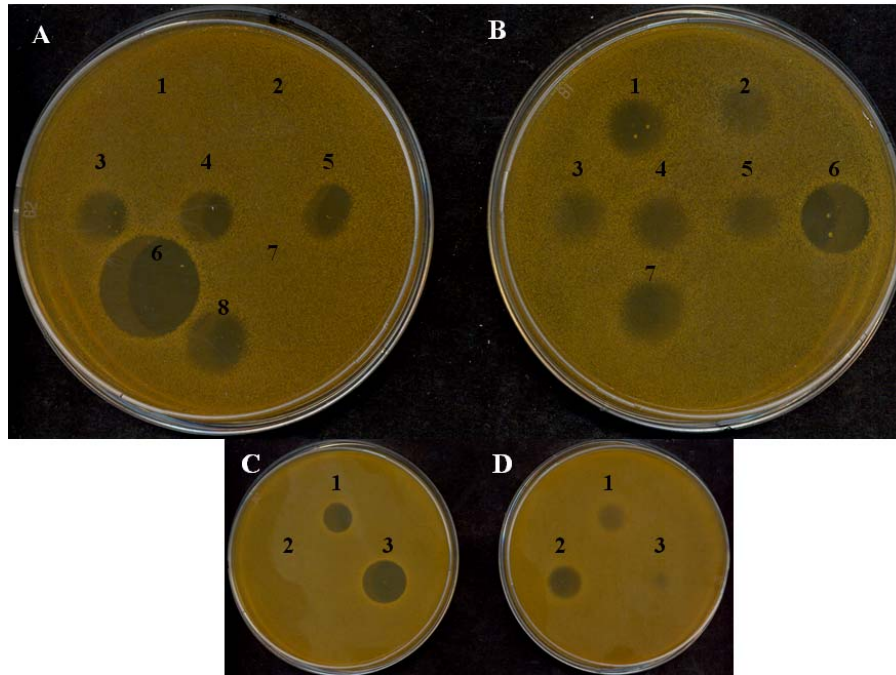


Figura 20. Producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con otras cepas de BAL en placas de microtitulación, separada físicamente de éstas mediante una membrana. **A.** Producción de bacteriocinas las cepas en cultivo puro: 1.- *L. pentosus* LPD5; 2.- *L. pentosus* 55/1; 3.- *L. pentosus* LPS2005; 4.- *L. pentosus* LPCO10; 5.- *L. pentosus* LPP3; 6.- *E. faecium* 6T1a; 7.- *E. faecium* 6T1a20; 8.- *L. plantarum* NC8-C. Césped indicador: *L. pentosus* 128/2. **B.** Producción de bacteriocinas en el cocultivo de *L. plantarum* NC8-C con: 1.- *L. pentosus* LPD5; 2.- *L. pentosus* 55/1; 3.- *L. pentosus* LPS2005; 4.- *L. pentosus* LPCO10; 5.- *L. pentosus* LPP3; 6.- *E. faecium* 6T1a; 7.- *E. faecium* 6T1a20. Césped indicador: *L. pentosus* 128/2. **C.** Producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C (halo 2), *E. faecium* 6T1a (halo 3) y el cocultivo *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a (halo 1), usando como césped indicador la cepa *L. pentosus* 55/1 (sólo es sensible a las enterocinas de *E. faecium* 6T1a). **D.** Producción de bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C (halo 2), *E. faecium* 6T1a (halo 3) y el cocultivo *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a (halo 1), usando como césped indicador la cepa *L. plantarum* VII (sólo es sensible a las plantaricinas de *L. plantarum* NC8-C).

Se realizaron también ensayos utilizando membranas de diálisis para separar las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a, obteniéndose los resultados que se exponen en la Figura 21.



Figura 21. Producción de bacteriocinas en cocultivos de las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a separadas por membrana de diálisis. **A.** Halos de inhibición producidos por cultivos puros de *E. faecium* 6T1a (izquierda) y *L. plantarum* NC8-C (derecha). **B.** Halos de inhibición producidos por cultivos mixtos de *E. faecium* 6T1a (arriba) y *L. plantarum* NC8-C (abajo), con la cepa *E. faecium* 6T1a dentro de la membrana de diálisis. **C.** Halos de inhibición producidos por cultivos mixtos de *E. faecium* 6T1a (arriba) y *L. plantarum* NC8-C (abajo), con la cepa *L. plantarum* NC8-C dentro de la membrana de diálisis. Césped indicador: *L. pentosus* 128/2.

Como se puede observar, se aprecian ciertas diferencias en la producción de bacteriocinas en el cocultivo respecto al cultivo puro de cada bacteria, independientemente de si la cepa se encontraba dentro o fuera de la membrana de diálisis. Estos datos apoyan a los obtenidos anteriormente, corroborando que no es necesaria una interacción física entre las cepas para que se produzca interferencia en la producción de bacteriocinas.

1.1.2.4.- EFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE COCULTIVOS EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR *L. plantarum* NC8-C

Puesto que se observó que la inhibición de la producción de bacteriocinas se producía incluso cuando las bacterias antagonistas estaban separadas físicamente, se probó si los SLC procedentes de cocultivos previos de *L. plantarum* NC8-C con otras BAL provocaban el mismo efecto, lo que apuntaría hacia la posibilidad de que hubiera una sustancia difusible responsable de dicho fenómeno de inhibición.

Como se observa en la Figura 22, se detecta cierto grado de inhibición de la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C cuando el SLC se utilizó inmediatamente después de su obtención. Por el contrario, se comprobó que no se producía inhibición cuando el sobrenadante había sido congelado antes de su ensayo, (datos no mostrados), lo que indicaría que el compuesto que provoca la inhibición sería una sustancia inestable a los tratamientos de congelación y descongelación.



Figura 22. Efecto de la adición de SLC procedentes de cocultivos de *L. plantarum* NC8-C con otras BAL sobre la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C. Cultivo de *L. plantarum* NC8-C con SLC de cocultivos de: 1.- NC8-C con LPD5; 2.- NC8-C con 55/1; 3.- NC8-C con LPS2005; 4.- NC8-C con Lb5q; 5.- NC8-C con Lb5p; 6.- NC8-C con LPCO10; 7.- NC8-C con LPP3; 8.- NC8-C con 6T1a; 9.- NC8-C con CECT4185; 10.- NC8-C con 57/2; 11.- NC8-C con 57/1; 12.- NC8-C con 44/1; 13.- NC8-C con Lb31g; 14.- NC8-C con L11g; 15.- NC8-C con L3p; 16.- NC8-C con Lb38p; 17.- NC8-C con Lb20g; 18.- NC8-C con MMH(H)19; 19.- Cultivo puro de NC8-C. Césped indicador: *L. pentosus* 128/2.

Por otro lado, se observa que existen ligeras diferencias en la actividad antimicrobiana del cultivo puro de *L. plantarum* NC8-C y los respectivos cultivos cuando se añadían los SLCs (Figura 22). Estas diferencias son muy evidentes en el caso de los sobrenadantes procedentes de los cocultivos con las cepas *L. pentosus* LPS2005, *L. plantarum* Lb5q, *L. plantarum* Lb5p, *L. plantarum* 57/2, *L. plantarum* 57/1 y *L. plantarum* 44/1, ya que los halos de inhibición son mucho más débiles respecto a los del cultivo puro (Figura 19).

1.1.2.5.- SINERGIA O ANTAGONISMO ENTRE DIFERENTES BACTERIOCINAS

Para comprobar si los fenómenos de inhibición de la producción de bacteriocinas entre cepas se debían a fenómenos de interacción entre las propias bacteriocinas, se combinaron las plantaricinas producidas por la cepa *L. plantarum* NC8-C con las enterocinas producidas por la cepa *E. faecium* 6T1a, previamente purificadas, y se cuantificó la actividad antimicrobiana de las mezclas.

Como se observa en la Tabla 10, no hubo disminución ni aumento de la actividad de las bacteriocinas cuando se mezclaron, lo que indica que en ningún caso las bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a ni se antagonizan entre sí, ni hay sinergias entre ellas.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana, expresada en UB/ml, de plantaricinas y enterocinas juntas y por separado frente a *L. pentosus* 128/2, *L. pentosus* 55/1 y *L. plantarum* VII.

	S: 128/2	S: 55/1	S: VII
Plantaricinas + Enterocinas	$1,6 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	4×10
Plantaricinas NC8-C	8×10	0	4×10
Enterocinas 6T1a	$1,6 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	0

1.1.2.6.- EFECTO DEL pH

Otra de las posibles causas de la inhibición de la producción de bacteriocinas por las cepas en estudio podrían ser los cambios de pH que se producen en el medio de cultivo debido al metabolismo microbiano. En los cocultivos, por ejemplo, el pH del medio de cultivo puede ser distinto al que se genera cuando la bacteria crece en cultivo puro, pudiendo afectar a la producción de bacteriocinas. No obstante, como se comprobó anteriormente (apartado 1.1.2.1) la disminución de la producción de bacteriocinas no se debía a una disminución del crecimiento de las cepas productoras.

1.1.2.6.a.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH NO REGULADO

Se inoculó medio MRS a distintos pHs iniciales con las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a, así como con cada una de las bacterias en cultivo puro. A tiempos 6 y 24 h se midieron los pHs, la actividad antimicrobiana y el número de UFC/ml en los cocultivos y en los correspondientes cultivos puros. En la Figura 23A se puede observar que a las 6 h de incubación no existen diferencias significativas en el crecimiento de cada una de las cepas en el cocultivo con respecto a su monocultivo. También se observa que en algunos cocultivos, *L. plantarum* NC8-C crece ligeramente más que *E. faecium* 6T1a, (pHs iniciales 6,1-5,0), mientras que por debajo de éstos (pHs iniciales 4,5-3,0), las diferencias en el número total de ambas cepas se hacen más patentes. En la Figura 23B se aprecia que ambas cepas, tanto en cultivo puro como en cocultivo, acidifican el medio hasta alcanzar aproximadamente un pH final de 4,5. Los medios con pHs iniciales por debajo de ese valor no sufrieron cambio alguno.

Según se puede deducir de los experimentos llevados a cabo, la acidez del cultivo viene marcada principalmente por la cepa *L. plantarum* NC8-C, puesto que el cocultivo muestra siempre los mismos valores de pH que el cultivo puro de *L. plantarum* NC8-C, mientras que la cepa *E. faecium* 6T1a en cultivo puro acidifica en menor medida el medio. En la Figura 23C se observa que la cepa *L. plantarum* NC8-C, a pHs 6,1-5,0, produce la misma cantidad de bacteriocina en cultivo puro que en el cocultivo, aunque dicha cantidad disminuye conforme desciende el pH inicial del medio. En el caso de *E. faecium* 6T1a, sólo produce bacteriocinas cuando el pH está comprendido entre 6,1 y 5,5, disminuyendo de forma sustancial en el cocultivo a esos mismos pH iniciales.

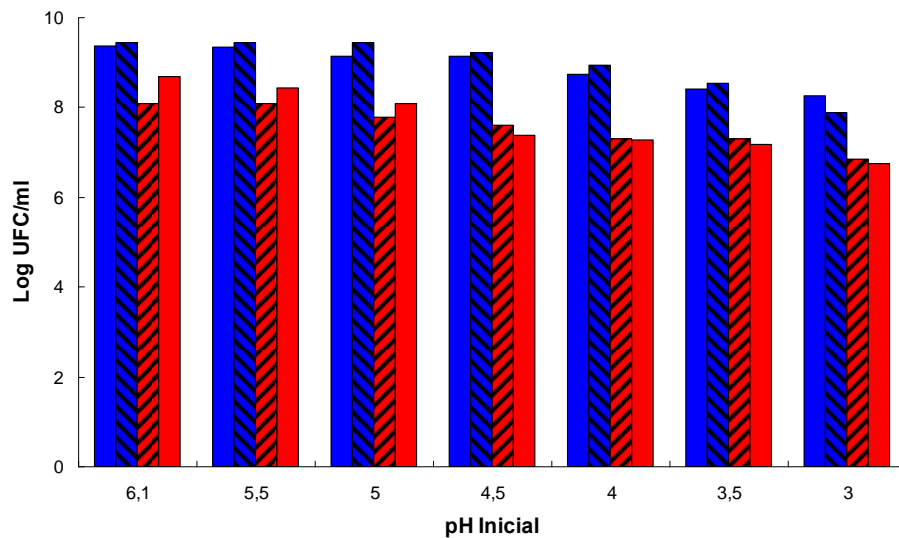
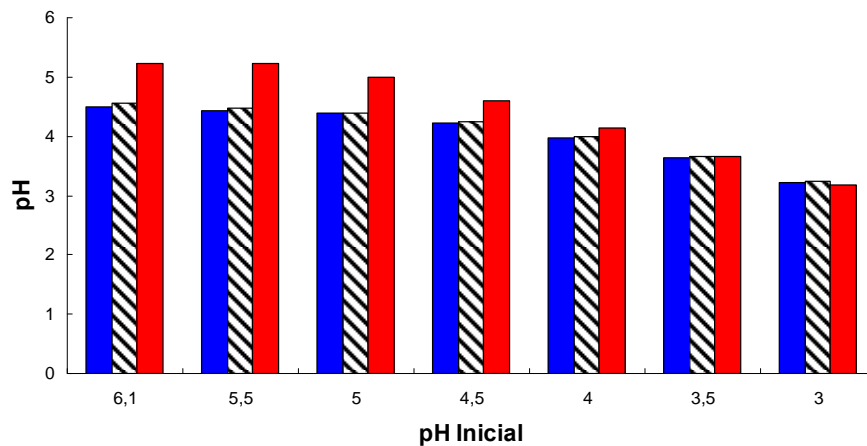
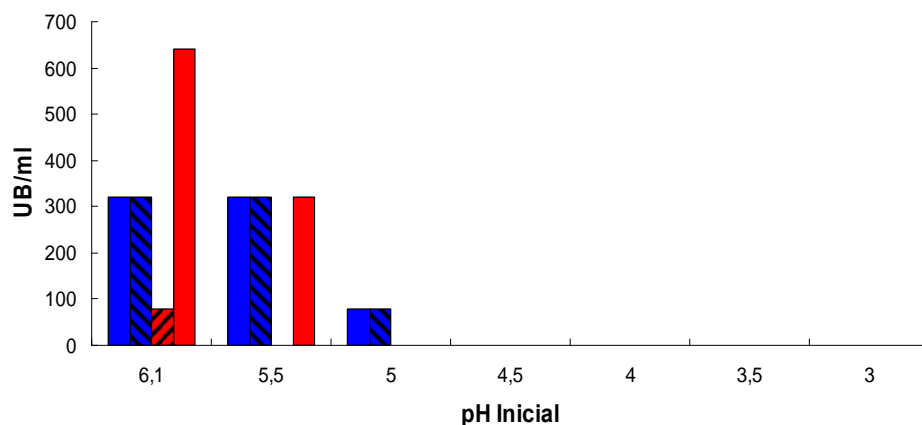
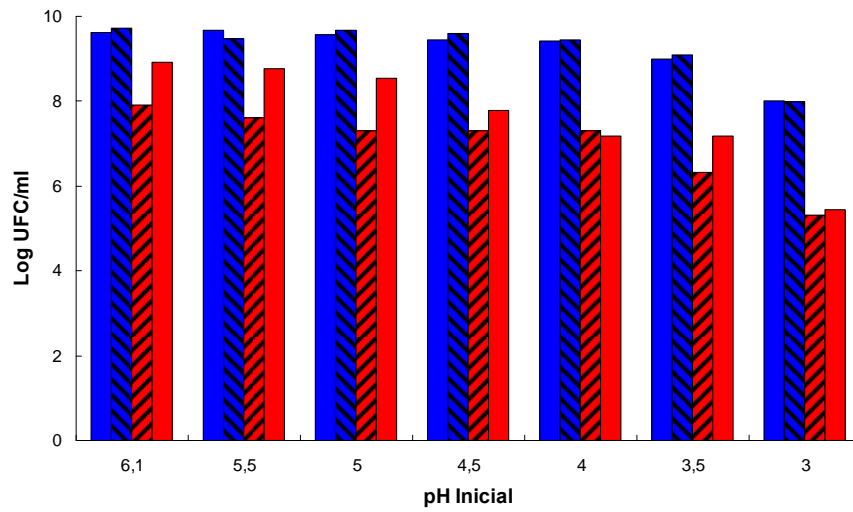
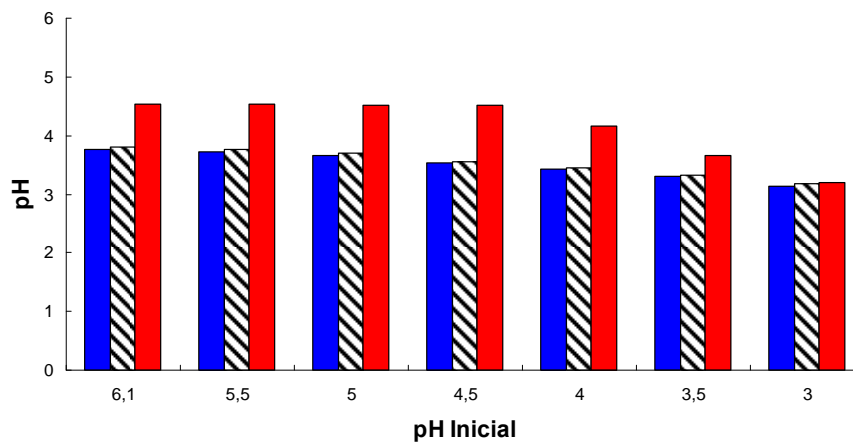
A

B

C


Figura 23. Evolución de los cultivos a las 6 h en función del pH inicial del medio. **A.** Crecimiento de las cepas en los cultivos: (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (■) *E. faecium* 6T1a en cultivo puro; (▨) *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con *E. faecium* 6T1a; (▩) *E. faecium* 6T1a en cocultivo con *L. plantarum* NC8-C. **B.** pH de los cultivos de: (■) *L. plantarum* NC8-C; (■) *E. faecium* 6T1a; (▨) Cocultivo *L. plantarum* NC8-C- *E. faecium* 6T1a. **C.** Actividad antimicrobiana de los SLC de cada cultivo: (■) *L. plantarum* NC8-C; (■) *E. faecium* 6T1a; (▨) *L. plantarum* NC8-C en el cocultivo con *E. faecium* 6T1a; (▩) *E. faecium* 6T1a en el cocultivo con *L. plantarum* NC8-C. El césped indicador para la detección de bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C fue *L. plantarum* V11 y para *E. faecium* 6T1a fue *L. pentosus* 55/1.

A



B



C

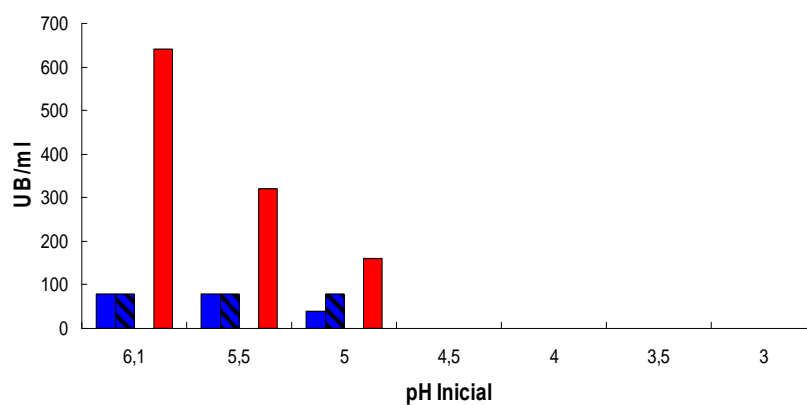


Figura 24. Evolución de los cultivos a las 24 h en función del pH inicial del medio. **A.** Crecimiento de las cepas en los cultivos: (■) *L. plantarum* NC8-C en cultivo puro; (■) *E. faecium* 6T1a en cultivo puro; (■/■) *L. plantarum* NC8-C en cocultivo con *E. faecium* 6T1a; (■/■) *E. faecium* 6T1a en cocultivo con *L. plantarum* NC8-C. **B.** pH de los cultivos de: (■) *L. plantarum* NC8-C; (■) *E. faecium* 6T1a; (N) Cocultivo *L. plantarum* NC8-C-*E. faecium* 6T1a. **C.** Actividad antimicrobiana de los SLC de cada cultivo: (■) *L. plantarum* NC8-C; (■) *E. faecium* 6T1a; (■/■) *L. plantarum* NC8-C en el cocultivo con *E. faecium* 6T1a; (■/■) *E. faecium* 6T1a en el cocultivo con *L. plantarum* NC8-C. El césped indicador para la detección de bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C fue *L. plantarum* VII y para *E. faecium* 6T1a fue *L. pentosus* 55/1.

Cuando los cultivos se mantuvieron 24 h a 30 °C, los resultados obtenidos fueron similares a los de las 6 h. En cuanto al crecimiento (Figura 24A), los cultivos siguen la misma tendencia que a las 6 h, siendo la cepa *L. plantarum* NC8-C la que crece ligeramente más que la cepa *E. faecium* 6T1a, siendo mínimas las diferencias entre los cultivos puros y los cocultivos. Respecto a la evolución del pH (Figura 24B) después de 24 h la acidificación es mayor, llegando a alcanzar valores por debajo de 4,0, siendo este valor nuevamente marcado por la cepa *L. plantarum* NC8-C. Mientras tanto, a los pH iniciales de 3,5 y 3,0 no se produce modificación alguna de pH. Finalmente, en la Figura 24C se aprecia que la cantidad de bacteriocina producida en el caso de *L. plantarum* NC8-C es menor a las 24 h que a las 6 h de incubación, disminuyendo conforme baja el pH, no registrándose diferencias significativas entre la cantidad de bacteriocina producida en el cocultivo y el respectivo cultivo puro. Sin embargo, en el caso de *E. faecium* 6T1a, la concentración de bacteriocinas en el cultivo puro es muy alta, siendo indetectable en el cocultivo y desapareciendo dicha actividad antimicrobiana a partir del pH inicial de 4,5.

1.1.2.6.b.- PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A pH REGULADO

También se estudió la evolución del desarrollo de las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a y la producción de bacteriocinas por las mismas cuando se mantenía constante el pH del medio. Se eligieron los pH 6,1 y 5,0 puesto que el primero es el pH inicial del MRS y el segundo, porque a ese pH no se detectaba actividad antimicrobiana en ciertos cocultivos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 25 y 26.

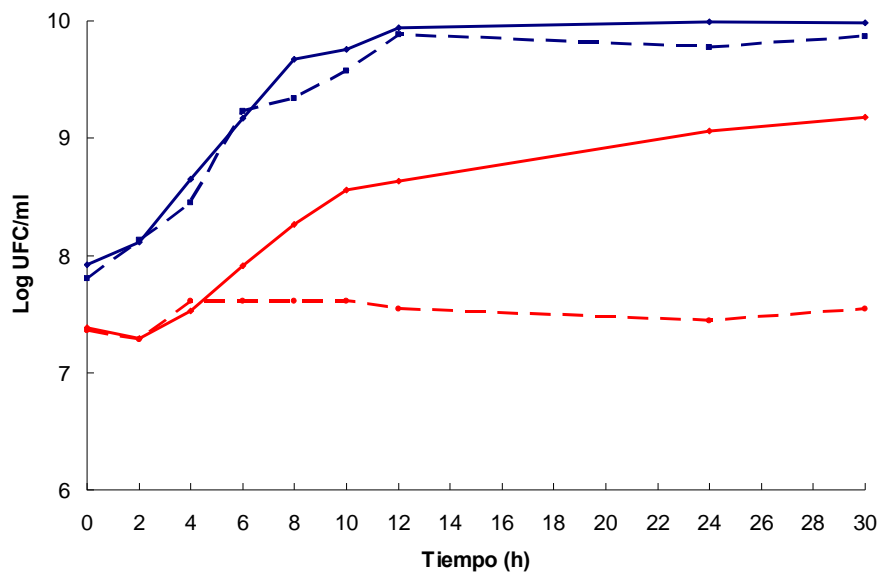
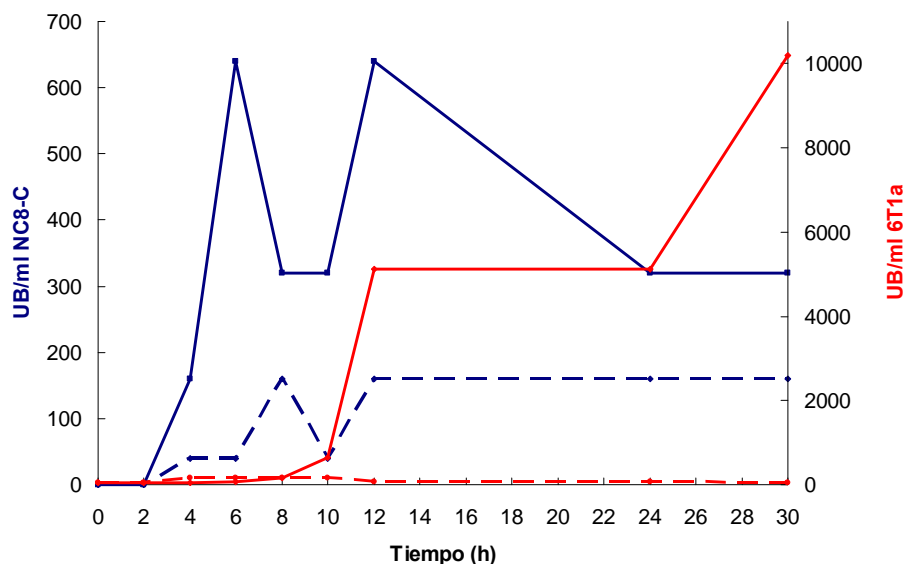
A

B


Figura 25. Curvas de desarrollo y producción de bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a en cultivos puros y mixtos a pH regulado 6,1. **A.** Crecimiento en cultivo puro de *L. plantarum* NC8-C (—) y *E. faecium* 6T1a (—); crecimiento en cultivo de *L. plantarum* NC8-C (---) y *E. faecium* 6T1a (---). **B.** Producción de bacteriocinas en cultivo puro por *L. plantarum* NC8-C (—) y *E. faecium* 6T1a (—); producción en cocultivo por *L. plantarum* NC8-C (---) y *E. faecium* 6T1a (---). El césped indicador para *L. plantarum* NC8-C fue *L. plantarum* VII1 y *L. pentosus* 55/1 para *E. faecium* 6T1a.

Cuando se realizaron los experimentos a pH controlado 6,1 (Figura 25A), las diferencias en el crecimiento de las cepas en cocultivo y en monocultivo fueron insignificantes. Sin embargo, se observa que la producción de bacteriocinas por ambas cepas en cocultivo es notoriamente inferior al de sus respectivos monocultivos, siendo mucho más patente en el caso de la cepa *E. faecium* 6T1a (Figura 25B).

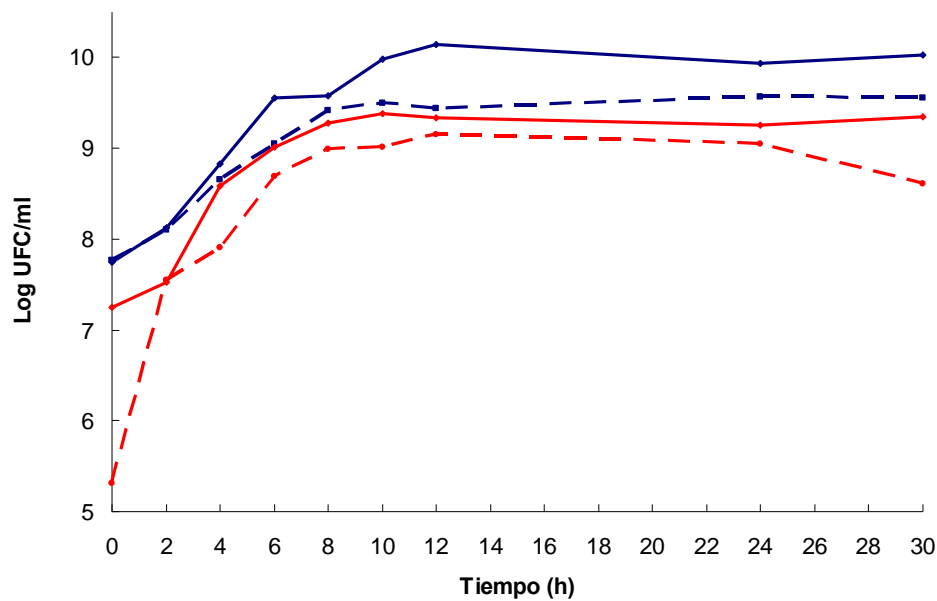
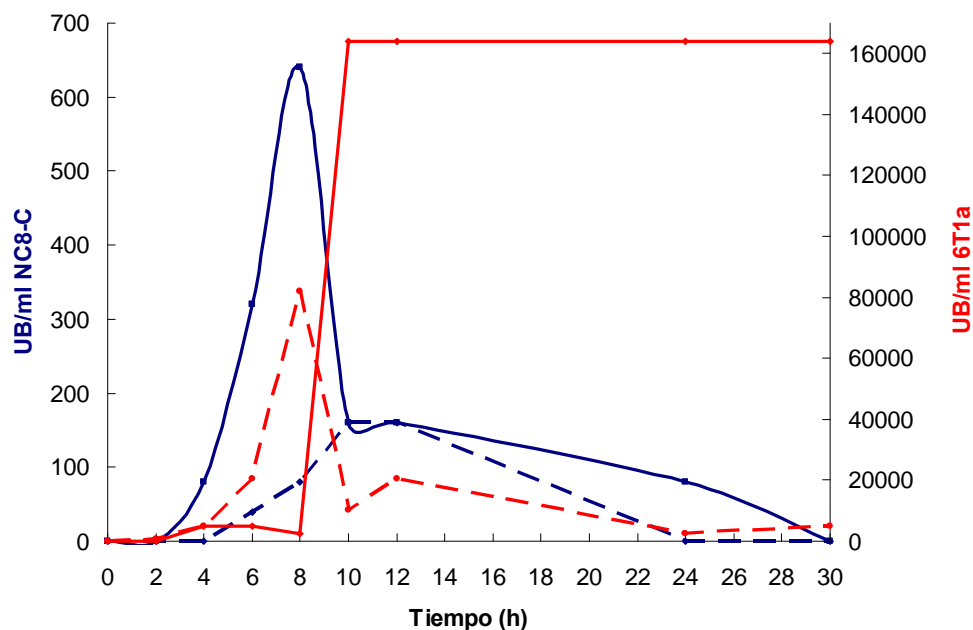
A

B


Figura 26. Curvas de desarrollo y producción de bacteriocinas de *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a en cultivos mixtos y puros, a pH regulado 5,0. **A.** Crecimiento en cultivo puro de *L. plantarum* NC8-C (—) y *E. faecium* 6T1a (—); crecimiento en cocultivo de *L. plantarum* NC8-C (---) y *E. faecium* 6T1a (---). **B.** Producción de bacteriocinas en cultivo puro por *L. plantarum* NC8-C (—) y *E. faecium* 6T1a (—); producción en cocultivo por *L. plantarum* NC8-C (---) y *E. faecium* 6T1a (---). El césped indicador para *L. plantarum* NC8-C fue *L. plantarum* V11 y *L. pentosus* 55/1 para *E. faecium* 6T1a

En la Figura 26A, donde el pH se mantuvo constante a 5,0, se puede observar que el crecimiento de *L. plantarum* NC8-C es similar tanto en monocultivo como en

cocultivo, mientras que en el caso de *E. faecium* 6T1a existen ciertas diferencias entre ambos. No obstante, esa diferencia en el crecimiento no explica la drástica disminución de la producción de bacteriocinas cuando *E. faecium* 6T1a se encuentra en cocultivo con *L. plantarum* NC8-C. En la Figura 26B se puede observar como se reduce considerablemente la producción de bacteriocinas en ambas cepas.

1.1.2.7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) DE LOS SLC DE COCULTIVOS Y CULTIVOS PUROS DE BAL

Con el objetivo de detectar mediante SDS-PAGE la actividad de las bacteriocinas producidas cuando las cepas se encontraban en cocultivo, se tomaron SLC de los cocultivos de NC8-C y 6T1a, NC8-C y 6T1a20 (variante de *E. faecium* 6T1a que no produce bacteriocinas), así como de sus monocultivos respectivos, y se examinaron en geles de poliacrilamida. En cada experimento se hacían cuatro geles: uno de ellos se teñía con nitrato de plata y los tres restantes se utilizaban para detectar la actividad antimicrobiana, usando distintos céspedes indicadores.

En la Figura 27A y B (línea 4) se puede observar que el cocultivo de *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a propició un leve descenso en la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C (180 UB/ml), mientras que en el cocultivo de *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a20 (línea 2) aumentó la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C (360 UB/ml).

La producción de bacteriocinas por *E. faecium* 6T1a también se vio afectada negativamente por la presencia de *L. plantarum* NC8-C en el cocultivo (Figura 27A y C, líneas 4 y 5). Teniendo en cuenta que el carril 5 sólo poseía 1/10 del volumen correspondiente de SLC, la inhibición de la producción de bacteriocinas por *E. faecium* 6T1a en cocultivo fue muy fuerte.

Por último, en la Figura 27D, se observan bandas de péptidos teñidas débilmente a las alturas de los halos de inhibición. En otros casos no se llega a visualizar porque

probablemente la cantidad de bacteriocina es demasiado pequeña para teñirse pero no para mostrar su actividad biológica.

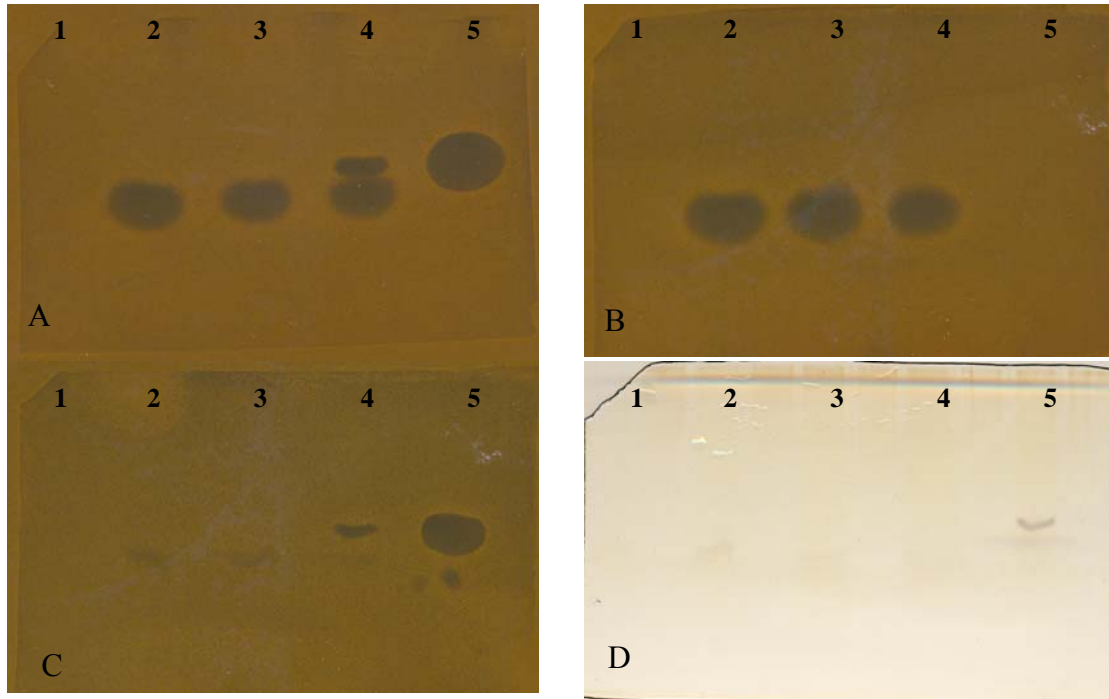


Figura 27. Análisis en geles de poliacrilamida de sobrenadantes de cocultivos: **A.** Cepa indicadora *L. pentosus* 128/2. **B.** Cepa indicadora *L. pentosus* 55/1. **C.** Cepa indicadora *L. plantarum* VII1. **D.** Tinción con nitrato de plata. En cada gel, **Línea 1.-** SLC de monocultivo de *E. faecium* 6T1a20; **Línea 2.-** SLC de cocultivo *E. faecium* 6T1a20-*L. plantarum* NC8-C; **Línea 3.-** SLC de monocultivo de *L. plantarum* NC8-C; **Línea 4.-** SLC de cocultivo *L. plantarum* NC8-C-*E. faecium* 6T1a; **Línea 5.-** SLC de monocultivo de *E. faecium* 6T1a.

2.- BIOFILMS

2.1.- FORMACIÓN DE BIOFILMS *IN VITRO* POR BAL

Aplicando la metodología descrita en el apartado 7.8 de Materiales y Métodos, se ensayó la capacidad de formación de biofilms por las cepas de BAL que aparecen en la Tabla 6. Como se muestra en la Figura 28, de las 159 cepas ensayadas sólo ocho formaron biofilms en placas de microtitulación de poliestireno: *L. plantarum* Lb5p, *L. plantarum* L6, *L. hilgardii* LB76, *P. parvulus* P339, *P. pentosaceus* P56, *L. fermentum* CNRZ 229, *E. hirae* CECT279 y *E. faecalis* CECT481 (Figura 28). Como control se utilizó *E. faecalis* 1 (EF 1), una cepa descrita previamente como formadora de biofilms (Toledo-Arana y col., 2001).

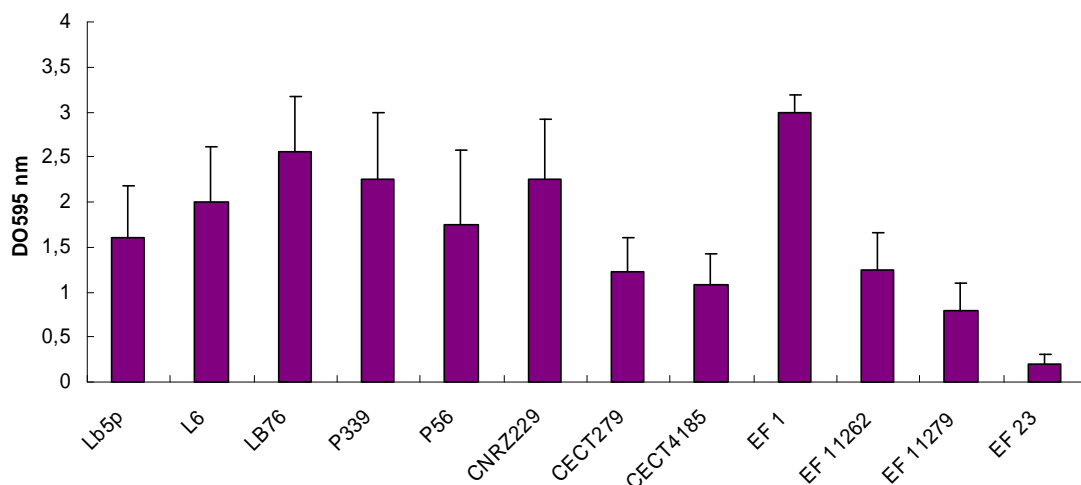


Figura 28. Formación de biofilms por diferentes BAL en placas de microtitulación. Cada columna muestra la media obtenida de la realización de 12 réplicas para cada cepa. La barra de error representa la desviación estándar respecto a dicha media.

Comparando los biofilms formados por estas BAL con el de las cepas control *E. faecalis* 1 que forma un biofilm de tipo fuerte (DO_{595 nm} superior a 2), *E. faecalis* 11262 y *E. faecalis* 11279 medio (DO_{595 nm} entre 1 y 2) y bajo (DO_{595 nm} entre 0,5 y 1), respectivamente, y *E. faecalis* 23 no formadora de biofilms (DO_{595 nm} menor de 0,5), se pudo apreciar que la cepa LB76 forma un biofilm que se puede denominar “fuerte”, las cepas CECT279 y CECT4185 “débil” y el resto, “intermedio”.

Estos resultados indicaban que las BAL al menos *in vitro* tenían poca capacidad de adhesión y, por tanto, de formar biofilms. Sin embargo, puesto que se conocía que la capacidad de formación de biofilms por los microorganismos puede verse inhibida o potenciada por numerosos factores, entre los que cabe mencionar el material de la superficie a colonizar, el estado de ésta, la presencia de otros microorganismos en el medio, etc., se procedió al estudio de la influencia de algunos de estos factores en la formación de biofilms por cepas de *L. pentosus*, entre otras, aisladas de fermentaciones de aceitunas.

2.2.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA FORMACIÓN DE BIOFILMS POR CEPAS DE BAL

2.2.1.- INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA SUPERFICIE DE ADHESIÓN

Se estudió la capacidad de adhesión de las cepas de *L. pentosus* que aparecen en la Tabla 1, a diferentes superficies: poliestireno y polipropileno (material de las placas de microtitulación), fibra de vidrio con poliéster y polietileno. Estas dos últimas superficies son del material del que están fabricados los fermentadores de aceitunas que se utilizan actualmente en la industria. Los resultados se muestran en la Figura 29.

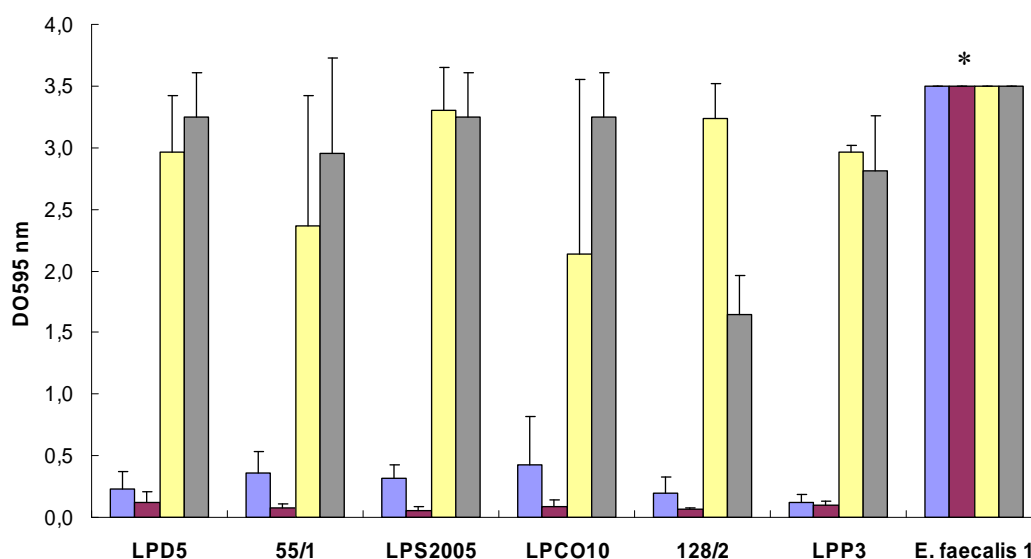


Figura 29. Formación de biofilms sobre distintas superficies por cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas. (■) Poliestireno; (■) Polipropileno. (■) Polietileno. (■) Fibra de vidrio con poliéster. Como control se utilizó la cepa *E. faecalis* 1. Cada valor se obtuvo con los resultados de 12 réplicas del ensayo. * Saturación en la medida.

Como se puede observar, existen diferencias significativas respecto a la capacidad de formación de biofilms por las diferentes cepas dependiendo de la superficie. Las cepas ensayadas apenas si forman biofilms cuando se desarrollan sobre poliestireno o polipropileno, mientras que todas formaron un biofilm “fuerte” sobre los materiales de los que están fabricados los fermentadores industriales: el polietileno y la fibra de vidrio con poliéster. También se aprecian ciertas diferencias entre las distintas cepas utilizadas en cuanto a la adhesión a estos dos últimos tipos de superficie, siendo el polietileno, en la mayoría de los casos, el soporte más favorable. La cepa control, *E. faecalis* 1, forma un biofilm muy fuerte independientemente de la superficie sobre la que se desarrolle.

2.2.2.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Un factor importante que puede influir en la mayor o menor formación de un biofilm es la temperatura a la que se desarrollan los microorganismos. Para estudiar dicha influencia, las cepas de BAL se incubaron a tres temperaturas distintas (4 °C, 22-25 °C y 30 °C) durante 120 h, en placas de microtitulación. Transcurrido ese tiempo, se analizó la formación de biofilms por cada una de ellas a cada temperatura, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 30.

Como se puede observar, al aplicar el test estadístico de Scheffé, se comprobó que la formación de biofilms en todos los casos es sustancialmente mayor cuando las cepas crecían a temperatura ambiente (22-25 °C), siendo algo menor a 30 °C y prácticamente inexistente tras la incubación a 4 °C, debido probablemente a que a esta temperatura los microorganismos no deben estar metabólicamente activos. Con la aplicación de dicho test estadístico podemos determinar que las cepas *L. pentosus* LPCO10 y *P. parvulus* P339 incrementan de forma significativa la formación de biofilms a temperatura ambiente, algo que no ocurre en el resto de cepas ensayadas. Respecto a la cepa control, *E. faecalis* 1, existen diferencias entre la formación de biofilms a temperatura ambiente y 30 °C. Y aún siendo mayor a temperatura ambiente, las diferencias no son estadísticamente significativas.

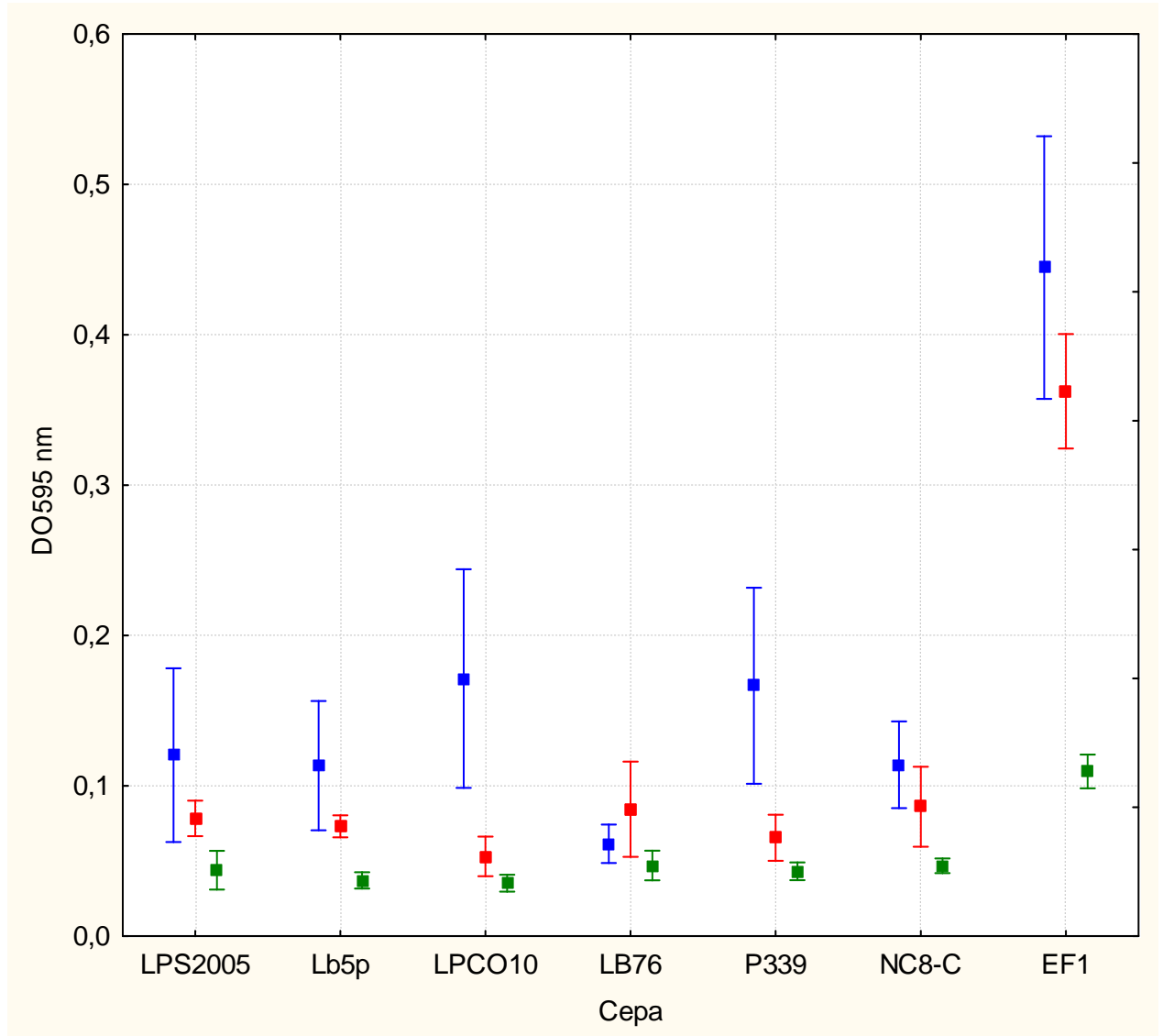


Figura 30. Valores medios (cuadrados) y límites de confianza (barras verticales, para $p=0,95$) deducidos del ANOVA para la formación de biofilms a distintas temperaturas de incubación por distintas cepas de BAL. (■) 4 °C; (■) temperatura ambiente (22-25 °C); (■) 30 °C. Como control del ensayo se utilizó *E. faecalis* 1. Cada dato representado se obtuvo mediante la ponderación de 12 réplicas del ensayo.

2.2.3.- INFLUENCIA DEL ACONDICIONAMIENTO DE LAS SUPERFICIES DE ADHESIÓN

Uno de los factores que tienen mayor influencia en la formación de biofilms es el grado de *acondicionamiento* de la superficie a colonizar. El *acondicionamiento* de una superficie es la preparación de ésta para la posterior adhesión de los microorganismos a la misma. El *acondicionamiento* de la superficie de un fermentador se puede llevar a cabo bien por medio de las salmueras que las bañan

(*acondicionamiento físico*) o bien por los microorganismos que las pueblan (*acondicionamiento biológico*). Generalmente, las superficies son *acondicionadas* con una fina película de moléculas orgánicas que resultan atractivas a los sistemas quimiotáctiles bacterianos, permitiendo así el desarrollo del biofilm (Reisner y *col.*, 2005; Vila y *col.*, 2008).

2.2.3.1.- ACONDICIONAMIENTO BIOLÓGICO

a) Por *Pediococcus*

Puesto que está descrito que cepas del género *Pediococcus* preceden a *L. pentosus* en la colonización de las salmueras, se utilizaron diferentes cepas de dicho género bacteriano para llevar a cabo tal *acondicionamiento*. Para ello, se realizaron cultivos sucesivos de distintas cepas de *L. pentosus* en pocillos de placas de microtitulación que habían sido previamente inoculados con las cepas *P. parvulus* P339, *P. pentosaceus* E11 o *P. pentosaceus* P56 y posteriormente lavados.

Como se observa en la Figura 31, no se aprecian diferencias en la intensidad del biofilm formado por las diferentes cepas de *L. pentosus* ensayadas, cualquiera que fuera la cepa de *Pediococcus* que colonizara previamente la superficie. En los tres casos, la progresión de la formación de biofilms es muy similar, aumentando conforme se repiten los cultivos sobre el mismo pocillo. En el caso de *E. faecalis* 1, utilizado como control, no existe relación entre el número de veces que se cultivó sobre la misma placa y la cantidad de biofilm formado, siendo siempre un biofilm muy fuerte, característico de esta cepa.

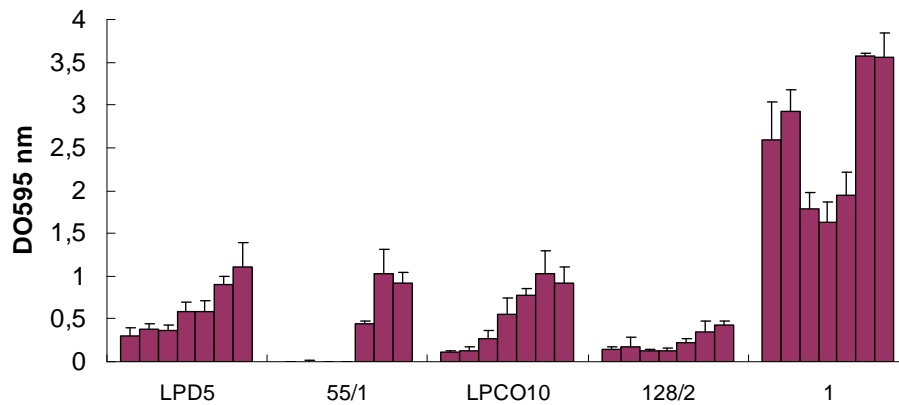
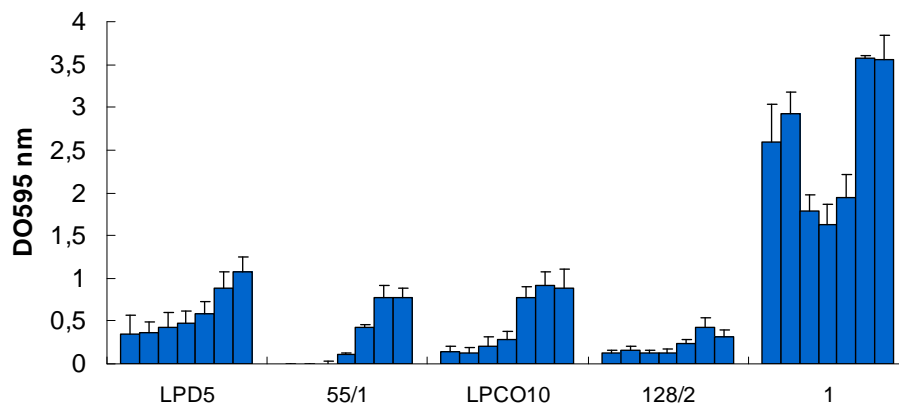
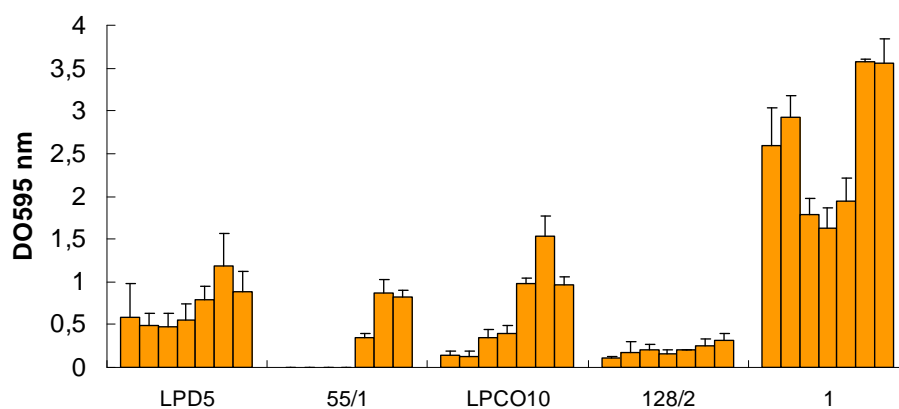
A

B

C


Figura 31. Formación de biofilms por cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas en placas de microtitulación, cuyos pocillos habían sido colonizados previamente por cepas de *Pediococcus*. **A.** Placa colonizada por *P. pentosaceus* E11. **B.** Placa colonizada por *P. parvulus* P339. **C.** Placa colonizada por *P. pentosaceus* P56. Cada barra se corresponde con el valor medio obtenido al cultivar cada cepa sobre los mismos pocillos de forma sucesiva, obteniéndose la desviación estándar a partir de 12 réplicas de la misma.

De igual forma, se procedió al *acondicionamiento* biológico de portaobjetos con la cepa *P. parvulus* P339. Tras la incubación durante 72 h a 30 °C, se cultivaron en éstos varias cepas de *L. pentosus* , tanto en cultivo puro como en cocultivo, durante un periodo similar y a continuación se cuantificaron las UFC adheridas a los portaobjetos (mediante MEB) y las libres en el medio de cultivo por conteo en placa. Los resultados se muestran en la Figura 32 y ponen de manifiesto que no existen diferencias significativas entre la adhesión a superficies *acondicionadas* y no *acondicionadas* (como control se utilizaron portaobjetos en los que no había crecido *P. parvulus* P339), siendo además el número de UFC adheridas a los portaobjetos (Figura 32A) menor que el número de lactobacilos libres en el medio de cultivo (Figura 32B).

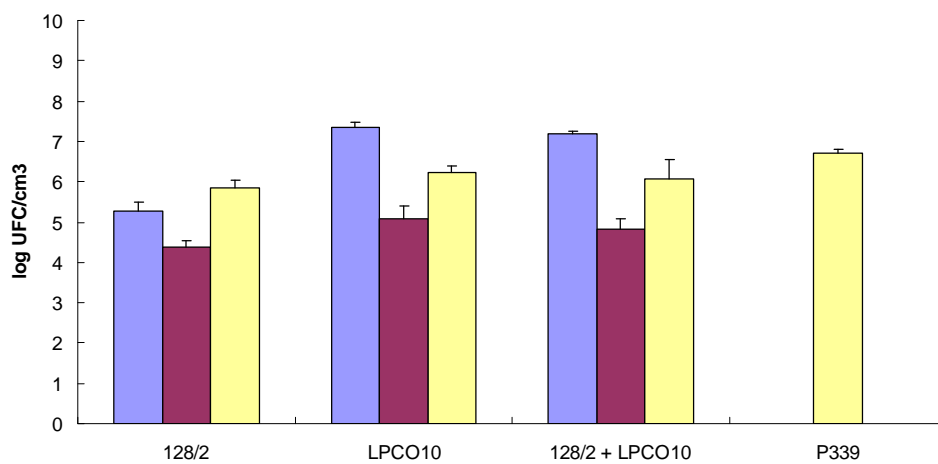
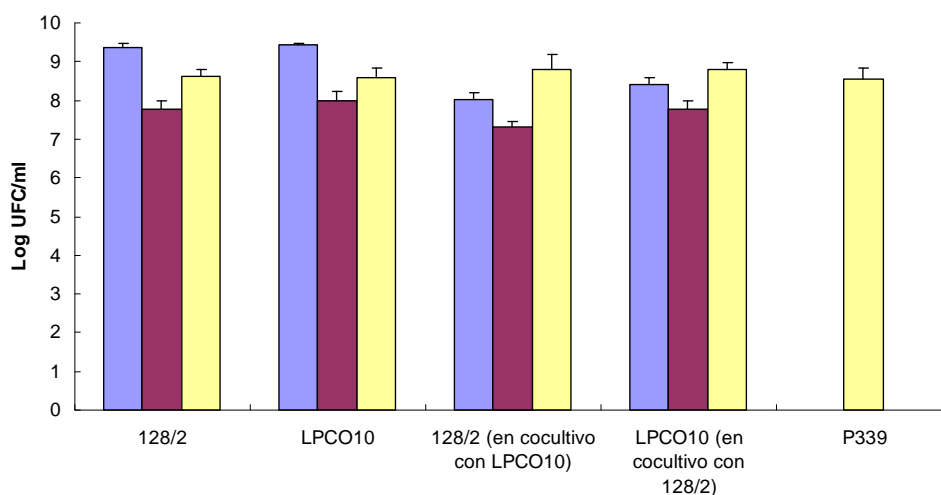
A

B


Figura 32. Estudio de la adhesión de *L. pentosus* en cultivo puro y en cocultivos. (A) UFC de las cepas indicadas adheridas a los portaobjetos (en el cocultivo *L. pentosus* 128/2- *L. pentosus* LPCO10 no es posible diferenciar entre ambas cepas); (B) UFC libres en el medio de cultivo (en el cocultivo de *L. pentosus* 128/2- *L. pentosus* LPCO10 sí es posible diferenciar ambas cepas). (■) Superficie sin acondicionar. (■) Superficie acondicionada. (■) *P. parvulus* P339.

b) Por *L. pentosus*

Con objeto de comprobar el *acondicionamiento* aumentaba la capacidad de formación de biofilms por aquellas cepas de nuestra colección que habían mostrado previamente una baja capacidad de formación de los mismos, se comparó dicha capacidad sobre placas de microtitulación nuevas frente a otras *acondicionadas* previamente por la cepa *L. pentosus* 128/2.

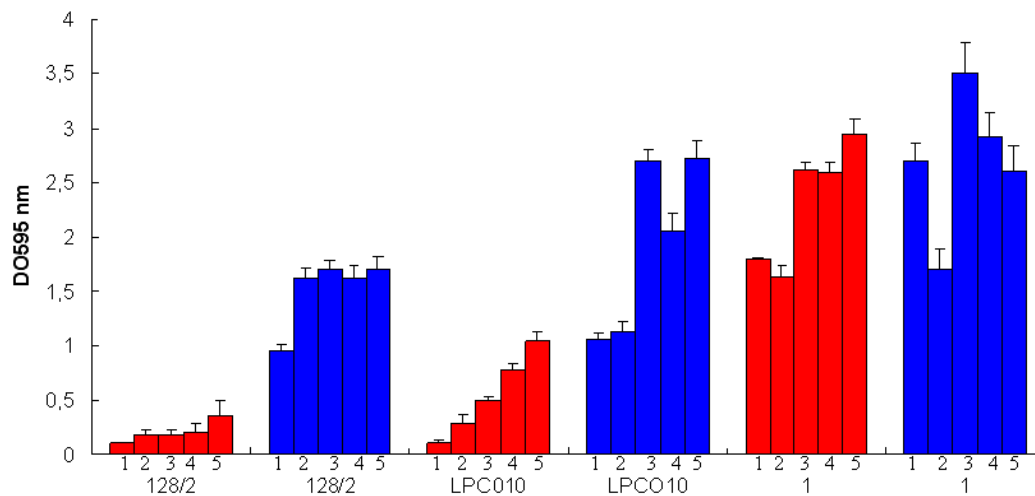


Figura 33. Progresión de la formación de biofilms por distintas cepas de BAL tras sucesivos cultivos en el mismo pocillo de placas de microtitulación (poliestireno). (■) Placa nueva; (■) placa previamente colonizada por *L. pentosus* 128/2. La numeración 1-5 indica el número de repetición del cultivo sobre el mismo pocillo de la placa de microtitulación. Los valores representados resultan de la ponderación entre 6 repeticiones del mismo.

En la Figura 33 se observa que cuando la placa se utiliza por primera vez las cepas empleadas son incapaces de formar biofilms (1■), pero conforme se va reutilizando dicha placa, la adhesión va aumentando (2■, 3■, 4■ y 5■). No obstante, cuando se utilizan placas cuyos pocillos han sido previamente colonizados por *L. pentosus* 128/2 (■), pero donde previamente se eliminó la cepa mediante lavados y tratamientos con alcohol (ver Materiales y Métodos), se comprobó que la capacidad de formación de biofilms por esas BAL era mucho mayor que cuando se utilizaban placas nuevas, sin *acondicionamiento* biológico, incluso desde la primera inoculación, manteniéndose o aumentando incluso dicha capacidad conforme se iban reinoculando (inoculaciones 1 a 5 ■).

2.2.3.2.- ACONDICIONAMIENTO FÍSICO

Para llevar a cabo estos estudios, se introdujeron portaobjetos en salmueras filtradas procedentes de un fermentador industrial tomadas a distintos tiempos del proceso fermentativo y a continuación se inocularon las salmueras con 10^5 UFC/ml de *L. pentosus* 128/2, *L. pentosus* LPCO10, *P. parvulus* P339 o con un cocultivo de 10^5 UFC/ml de *L. pentosus* 128/2 con 10^5 UFC/ml de *L. pentosus* LPCO10. Después de la inoculación, las muestras se incubaron a 28 °C durante 3, 6 y 10 días, tras lo cual se determinaron las bacterias presentes en la salmuera y las adheridas a los portaobjetos (UFC/cm², cuantificadas por MEB, según lo descrito en el apartado 7.8.1. de Materiales y Métodos), transformando este número en UFC/cm³ para ver las diferencias entre el número de bacterias adheridas y no adheridas.

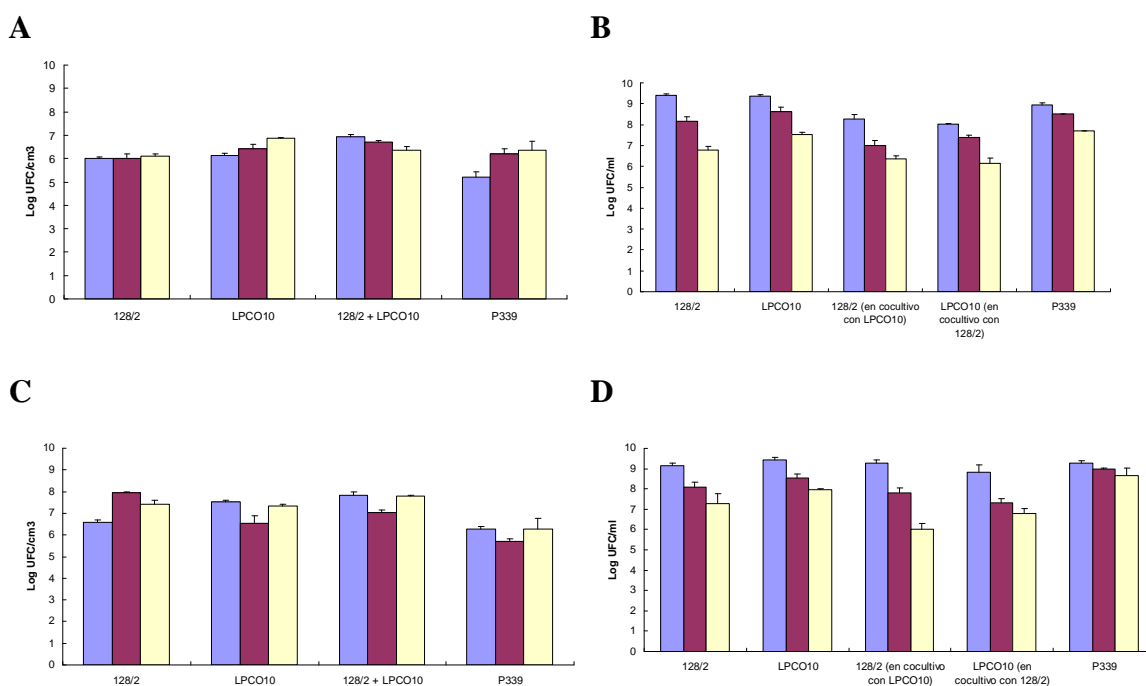


Figura 34. Cuantificación de los microorganismos adheridos a los portaobjetos acondicionados con salmueras, así como los presentes de forma libre en la salmuera. **A.** UFC/cm³ en los portaobjetos tras 3 días de *acondicionamiento*. **B.** UFC/ml en la salmuera tras 3 días de *acondicionamiento*. **C.** UFC/cm³ en los portaobjetos tras 30 días de *acondicionamiento*. **D.** UFC/ml en la salmuera tras 30 días de *acondicionamiento*. (■) 3 días de incubación, (■) 6 días de incubación y (■) 10 días de incubación. Los datos representados resultan de la media obtenida por el recuento de 5 conteos en placa (expresados como UFC/ml) o en fotografía (en UFC/cm³).

Como se puede observar en la Figura 34, al aumentar el tiempo de *acondicionamiento* de los portaobjetos de 3 a 30 días, la adhesión a los mismos

aumentaba en casi dos unidades logarítmicas (Figura 34A y 34C). A los 30 días de *acondicionamiento*, la diferencia existente entre el número de microorganismos en los portaobjetos y en el medio se acorta (Figura 34C y 34D). Finalmente, se observa que en la salmuera las UFC/ml van disminuyendo conforme aumenta el tiempo de incubación desde los 3 días a los 10 días, mientras que en los portaobjetos el número de bacterias adheridas se mantiene igual o aumenta ligeramente.

2.2.4.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES NO ACONDICIONADAS

A la vista de los resultados anteriores, se probó si la capacidad de formación de biofilms por las BAL se vería afectada si las superficies de adhesión se sometían a tratamientos de limpieza entre cultivos sucesivos de las mismas cepas en los mismos pocillos de las placas de microtitulación. Para ello, se utilizaron las BAL formadoras y no formadoras de biofilms siguientes: *E. faecium* T138, *L. plantarum* MC24, *L. hilgardii* LB76 y *P. parvulus* P339 y como control, la cepa *E. faecalis* 1, cultivándose a 30 °C durante 24 h. Se realizaron de forma paralela cultivos en dos placas de microtitulación, las cuales tras la cuantificación del biofilm formado se lavaban de dos formas diferentes: una de ellas con agua caliente y jabón y la otra, además, frotando cada pocillo con un bastoncillo de algodón.

En la Figura 35 se puede apreciar que existen claras diferencias en cuanto a la capacidad de formación de biofilms por las diferentes cepas ensayadas, dependiendo del procedimiento de lavado de los pocillos de la placa de microtitulación. Así, en las lavadas únicamente con agua y jabón (Figura 35A) se observa una progresión en la formación de biofilms, además de una mayor capacidad de formarlo tras cada lavado, a diferencia de los resultados que se presentan en la Figura 35B, donde el lavado es más exhaustivo (agua, jabón y bastoncillo de algodón). Esta misma tendencia se observa en todas las cepas ensayadas excepto en el caso de *E. faecalis* 1, cuya capacidad de formación de biofilms no se ve afectada por ningún tratamiento de la superficie de anclaje.

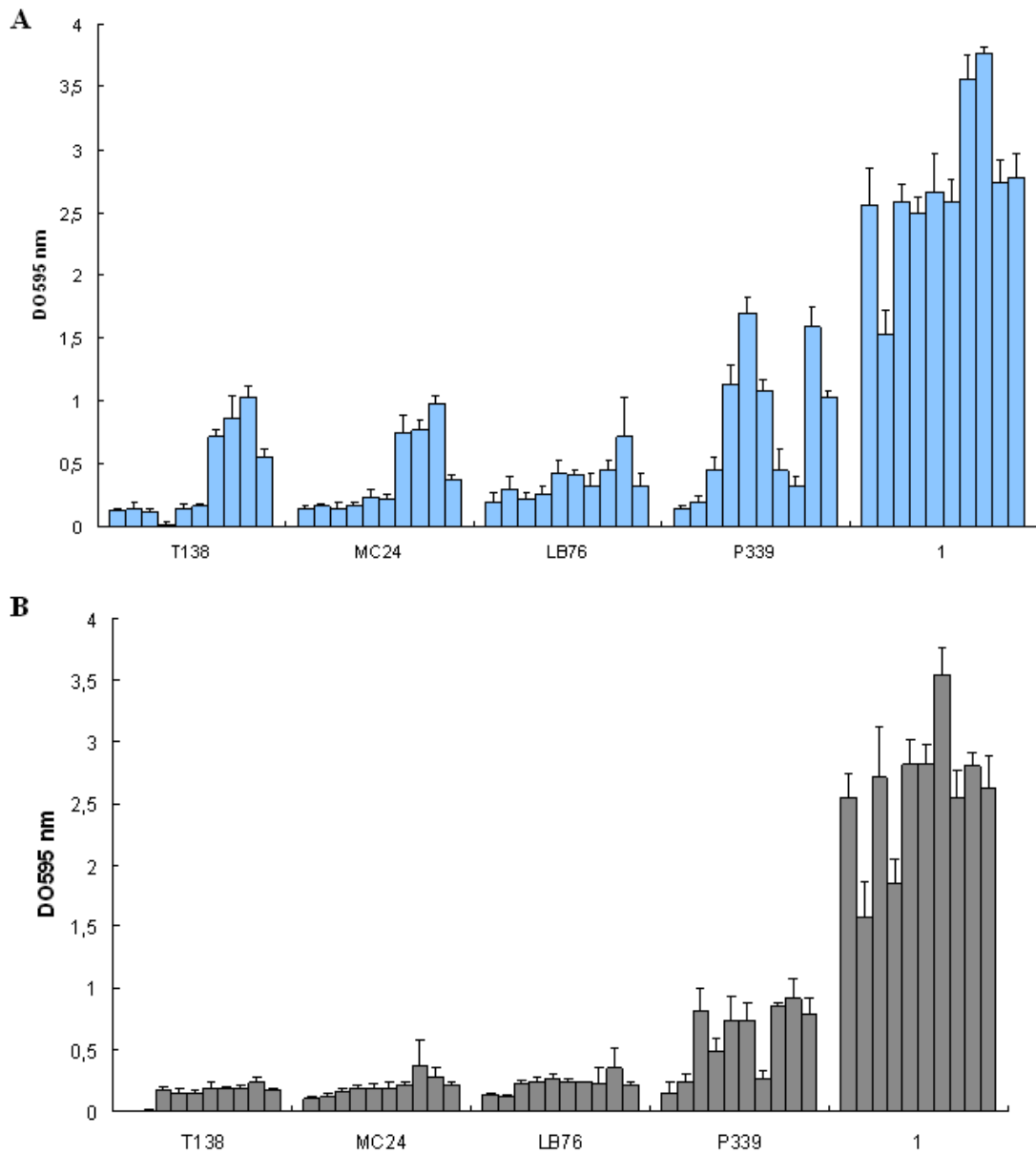


Figura 35. Progresión de la formación de biofilms tras sucesivos cultivos y diferentes lavados de los pocillos de una placa de poliestireno. **A.** Placa lavada con agua y jabón. **B.** Placa lavada con agua, jabón y bastoncillo. Los datos mostrados resultan de la ponderación del valor obtenido en 12 pocillos de la placa de microtitulación en las mismas condiciones.

2.2.5.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PRESENCIA DE BACTERIOCINAS

Por otro lado, se estudió si la presencia de bacteriocinas en el medio de cultivo podría afectar a la capacidad de las BAL para formar biofilms. Como modelo, se escogió la cepa *E. faecalis* 1 ya que forma un biofilm muy fuerte como se ha mostrado anteriormente. Para ello se cultivó dicha cepa en una placa de microtitulación en

presencia de distintas concentraciones de bacteriocinas previamente prepurificadas, determinándose para cada pocillo de la placa de microtitulación el número de UFC/ml y el biofilm formado en cada uno de ellos.

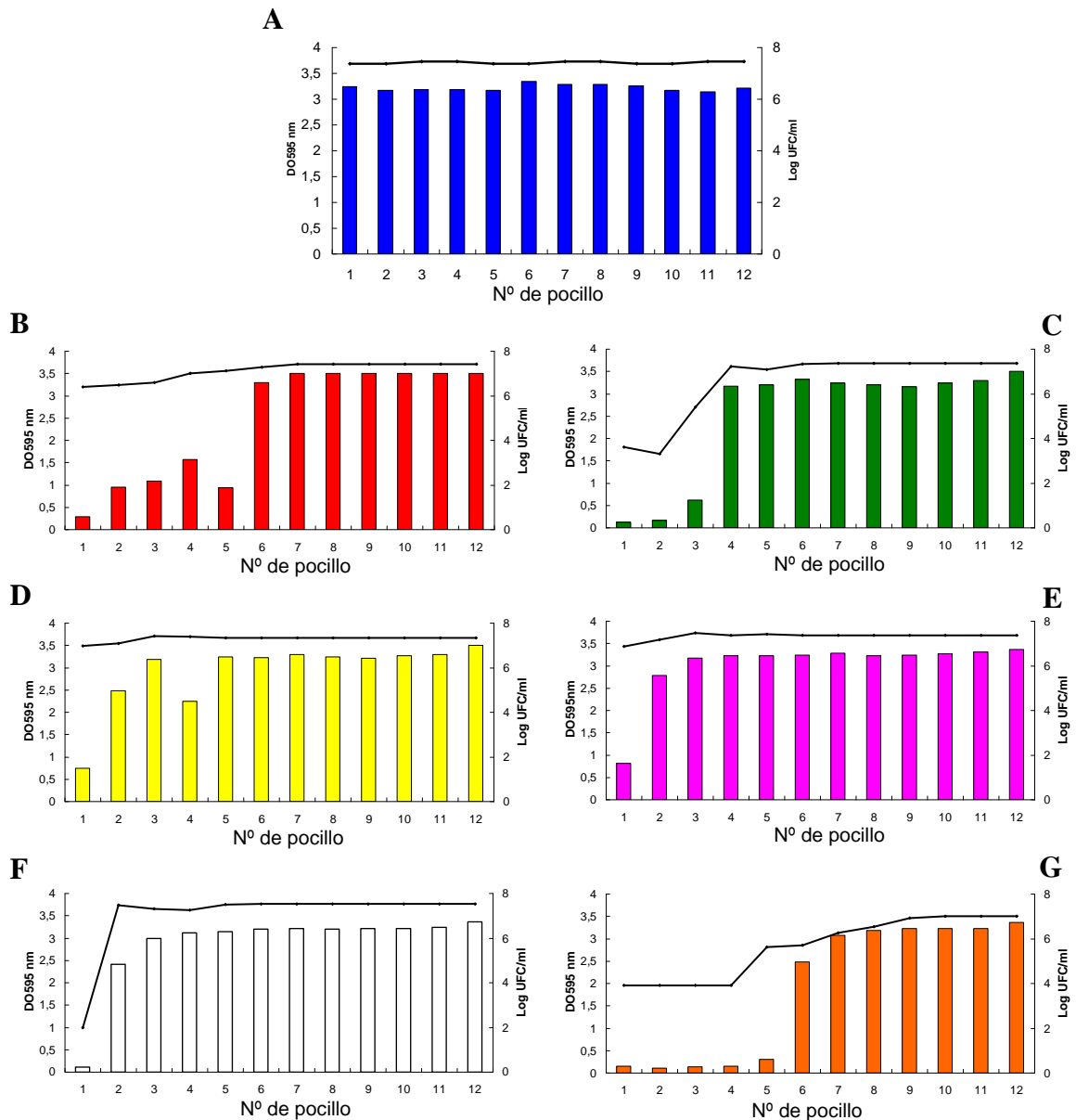


Figura 36. Formación de biofilms y curvas de crecimiento de *E. faecalis* 1 en placas de microtitulación en presencia de bacteriocinas. Control sin bacteriocinas (■). Formación de biofilms en presencia de: mundticina (■), enterocinas L50A y L50B (■), plantaricina S (■), plantaricinas NC8, E/F y J/K (■), bacteriocina RC714 (□), y enterocina A (■). (—), UFC/ml de *E. faecalis* 1. Cada pocillo contiene una dilución en base 2 de la bacteriocina del pocillo anterior.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de determinadas bacteriocinas en el medio hace disminuir drásticamente la formación de biofilms por *E. faecalis* 1.

Por ejemplo, la mundticina a concentraciones comprendidas entre 640 y 20.480 UB/ml. Dicha disminución no es debida a una disminución del número de enterococos (Figura 36B), que se mantiene constante independientemente de la concentración de bacteriocina en el medio. Por otro lado, en presencia de enterocinas L50A y L50B (producidas por *E. faecium* 6T1a) hay una clara disminución de la formación de biofilms a concentraciones altas de dichas bacteriocinas, debido a una disminución del número de UFC/ml, tal y como se observa en la Figura 36C.

En presencia de plantaricinas S (de *L. pentosus* LPCO10) y PLNC8, E/F y J/K (de *L. plantarum* NC8), el comportamiento de la cepa *E. faecalis* 1 es similar: disminución de la formación de biofilms a concentraciones elevadas de bacteriocina pero sin disminución de las UFC/ml en ningún caso (Figuras 36D y 36E respectivamente). La bacteriocina RC714 (producida por la cepa *E. faecium* RC714) a su concentración máxima provoca una disminución de la formación de biofilms que se correlaciona con una disminución del número de bacterias (Figura 36F). Por último, la enterocina A (producida por la cepa *E. faecium* CTC492) afecta a la formación de biofilms y al crecimiento de *E. faecalis* 1 a concentraciones altas pero también actúa inhibiendo el crecimiento de la cepa. (Figura 36G).

2.2.6.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN SUPERFICIES SATINIZADAS CON DIFERENTES BACTERIOCINAS

Tanto a nivel industrial como a nivel médico, existe un gran interés por el tratamiento de superficies para evitar la formación de biofilms. A nivel sanitario pueden originar problemas de salubridad y a nivel industrial, las cepas presentes en los biofilms pueden interferir en el desarrollo de cultivos iniciadores en las fermentaciones de alimentos. Un tratamiento eficaz consiste en tratar las superficies de interés con bacteriocinas para impedir o dificultar la formación de dichos biofilms. En este estudio, se probó si la capacidad de formación de biofilms por distintas cepas se veía afectada cuando la superficie a colonizar había sido expuesta a bacteriocinas producidas por diferentes BAL.

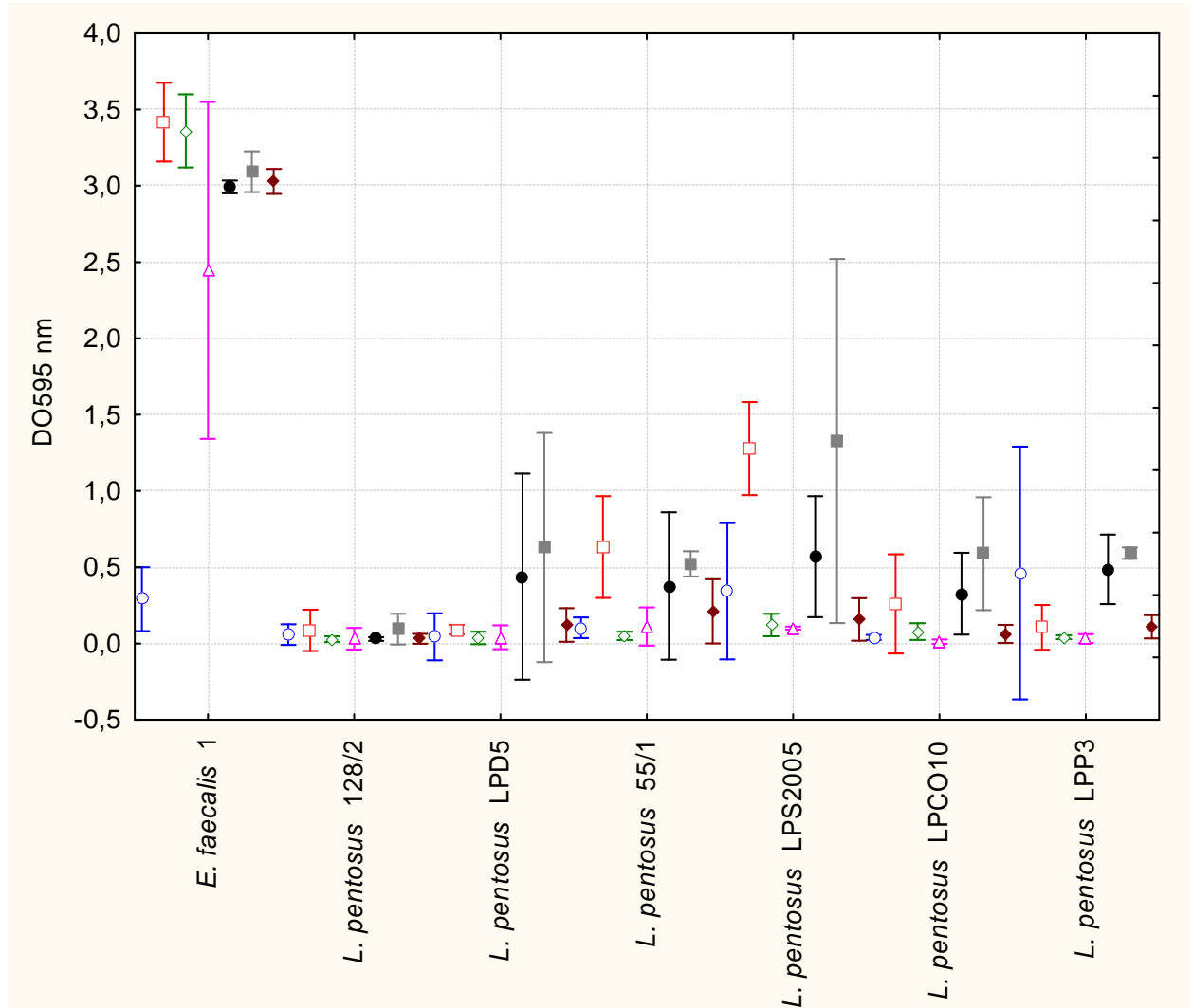


Figura 37. Valores medios y límites de confianza ($p=0,95$) deducidos del ANOVA para la formación de biofilms en pocillos de placas de microtitulación satinizadas con bacteriocinas. Superficie satinizada con: enterocina A (○), plantaricinas S (□), bacteriocina RC714 (◇), mundticina (△), enterocinas L50A y L50B (●), plantaricinas NC8-C, EF y JK (■), superficie no satinizada (◆). Resultados obtenidos de la ponderación de 6 réplicas en cada caso.
* Saturación en la medida.

Como se observa en la Figura 37, el efecto producido por las bacteriocinas empleadas en la satinización de las placas sobre la capacidad de formación de biofilms por diversas BAL fue ligeramente diferente según la cepa empleada, observándose en ciertos casos una aparente estimulación de la formación de biofilms, siendo ésta más llamativa en el caso de las cepas LPS2005 y 55/1. Estadísticamente, se observan diferencias significativas de aumento de la formación de biofilms en los cultivos de *L. pentosus* 55/1 y LPCO10 sobre superficies satinizadas con plantaricinas NC8-C, EF y

JK, en *L. pentosus* LPS2005 con plantaricina S y en *L. pentosus* LPP3, sobre superficies tratadas con plantaricinas NC8-C, EF y JK y enterocinas L50A y L50B. Es en la cepa control, *E. faecalis* 1, donde encontramos los dos tipos de comportamiento frente a superficies satinizadas, existiendo tanto disminución como incremento significativo de la formación de biofilms. Así, las superficies satinizadas con pantaricinas S o bien con bacteriocina RC714 estimulan la formación de biofilms, aunque este efecto no es demasiado llamativo. Por el contrario, es muy llamativa la disminución en la formación de biofilms, llegando a ser casi nula, cuando la superficie se encuentra satinizada con la enterocina A (Figura 37).

2.2.7.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PRESENCIA DE EXOPOLISACÁRIDO

Se estudió también la influencia que puede ejercer el exopolisacárido extraído de las salmueras de fermentación sobre la formación de biofilms por diferentes cepas de BAL. Para ello, se ensayaron distintas concentraciones de dicho compuesto. Como se puede observar en la Figura 38, no existen diferencias significativas en cuanto a la capacidad de formación de biofilms ni en presencia ni en ausencia de dicho producto en el medio.

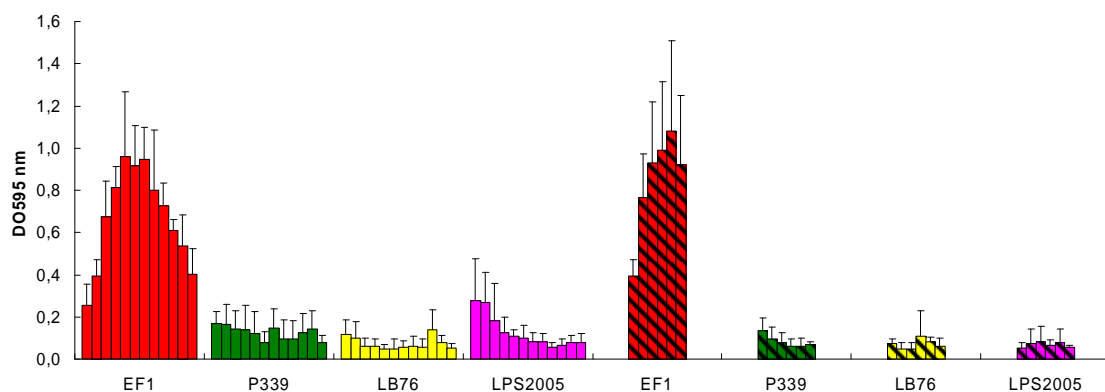


Figura 38. Formación de biofilms en pocillos de una placa de poliestireno en presencia de exopolisacárido extraído de las salmueras de fermentación de aceitunas verdes. Las columnas con colores sin rayar se corresponden con los cultivos en presencia de exopolisacárido, mientras que las columnas con los colores rayados se corresponden a cultivos en ausencia de exopolisacárido. Cada columna se corresponde con un pocillo y cada uno contiene una dilución en base 2 del exopolisacárido que contenía el pocillo anterior. Los resultados mostrados resultan de la ponderación entre 4 repeticiones del ensayo.

2.2.8.- FORMACIÓN DE BIOFILMS POR CULTIVOS MIXTOS DE BAL

En algunos casos descritos en la bibliografía, la capacidad de formación de biofilms se puede ver potenciada o inhibida cuando las BAL se encuentran en cocultivo con otros microorganismos de su misma o diferente especie. Para investigar tal extremo, se realizaron distintos cocultivos en placa de microtitulación previamente colonizadas por *Pediococcus*.

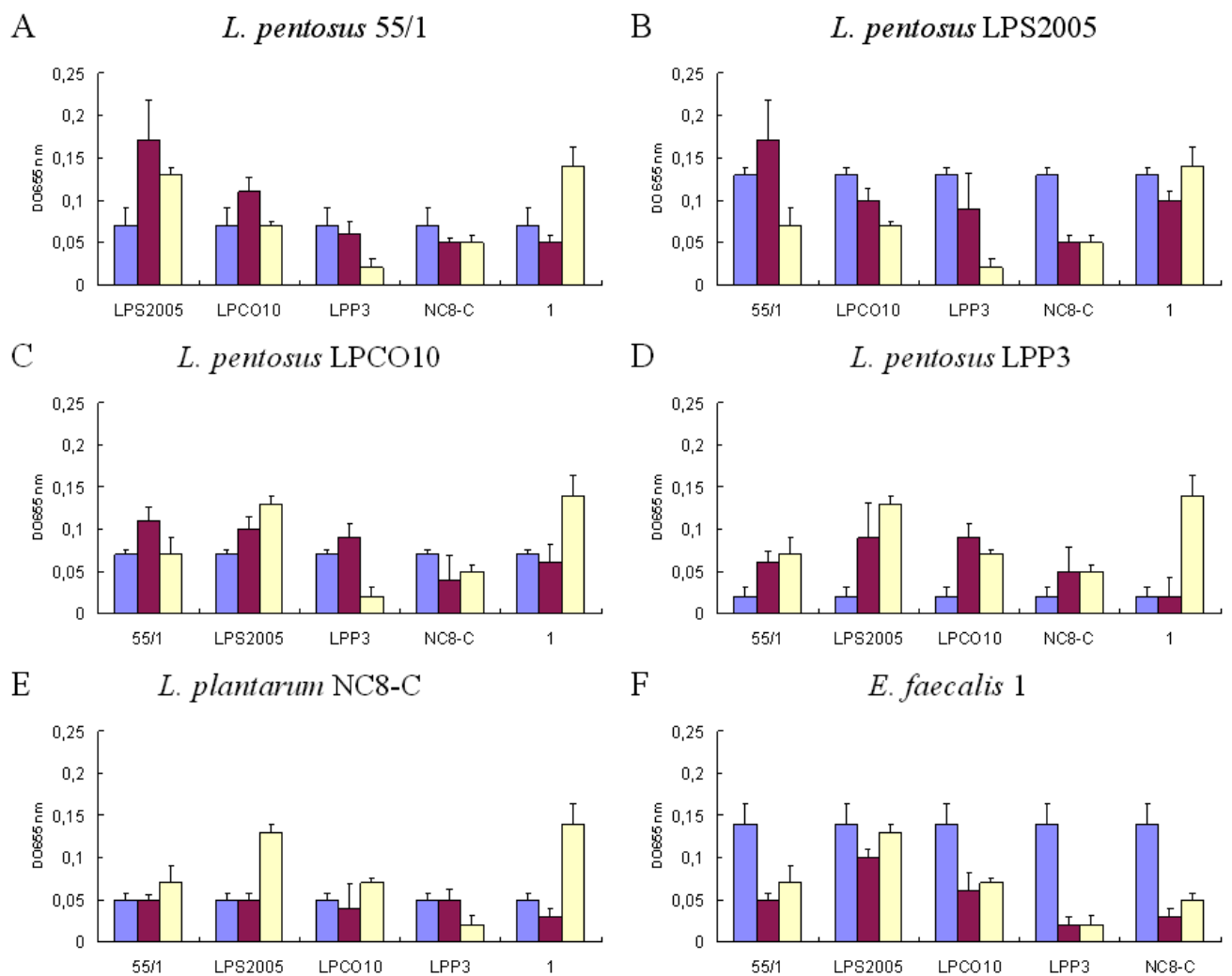
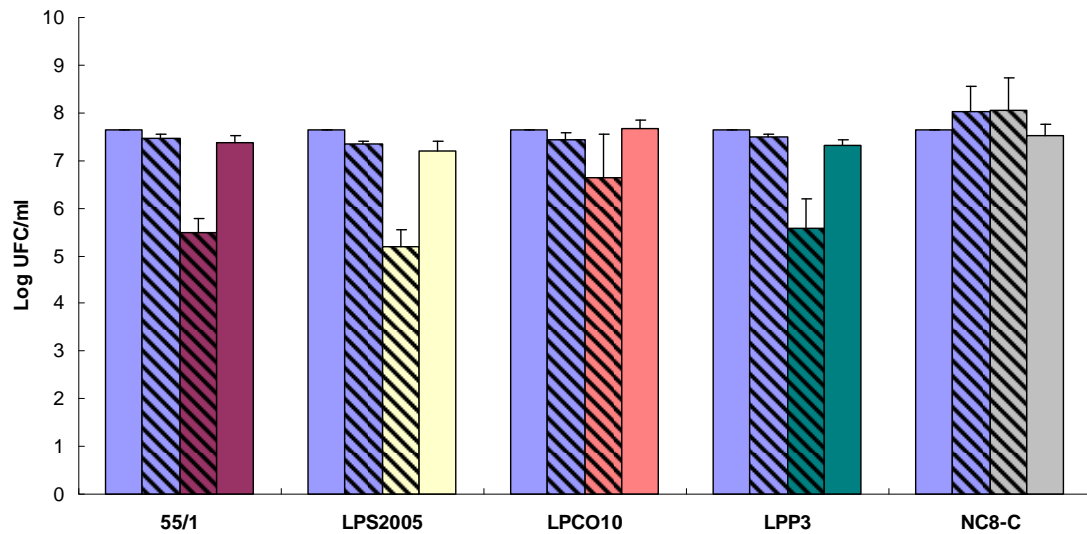


Figura 39. Formación de biofilms en cocultivos de distintas cepas de BAL. (■) Monocultivo de la cepa indicada en la parte superior (■) Cocultivo de la cepa indicada en la parte superior con la correspondiente cepa del eje X (■) Monocultivo de la cepa indicada en el eje X. Las barras de error se obtuvieron mediante la realización de 6 réplicas.

A



B

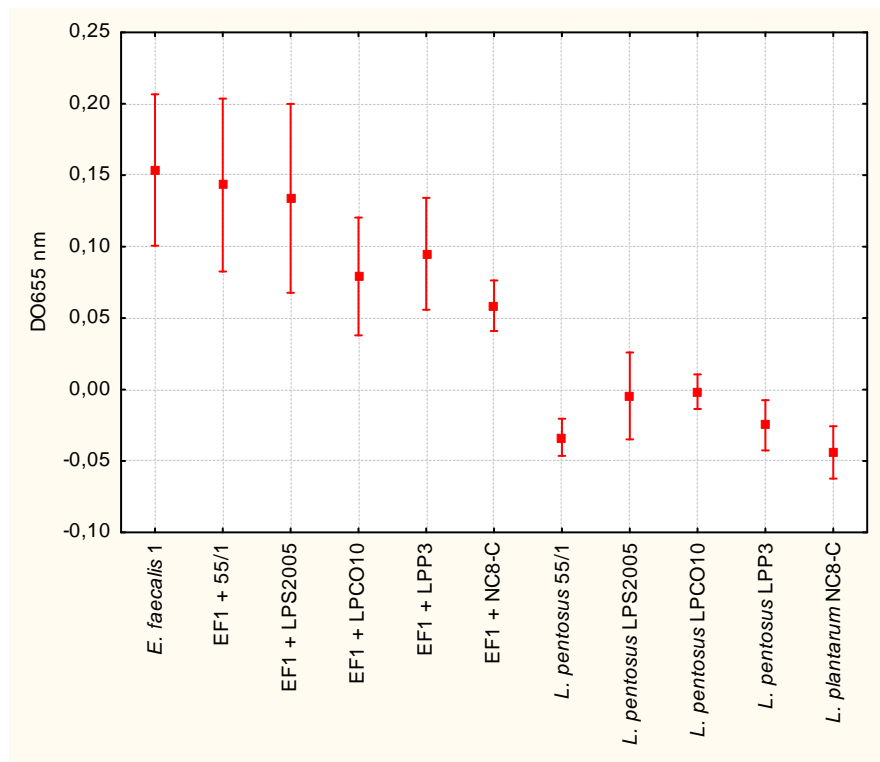


Figura 40. Crecimiento bacteriano y formación de biofilms en cocultivos de *E. faecalis* 1 con cepas de *Lactobacillus*. **A.** Crecimiento de *E. faecalis* 1 en cultivo puro (■) y en cocultivo (▣), con cada una de las cepas indicadas en abscisas. Cultivos puros de las cepas 55/1 (■), LPS2005 (■), LPCO10 (■), LPP3 (■) y NC8-C (■); en rayado los cocultivos de éstas (mismos colores) con *E. faecalis* 1. **B.** Análisis de los valores medios y límites de confianza ($p=0,95$) deducidos del ANOVA para la formación de biofilms por *E. faecalis* 1 en cultivo puro y en cultivos mixtos.

Como se puede observar en la Figura 39, existen dos pautas diferentes en la formación de biofilms por las cepas de BAL ensayadas. Comparado con su monocultivo

respectivo, en unos casos se produce un incremento de la formación de biofilms, como en los cocultivos 55/1-LPS2005 y 55/1-LPCO10 (Figura 39A). Sin embargo, en la mayoría de los casos se produce una disminución de la formación de biofilms en el cocultivo, siendo uno de los casos más llamativos el de la cepa utilizada como control, *E. faecalis* 1 (Figura 39F). Esto podría deberse a una disminución del número de bacterias, por lo que se procedió a su determinación.

Como se observa en la Figura 40A, no existen apenas diferencias entre el crecimiento de *E. faecalis* 1 en cultivo puro (monocultivo) y en cocultivo. Sin embargo, la formación de biofilms disminuye sustancialmente en algunos de los cultivos mixtos (Figura 40B), siendo únicamente en el caso del cocultivo con *L. plantarum* NC8-C donde esta disminución es estadísticamente significativa.

2.2.9.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN CULTIVOS MIXTOS *L. pentosus*-LEVADURAS

Puesto que las poblaciones de *L. pentosus* y levaduras coexisten a lo largo de todo el proceso fermentativo, se estudió *in vitro* si la interacción entre ambos grupos de microorganismos tenía alguna influencia en la formación de biofilms mixtos.

Utilizando levaduras aisladas de fermentadores industriales, se realizaron cocultivos en placa de microtitulación de éstas con cada una de las dos cepas *L. pentosus*, 128/2 y LPCO10, utilizando como medio de cultivo salmuera filtrada de un fermentador industrial. Además, antes de la cuantificación del biofilm, se tomaron muestras de cada una de las combinaciones y se depositaron sobre un portaobjetos, los cuales se procesaron para su visualización por microscopía electrónica de barrido.

En la Figura 41 se observa que *Pichia galeiformis* y la levadura A (aún por identificar) en monocultivo forman un biofilm fuerte, mientras que en el caso de *Candida tropicalis* éste es débil. Cuando *L. pentosus* 128/2 se cocultivó con cada una de las tres cepas de levaduras (Figura 41A), en todos los casos disminuyó la formación de biofilms, siendo más llamativo en el caso del cocultivo con la levadura A. De forma similar sucede en los cocultivos de *L. pentosus* LPCO10 con las tres especies de

levaduras (Figura 41B). Igualmente, cuando se cocultivaron las dos cepas 128/2 y LPCO10 a la vez con cada una de las levaduras, se produjo una drástica disminución de la formación de biofilms de las levaduras respecto a sus respectivos controles. (Figura 41C).

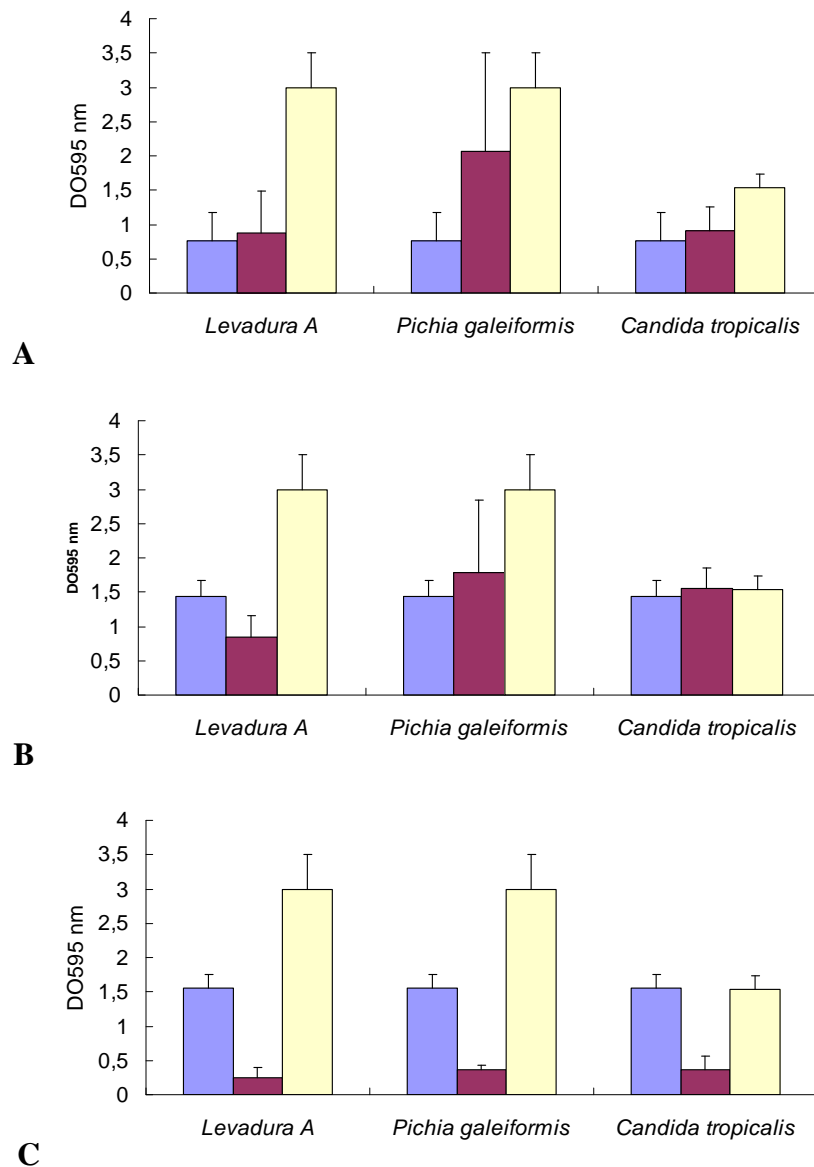


Figura 41. Formación de biofilms en cultivos mixtos BAL/levaduras. **A.** *L. pentosus* 128/2 en monocultivo (■), cultivo mixto 128/2-levadura (■), monocultivo de la levadura indicada (■). **B.** *L. pentosus* LPCO10 en monocultivo (■), cultivo mixto LPCO10-levadura (■), monocultivo de la levadura indicada (■). **C.** *L. pentosus* 128/2 y LPCO10 en cocultivo (■), cultivo mixto de 128/2-LPCO10-levadura (■), monocultivo de la levadura indicada (■). Los datos representados se obtuvieron de la ponderación de 6 réplicas del ensayo.

En la Figura 42 se muestra en micrografías al MEB el mismo experimento, pudiéndose corroborar de forma visual los resultados obtenidos.

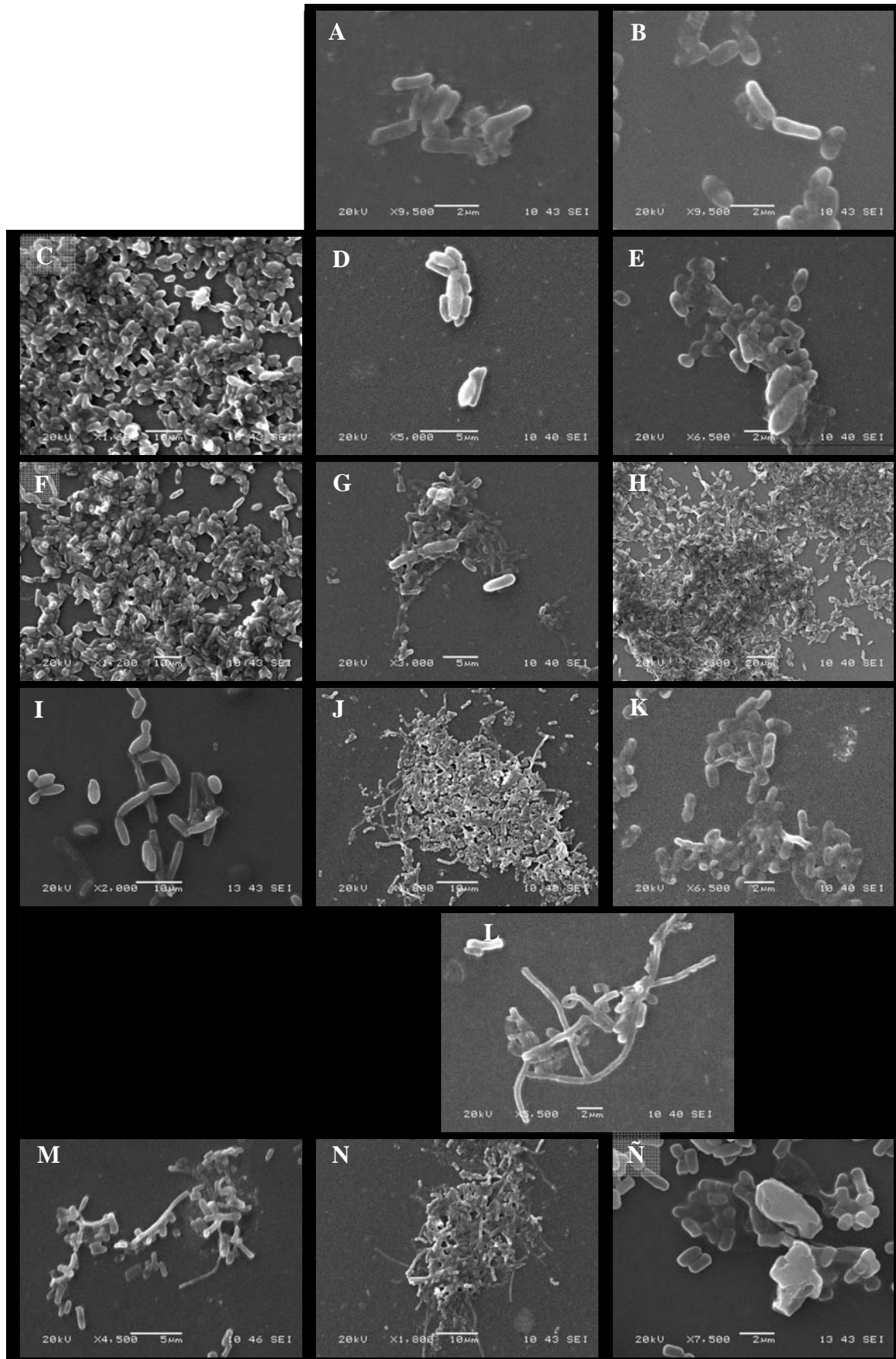


Figura 42. Fotografías al MEB de la formación de biofilms en cultivos mixtos BAL/levaduras. **A.** *L. pentosus* 128/2 en monocultivo. **B.** *L. pentosus* LPCO10 en monocultivo. **C.** Levadura A en monocultivo. **D.** Cultivo mixto 128/2-levadura A. **E.** Cultivo mixto LPCO10-levadura A. **F.** *P. galeiformis* en monocultivo. **G.** Cultivo mixto 128/2-*P. galeiformis*. **H.** Cultivo mixto LPCO10-*P. galeiformis*. **I.** *C. tropicalis* en monocultivo. **J.** Cultivo mixto 128/2-*C. tropicalis*. **K.** Cultivo mixto LPCO10-*C. tropicalis*. **L.** Cultivo mixto 128/2-LPCO10. **M.** Cultivo mixto 128/2-LPCO10-levadura A. **N.** Cultivo mixto 128/2-LPCO10-*P. galeiformis*. **Ñ.** Cultivo mixto 128/2-LPCO10-*C. tropicalis*.

Finalmente, a fin de comprobar si las diferencias observadas en la formación de biofilms en los cocultivos de *L. pentosus* con levaduras eran significativas, se aplicó al mismo ensayo el test estadístico de Scheffé, obteniéndose los resultados representados en la Figura 43. En dicha figura podemos observar que la disminución de la formación de biofilms por la “levadura A” y por *Pichia galeiformis* cuando se encuentra en cualquiera de los cocultivos es significativa. Sucede lo mismo en el cocultivo de *Candida tropicalis* con el cultivo mixto de *L. pentosus* 128/2 y LPCO10.

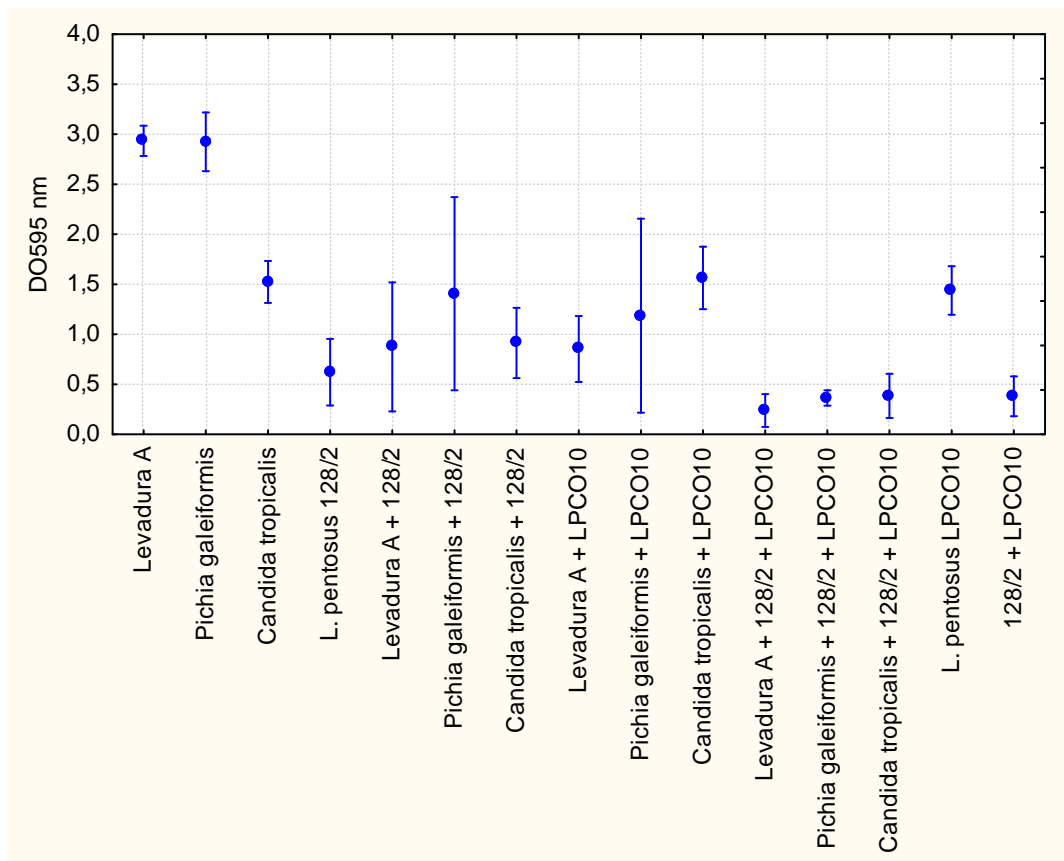


Figura 43. Valores medios y límites de confianza ($p=0,95$) deducidos del ANOVA para la formación de biofilms mixtos BAL-levaduras.

2.2.10.- ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA FORMACIÓN DE BIOFILMS MIXTOS *L. pentosus*-LEVADURAS

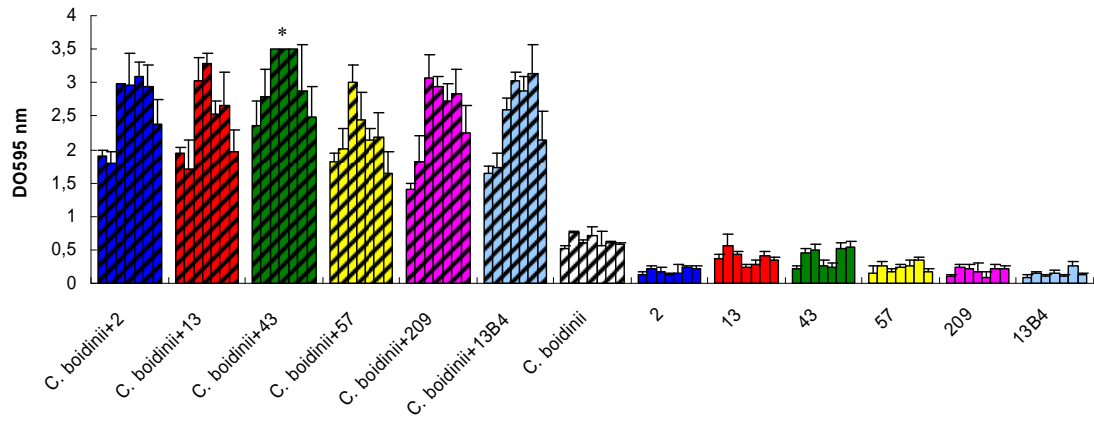
2.2.10.1.- INFLUENCIA DE LA CAPACIDAD DE COAGREGACIÓN DE *L. pentosus*

En ciertos casos, cuando levaduras y bacterias se encuentran en cocultivo, se produce *coagregación*, que se define como la agregación entre microorganismos genéticamente diferentes. Puesto que se ha demostrado la importancia de que los microorganismos probióticos posean esta propiedad (Castagliuolo y col., 2005), se ensayó si dicha capacidad estaba relacionada con la formación de biofilms.

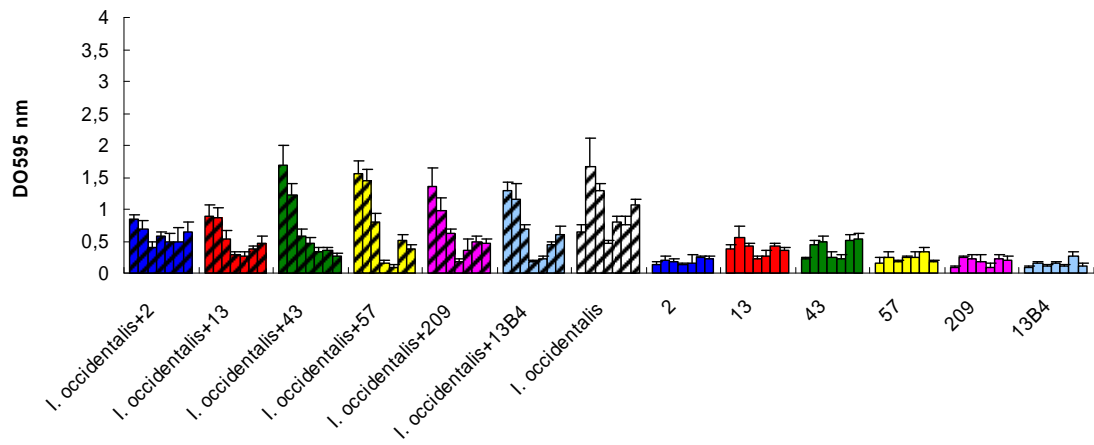
Para estos ensayos se escogieron diversos géneros de levaduras que se encuentran habitualmente en las fermentaciones de aceitunas, así como cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentadores industriales y de la nave experimental del Departamento de Biotecnología del Instituto de la Grasa, cuya capacidad de coagregación, según el método descrito por Pretzer y col., 2005, se había comprobado previamente. Las levaduras utilizadas fueron: *Candida boidinii*, *Issatchenkia occidentalis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Debayomyces etchellsii*. Y las cepas de *L. pentosus*, 2, 13, 43, 57, 209 y 13B4, las 5 primeras aisladas de salmuera y la última, de un biofilm de aceitunas fermentadas tipo Gordal.

Se ensayó la formación de biofilms de cada una de las levaduras y de las cepas de *L. pentosus*, tanto por separado como en cocultivo, a lo largo de 7 días de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 44.

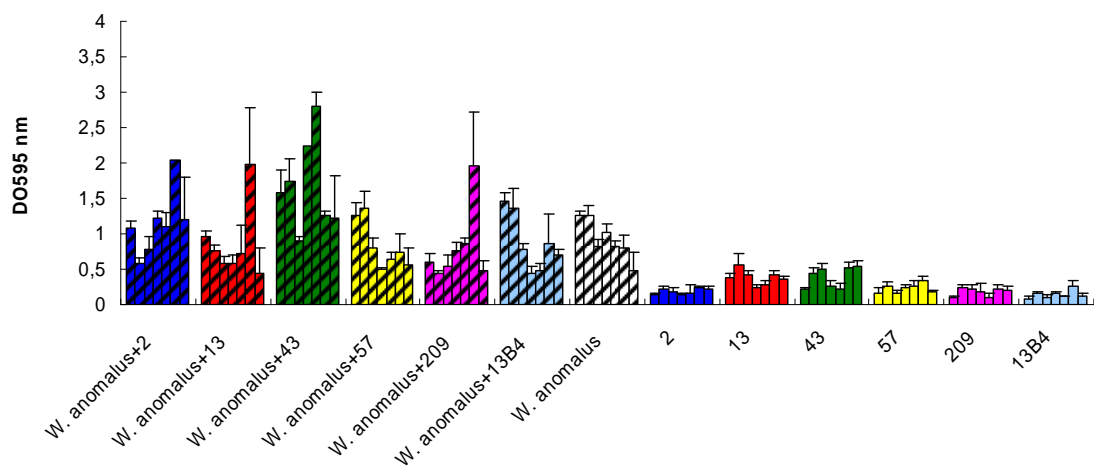
A



B



C



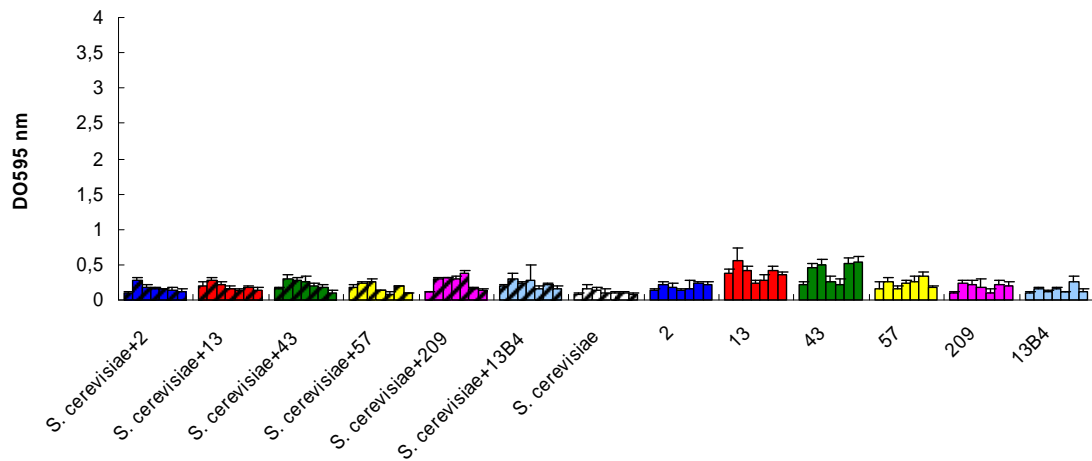
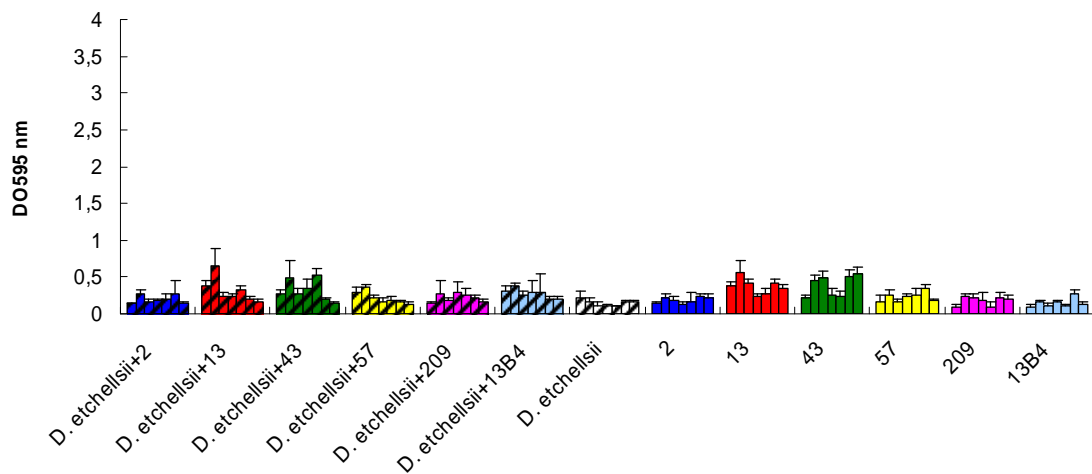
D

E


Figura 44. Formación de biofilms mixtos *L. pentosus*-levaduras, ambas aisladas de fermentaciones de aceitunas. En rayado con el fondo blanco, cultivo puro de la levadura y en color liso, cultivo puro de la cepa de *L. pentosus* correspondiente. En rayado y color, cocultivo de las cepas indicadas. Cada columna se corresponde con un día de incubación. Los datos obtenidos resultan de la ponderación de 6 réplicas para cada caso.

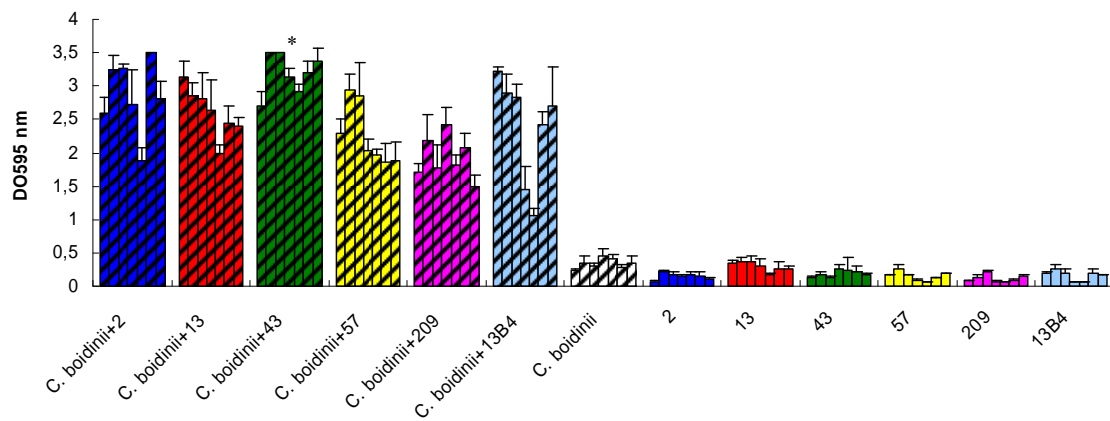
* Saturación en la medida.

Como se observa, por regla general, a partir del tercer día de incubación es cuando el biofilm se hace más evidente, incrementándose levemente a lo largo de los días sucesivos o disminuyendo, dependiendo de la pareja *L. pentosus*-levadura ensayada. Por ello, en las pruebas siguientes se ensayó la formación de biofilms tras 3 días de incubación.

Por otro lado, es evidente que ninguna de las cepas de *L. pentosus* tiene la capacidad de formar biofilms cuando están en cultivo puro (como se comprobó anteriormente), lo mismo que las levaduras, excepto en los casos de *C. boidinii*, *I.*

occidentalis y *W. anomalus*, donde se observa la formación de un leve biofilm. Por el contrario, cuando se realizaron cultivos mixtos entre estas levaduras y las BAL, se apreció un incremento muy notable en la formación de biofilms en los cocultivos con *C. boidinii* y *W. anomalus* (Figuras 44A y 44C). Sin embargo, en el caso de los cocultivos con *S. cerevisiae* y *D. etchellsii*, se observa el mismo patrón de formación de biofilms tanto en los cultivos puros como en los cultivos mixtos, en los que en ambos casos es prácticamente nula (Figuras 44D y 44E).

A



B

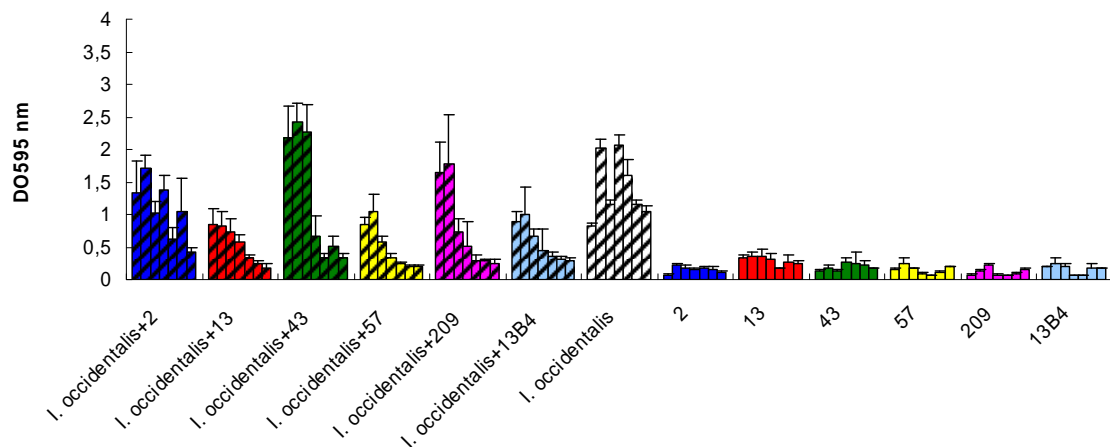


Figura 45. Formación de biofilms en cocultivos BAL-levaduras en presencia de manosa. En rayado, cocultivo de las cepas BAL-levaduras; en rayado con el fondo blanco, levadura en cultivo puro; y en color liso, BAL en cultivo puro. Cada columna se corresponde con un día de incubación. Los datos representados resultan de la ponderación de 6 réplicas.

* Saturación en la medida.

Según lo descrito por Pretzer y *col.*, 2005, en ciertos casos la coagregación BAL-levaduras se puede ver inhibida por la presencia de manosa, debido a que dicho fenómeno está mediado por receptores dependientes de éste azúcar. Por ello, se comprobó si la adición de este azúcar afectaba a la formación de biofilms por aquellas levaduras en las que se había demostrado previamente que formaban biofilms en cocultivo con BAL. Para ello, se procedió de forma similar a la descrita en el apartado 7.9.2 de Materiales y Métodos, añadiendo además manosa a una concentración final de 0,1 M, siguiéndose la evolución del biofilm formado a lo largo de 7 días de incubación.

Como se puede observar en la Figura 45, ninguna de las dos cepas de levaduras experimentaron cambios en su capacidad de adhesión a superficies en presencia de manosa, ya que se obtuvieron resultados similares a los de en ausencia de manosa, tal y como se puede apreciar al compararlos con los de la Figura 44. La adición de manosa inhibe la coagregación BAL-levadura, como se comprobó al observar los cocultivos bajo el microscopio óptico, correspondiéndose con lo descrito por Pretzer y *col.*, 2005, por lo que se puede deducir que en nuestro caso, la coagregación no está relacionada con la formación de biofilms.

2.2.10.2.- INFLUENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES: TIROSOL, HIDROXITIOSOL, HIDROXITIOSOL-OH Y OLEUROPEÍNA

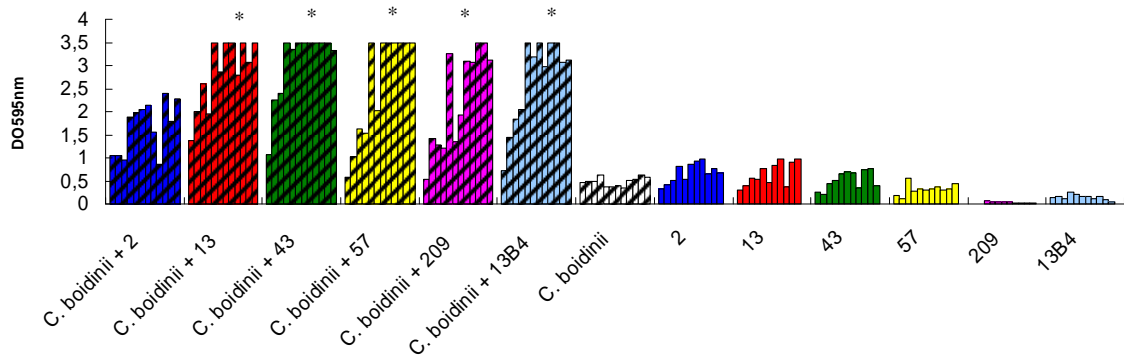
Tanto el tirosol como el hidroxitirosol, el hidroxitirosol-OH y la oleuropeína, son compuestos polifenólicos presentes en las fermentaciones de aceitunas, por lo que se estudió si éstos tenían alguna influencia sobre la capacidad de formación de biofilms mixtos BAL-levaduras.

Según la pareja *L. pentosus*-levadura de que se tratase, el tirosol tuvo distintos efectos. Así, en todos los cocultivos de *C. boidinii* con las diferentes cepas de *L. pentosus* (Figura 46A) se produjo una disminución en la formación de biofilms cuando el tirosol se encontraba a altas concentraciones, viéndose tal efecto al ser comparados con los formados en ausencia de éste (Figura 44A). Conforme la concentración de

polifenol disminuye, aumenta la formación de biofilms, llegando a ser superior a la observada en ausencia completa de tirosol y alcanzando su máximo a concentraciones por debajo de 0,054 g/l, donde se saturan las medidas para la formación de biofilms.

Por el contrario, en los cocultivos de *L. pentosus* con *I. occidentalis* (Figura 46B) no se observaron grandes diferencias en el grado de formación de biofilms en presencia o en ausencia de tirosol (Figura 44B), excepto en el caso del cocultivo con *L. pentosus* 209, donde para todas las concentraciones ensayadas el biofilm formado era muy fuerte.

A



B

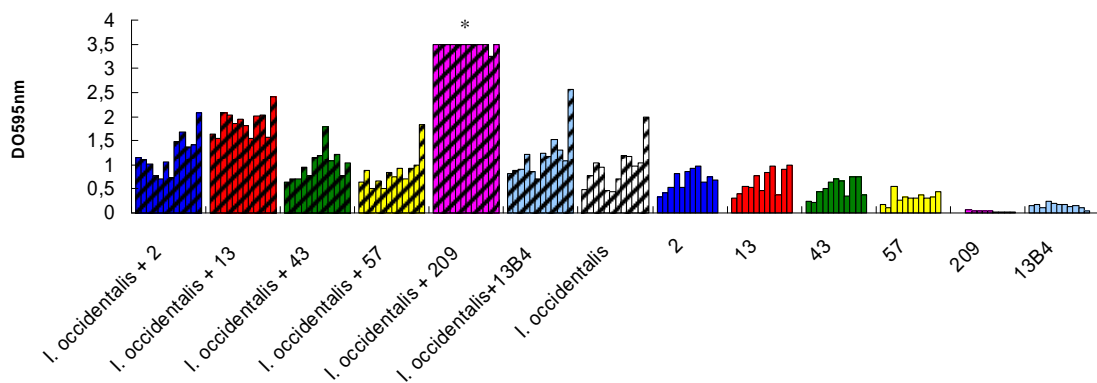


Figura 46. Formación de biofilms en los cocultivos *L. pentosus*-levaduras en presencia de distintas cantidades de tirosol, tras 72 h de incubación. En rayado aparece el cocultivo de las cepas indicadas, en rayado con el fondo blanco la levadura en cultivo puro y en color liso las cepas de *L. pentosus* indicadas. Cada columna se corresponde con una dilución en base 2 de la concentración de tirosol existente en el pocillo anterior, siendo la concentración inicial de 1,73 g/l.

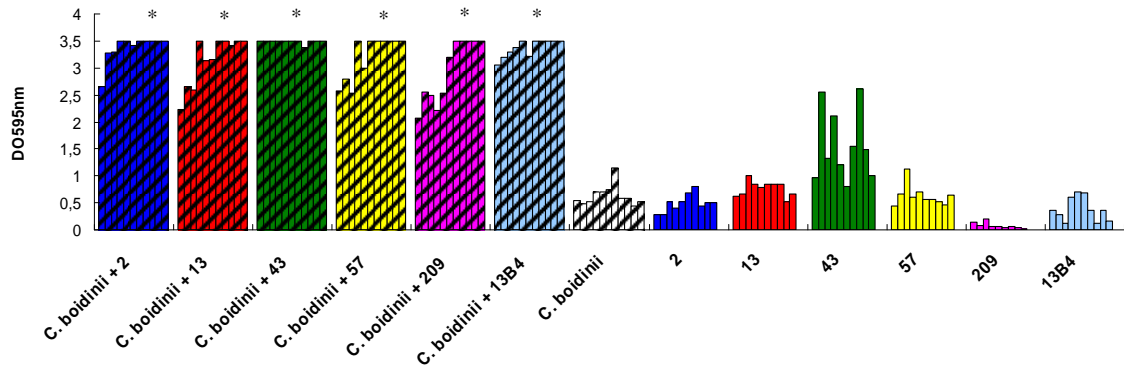
* Saturación en las medidas.

Por otro lado, cuando se añadieron diferentes concentraciones de hidroxitirosol, se observaron variaciones en la formación de biofilms en los cocultivos con las levaduras *C. boidinii*, *I. occidentalis* y *W. anomalus*. En los cocultivos de *C. boidinii* con las cepas de *L. pentosus* ensayadas se observa una disminución en la formación de biofilms cuando la concentración de hidroxitirosol es elevada (Figura 47A). Este efecto se observa al comparar con los resultados obtenidos en ausencia de hidroxitirosol (Figura 44A). No obstante, la presencia de dicho compuesto polifenólico a concentraciones inferiores a 0,1081 g/l favoreció de forma general la formación de biofilms en los cocultivos, llegando a producir saturación en las medidas.

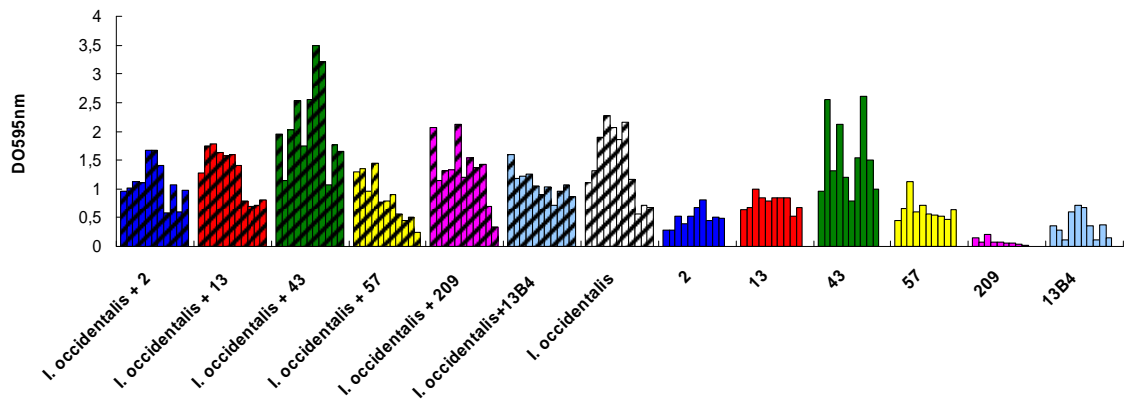
Los biofilms procedentes de los cocultivos de *I. occidentalis* con las diferentes cepas de *L. pentosus* en presencia de hidroxitirosol (Figura 47B) experimentaron un incremento respecto a los formados en ausencia dicho compuesto (Figura 44B). En esta ocasión, el hidroxitirosol parece favorecer ligeramente la formación de biofilms a concentraciones altas, de forma que cuando ésta baja, la formación de biofilms también lo hace.

Finalmente, en los cocultivos *W. anomalus-L. pentosus* (Figura 47C) se observa un notable incremento en la formación de biofilms respecto a los mismos cocultivos en ausencia de hidroxitirosol (Figura 44C), viéndose claramente favorecida la formación de biofilms a concentraciones altas del polifenol y disminuyendo conforme la concentración del hidroxitirosol lo hace.

A



B



C

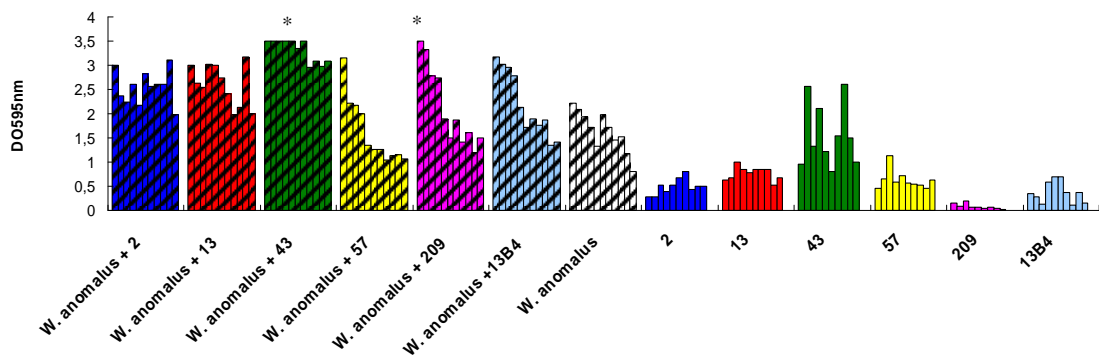
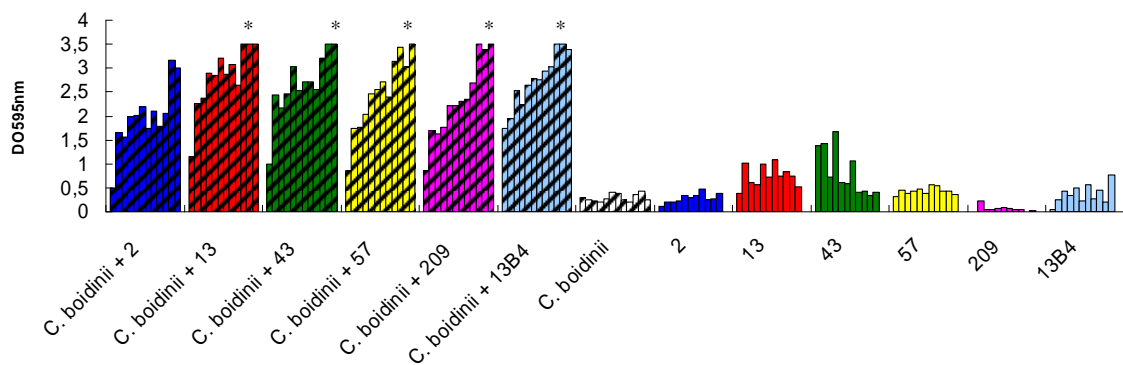


Figura 47. Formación de biofilms en cocultivos *L. pentosus*-levaduras en presencia de distintas concentraciones de hidroxitirosol tras 72 h de incubación. En rayado, cocultivo de las cepas indicadas, en rayado con fondo blanco la levadura en cultivo puro y en color liso, cada una de las cepas de *L. pentosus* en cultivo puro. Cada columna se corresponde con una dilución en base 2 del hidroxitirosol presente en el pocillo anterior, siendo la concentración de partida de 1,73 g/l.

* Saturación en las medidas.

En presencia de hidroxitirosol-OH se observaron variaciones en la formación de biofilms en los cocultivos con las levaduras *C. boidinii* y *W. anomalus*. En el primer caso, las elevadas concentraciones de hidroxitirosol-OH provocaron una disminución de la capacidad de formación de biofilms de los cocultivos (Figura 48A). A medida que la presencia del polifenol es menor, la formación de biofilms aumenta hasta llegar a los valores observados en ausencia de hidroxitirosol-OH e incluso superándolos (Figura 44A).

A



B

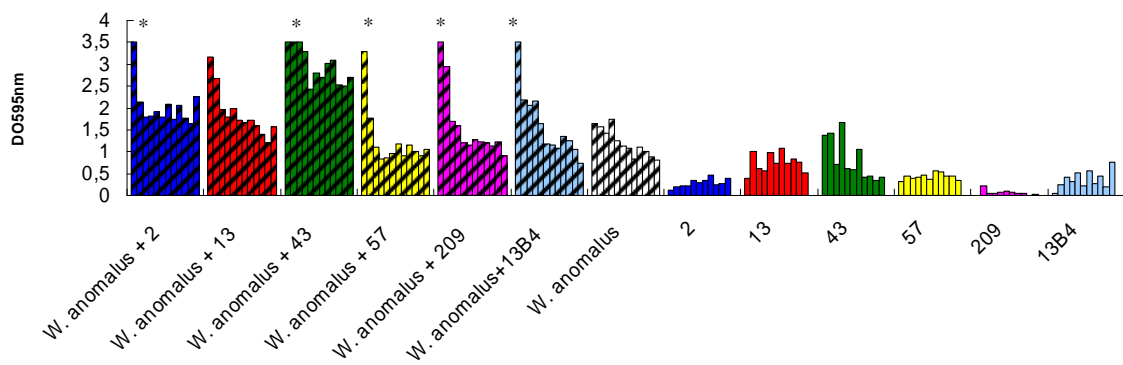


Figura 48. Formación de biofilms en cocultivos *L. pentosus*-levaduras en presencia de distintas concentraciones de hidroxitirosol-OH tras 72 h de incubación. En rayado, cocultivo de las cepas indicadas, en rayado con fondo blanco la levadura en cultivo puro y en color liso, cada una de las cepas de *L. pentosus* en cultivo puro. Cada columna se corresponde con una dilución en base 2 del hidroxitirosol-OH existente en el pocillo anterior, siendo la concentración inicial de 1,73 g/l.

* Saturación en las medidas.

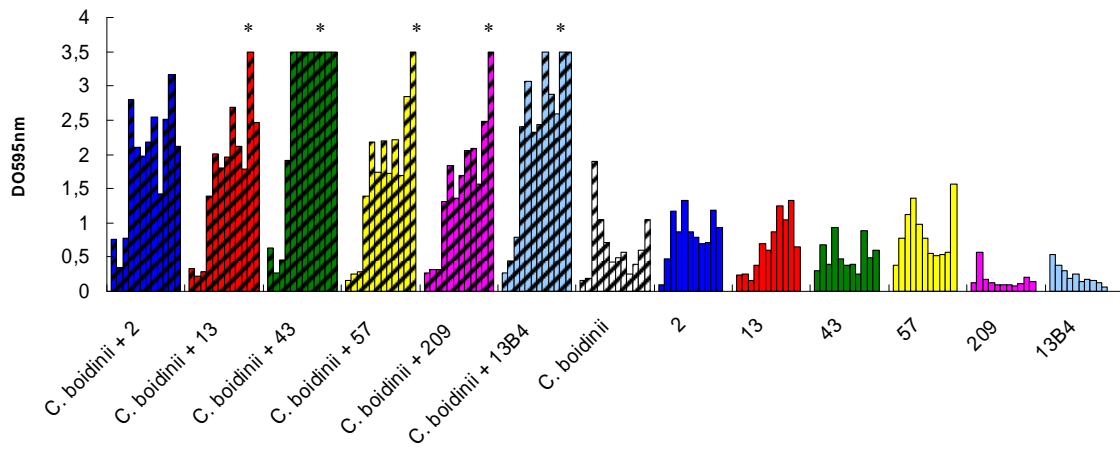
En el caso de los cocultivos con *W. anomalus* (Figura 48B) se observa un aumento de la capacidad de formación de biofilms en presencia del hidroxitirosol-OH respecto a los cocultivos en ausencia del polifenol (Figura 44C) Dicha formación de biofilms es mayor a elevadas concentraciones del hidroxitirosol-OH, existiendo una enorme diferencia entre la concentración inicial (1,73 g/l) y la dilución 1:2 de la misma.

Finalmente, la adición de oleuropeína afectó de forma diferente a la formación de biofilms de los cocultivos con *C. boidinii*, *W. anomalus* o *S. cerevisiae*. En los cocultivos con *C. boidinii* (Figura 49A) se observa una clara disminución de la formación de biofilms respecto a los cocultivos en su ausencia (Figura 44A). Esta disminución es muy evidente a altas concentraciones del polifenol, recuperándose la capacidad de formación de biofilms a medida que es más baja la concentración de dicho compuesto.

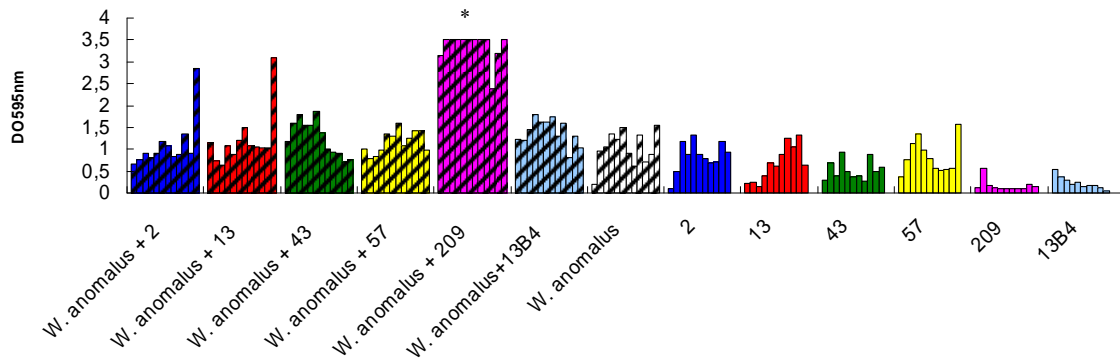
En los cocultivos de *W. anomalus* con las cepas de *L. pentosus* no se apreciaron grandes diferencias en el grado de formación de biofilms en presencia o en ausencia de oleuropeína (Figuras 49B y 44C, respectivamente). Sin embargo, volvió a ser llamativa la alta capacidad de formación de biofilms entre *W. anomalus* y *L. pentosus* 209 en presencia de oleuropeína, independientemente de la concentración a la que se encontrara ésta.

Por último, la oleuropeína parece favorecer la formación de biofilms en los cocultivos de *S. cerevisiae* con los distintos *L. pentosus* ensayados (Figura 49C) respecto a los cocultivos realizados en ausencia de oleuropeína (Figura 44D), fenómeno que no hemos podido observar en dicha levadura con ningún otro polifenol ensayado. Así, se observa que bajas concentraciones de oleuropeína en el medio potencian la formación de biofilms en los cocultivos, siendo el caso más llamativo el observado en el cocultivo de *S. cerevisiae* con *L. pentosus* 209.

A



B



C

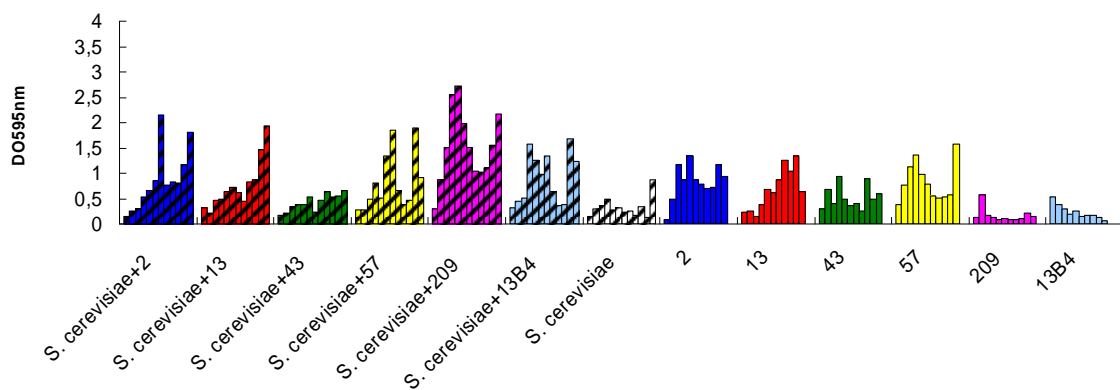


Figura 49. Formación de biofilms en cocultivos BAL-levaduras en presencia de distintas concentraciones de oleuropeína tras 72 h de incubación. En rayado, cocultivo de las cepas indicadas, en rayado con fondo blanco la levadura en cultivo puro y en color liso, cada una de las BAL en cultivo puro. Cada columna se corresponde con una dilución en base 2 de la oleuropeína presente en el pocillo anterior. Concentración de partida: 1,73 g/l.

* Saturación en las medidas.

2.2.10.3.- INFLUENCIA DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS PROCEDENTES DE COCULTIVOS *L. pentosus*-LEVADURAS

Para investigar si el contacto célula-célula era condición indispensable para que se formaran los biofilms mixtos, se procedió a realizar un ensayo con sobrenadantes libres de células (SLC). Dichos SLC se obtuvieron de cocultivos de *C. boidinii* con diferentes cepas de *L. pentosus* separados por membranas de diálisis. Las cepas empleadas fueron *L. pentosus* 13, *L. pentosus* 209 y *L. pentosus* 13B4.

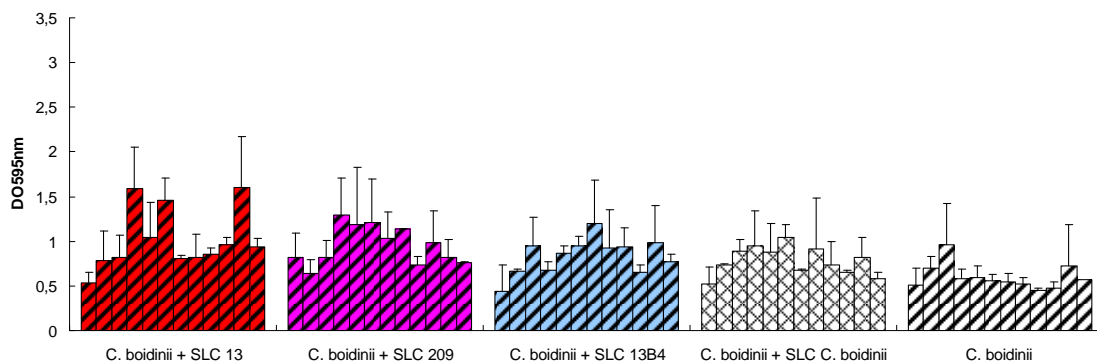


Figura 50. Formación de biofilms por *C. boidinii* en presencia de SLC de cocultivos entre ésta y *L. pentosus* 13 (■), *L. pentosus* 209 (■) y *L. pentosus* 13B4 (■). Como control se cultivó a *C. boidinii* con SLC de un cultivo de ella misma (■) y *C. boidinii* sin añadir ningún SLC (■). Cada columna representa una dilución en base 2 del SLC respecto al anterior. Los datos mostrados resultan de la ponderación de 3 réplicas de cada ensayo.

En la Figura 50 se observa que la adición dichos SLC no estimula la formación de biofilms por *C. boidinii*, ya que la cantidad de éstos es similar en todos los casos.

2.2.10.4.- FORMACIÓN DE BIOFILMS EN PORTAOBJETOS

Se ensayó la capacidad de formación de biofilms por *C. boidinii* en presencia de cepas de *L. pentosus* sobre portaobjetos de cristal a fin de visualizarlos por microscopía electrónica de barrido (MEB) en vez de cuantificarlos mediante la técnica del cristal violeta.

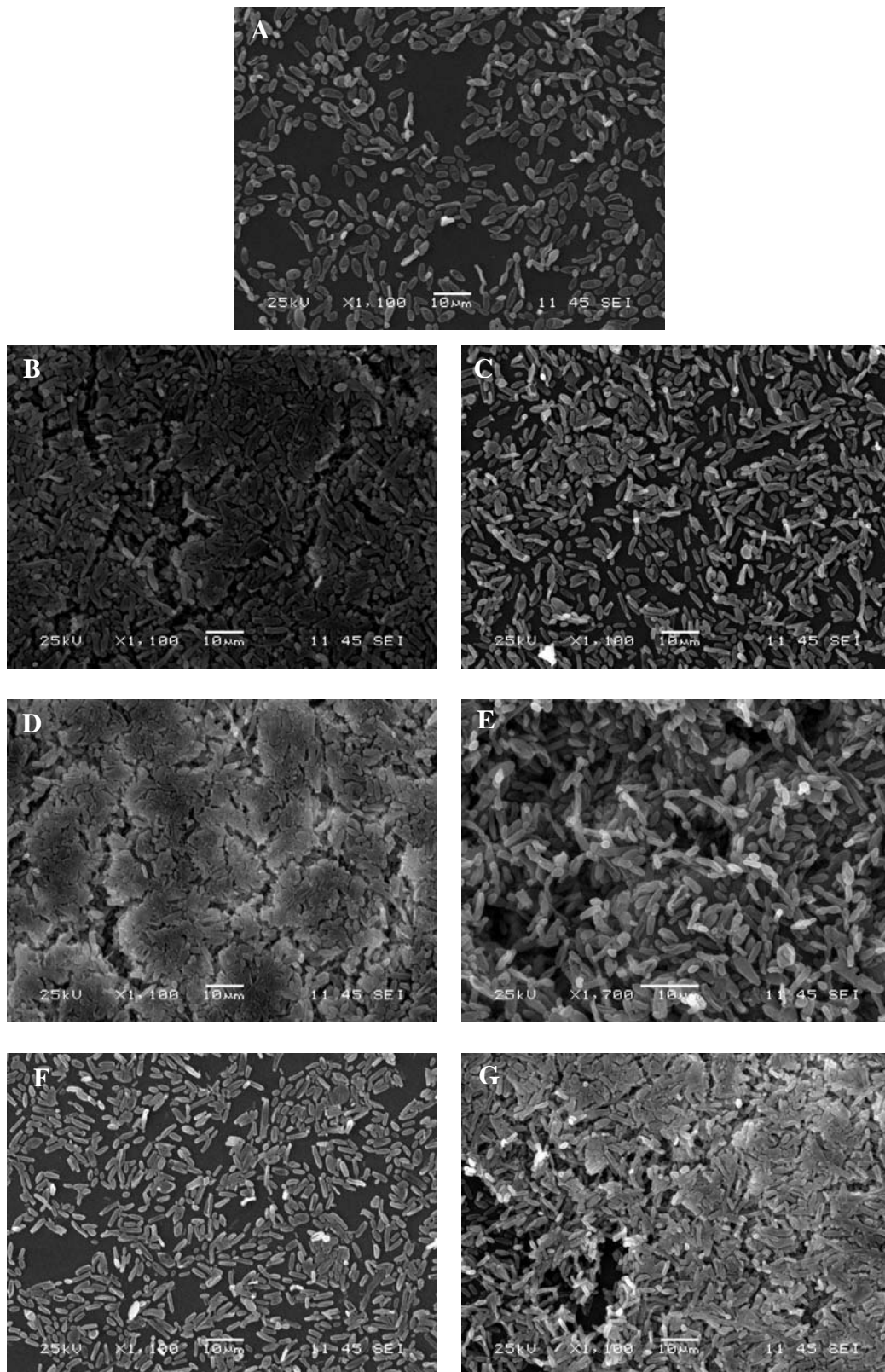


Figura 51. Formación de biofilms mixtos *C. boidinii*-*L. pentosus* sobre portaobjetos de cristal. **A.** *C. boidinii* en cultivo puro. **B.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 2. **C.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 13. **D.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 13B4. **E.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 43. **F.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 57. **G.** Cocultivo *C. boidinii*-*L. pentosus* 209.

Como se observa en la Figura 51, se produce un aumento de la capacidad de formación de biofilms por cada uno de los cocultivos respecto a la del cultivo puro de *C. boidinii* (Figura 51A). En ciertos casos como en los cocultivos con *L. pentosus* 13 y *L. pentosus* 57, este incremento es relativamente pequeño (Figuras 51C y 51F), mientras que el biofilm es muy fuerte en el caso de los cocultivos con *L. pentosus* 43 y *L. pentosus* 209 (Figuras 51E y 51G). En los cocultivos con *L. pentosus* 2 y *L. pentosus* 13B4 se produce un incremento de la formación de biofilms intermedio entre los anteriores (Figuras 51B y 51D)

2.3.- ESTUDIO SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOFILMS EN FERMENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA. PLANTA PILOTO

Además de estudiar en el laboratorio la capacidad de formación de biofilms por los microorganismos que pueblan las salmueras de fermentaciones de aceitunas, se llevaron a cabo también estudios a nivel de planta piloto. Nos interesaba conocer si las poblaciones de levaduras y lactobacilos eran capaces de formar biofilms en su hábitat natural y si éstos se desarrollaban en las distintas superficies que ofrece esta fermentación (paredes del fermentador y superficie de los frutos). Como se especifica en el apartado de Materiales y Métodos, se utilizaron cultivos iniciadores de cepas tecnológicamente contrastadas.

2.3.1.- DESARROLLO MICROBIANO DURANTE LA FERMENTACIÓN

En paralelo al estudio de la formación de biofilms se siguió la evolución del desarrollo de las poblaciones de microorganismos presentes en el proceso, tanto en las salmueras de fermentación como sobre la piel de los frutos.

2.3.1.1.- DESARROLLO MICROBIANO EN LAS SALMUERAS DE FERMENTACIÓN

En la Figura 52 se observa que en cada uno de los fermentadores estudiados, el crecimiento del cultivo iniciador inoculado es exponencial en los primeros días de fermentación, tras lo cual disminuye paulatinamente a medida que transcurre el proceso de fermentación. Las levaduras comienzan a aparecer en los fermentadores entre los 4-19 días de fermentación, siendo en el caso del fermentador inoculado con un cultivo mixto de las cepas *L. pentosus* 128/2 y LPCO10 en el que la presencia de aquellas fue más tardía (Figura 52C).

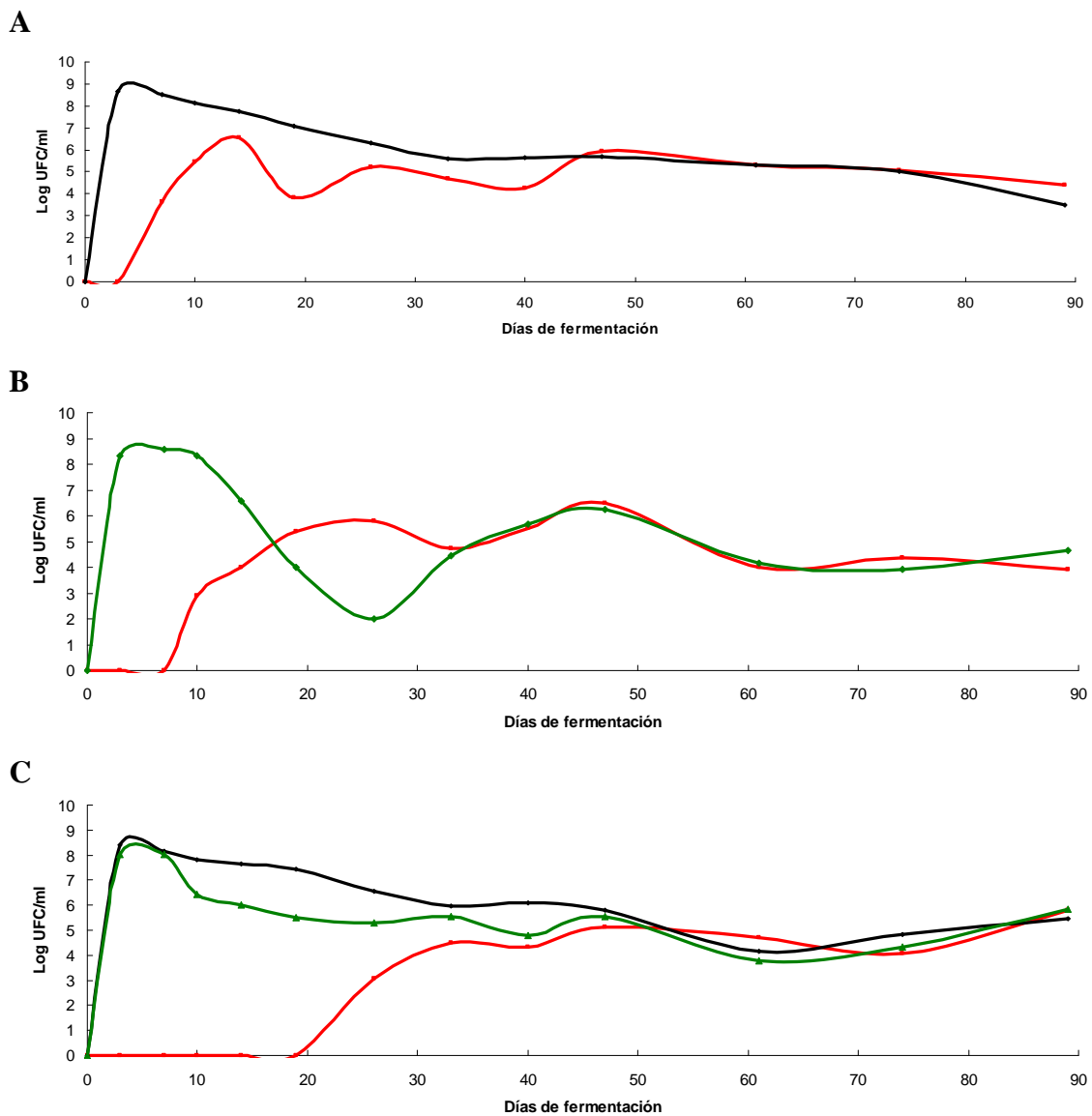


Figura 52. Evolución de las poblaciones microbianas presentes en los fermentadores en planta piloto. **A.** Fermentador inoculado con *L. pentosus* 128/2. **B.** Fermentador inoculado con *L. pentosus* LPCO10. **C.** Fermentador inoculado con las cepas 128/2 y LPCO10. (—) *L. pentosus* 128/2; (—) *L. pentosus* LPCO10; (—) levaduras totales. Cada fermentador fue inoculado a una concentración final de 10^5 UFC/ml con cada cepa.

2.3.1.2.- DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN LA SUPERFICIE DE LOS FRUTOS

Para el cálculo de los microorganismos adheridos a la superficie de los frutos se tuvo en cuenta que la superficie exterior de una aceituna gordal (Weisstein, 2011) se estima en $23,25 \pm 4,34 \text{ cm}^2$. En la Tabla 11 se puede observar la elevada presencia de lactobacilos adheridos a las superficies de las aceitunas desde el séptimo día del inicio de la fermentación, disminuyendo ligeramente dicho número a lo largo del proceso. Las levaduras por el contrario, comienzan en 10^4 UFC/cm^2 y aumentan su número a lo largo de la fermentación hasta las 10^8 UFC/cm^2 .

Tabla 11. Recuentos de *L. pentosus* y levaduras, expresados en (UFC/cm²), aislados de la superficie de la aceituna a lo largo del proceso de fermentación. Los resultados se obtuvieron de la extracción del biofilms de 8-10 aceitunas y se analizaron por triplicado.

Tiempo (días)	Inoculados con <i>L. pentosus</i> LPCO10		Inoculados con <i>L. pentosus</i> 128/2		Fermentación espontánea	
	<i>L. pentosus</i>	Levaduras	<i>L. pentosus</i>	Levaduras	<i>L. pentosus</i>	Levaduras
0	0	0	0	0	0	0
7	$5,50 (\pm 0,12) \times 10^9$	$1,10 (\pm 0,16) \times 10^4$	$2,20 (\pm 0,12) \times 10^9$	$9,70 (\pm 0,12) \times 10^4$	$6,90 (\pm 0,12) \times 10^9$	$1,10 (\pm 0,12) \times 10^4$
14	$1,20 (\pm 0,67) \times 10^8$	$1,80 (\pm 0,30) \times 10^6$	$6,14 (\pm 0,12) \times 10^7$	$2,70 (\pm 0,12) \times 10^7$	$1,00 (\pm 0,12) \times 10^8$	$8,50 (\pm 0,12) \times 10^6$
19	$1,45 (\pm 2,34) \times 10^8$	$1,20 (\pm 1,79) \times 10^7$	$1,45 (\pm 0,12) \times 10^8$	$3,60 (\pm 0,12) \times 10^7$	$9,40 (\pm 0,12) \times 10^7$	$3,05 (\pm 0,12) \times 10^6$
28	$2,00 (\pm 1,07) \times 10^8$	$3,30 (\pm 0,91) \times 10^6$	$8,90 (\pm 0,12) \times 10^6$	$7,40 (\pm 0,12) \times 10^6$	$1,50 (\pm 0,12) \times 10^7$	$8,80 (\pm 0,12) \times 10^5$
47	$4,90 (\pm 0,46) \times 10^7$	$8,10 (\pm 0,77) \times 10^7$	$1,25 (\pm 0,12) \times 10^7$	$7,60 (\pm 0,12) \times 10^6$	$1,20 (\pm 0,12) \times 10^7$	$1,70 (\pm 0,12) \times 10^7$
62	$9,00 (\pm 0,55) \times 10^6$	$6,75 (\pm 0,74) \times 10^8$	$4,90 (\pm 0,12) \times 10^7$	$1,26 (\pm 0,12) \times 10^8$	$9,00 (\pm 0,12) \times 10^6$	$5,10 (\pm 0,12) \times 10^8$
81	$1,05 (\pm 0,70) \times 10^8$	$2,90 (\pm 0,42) \times 10^8$	$1,70 (\pm 0,12) \times 10^8$	$2,90 (\pm 0,12) \times 10^8$	$1,50 (\pm 0,12) \times 10^8$	$6,40 (\pm 0,12) \times 10^8$

2.3.2.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES ABIÓTICAS

Para ello, los portaobjetos extraídos de los fermentadores a distintos tiempos se procesaron para su observación mediante MEB. Los resultados de la progresión de la formación de biofilms se muestran en la Figura 53.

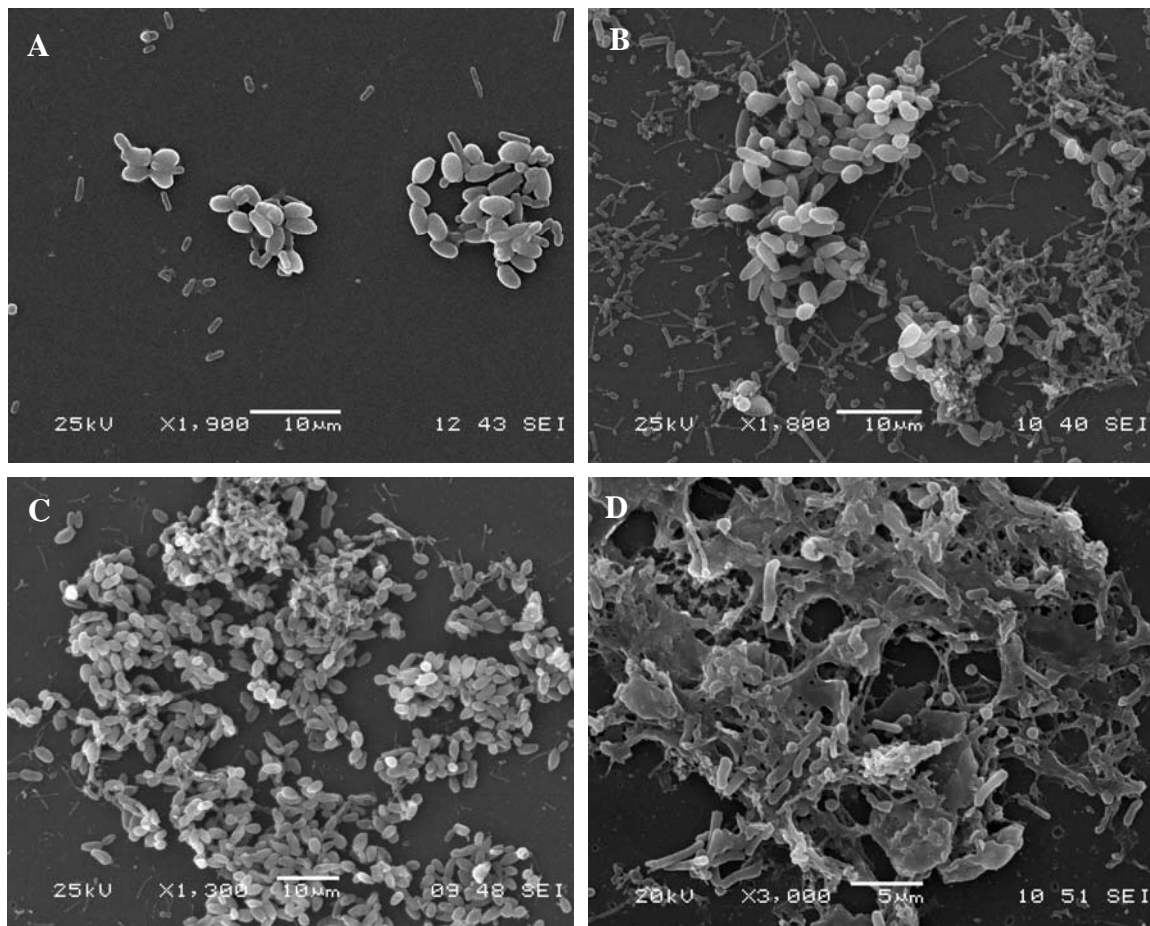


Figura 53. Desarrollo de biofilms mixtos levaduras-*L. pentosus* sobre portaobjetos durante la fermentación de aceitunas de mesa. Las fotografías **A**, **B**, **C** y **D**, tomadas en un microscopio de barrido, se corresponden con 10, 37, 57 y 80 días de fermentación, respectivamente.

Como se puede apreciar en la Figura 53A, a los 10 días de fermentación los microorganismos comienzan a adherirse a la superficie del cristal, posiblemente *acondicionada* por otros microorganismos o por las condiciones físico-químicas de la propia salmuera, empezando a formarse microcolonias mixtas de levaduras y bacterias. A medida que la fermentación avanza, las microcolonias aumentan de tamaño para formar finalmente macrocolonias que cubren la mayor parte de la superficie del portaobjetos de vidrio (Figuras 53B y 53C, a los 37 y 57 días de fermentación). Al final

del proceso (aproximadamente 80 días) se observa un biofilm ininterrumpido que cubre toda la superficie de los portaobjetos (Figura 53D). Independientemente del inóculo utilizado se pudo constatar que la dinámica de la formación y desarrollo de los biofilms fueron similares en todos los fermentadores.

En todas las micrografías realizadas se podía apreciar que los diferentes microorganismos aparecían unidos entre sí como si parte de sus paredes celulares se hubieran fusionado (Figura 53A). La Figura 54 muestra con mayor detalle dos de las microcolonias de la Figura 53A, donde se aprecia la unión entre los distintos microorganismos que forman parte del biofilm.

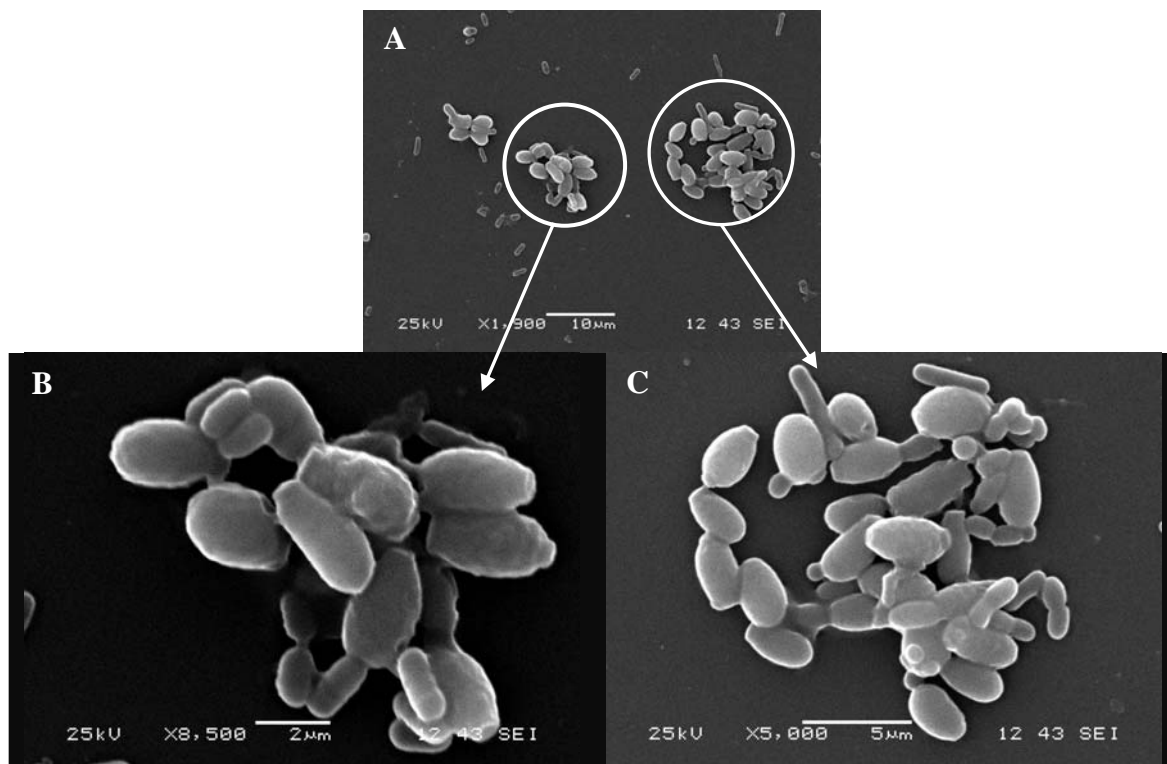


Figura 54. Fotografías al MEB de microcolonias adheridas a portaobjetos a los 10 días de la fermentación de aceitunas de mesa, donde se pueden apreciar las uniones entre levaduras y bacterias. **A.** Plano del portaobjetos a 1.900 aumentos. **B.** Microcolonia de la imagen A a 8.500 aumentos. **C.** Microcolonia de la imagen A a 5.000 aumentos.

2.3.3.- FORMACIÓN DE BIOFILMS SOBRE SUPERFICIES BIÓTICAS

Al igual que en el caso de los portaobjetos, se siguió la evolución de la formación de los biofilms en la epidermis de los frutos.

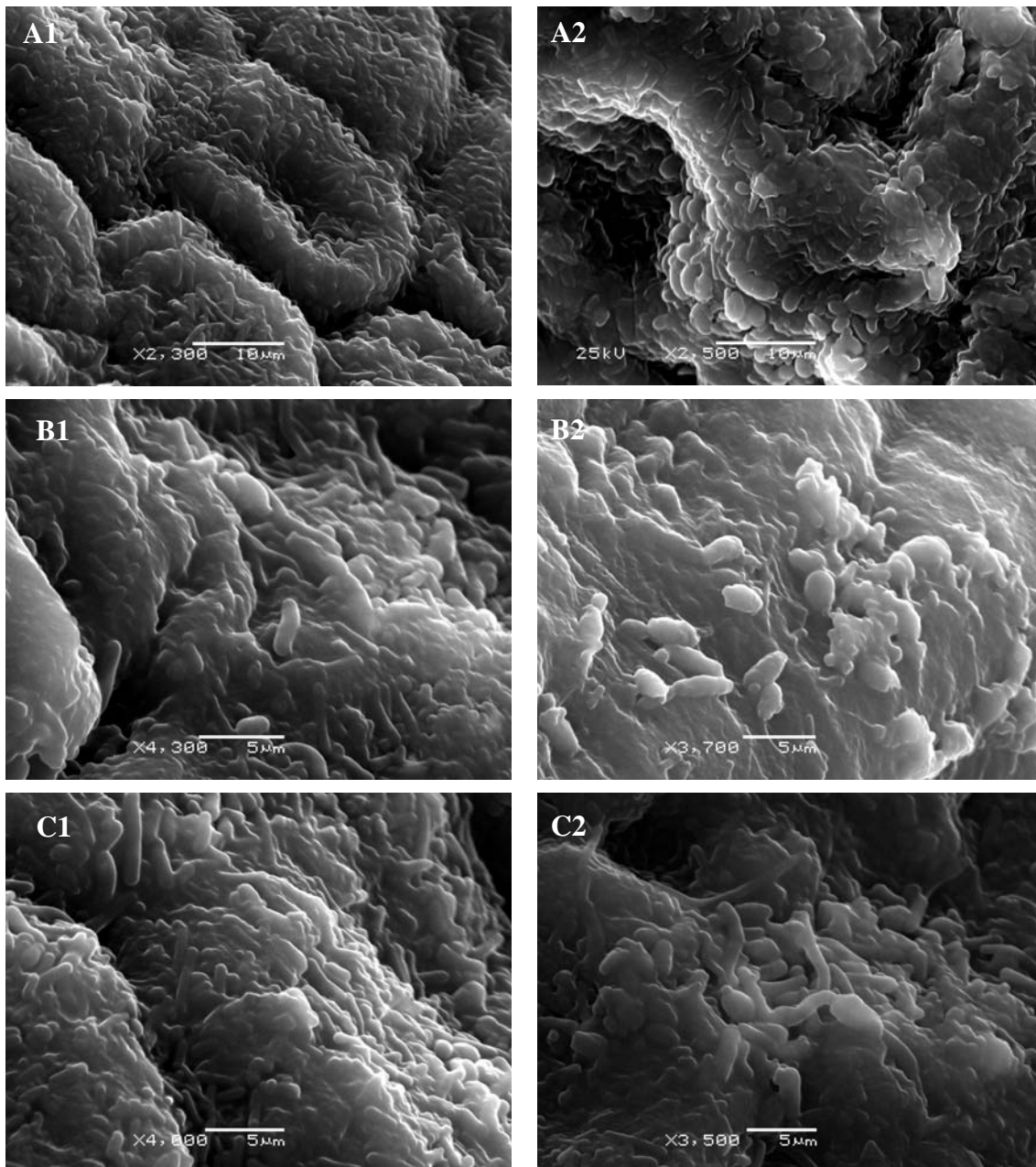


Figura 55. Desarrollo de biofilms mixtos levaduras-*L. pentosus* en la epidermis de la aceituna durante la fermentación de aceitunas de mesa. Fotografías **A1** y **A2**: biofilms formados después de 37 y 55 días de la inoculación de las salmueras con *L. pentosus* LPCO10; **B1** y **B2**: biofilms formados tras 37 y 55 días de la inoculación de las salmueras con *L. pentosus* 128/2; **C1** y **C2**: superficies de aceitunas después de 37 y 55 días de fermentación espontánea.

En la Figura 55 se visualizan distintos planos de superficies de aceitunas en varios momentos del proceso fermentativo. En ellos se puede observar que la epidermis del fruto está totalmente recubierta por microorganismos. Además, la arquitectura de estos biofilms es totalmente diferente a la de los portaobjetos, observándose biofilms maduros tras 37 días de fermentación (Figura 55-A1, B1 y C1) que se mantienen

durante todo el proceso (Figura 55-A2, B2 y C2). Estas asociaciones polimicrobianas presentan todas las características típicas de un biofilm, embebidas por una matriz, donde resulta difícil adivinar la apariencia externa de los microorganismos que lo componen.

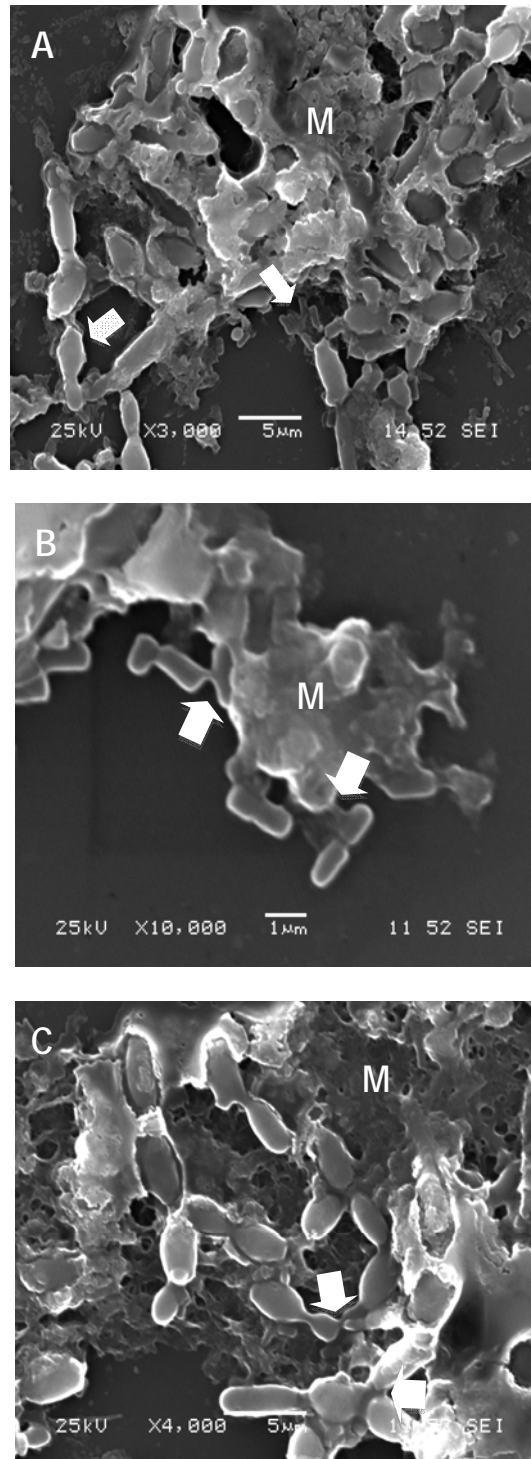


Figura 56. Fotografías al MEB de fragmentos de biofilms extraídos de la superficie de aceitunas fermentadas. En **A**, las flechas blancas señalan las levaduras y bacterias; en **B** y **C**, las flechas señalan uniones entre bacterias y levaduras. M: matriz que envuelve a bacterias y levaduras.

En la Figura 56 se pueden observar fragmentos de biofilms extraídos de las epidermis de los frutos analizados por MEB, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En contraste con lo observado en los biofilms de la superficie de aceitunas intactas (Figura 55), se puede distinguir con mayor claridad la morfología de los microorganismos que los componen, *L. pentosus* y levaduras (Figura 56A), así como la matriz que los rodea. Además, se pueden observar claramente las conexiones entre los diferentes microorganismos (Figuras 56B y 56C).

En análisis realizados al MEB de aceitunas procedentes de fermentadores industriales se pudo observar la presencia en alguna de las muestras de estructuras semejantes a hifas en determinadas zonas de la superficie de los frutos (Figura 57A). En algunos casos, entre estas zonas se pueden apreciar los biofilms de lactobacilos como los anteriormente observados (Figura 57B y 57C), mientras que en otros casos, estas hifas enmascaran prácticamente la superficie de la aceituna (Figura 57D).

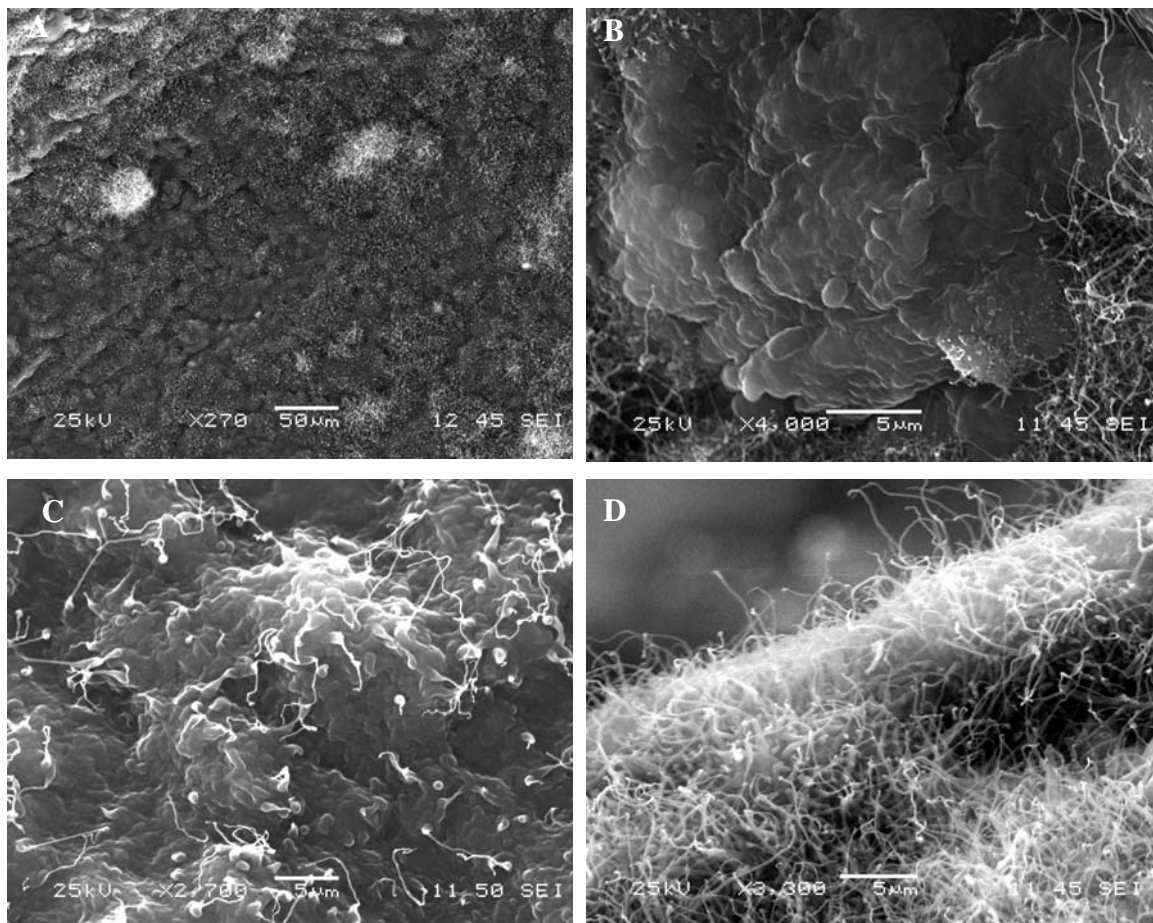


Figura 57. Fotografías al MEB de superficies de aceitunas tipo Gordal de fermentadores industriales

2.3.4.- CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE LA EPIDERMIS DE LOS FRUTOS POR LOS CULTIVOS INICIADORES

Con objeto de evaluar la capacidad tecnológica de los cultivos iniciadores utilizados, se determinó el perfil de RAPD-PCR de colonias al azar procedentes de los biofilms extraídos de la superficie de las aceitunas a distintos tiempos de fermentación. Los dendogramas que se obtuvieron en los fermentadores inoculados con las cepas *L. pentosus* LPCO10 ó *L. pentosus* 128/2, así como en los no inoculados (fermentación espontánea) se muestran en las Figuras 58, 59 y 60, respectivamente.

Los resultados obtenidos, considerando de forma arbitraria que a partir del 80% de similitud no podemos distinguir entre cepas, ponen de manifiesto que ninguna de estas cepas fue capaz de dominar completamente en los biofilms sobre las cepas autóctonas de *L. pentosus*, ya que se obtienen grupos diferentes a ellas dentro de cada dendograma, tanto en los fermentadores inoculados con *L. pentosus* LPCO10 como en los inoculados con *L. pentosus* 128/2 (Figuras 58 y 59 respectivamente). En el caso del fermentador inoculado con la cepa *L. pentosus* LPCO10 se observa que algo más de la mitad de las colonias son muy similares entre sí y su perfil se corresponde con el de esta cepa (Figura 58). Sin embargo, en el caso del fermentador inoculado con la cepa *L. pentosus* 128/2 (Figura 59), la mayoría de los perfiles RAPD-PCR obtenidos eran diferentes al de ésta. Finalmente, en la fermentación espontánea se obtuvieron varios clúster correspondientes a distintas cepas silvestres de *L. pentosus* (Figura 60).

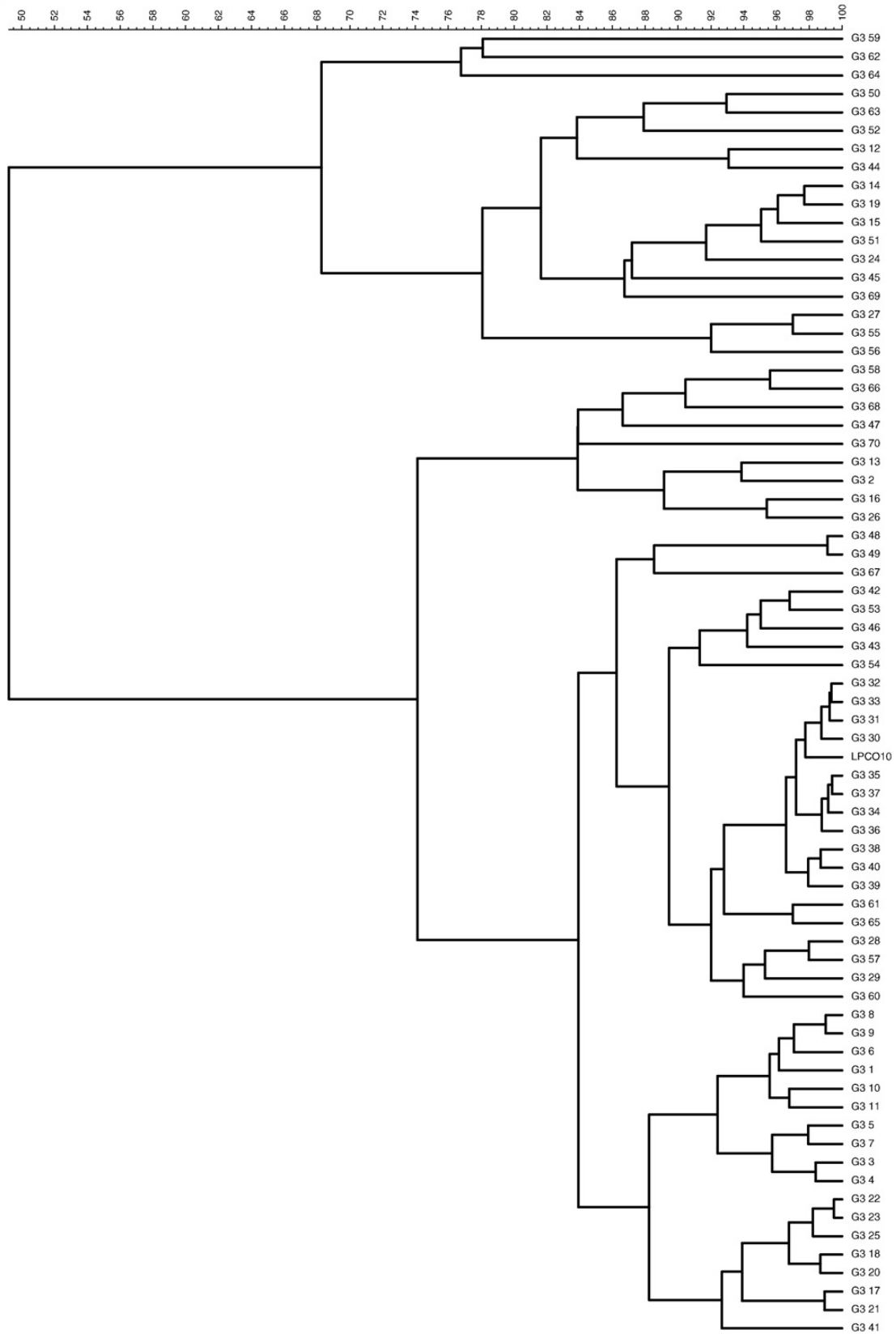


Figura 58. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* aisladas de la epidermis de los frutos durante la fermentación de aceitunas gordal al estilo sevillano inoculadas con *L. pentosus* LPCO10. A partir del 80% de similitud no se pueden asignar perfiles diferentes.

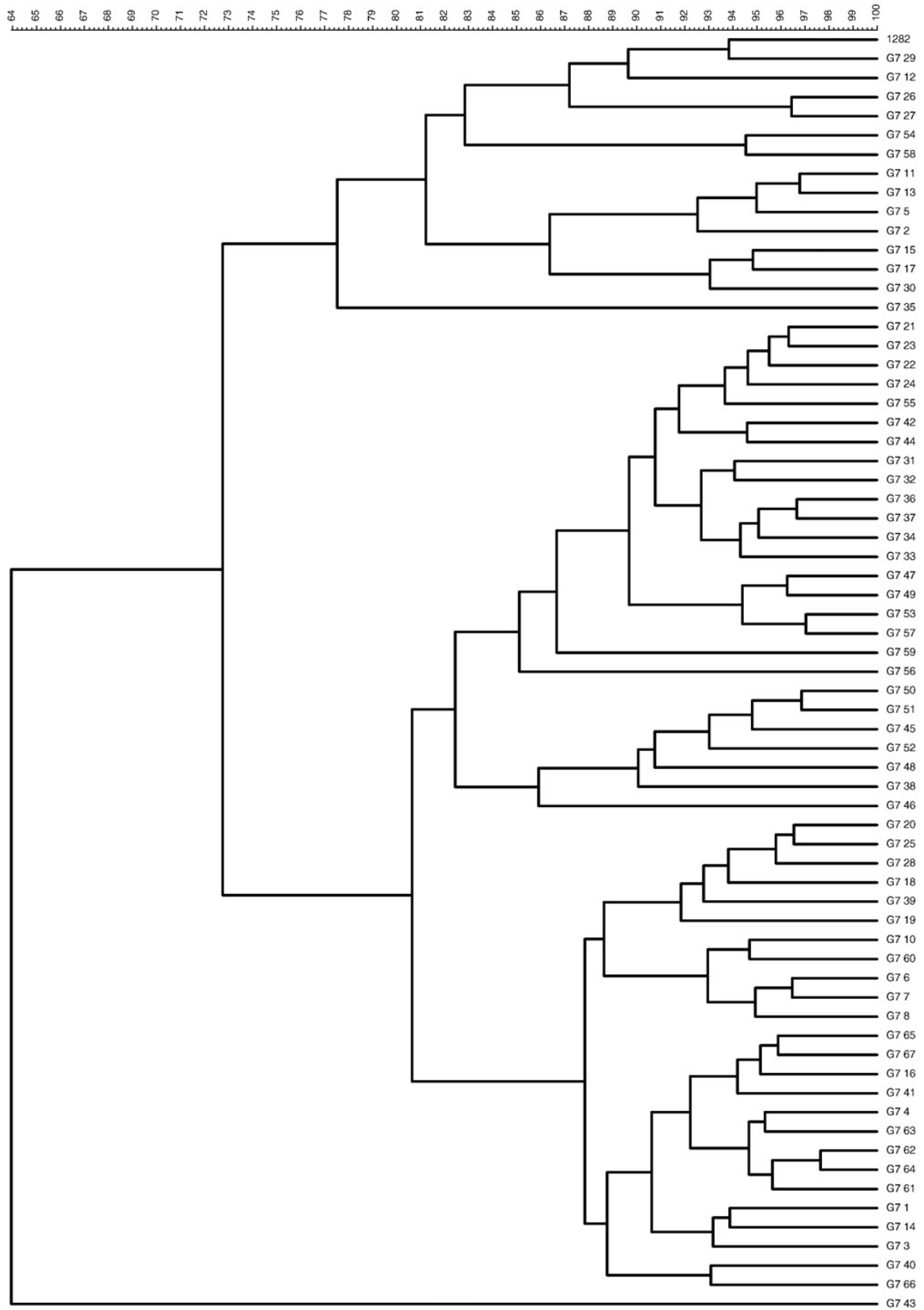


Figura 59. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* aisladas de la epidermis de los frutos durante la fermentación de aceitunas gordal al estilo sevillano inoculadas con *L. pentosus* 128/2. Grado de similitud considerado del 80%.

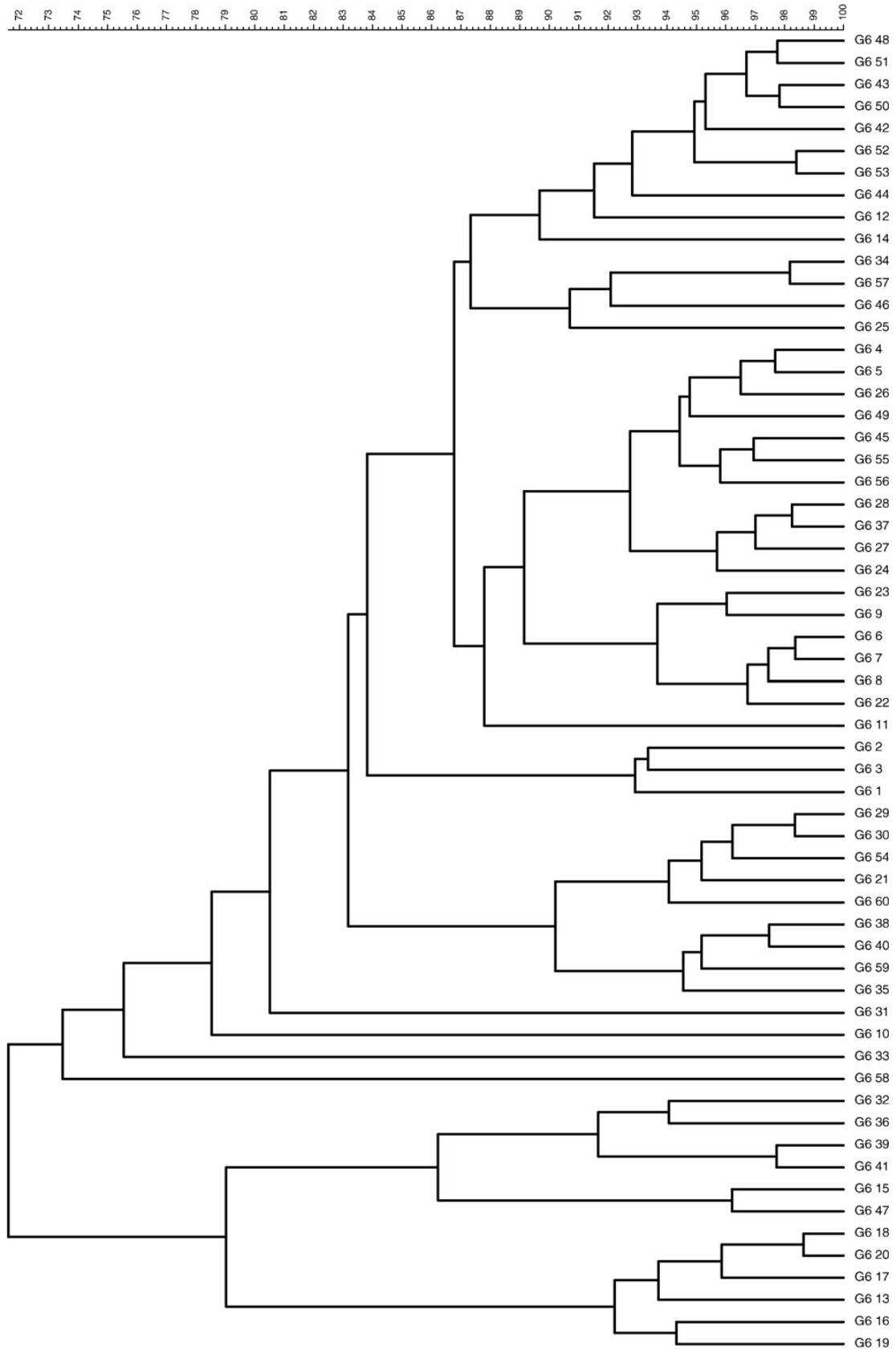


Figura 60. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* aisladas de la epidermis de los frutos durante la fermentación espontánea de aceitunas gordal al estilo sevillano. A partir del 80% de similitud no se pueden asignar perfiles diferentes.

Por otro lado, se realizaron fermentaciones de aceitunas gordal estilo sevillano utilizando como cultivo iniciador a la cepa *L. pentosus* LPCO10 resistente espontánea a estreptomicina y a rifampicina, con el objetivo de seguir de forma más precisa la implantación de dicho inóculo, así como observar la posible variabilidad genética de dicha cepa a lo largo de la fermentación. Para ello, tras el muestreo de los fermentadores se aislaban colonias en placas de MRS con estreptomicina y rifampicina y las colonias se analizaban mediante RAPD-PCR, obteniéndose los resultados que se muestran en las Figuras 61, 62 y 63.

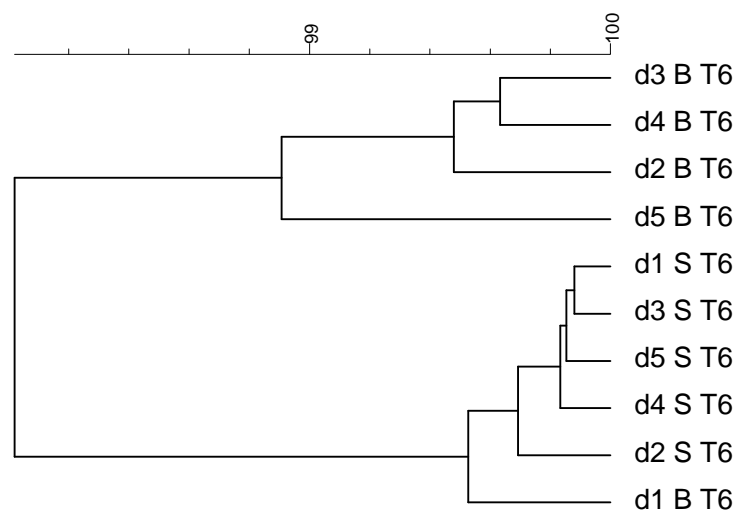


Figura 61. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* LPCO10 aisladas en medio MRS+Sm+Rif a los 6 días de fermentación de aceitunas tipo Gordal al estilo sevillano. La nomenclatura asignada a cada colonia fue la siguiente: d: fermentador del que proviene; 1-5: número de la colonia; S o B: colonia aislada de salmuera o biofilm, respectivamente; T6: colonia aislada a los 6 días de fermentación. A partir del 80% de similitud no se pueden distinguir perfiles diferentes.

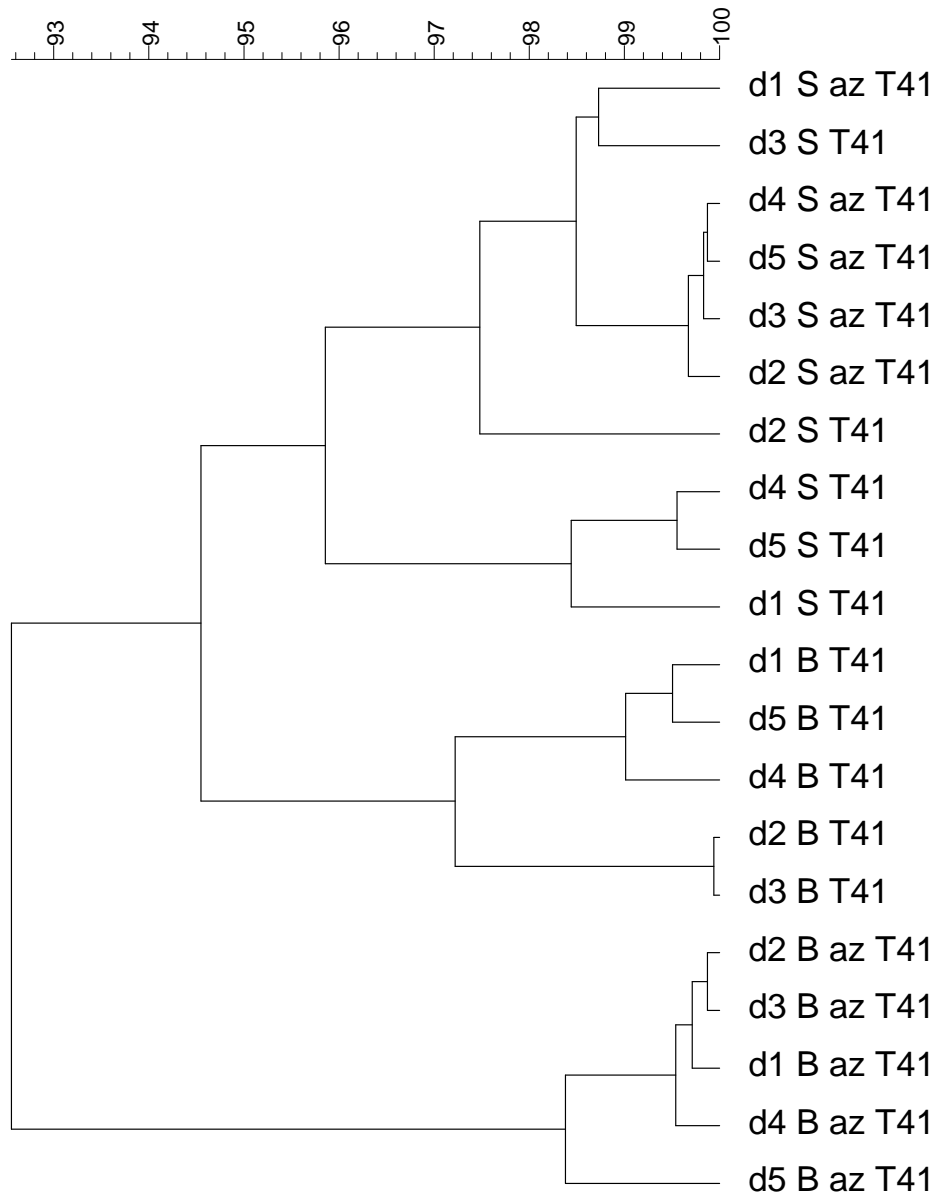


Figura 62. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* LPCO10 aisladas en medio MRS+Sm+Rif a los 41 días de fermentación de aceitunas tipo Gordal al estilo sevillano. La nomenclatura asignada a cada colonia fue la siguiente: d: fermentador del que proviene; 1-5: número de la colonia; S o B: colonia aislada de salmuera o biofilm, respectivamente; az: colonia aislada en primer lugar en medio MRS+azida y después comprobada su resistencia en MRS+Sm+Rif; T41: colonia aislada a los 41 días de fermentación. A partir del 80% de similitud no se pueden distinguir perfiles diferentes.

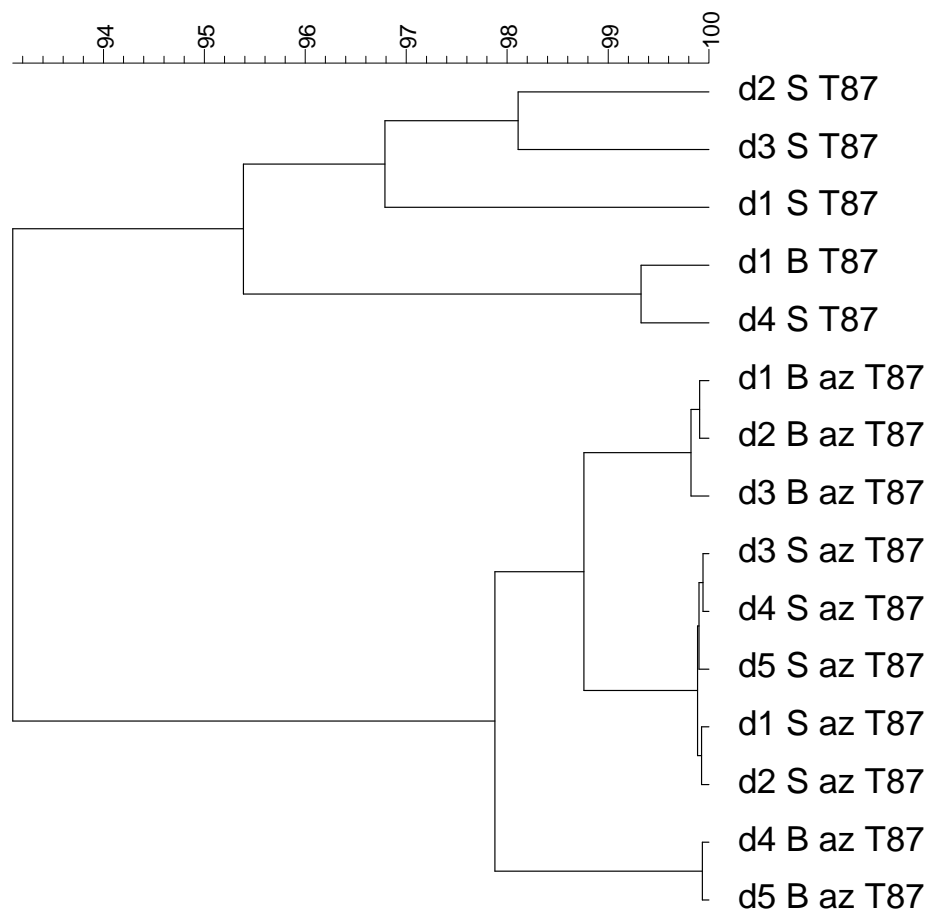


Figura 63. Análisis por RAPD-PCR de colonias de *L. pentosus* LPCO10 aisladas en medio MRS+Sm+Rif al finalizar la fermentación (87 días) de aceitunas tipo Gordal al estilo sevillano. La nomenclatura asignada a cada colonia fue la siguiente: d: fermentador del que proviene; 1-5: número de la colonia aislada; S o B: colonia aislada de salmuera o biofilm, respectivamente; az: colonia aislada en primer lugar en medio MRS+azida y después comprobada su resistencia en MRS+Sm+Rif; T87: colonia aislada a los 87 días de fermentación. A partir del 80% de similitud no se pueden distinguir perfiles diferentes.

En esta fermentación se observa una clara separación entre las colonias aisladas de la salmuera y las aisladas del biofilm. Al inicio de la fermentación (Figura 61) el análisis por RAPD-PCR separa dos grupos con un grado de similitud del 98,8%, el primero de ellos formado por colonias aisladas del biofilm y el otro de la salmuera. Conforme avanza la fermentación -a los 41 días- (Figura 62), se mantiene dicha separación, prácticamente con el mismo grado de similitud (94,4%). Es ya al concluir la fermentación cuando se deja de observar esa tendencia tan marcada, viéndose una ligera mezcla entre cepas aisladas en salmuera y en biofilms (Figura 63). No obstante, en todos los casos el nivel de semejanza fue superior al 92 %, por lo que si tomamos como

referencia un 80 % de semejanza para decir que son cepas diferentes, tenemos entonces que asumir que todas las colonias encontradas pertenecen a la misma cepa.

2.3.5.- DETECCIÓN POR PCR DE MICROORGANISMOS Y GENES DE INTERÉS EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS AISLADOS DE LOS BIOFILMS

La matriz polimérica que envuelve a los microorganismos en los biofilms está formada, entre otras macromoléculas, por proteínas y ácidos nucleicos, especialmente ADN (Branda y *col.*, 2005; Battin y *col.*, 2007). Dichos ácidos nucleicos proceden, en unos casos, de la lisis de los microorganismos que se encuentran en los biofilms y en otros, del ADN que liberan aquellos como una etapa del proceso natural de transformación. Utilizando diferentes cebadores específicos (ver Materiales y Métodos), analizamos la presencia de distintos géneros y especies de BAL en los biofilms a lo largo del proceso de fermentación. Para ello utilizamos el exopolisacárido (EPS) del biofilm, previamente purificado, y el sobrenadante y el precipitado obtenidos de la extracción de dicho biofilm.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 12, 13 y 14. La Figura 64 ilustra algunos ejemplos obtenidos en las distintas muestras.

En la Tabla 12, donde se analiza la presencia de genes en los sobrenadantes de los biofilms extraídos de las superficies de aceitunas, se puede observar que en todos los muestreos realizados a cada fermentador aparece ADN procedente del género *Lactobacillus*. Así, el gen *Lpdnak*, que es específico de este género, da positivo en casi todas las muestras y en las que no, el par de cebadores R16-1F y LbMA1-R (específicos también de *Lactobacillus*) sí lo hace, además de volver a confirmar los resultados obtenidos al usar los cebadores para el *Lpdnak*. Utilizando PCR con los cebadores específicos plant/pent/paraplant o por restricción del amplificado del gen *dnaK* con la enzima TSP5091 se pudo determinar la presencia de la especie *L. pentosus*, con excepción de las muestras del fermentador G6, en los muestreos de 13 y 27 días y en el muestro de 27 días del fermentador G7. En esta misma tabla se observa que los géneros *Enterococcus* y *Leuconostoc* aparecen ya avanzada la fermentación: en el fermentador G3 (inoculado con *L. pentosus* LPCO10) a partir del día 27 de fermentación, en el G6

(sin inocular) aparecen al final de la fermentación (día 73) y en el fermentador G7 (inoculado con *L. pentosus* 128/2), a partir del día 46 de fermentación. En ningún caso se encontró material genético procedente del género *Pediococcus*. Finalmente, se detectaron genes codificantes de plantaricina S y de exopolisacárido en el fermentador G3 desde principios de la fermentación y en los fermentadores G6 y G7 justo al final de la misma.

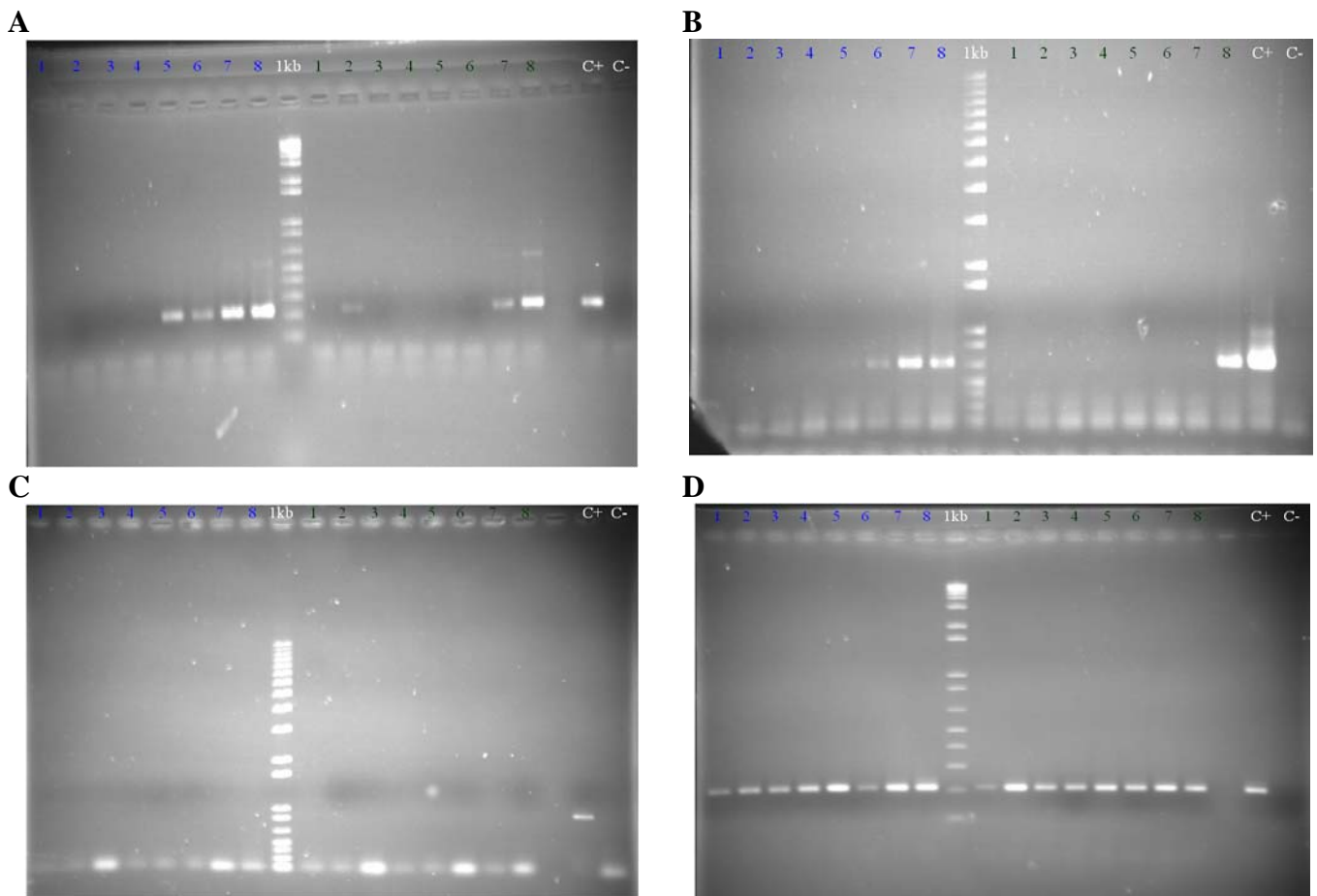


Figura 64. Fragmentos de ADN resultantes de distintas reacciones de PCR sobre muestras de biofilms obtenidos de la epidermis de los frutos durante el proceso de fermentación. **A.** Cebadores para la detección de *L. pentosus*, *L. plantarum* y/o *L. paraplantarum* sobre muestras del sobrenadante de la extracción del biofilm. **B.** Cebadores para detectar el gen *GT-priming*, específico de *L. pentosus*, empleados sobre una muestra del sobrenadante de la extracción del biofilm. **C.** Cebadores específicos del género *Pediococcus* en muestras de EPS previamente purificado. **D.** Cebadores específicos del género *Lactobacillus* en muestras del pellet de la extracción del biofilm. Líneas 1-8, fermentador inoculado con una mezcla de *L. pentosus* LPCO10 y *L. pentosus* 128/2; línea 10, marcador de 1 Kb; líneas 10-17, fermentador inoculado con *L. pentosus* LPCO10. Cada número indica una muestra de un tiempo diferente. C+, control positivo: amplificación de ADN previamente purificado y comprobado que posee unión específica con el cebador utilizado; C-, control negativo: reacción de PCR sin ADN para amplificar.

Tabla 12. Presencia (+)/ ausencia (-) de especies y géneros de BAL, así como de genes de dichas bacterias en los sobrenadantes de los biofilms extraídos de la superficie de aceitunas fermentadas utilizando cultivos iniciadores (campaña 2010). G3, fermentador inoculado con *L. pentosus* LPCO10; G6, fermentador con fermentación espontánea (sin inocular); G7, fermentador inoculado con *L. pentosus* 128/2.

FERMENTADOR	DIAS DE FERMENTACIÓN	dnak	plant/pent/paraplant			TSP509I			Enterococcus	R16-1F	Leuconostoc	Pediococcus	Plantaricina S	GT-priming
		<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. paraplant.</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. paraplant.</i>		<i>Lactobacillus</i>				
G3	6	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
G3	13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
G3	27	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
G3	46	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
G3	62	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
G3	73	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
G6	6	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
G6	13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
G6	27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
G6	46	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
G6	62	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
G6	73	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
G7	6	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
G7	13	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
G7	27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
G7	46	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
G7	62	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	
G7	73	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	

Tabla 13. Presencia (+)/ ausencia (-) de especies y géneros de BAL, así como de genes de dichas bacterias en el exopolisacárido de los biofilms extraídos de la superficie de aceitunas fermentadas utilizando cultivos iniciadores (campaña 2010). G3, fermentador inoculado con *L. pentosus* LPCO10; G6, fermentador con fermentación espontánea (sin inocular); G7, fermentador inoculado con *L. pentosus* 128/2.

FERMENTADOR	DÍAS DE FERMENTACIÓN	dnak	plant/pent/paraplant			<i>Enterococcus</i>	R16-1F	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	Plantaricina S	GT-priming
		<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. paraplant.</i>		<i>Lactobacillus</i>				
G3	6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G3	13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G3	27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G3	46	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G3	62	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
G3	73	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
G6	6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G6	13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G6	27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G6	46	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G6	62	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G6	73	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
G7	6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G7	13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G7	27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G7	46	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G7	62	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G7	73	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Tabla 14. Presencia (+)/ ausencia (-) de especies y géneros de BAL, así como de genes de dichas bacterias en el precipitado de los biofilms extraídos de la superficie de aceitunas fermentadas utilizando cultivos iniciadores (campaña 2010). G3, fermentador inoculado con *L. pentosus* LPCO10; G6, fermentador con fermentación espontánea (sin inocular); G7, fermentador inoculado con *L. pentosus* 128/2.

FERMENTADOR	DÍAS DE FERMENTACIÓN	dnak	plant/pent/parapant			Enterococcus	R16-1F	Leuconostoc	Pediococcus	Plantaricina S	GT-priming
		<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. parapant.</i>		<i>Lactobacillus</i>				
G3	6	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G3	13	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
G3	27	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
G3	46	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
G3	62	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G3	73	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
G6	6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G6	13	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G6	27	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G6	46	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G6	62	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
G6	73	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
G7	6	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
G7	13	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
G7	27	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
G7	46	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
G7	62	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
G7	73	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+

La Tabla 13, donde se analiza el ADN encontrado en el exopolisacárido extraído de los biofilms, se observa que todos los fermentadores y muestreos presentan ADN procedente de *Lactobacillus* (utilizando el par de cebadores R16-1F y LbMA1-R), mientras que sólo se pudo confirmar la presencia de *L. pentosus* justo al final de la fermentación. Además, se encontró ADN de *Enterococcus* así como genes de plantaricina S en el fermentador G3 (inoculado con *L. pentosus* LPCO10) al final de la fermentación.

En la Tabla 14, donde se reflejan los resultados obtenidos del análisis del pellet del biofilm, se observa nuevamente la presencia del género *Lactobacillus* en los muestreos realizados, confirmándose además en todos los casos la presencia de *L. pentosus*. En esta ocasión, aparecen enterococos a mediados de la fermentación en el fermentador G3 y a finales de la misma en el fermentador G6. Además, se amplifican los genes codificantes de plantaricina S a lo largo de la fermentación en los fermentadores G3 (inoculados con *L. pentosus* LPCO10) y G6 (sin inocular), mientras que en el fermentador G7 (inoculado con *L. pentosus* 128/2), estas secuencias aparecen al final de la fermentación. Por último, se detectan genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos en todos los fermentadores al final del proceso fermentativo.

VI. DISCUSIÓN

1.- SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BAL EN COCULTIVOS

A fin de conseguir mejorar la calidad final y la seguridad de los alimentos fermentados es frecuente utilizar cultivos iniciadores, consistentes en una o varias cepas de BAL, normalmente aisladas del mismo proceso fermentativo al que se van a aplicar (Plumed-Ferrer y *col.*, 2004; Di Cagno y *col.*, 2007; 2008; Giraffa y *col.*, 2010; Ruiz-Barba y *col.*, 1994; 2010; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012). Muchas de estas fermentaciones están basadas en procesos tradicionales en los que se desarrolla una microbiota natural, que es dominada por el cultivo iniciador inoculado (Giraffa y *col.*, 2010; Ruiz-Barba y *col.*, 2010; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012). Además de su contribución al desarrollo de las propiedades sensoriales específicas del producto final, los cultivos iniciadores de BAL previenen el deterioro de los alimentos y prolongan la vida útil de los mismos mediante la producción de una amplia gama de sustancias antimicrobianas. Entre éstas, las bacteriocinas han demostrado ser muy útiles para permitir a la cepa productora controlar el proceso fermentativo (Ruíz-Barba y *col.*, 1994; Ruiz-Barba y Jiménez-Díaz, 2012).

Entre las bacteriocinas más interesantes desde el punto de vista de su regulación se encuentra la plantaricina NC8 (PLNC8), una bacteriocina de clase IIb cuya producción está regulada mediante *quorum sensing*. Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus plantarum* NC8 durante el cocultivo con otras bacterias Gram-positivas específicas (Maldonado y *col.*, 2004a). Un fenómeno similar se ha descrito para *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Tabasco y *col.*, 2009). Además de PLNC8, la cepa NC8 produce otras dos bacteriocinas de clase IIb, denominadas plantaricinas EF (PLEF) y JK (PLJK), cuya producción también está regulada (Maldonado y *col.*, 2004a). En los cocultivos de la cepa NC8, además de bacteriocinas se produce un péptido autoinductor (PLNC8IF) que regula la producción de las bacteriocinas de 2 péptidos. Más recientemente se ha demostrado que el crecimiento y supervivencia de *L. plantarum* NC8 en fermentaciones de aceitunas mejora en gran medida cuando se coinocula con bacterias que inducen la producción, posiblemente debido al estímulo que implica la

mejora de dicha producción de bacteriocinas, entre otras causas (Ruíz-Barba y *col.*, 2010). Ello llevó a postular que las cepas productoras de bacteriocinas y las cepas inductoras podrían asociarse en cultivos iniciadores mixtos para la fermentación de los alimentos. Dado que los microorganismos crecen en comunidades polimicrobianas en la naturaleza, es posible que las interacciones entre los miembros que la forman influyan en su comportamiento (Paramithiotis y *col.*, 2006; Sieuwerts y *col.*, 2010; Smith y *col.*, 2004). Tales interacciones podrían implicar señalización entre especies debido a moléculas difusibles (di Cagno y *col.*, 2007, 2010). Existen trabajos que tratan la interacción de BAL y levaduras en la fermentación de alimentos (Kakarai y *col.*, 2007; Tada y *col.*, 2007). La mayoría de las interacciones descritas tienen efectos beneficiosos sobre las cepas implicadas -tales como el aumento de los niveles de producción de proteínas relacionadas con el estrés, facilitar la formación de biofilms, etc.- y por consiguiente, para el proceso de fermentación. Sin embargo, en algunos casos, estas interacciones pueden producir efectos secundarios indeseables, influyendo negativamente en el proceso de fermentación (Savard y *col.*, 2002; Smith y *col.*, 2004; Girafa y *col.*, 2010). Por ejemplo, y a pesar de utilizar cultivos iniciadores con características tecnológicas adecuadas, entre ellas la anteriormente comentada producción de sustancias antimicrobianas, en algunas ocasiones se puede producir un fallo en la implantación del inóculo, lo que puede originar la aparición de características no deseables en el producto final (Somers y *col.*, 2001; Georges y *col.*, 2008). Los datos recogidos en esta Memoria de Tesis Doctoral sugieren que la relación entre los microorganismos inoculados y la microbiota espontánea podría ser trascendente para el desarrollo de la fermentación, afectando al resultado final del proceso tal y como se ha demostrado en la fermentación de otros muchos alimentos (Somers y *col.*, 2001; Charlet y *col.*, 2008; Georges y *col.*, 2008; Di Cagno y *col.*, 2010). Probablemente, esto podría ser consecuencia de las múltiples interacciones microbianas que suceden de forma natural en los consorcios microbianos formados durante la fermentación. En nuestro caso, describimos un tipo de interacción entre BAL que probablemente tiene lugar en condiciones naturales. Por ello, es necesario prestar atención a las interacciones entre los inóculos utilizados y la microbiota natural que se desarrolla durante la fermentación, así como estudiar previamente la conveniencia de utilizar determinados cultivos iniciadores mixtos, por la posible aparición de interacciones negativas.

En este estudio mostramos que el cocultivo de dos cepas productoras de bacteriocinas, *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a, da lugar a una importante reducción o supresión de la producción de bacteriocinas. Además, observamos que este fenómeno no se limita a estas dos cepas y sino que también se produce en otros cocultivos con BAL aisladas a partir de diferentes fermentaciones de alimentos. Cuando se cocultivaron distintas cepas de BAL, encontramos con frecuencia que aquellas que producían bacteriocinas en cultivo puro, bien producían menos cantidad, bien dejaban de producir dichos compuestos antimicrobianos (Tabla 9). Por ejemplo, la cepa *L. plantarum* NC8-C, productora constitutiva de las plantaricinas de clase IIb, PLNC8 α /PLNC8 β , E/F y J/K, disminuía en mayor o menor medida su producción dependiendo de que una u otra cepa estuviera presente en el cocultivo. Este fenómeno era independiente de si la otra bacteria coinoculada producía o no bacteriocinas. En ciertos casos, cuando ambas cepas eran productoras, dicha reducción o abolición de la producción de bacteriocinas se producía en una, otra, o ambas cepas (Tabla 9).

El caso más llamativo lo constituyó la interacción *L. plantarum* NC8-C/*E. faecium* 6T1a. Ambas cepas producen sus correspondientes bacteriocinas en monocultivo pero cuando se cocultivan, disminuyen drásticamente su producción. Sin embargo, la cepa *E. faecium* 6T1a20 no productora de enterocinas I y J, derivada de la cepa 6T1a, induce la producción de bacteriocinas en *L. plantarum* NC8-C en cocultivo (Maldonado y col., 2004a). La única diferencia que existe entre *E. faecium* 6T1a y *E. faecium* 6T1a20 es que esta última cepa carece del plásmido pEF1, que codifica las enterocinas. Por lo tanto, se puede deducir que *E. faecium* 6T1a también estimula la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C. En ese caso, la disminución de la producción de bacteriocinas por la cepa NC8-C se hace más evidente debido a que la actividad inhibidora que se detecta debería ser la diferencia entre la cantidad de bacteriocinas inducidas y reprimida. De hecho, como se muestra en la Figura 27A y 27B (carril 4), el cocultivo de *L. plantarum* NC8-C con *E. faecium* 6T1a dio como resultado una ligera disminución en la producción de bacteriocinas por parte de *L. plantarum* NC8-C (180 UB/ml), mientras su producción en los cocultivos con *E. faecium* 6T1a-20 (360 UB/ml) (Figura 27A y 27B, carril 2). Esto sugiere que el nivel de bacteriocinas producidas por *L. plantarum* NC8-C en un cocultivo con *E. faecium* 6T1a es el resultado de un equilibrio entre la inducción e inhibición ejercida por el

enterococo. También, *L. plantarum* NC8-C afecta negativamente a la producción de enterocinas por *E. faecium* 6T1a, como se muestra en la Figura 27A y 27C (carriles 4 y 5). Teniendo en cuenta que sólo se cargó 1/10 del volumen correspondiente de SLC en el carril 5, la inhibición de la producción de bacteriocinas en *E. faecium* 6T1a en cocultivo se puede considerar como muy fuerte. Por otro lado, el plásmido ha sido secuenciado y no se han encontrado homologías con ninguna proteasa conocida (Ruíz-Barba y col., 2007), por lo que, no se podría atribuir la disminución de la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C ni por *E. faecium* 6T1a en cocultivo a la presencia de dicha proteasa.

Existen numerosos factores que podrían influir en la disminución o abolición de la producción de bacteriocinas por las BAL. Uno de ellos sería la dinámica poblacional de los cocultivos. En éstos se podrían dar fenómenos de competencia por los nutrientes entre las diferentes cepas, lo cual podría llevar a una disminución drástica del crecimiento de una, otra, o ambas y, por consiguiente, a un descenso de la producción de bacteriocinas. Sin embargo, esta hipótesis se descartó al observar que las diferencias de UFC/ml entre las cepas creciendo en cultivo puro o en cocultivo no eran significativas, por lo que ello no explicaría la drástica disminución de la producción de bacteriocinas. De igual forma, se descartó la posibilidad de que la disminución de la producción de bacteriocinas se debiese únicamente a la presencia física de otra cepa en el mismo cultivo que la cepa productora. Efectivamente, *L. plantarum* NC8-C seguía produciendo bacteriocinas en presencia de aquellas cepas que inhibían su producción pero, en este caso, inactivadas por calor, lo que indicaba que era necesario que las cepas causantes de la disminución de la producción de bacteriocinas estuvieran vivas. Por otro lado, se comprobó que no era necesario que las cepas que interfieren en la producción estuviesen en contacto directo con la productora, ya que si se cultivaban éstas separándolas mediante una barrera que impidiese su contacto físico, pero no el paso de moléculas, los efectos observados eran similares que cuando se cocultivaban sin barreras físicas (Figuras 20 y 21). Maldonado y col. observaron igualmente que para inducir la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8 era necesaria la presencia de otras bacterias Gram positivas en el mismo medio y que éstas podían estar o no en contacto directo con ella para inducir la producción de bacteriocinas (Maldonado y col.,

2003; Maldonado y *col.*, 2004a, 2004b; Maldonado-Barragán, 2005; Rojo-Bezares y *col.*, 2008; Maldonado y *col.*, 2009; Ruiz-Barba y *col.*, 2010).

A la luz de estos resultados se podrían vislumbrar varias posibles causas de la abolición de la producción de bacteriocinas. Una de ellas podrían ser los cambios en las condiciones físico-químicas del medio de cultivo que se producen cuando se desarrolla un cultivo puro o cuando lo hace un cultivo mixto. Otra posibilidad sería la presencia de alguna molécula en los cocultivos, producida por la cepa inhibidora, que llevase en último término a una disminución o abolición de la producción de bacteriocinas. Como factor físico-químico se estudió la influencia del pH, ya que se pueden observar variaciones de este parámetro dependiendo de si se trata de un cultivo puro o de un cocultivo. Dicho estudio se abordó de dos formas diferentes: a) utilizando medio de cultivo con distintos pHs de partida (pHi), y b) manteniendo un valor de pH constante a lo largo de todo el cultivo. Cuando se utilizaron distintos pHi para cocultivar las cepas *L. plantarum* NC8-C y *E. faecium* 6T1a se pudieron observar diferencias en producción de bacteriocinas por ambas cepas tras 6 y 24 h de incubación. Independientemente del pH inicial del medio y el tiempo de cultivo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de cada una de las cepas en el cocultivo con respecto a su respectivo monocultivo. También se puso en evidencia que el pH final del medio en el cocultivo venía marcado por la cepa *L. plantarum* NC8-C, la cual acidificaba el medio hasta un valor de 4,5 a las 6 h y ligeramente inferior a 4,0 a las 24 h. En estas condiciones se observó que *L. plantarum* NC8-C producía las mismas UB/ml en monocultivo que en cocultivo en el rango de pHi de 6,1-5,0 y que dicha actividad disminuía conforme el pHi del medio era menor. Sin embargo *E. faecium* 6T1a sólo producía enterocinas cuando el pHi estaba comprendido entre 6,1 y 5,5, disminuyendo de forma sustancial en cocultivo a esos mismos pHi. Estos resultados indicaban que dicha disminución podría deberse a la acidificación del medio provocada por *L. plantarum* NC8-C y que afectaría al crecimiento de *E. faecium* 6T1a, por lo que se procedió a estudiar la producción de bacteriocinas a pH regulado el pH del medio durante el cocultivo.

Manteniendo el pH constante a 6,1 ó 5,0 se observó que las diferencias entre el número de UFC/ml de cada una las cepas en monocultivo o en cocultivo no eran significativas, mientras que la diferencia en las UB/ml era muy notable, siendo

particularmente ostensible en el caso de *E. faecium* 6T1a (Figuras 25 y 26). Estos resultados descartaban la posibilidad de que la disminución de la producción de bacteriocinas por ambas cepas en cocultivo fuera consecuencia directa del pH del medio de cultivo.

En la mayoría de los casos estudiados la disminución de la producción de bacteriocinas se daba en cocultivos de cepas productoras. Cabría entonces la posibilidad de que el efecto observado no se debiese a una disminución de la producción de bacteriocinas, sino a un enmascaramiento de su acción sobre la cepa indicadora utilizada para cuantificar la cantidad de las mismas. Es decir, que la presencia de dos bacteriocinas juntas disminuyera la capacidad de ambas de inhibir a la cepa sensible, mediante un fenómeno de antagonismo entre ellas. Para comprobarlo, se hicieron mezclas de las plantaricinas producidas por *L. plantarum* NC8-C y las enterocinas producidas por *E. faecium* 6T1a, poniéndose de manifiesto que en ningún caso se producía una interferencia en la actividad inhibidora de las mismas (Tabla 10).

Descartados los factores físico-químicos, se podría especular que la presencia de algún tipo de molécula en los cocultivos sería la causa del fenómeno descrito. Cuando se añadieron sobrenadantes libres de células (SLC) procedentes de cocultivos de cepas que afectaban a la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C, se observó (Figura 22) que ésta presentaba un patrón de producción de bacteriocinas muy parecido al producido cuando *L. plantarum* NC8-C crecía en cocultivo con las cepas de las que procedían los SLC (Figura 15B). Por otro lado se comprobó que, cuando los SLC habían sido congelados antes de su utilización, no se veía afectada la producción de bacteriocinas por la cepa NC8-C, lo que indicaría que el compuesto que provoca dicho efecto sería una sustancia inestable a la congelación/descongelación.

Todos estos resultados apuntan a que la abolición de la producción de bacteriocinas es debida a la presencia de alguna sustancia liberada al medio durante el crecimiento en el cocultivo. Esta hipótesis se basa en la necesidad de que la cepa causante de la disminución de la producción de bacteriocinas por *L. plantarum* NC8-C esté viva, aunque no sea necesario un contacto directo entre las cepas, y a que los SLC obtenidos durante los cocultivos tienen el mismo efecto sobre las cepas productoras de

bacteriocinas. De hecho, existen descritas distintas enzimas capaces de actuar como inhibidores del *quorum sensing*, al degradar las señales necesarias para que se produzca éste (Park y *col.*, 2003; Kang y *col.*, 2004; Dong y Zhang, 2005; Uroz y *col.*, 2009; Huma y *col.*, 2011; Kalia y Purohit, 2011; Romero y *col.*, 2011)

2.- BIOFILMS

En la bibliografía aparecen descritas numerosas especies de BAL con capacidad de formar biofilms. Entre ellas, se incluyen las especies *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. fructivorans* (Millsap y col., 1997; Somers y col., 2001; Sturme y col., 2005; Tannock y col., 2005; Kawarai y col., 2007; Lebber y col., 2007; Kubota y col., 2008; Kubota y col., 2009) pero hasta el momento, ninguna perteneciente a la especie *L. pentosus*. En esta Memoria de Tesis Doctoral se describe la capacidad de formar biofilms por cepas de BAL aisladas de alimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Dependiendo de la naturaleza de la superficie de adhesión, las cepas de BAL presentaban mayor o menor capacidad de formar biofilms. Mientras que en superficies de poliestireno la adhesión era muy débil, cuando se utilizaron materiales de fibra de vidrio con poliéster o de polietileno, la capacidad de adhesión aumentaba considerablemente. Si tenemos en cuenta que en la industria de la aceituna de mesa se utilizan fermentadores fabricados con estos dos tipos de materiales, aparentemente éstos representarían una buena superficie de anclaje para los diferentes microorganismos que contribuyen al proceso de fermentación. Esto puede afectar a la fermentación láctica que tiene lugar durante la elaboración de la aceituna de mesa, ya que los biofilms formados sobre la cara interna de los fermentadores, en contacto con los frutos y la salmuera, podrían constituir un reservorio de microorganismos que servirían de inóculos o cultivos iniciadores “naturales” de una campaña a otra. En este sentido, existen varias evidencias que apuntan al papel clave que podrían jugar los biofilms en este proceso fermentativo.

Por un lado, en las fermentaciones espontáneas (donde no se utilizan cultivos iniciadores), a pesar de que la carga microbiana del material de partida es muy escasa, al cabo de unos días la población de *L. pentosus* es muy numerosa, dominando el proceso fermentativo junto a las levaduras (Garrido-Fernández y col., 1997; De Castro y col., 2002; Kulisic y col., 2005; Campaniello y col., 2005; De Bellis y col., 2010). Por otro, estudios realizados anteriormente en nuestro grupo indican que en cada planta de

procesado de aceitunas persisten año tras año las mismas cepas de *L. pentosus* (Maldonado y col., 2002). Y finalmente, que en aquellos fermentadores donde se inocularon cultivos iniciadores de cepas de *L. pentosus* en el pasado, aparecen de nuevo dichos lactobacilos.

Un aspecto importante, no sólo en la formación de biofilms, sino también en el desarrollo microbiano, es la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos. Al estudiar la formación de biofilms utilizando distintas temperaturas de incubación se pudo observar que a baja temperatura (4 °C) la formación de biofilms era prácticamente nula, debido seguramente al bajo desarrollo microbiano. Sin embargo, a temperatura ambiente (22-25 °C) y a 30 °C la formación de biofilms aumentaba, siendo dicha capacidad mayor al primer rango de t^a. Este dato resulta interesante, ya que las fermentaciones en la industria de la aceituna se realizan a temperatura ambiente (Garrido-Fernández y col., 1995; Arroyo-López y col., 2012), lo que a priori, podría favorecer la formación de biofilms.

Otro aspecto importante en la formación de biofilms es el *acondicionamiento* de las superficies, debido al crecimiento previo de otros microorganismos, ya que en la industria, los fermentadores se reutilizan año tras año para la elaboración de la aceituna de mesa. En este sentido, en los ensayos realizados por nosotros se aprecia que la capacidad de formación de biofilms por las cepas de *L. pentosus* es mucho mayor cuando la superficie ha sido colonizada previamente por otras BAL, comparado con la misma superficie sin *acondicionar* . Además, la adhesión va aumentando conforme se repiten los cultivos de las cepas sobre la misma superficie. Por ejemplo, cuando las cepas que *acondicionaban* la superficie pertenecían al género *Pediococcus* , la adhesión inicial era baja, aumentando paulatinamente conforme se repetían los cultivos de las cepas sobre la misma superficie. También son destacables las diferencias observadas dependiendo del modo de lavado de las superficies; cuando el lavado era exhaustivo, la adhesión de las cepas entre cultivo y cultivo no se veía favorecida, mientras que si éste era liviano, la capacidad de formación de biofilms iba aumentando progresivamente.

Está descrito que la inmersión de un sustrato sólido en casi cualquier líquido acuoso conduce a la fijación rápida de moléculas orgánicas en su superficie, para formar

lo que se conoce como una “película de acondicionamiento” (Zottola y Sasahara, 1994; Costerton, 2009; Wimpenny, 2009). Dichas “películas” facilitan la unión de los microorganismos a dichas superficies y que, después de un periodo de tiempo, forman una asociación fuerte y específica mediada por los productos adhesivos generados por los propios microorganismos (Kumar y Anand, 1998; Davey y O’Toole, 2000; Beer y Stoodley, 2006; Kolter y Greenberg, 2006; Nobile y Mitchell, 2007; Reid y *col.*, 2007; Wimpenny, 2009; Remis y *col.*, 2010; Karunakaran y *col.*, 2011). En este sentido, la salmuera de fermentación de las aceitunas de mesa proporciona un entrono muy rico en nutrientes procedentes de los frutos, lo que posiblemente contribuye a formar “películas de acondicionamiento” en las diferentes superficies sólidas del entorno de la fermentación. De este modo, cuando se *acondicionaron* portaobjetos con salmuera procedente de la industria se observó que al aumentar el tiempo de *acondicionamiento* de 3 a 30 días, la adhesión a los mismos se veía favorecida, aumentando en casi dos unidades logarítmicas las UFC adheridas. Además, conforme aumentaba el tiempo de incubación, los microorganismos presentes en el medio de cultivo tenían una tendencia a disminuir en número, mientras que en los portaobjetos la tendencia era opuesta, lo que indicaría que aumentaba en número de microorganismos adheridos formando colonias que conducirían a la formación de biofilms.

La formación de biofilms sobre superficies abióticas pueden entrañar ciertos riesgos a nivel industrial y médico, por lo que es preciso evitar su formación ya que pueden crear problemas de índole sanitario. Las BAL son conocidas también, además de por ser organismos beneficiosos, por ser contaminantes de productos alimentarios, lo que provoca una preocupación constante en la industria de la alimentación (Naitou, 1999). Pueden ocasionar contaminación o deterioro de productos cárnicos (Niven y *col.*, 1949; Björkroth y Korkeala, 1997; Aymerich y *col.*, 2003), encurtidos (Naitou, 1999; Sheneman y Costilow, 1955), mayonesa (Kurtzman y *col.*, 1971), aderezo para ensaladas (Kurtzman y *col.*, 1971), queso (Somers y *col.*, 2001), pasta fermentada de soja (Nikkuni y *col.*, 1996), salsa de soja (Suezawa y *col.*, 1993; Naitou, 1999), sake o vino de arroz (Naitou, 1999) y cerveza (Sakamoto y Konings, 2003). En la mayoría de los casos el deterioro originado por las BAL se origina en las líneas de producción o en las materias primas, siendo dichas bacterias resistentes al estrés ambiental. Aunque existen muchos estudios sobre resistencia al estrés de las BAL, la mayoría de ellos se

centran en la resistencia a los ácidos estomacales y a los biofilms que constituyen la placa dental, pero sólo algunos en el deterioro de los alimentos (Imai, 1989; Suezawa y *col.*, 1993; Nikkuni y *col.*, 1996; Naitou, 1999; Entani y *col.*, 2000; Kubota y *col.*, 2008).

No obstante, los biofilms de BAL pueden ser una herramienta eficaz en la lucha contra otros contaminantes de alimentos. En este sentido Guerrieri y *col.* (2009), demostraron que los biofilms formados por diferentes BAL, tanto productoras de bacteriocinas como no productoras, eran capaces de influir en la supervivencia de *Listeria monocytogenes*, patógeno que se desarrolla en alimentos. Guerrieri y *col.* (2009) observaron además que los biofilms formados por las BAL eran capaces de reducir la supervivencia de *L. monocytogenes* tanto en estado platónico como cuando se encontraba formando biofilms. Por ello, en nuestro estudio se ensayó el efecto del tratamiento de las superficies con distintas bacteriocinas producidas por BAL, así como la adición de bacteriocinas al medio de cultivo, en la formación de biofilms por diferentes bacterias. Cuando la superficie había sido tratada con bacteriocinas, por regla general se producía un ligero aumento de la capacidad de formación de biofilms, siendo especialmente llamativos los casos de las cepas *L. pentosus* 55/1 y *L. pentosus* LPS2005. Por otro lado, cuando las bacteriocinas se añadieron al medio de cultivo, se solía producir una bajada significativa de la capacidad de formación de biofilms a altas concentraciones de las mismas, no debiéndose en la mayoría de los casos a un retardo del crecimiento de la cepa ensayada. Esto se pudo observar en el caso de la cepa *E. faecalis* 1, la cuál en presencia de altas concentraciones de mundticina, enterocinas L50A y L50B, plantaricinas NC8, EF y JK y enterocina A, vio mermada su capacidad de formación de biofilms, mientras que el crecimiento no se afectó de forma significativa.

La capacidad de formación de biofilms puede verse afectada por la presencia de otros microorganismos en el mismo medio de cultivo. En este sentido se dan situaciones opuestas: en unos casos, la capacidad de formación de biofilms por ciertas bacterias se ve potenciada, mientras que en otros, por el contrario, se ve inhibida. Esta situación se da tanto en cultivos mixtos entre BAL como en cocultivos BAL-levaduras. Kawarai y *col.* (2007) observaron que el cocultivo de BAL con levaduras procedentes de la bebida

alcohólica sake conducía a la formación de biofilms mixtos, a pesar que ninguno de ellos era capaz de formarlos en monocultivo. La Figura 41 pone de manifiesto que las cepas de *L. pentosus* LPCO10 y *L. pentosus* 128/2 no son capaces de formar biofilms cuando se encuentran en monocultivo, mientras que las levaduras aisladas de la fermentación de aceitunas sí lo son y, cuando se ambas encuentran en cocultivo, la capacidad de formación de biofilms de dichas levaduras disminuye. Por el contrario, cuando se cocultivaron distintas cepas de BAL entre ellas, la tendencia general fue a aumentar ligeramente la formación de biofilms en el cocultivo (Figura 39). Sin embargo, en este mismo ensayo se encontró un caso llamativo, donde la cepa *E. faecalis* 1 (utilizada como control en este estudio) vio disminuida su capacidad de formación de biofilms cuando se encontraba en cocultivo con otras BAL, todo ello a pesar de no verse afectada su capacidad de crecimiento en el mismo.

Aunque los primeros estudios sobre la formación de biofilms se centraron en aquellos formados por una sola especie de microorganismo, estudios más recientes estudian la formación de biofilms mixtos, ya que en la práctica, en entornos naturales y en alimentos hay más de una especie presente (Adam y *col.*, 2002; Hogan y Kolter, 2002; Eglund y *col.*, 2004; Rao y *col.*, 2005; Romano y Kolter, 2005; An y *col.*, 2006; Burmolle y *col.*, 2006; Gibson y *col.*, 2009; Furukawa y *col.*, 2010). Hogan y Kolter (2002) pusieron de manifiesto que la congregación de bacterias y levaduras resultaba en una interacción patógena (Gibson y *col.*, 2009). Kawarai y *col.* (2007) encontraron combinaciones de BAL y levaduras capaces de formar biofilms cuando se encontraban juntas en el medio de cultivo. Así, observaron que ninguna de las cepas de *S. cerevisiae* ni de las BAL ensayadas, entre las que se encontraban cepas de *L. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *L. paracasei*, *L. sakei*, *L. acidophilus* o *L. casei*, eran capaces de formar biofilms en monocultivo, mientras que algunas sí tenían dicha capacidad cuando se cocultivaron con distintas cepas de *S. cerevisiae* (Kawarai y *col.*, 2007). En este sentido, cuando en nuestro estudio ensayamos la capacidad de formación de biofilms en cultivos mixtos de aquellas levaduras capaces de coagregar con determinadas BAL, se pudieron observar resultados bien distintos de los obtenidos anteriormente en nuestro estudio. Por ejemplo, mientras que las levaduras *C. boidinii*, *I. occidentalis* y *W. anomalus* formaban biofilms débiles cuando se encontraban en cultivo puro, y las BAL eran totalmente incapaces de formarlos (Figura 44), cuando se encontraban en cocultivo estas levaduras

y las BAL se producía un incremento importante de la formación de biofilms, muy acusado en el caso de los cocultivos con *C. boidinii* o *W. anomalus*. *Issatchenka occidentalis* mantuvo su patrón de formación de biofilms con independencia de la BAL presente en el cocultivo. Esta capacidad de formación de biofilms en cocultivo se podría atribuir directamente a la capacidad de coagregación de las cepas ensayadas. Sin embargo, según Pretzer y col. (2005) la coagregación se puede inhibir en presencia de manosa. Efectivamente, al añadir manosa se observó que en ningún caso se producían cambios en la capacidad de adhesión de los cocultivos a las superficies. De estos resultados se deduce que la manosa inhibe la coagregación entre BAL y levaduras, pero no impide la formación de biofilms.

Existen muchos compuestos naturales capaces de afectar al desarrollo de los biofilms formados por una única cepa, aunque no se ha demostrado que suceda lo mismo en biofilms mixtos (Shank y Kolter, 2009). Puesto que durante la fermentación de la aceituna de mesa aparecen multitud de compuestos en la salmuera de fermentación, se ensayó la capacidad de formación de biofilms en cocultivos de BAL con levaduras en presencia de distintos polifenoles presentes durante la elaboración de la aceituna de mesa. Aunque el contenido en polifenoles de las aceitunas verdes al estilo español es bajo, es deseable que las BAL presenten un grado de resistencia moderada a ellos, ya que inhiben el desarrollo bacteriano. En este sentido, los resultados obtenidos fueron muy diversos: el tirosol facilitó la formación de biofilms en los cocultivos con las levaduras *C. boidinii* e *I. Occidentalis*, mientras que el hidroxitirosol influyó de forma diferente según de qué cocultivo se tratara. Así, mientras que en los cocultivos con *C. boidinii* inducía un aumento considerable de la formación de biofilms cuando el polifenol se encontraba a bajas concentraciones, en los cocultivos con *I. occidentalis* y *W. anomalus* dicha estimulación se producía a altas concentraciones del mismo. El hidroxitirosol-OH tuvo los mismos efectos que el hidroxitirosol, y la oleuropeína produjo un incremento en la formación de biofilms en los cocultivos con *C. boidinii*, *I. occidentalis* y *S. cerevisiae*, aumentando conforme la dilución del polifenol era mayor.

Por otro lado, se pudo comprobar la necesidad del contacto célula-célula para que formaran biofilms mixtos *C. boidinii* y distintas BAL, ya que al añadir SLC procedentes de cocultivos de ambas no se vio en ningún caso estimulación de la

formación de dichas estructuras. Furukawa y *col.* (2010) comprobaron que era necesario el contacto célula-célula para la formación de biofilms, ya que en un estudio previo observaron que *L. plantarum* y *S. cerevisiae* en cocultivo eran capaces de formarlo (Kawarai y *col.*, 2007), mientras que al añadir al cultivo de la levadura SLC procedentes de la bacteria, no se producía aquél.

En el estudio que realizamos a nivel de plantas piloto se puso de manifiesto por microscopía electrónica de barrido la presencia de biofilms tanto en superficies bióticas como abióticas. Típicamente, los microorganismos que forman un biofilm están incrustados en una sustancia polimérica extracelular denominada *matriz*, que es excretada por las propias células (Beer y Stoodley, 2006; Nobile y Mitchell, 2007; Karunakaran y *col.*, 2011). Así, en las superficies de portaobjetos introducidos en los fermentadores se observó una progresiva adhesión de microorganismos formando en primer lugar microcolonias, luego crecían conforme se adherían más microorganismos, formando macrocolonias y conforme avanzaba la fermentación, complejos biofilms, constituidos por bacterias y levaduras. En ellos se podía observar que las paredes celulares de los microorganismos se encontraban unidas y, además, en el caso de las levaduras sus paredes celulares mostraban numerosas protuberancias/rugosidades. Kawarai y *col.* (2007) describieron una situación similar en cepas de levaduras que forman parte de biofilms mixtos con bacterias lácticas aisladas de yogurt tales como *L. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *L. paracasei*, *L. sakei*, *L. casei*, *L. helveticus* y *L. bulgaricus*. Su hipótesis era que las bacterias excretarían una sustancia que provocaría en la levadura una serie de alteraciones en la pared celular, lo que favorecería su anclaje a una superficie donde se desarrollaría un biofilm.

A principios de los años setenta las investigaciones apuntaban a que los microorganismos podrían adherirse a los alimentos y a las superficies en contacto con ellos (Hood y Zottola, 1995). En el caso específico de la aceituna de mesa, la presencia de bacterias y levaduras presentes en la superficie de la aceituna fue descrita por primera vez por Nychas y *col.* (2002) durante la fermentación de aceitunas negras. Utilizando MEB observaron que las levaduras tendían a predominar en la superficie de la aceituna y en los estomas, mientras que las bacterias predominaban en los espacios intercelulares de las cámaras sub-estomáticas. En nuestro trabajo, cuando se analizaron

directamente las epidermis de los frutos al MEB se observó que la arquitectura de las comunidades microbianas era completamente diferente a la observada en los portaobjetos de vidrios antes estudiados. Se comprobó la existencia de biofilms mixtos, al contrario de lo descrito por Nychas y *col.* (2002), cubriendo toda la superficie de los frutos y manteniéndose a lo largo de toda el periodo de fermentación. Éstos presentaban las características propias de un biofilm, es decir, asociaciones polimicrobianas embebidas en una matriz, donde a medida que avanza la fermentación se hace más difícil discernir entre unos microorganismos y otros. Aunque la mayoría de los microorganismos se desarrollaban en el interior de los biofilms, se observó que existían bacterias y levaduras fuera de la matriz. Está descrito que los microorganismos que forman parte de comunidades microbianas (Davey y O'Toole, 2000; Costerton, 2009; Wimpenny, 2009) son capaces de producir células plantónicas ocasionales que se desprenden de la matriz y migran para establecer nuevas comunidades en las diferentes superficies disponibles en el entorno.

Por otro lado, al analizar la epidermis de aceitunas procedentes de fermentadores industriales se visualizaron unas estructuras semejantes a hifas en determinadas zonas de los frutos (Figura 57). Aunque no entramos en su estudio, éstas guardan cierto parecido a las estructuras formadas por *Candida albicans* cuando forma biofilms. Está descrito que cuando los biofilms de *C. albicans* alcanzan la madurez, el crecimiento celular se reprime pero a su vez se potencia la formación de hifas, lo que favorece su dispersión (Blankenship y Mitchell, 2006). Curiosamente, el tirosol juega un papel importante en el *quorum sensing* para la formación de biofilms por *C. albicans* (Chen y *col.*, 2004; Alem, y *col.*, 2006), polifenol que se encuentra en las aceitunas y que produjo en nuestro estudio un aumento en la formación de biofilms mixtos BAL-levaduras.

Mediante una combinación de métodos, químico y mecánico (Böckelmann y *col.*, 2003; Weber y Legge, 2010), fue posible separar los biofilms de la epidermis de las aceitunas y estimar así el número de las diferentes poblaciones de BAL y levaduras durante la fermentación. De esta forma, se pudo comprobar que, tanto BAL como las levaduras se encontraban en un número muy elevado ya desde el séptimo día después de la inoculación, siguiendo así hasta el final del proceso. Teniendo en cuenta que la

superficie exterior de una aceituna gordal (Weisstein, 2011) se estima en $23,25 \pm 4,34$ cm^2 , el número medio de bacterias y levaduras por fruto al final de la fermentación es de 10^{10} y 10^{11} log UFC/ml, respectivamente. Por lo tanto, si el peso de una aceituna gordal se estima en $9,6 \pm 0,4$ g y un fermentador industrial contiene aproximadamente 9.500 kg de aceitunas, el número total de bacterias y levaduras por fermentador es mayor de 14 unidades logarítmicas de UFC. Por otro lado, las poblaciones de *L. pentosus* y levaduras presentes en las salmueras de fermentación de aceitunas al estilo español suelen ser de 10^9 y 10^6 log UFC/ml, respectivamente (Garrido-Fernández y col., 1995; 1997; Panagou y Tassou, 2006; Panagou y col., 2008; Hurtado y col., 2008; 2010; Hurtado, 2010). Teniendo en cuenta que los fermentadores industriales poseen unos 5.500 litros de salmuera, el total podría estimarse en aproximadamente 16 y 13 unidades logarítmicas de UFC la presencia de *L. pentosus* y levaduras respectivamente. Estas estimaciones llevan a la conclusión de que los frutos y las salmueras son fuentes de un número similar de BAL, pero las aceitunas contienen un mayor número de levaduras.

Además de estudiar cómo se desarrollaban los biofilms a lo largo del proceso fermentativo, se estudió también la capacidad de implantación de los cultivos iniciadores en la epidermis de las aceitunas, así como el desarrollo de posibles cepas indígenas. En un principio, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que ni la cepa *L. pentosus* 128/2 ni *L. pentosus* LPCO10 fueron capaces de dominar sobre las cepas de *L. pentosus* autóctonas en el biofilm, ya que se obtienen grupos diferentes a ellas dentro de cada dendograma. En el caso del fermentador inoculado con la cepa *L. pentosus* LPCO10 se observa que algo más de la mitad de las colonias aisladas de la superficie de los frutos son muy similares a esta cepa. Sin embargo, en el caso del fermentador inoculado con de la cepa *L. pentosus* 128/2 la mayoría de los perfiles obtenidos son diferentes a ésta. En la fermentación espontánea, como control, se obtuvieron varios clúster correspondientes a distintas cepas silvestres de *L. pentosus*. Por otro lado, cuando los fermentadores se inocularon con *L. pentosus* LPCO10 marcado con una doble resistencia a str y rif, se observó una clara separación entre las colonias aisladas de la salmuera y las aisladas del biofilm, siendo muy marcada desde el inicio de la fermentación hasta mediados de ésta, a los 41 días de fermentación. Sin embargo, al final de la fermentación se dejó de observar esa tendencia, no observándose una separación clara entre cepas aisladas en salmuera y en biofilms. No obstante, en

todos los casos el nivel de semejanza era superior al 92%, por lo que si tomamos como referencia un 80% de semejanza para decir que eran cepas diferentes, en este caso, tenemos que asumir que todas las colonias encontradas pertenecían a la misma cepa. En este ensayo por el contrario, la implantación del inóculo fue correcta, ya que se impuso frente a las cepas silvestres presentes en la salmuera. La diferente implantación de los inóculos entre las distintas experiencias puede ser debida a la carga microbiana inicial de la aceituna de partida, pudiendo ésta afectar en algunos casos a la correcta implantación del inóculo.

En el seguimiento de los fermentadores inoculados con *L. pentosus* 128/2 y con *L. pentosus* LPCO10 de las plantas piloto no se evaluó únicamente la formación de biofilms a lo largo de todo el proceso, sino que se estudió también la presencia de diferentes microorganismos en los fermentadores. Los resultados muestran que, además de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores, se desarrollaron otras cepas pertenecientes a diversos géneros. Así, en el ADN purificado del sobrenadante de extracción de los biofilms de la epidermis de los frutos, del exopolisacárido y del precipitado de los biofilms de las aceitunas, pudimos constatar la presencia de material genético correspondiente a *L. pentosus* en todos ellos, exceptuando el encontrado en el exopolisacárido, donde se determinó la presencia de *Lactobacillus*, pero sólo se pudo confirmar que perteneciese a *L. pentosus*, probablemente debido a una baja calidad del material purificado. La presencia de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores se puso de manifiesto a través de este análisis, ya que se aisló ADN codificante para plantaricina S, bacteriocina producida por la cepa *L. pentosus* LPCO10. Además del de lactobacilos, se encontró material genético de *Enterococcus*, al poco tiempo de comenzar la fermentación en el precipitado y más tarde en el sobrenadante de extracción del biofilm. También se encontró ADN de *Leuconostoc* a partir del primer mes de fermentación, aunque sólo en el sobrenadante de extracción. Por el contrario, no se encontraron rastros de ADN de *Pediococcus* en ninguna de las muestras tomadas. Finalmente, también se detectó la presencia de genes codificantes de exopolisacárido específico de *L. pentosus* en todos los fermentadores, aunque de forma más tardía en algunos de ellos.

Durante décadas se había asumido que las diferentes poblaciones microbianas de *L. pentosus* y levaduras, microorganismos mayoritarios en las fermentaciones de aceitunas al estilo español, aparecían exclusivamente en estado planctónico (Ruiz-Barba y col., 1994; Garrido-Fernández y col., 1995; 1997; Panagou y Tassou, 2006; Panagou y col., 2008; Hurtado y col., 2008; 2010) debido a que hasta ahora, el desarrollo de las poblaciones microbianas se había seguido exclusivamente en las salmueras de fermentación. Por primera vez, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran claramente la capacidad de *L. pentosus* y de las levaduras para colonizar tanto superficies bióticas como abióticas en contacto con la salmuera, formando biofilms mixtos en la fermentación de aceitunas al estilo sevillano o español. La propia arquitectura del biofilm, donde los microorganismos se encuentran envueltos en una matriz de exopolisacáridos, podría ayudar a los microorganismos a sobrevivir durante largos periodos de tiempo o resistir a factores ambientales que normalmente rigen la fermentación de la aceituna de mesa (pH bajo, alta concentración de sal, presencia de compuestos polifenólicos). Hood y Zottola (1995) señalaron que los microorganismos que forman parte de biofilms podían ser más resistentes a los desinfectantes que los de vida libre. Años más tarde, Kubota y col. (2008) demostraron que una cepa de *L. plantarum* era más resistente a factores ambientales cuando formaba biofilms que cuando se encontraba en estado planctónico. Behrendt y col. (2012) estudiaron la diversidad microbiana a distintos niveles del biofilm formado en la cloaca de *Lissoclinum patella*, describiendo cómo un biofilm puede proporcionar distintos micronichos, favoreciendo así una enorme diversidad bacteriana en un área muy reducida. En nuestro caso, la formación de biofilms sobre la superficie de aceitunas, además de la función protectora, podría deberse a que los frutos son fuente de sustratos (vitaminas, aminoácidos, azúcares, etc) que los microorganismos necesitan para crecer, así que la colonización de la epidermis de los frutos por ciertas cepas podría significar una adaptación ventajosa frente a otras incapaces de formar biofilms.

Aunque existen algunas publicaciones sobre la adhesión microbiana a la piel de las aceitunas (Nychas y col., 2002; Lavermicocca y col., 2005; Lavermicocca, 2006; Lavermicocca y col., 2010; De Bellis y col., 2010), los resultados presentados en este trabajo representan avances sustanciales con respecto a éstos. En estos trabajos previos sólo aparecían BAL unidas a las superficies de aceitunas, no apareciendo interacción

alguna con levaduras y más importante aún, los microorganismos no parecen vivir incrustados en la matriz del biofilm, lo contrario de lo que demuestran nuestros resultados. Podría especularse que la ausencia de biofilms verdaderos en estos casos fue causada por la adición de bacterias a las aceitunas ya procesadas y, además, porque estas bacterias (*L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum*) no son habitantes naturales de la fermentación de aceitunas de mesa (De Bellis y col., 2010; Lavermicocca y col., 2005; 2010). De este modo serían capaces de adherirse a la epidermis de las aceitunas pero no podrían interactuar con la microbiota espontánea para formar biofilms verdaderos. En el caso de las fermentaciones espontáneas, tales como las descritas por Nychas y col. (2002) las aceitunas no se trataron previamente con lejía para alterar la permeabilidad de la cutícula como ocurre en las aceitunas al estilo español con lo que, en estos casos, actuaría como barrera para la liberación de nutrientes desde el interior de los frutos. En nuestro trabajo, los microorganismos se encontraban en contacto directo con la fuente de nutrientes y esta circunstancia probablemente juega un papel esencial en la formación de biofilms sobre la superficie de las aceitunas. Estas comunidades microbianas desempeñan, sin duda, un papel importante en el proceso, garantizando así una correcta fermentación del fruto.

VII. CONCLUSIONES

La fermentación de aceitunas es un proceso microbiológico sumamente complejo, en el que juegan un papel muy importante las interacciones entre las diferentes poblaciones de microorganismos que se desarrollan en ese nicho ecológico. En esta Memoria de Tesis Doctoral se han estudiado algunos casos de interrelaciones microbianas que pueden tener gran influencia en el éxito final del proceso fermentativo.

1.- La pugna entre bacterias del ácido láctico por ocupar el entorno de la fermentación de aceitunas podría conducir, en ciertos casos, a la eliminación o atenuación de determinadas características ventajosas desde el punto de vista ecológico, por ejemplo, la producción de bacteriocinas. Por ello, cuando se utilicen cultivos iniciadores de dichas bacterias, productoras de bacteriocinas, es necesario tener en cuenta esas posibles interacciones negativas entre los inóculos y la microbiota natural que se desarrolla en dicho proceso fermentativo.

2.- Los microorganismos que pueblan el entorno de la fermentación de aceitunas -principalmente, determinadas especies de levaduras y diversas cepas de *Lactobacillus pentosus*- son capaces de formar comunidades polimicrobianas en las diferentes superficies que ofrece el ambiente fermentativo: paredes del fermentador y epidermis de los frutos. Por tanto, la forma de vida de estos microorganismos no es exclusivamente plantónica, tal y como se concebía previamente.

3.- Esas comunidades mixtas *Lactobacillus pentosus*-levaduras son mucho más complejas cuando se edifican en la epidermis de las aceitunas que cuando lo hacen en las superficies sólidas del fermentador. En el primer caso, se puede hablar de verdaderos biofilms, en el que los microorganismos que los componen están embebidos en una matriz polimérica compleja, formada por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. En el segundo, aún cuando se pueden apreciar zonas de interacción entre levaduras y lactobacilos, no existe tal matriz envolvente y se puede distinguir la morfología de los microorganismos que componen la comunidad.

4.- Al menos *in vitro*, la capacidad de adhesión a las diferentes superficies abióticas del entorno de la fermentación se ve condicionada por diferentes factores, tales como la naturaleza de las mismas -preferentemente se adhieren a los materiales de los

que están fabricados los fermentadores, fibra de vidrio y polietileno-, el *acondicionamiento biológico* -superficies colonizadas previamente por cepas del género *Pediococcus* u otras BAL, que preceden a *L. pentosus* en la fermentación-, por la presencia de otras bacterias y/o levaduras, y/o por la existencia de compuestos fenólicos en el medio de cultivo, compuestos fenólicos que se encuentran en los frutos.

5.- Puesto que tanto levaduras como *L. pentosus* están presentes y viables en la cutícula de las aceitunas hasta el final del proceso fermentativo, este alimento podría constituir un magnífico y eficiente vehículo de transporte de dichos microorganismos al tracto gastrointestinal humano.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

Adam, B., Baillie, G. S. and Douglas, L. J., 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, **51**: 344-349.

Agle, M. E., 2007. Biofilms in the food industrie. In *Biofilms in the food environment* (Eds. H.P. Blaschek, H.H. Wang, and M.E. Agle), pp. 105-125. IFT Press, Blackwell Publishing, Ltd., Oxford, UK.

Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H. and Douglas, L. J., 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, **5**: 1770-1779.

Amelio, M. and De Muro, E., 2000. Naturally fermented Black olives of *Taggiasca* variety (*Olea europaea* L.). *Grasas y Aceites*, **51**: 429-439.

Amiot, M. J., Fleuriet, A. and Macheix, J. J., 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**: 823-826.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat smallscale facility. 2-Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, **17**: 462-468.

An, D., Danhorn, T., Fuqua, C. and Parsek, M. R., 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 3828-3833.

Anderson, D. A. and McKay, L. L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**: 549-552.

Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L. and Moschetti, G., 2012. Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, **30**: 8-16.

Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A. and Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, **23**: 791-796.

Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J. and Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, **128**: 189-196.

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Baquero, J. M., García-García, P., Jiménez-Díaz, R., López-López, A., Rodríguez-Gómez, F. and Garrido-Fernández, A., 2012. Fermentation of olive fruits. In Hand book of plant-based fermented food and beverage technology. Second edition. CRC Press, pp. 307-325.

Asehraou, A., Peres, C., Brito, D., Faid, M. and Serhrouchni, M., 2000. Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y Aceites*, **51**: 225-229.

Axelsson, L. T., 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and von Wright, A. (eds.), *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-65.

Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and von Wright, A. (eds.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 1-72.

Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. and Hugas, M., 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal lowacid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 4583-4594.

B

Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. and Gram, L., 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, **87**: 239-250.

Barrio, E., González, S. S., Arias, A., Belloch, C. and Querol, A., 2006. Molecular mechanisms involved in the adaptative evolution of industrial yeasts. In: Querol, A. and Fleet, H. (eds.), *Yeast in food and beverages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 153-174.

Battcock, M. and Azam-Ali, S., 1998. Bacterial fermentations. In: *Fermented fruits and vegetables. A global perspective*. FAO agricultural services bulletin num. 134.

Battin, T. J., Sloan, W. T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I. M., Curtis, T. P. and Eberl, L., 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews*, **5**: 76-81.

Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A. and Arroyo-López, F. N., 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, **147**: 89-96.

Beer, D. and Stoodley, P., 2006. Microbial biofilms. *Prokaryotes*, **1**: 904-937.

Behrendt, L., Larkum, A. W.D., Trampe, E., Norman, A., Sorensen, S. J. and Kühl, M., 2012. Microbial diversity of biofilm communities in microniches associated with the didemnid ascidian *Lissoclinum patella*. *International Society for Microbial Ecology Journal*, **6**: 1222-1237.

Bernardeu, M., Guéguen, M. and Vernoux, J. P., 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**: 487-513.

Bernardeu, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. and Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126**: 278-285.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C. and Ray, B., 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2**: 319-322.

Björkroth, K. J. and Korkeala, H. J., 1997. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 448-453.

Blankenship, J. R. and Mitchell, A. P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 588-594.

Bobillo, M. and Marshall, V. M., 1991. Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, **8**: 153-160.

Böckelmann, U., Szewzyk, U. and Grohmann, E., 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **55**: 201-211.

- Borbolla y Alcalá, J. M. and Rejano, L., 1978. Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. El lavado de los frutos tratados con lejía. *Grasas y aceites*, **29**: 281-291.
- Borcakli, M., Ozay, G. and Alperden, I., 1995. Fermentation of black olives with application of starter culture and aeration. *Developments in Food Science*, **37**: 1849-1863.
- Bos, R., van der Mei, H. C., Meinders, J. M. and Busscher, H. J., 1994. Quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate-flow chamber – basic principles of the analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **20**: 289-305.
- Bourquelot, E. and Vintilesco, J., 1908. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retiré de l'oliver (*Olea europaea* L.). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, Paris, **147**: 533-535.
- Brackett, R. E., 1997. Fruits, vegetables, and grains. pp. 117-126 in: *Food Microbiology*. Fundamentals and Frontiers. Doyle M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (eds.) ASM Press, Washington DC.
- Branda, S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, **13**: 20-26.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg C. J. and Moineau, S., 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Dairy Science*, **86**: 407-423.
- Buckenhüskes, H. J., Aabye Jensen, H., Andersson, R., Garrido Fernández, A. and Rodrigo, M., 1990. Fermented vegetables. In Zeuthen, P., Cheftel, J. C., Ericsson, C., Gormeley, T. R., Linko, P. and Paulus, K. (ed.). Food biotechnology: Avenues to healthy and nutritious products, vol. 2. Processing and quality of foods. *Elsevier Applied Science*, London: 167-187.

Burmolle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. S., Sorensen, S. J. and Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 3916-3923.

Busscher, H. J., Bos, R. and van der Mei, H. C., 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, **128**: 229-234.

C

Caggia, C., Randazzo, C. I., Di Salvo, M., Romeo, F. and Giudici, P., 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in green table olives. *Journal of Food Protection*, **67**: 2189-2194.

Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M. R., Altieri, C. and Sinigaglia, M., 2005. Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles. *Food Technology and Biotechnology*, **43**: 289-294.

Campbell-Platt, G., 1994. Fermented foods-a world perspective. *Food Research International*, **27**: 253-251.

Caplice, E. and Fitzgerald, G. F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **50**: 131-149.

Castagliuolo, I., Galeazzi, F., Ferrari, S., Elli, M., Brun, P., Cavaggioni, A., Tormen, D., Sturniolo, G. C., Morelli, L. and Palu, G., 2005. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **43**: 197-204.

Chammen, N., Kachouri, M., Mejri, M., Peres, C., Boudabous, A. and Hamdi, M., 2005. Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. *Bioresearch Technology*, **96**: 1311-1316.

Chan, W. C., Coyle, B. J. and Williams, P., 2004. Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**: 4633-4641.

Charlet, M., Duboz, G., Faurie, F., Le Quéré, J.-L. and Berthier, F., 2008. Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **131**: 10-19.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, K., 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, **35**: 1-27.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. and Fink, G., 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *The National Academy of Sciences of the USA*, **101**: 5048-5052.

Chorianopoulos, N. G., Boziaris, L. S., Stamatiou, A. and Nychas, G. J. E., 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, **22**: 117-124.

Ciafardini, G., Marsilio, A., Lanza, B. and Pozzi, N., 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 4142-4147.

Claesson, M. J., van Sinderen, D. and O'Toole, P. W., 2007. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology letters*, **269**: 22-28.

Cogan, T. M., 2002. Public Health Aspects. In *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Roginsky, H., Fuquiay, J. and Fox, P. F. (eds) **1**: 314-320. *Academic Press*, London.

Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martínez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. and Walbanks, S., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, **77**: 5-12.

COI (Consejo Oleícola Internacional). Las aceitunas de mesa. Madrid, 2004. D. L.: M-46. 833-2004.

COI/OT/NC nº 1, Diciembre 2004. Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, Consejo Oleícola Internacional.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S. and Sohier, D., 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **108**: 130-135.

Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 777-788.

Costerton, J. W., 2007. The biofilm primer. *Springer series on biofilms* (Ed. J.W. Costerton), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Costerton, J. W., 2009. In Costerton, J. W. (Ed.), The biofilm primer. *Springer-Verlag*, New York, Berlin, Heidelberg.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322.

D

Daeschel, M. A., Andersson, R. E. and Fleming, H. P., 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*, **46**: 357-367.

Daeschel, M. A. and Fleming, H. P., 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiology*, **1**: 303-313.

Dang, H. and Lovell, C. R., 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 467-475.

Davey, M. E. and O'Toole, G., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 847-867.

Deák, T., 1991. Foodborne Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, **36**: 179-278.

Deák, T., 1995. Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology*, **6**: 287-292.

Déak, T. and Beuchat, L. R., 1996. Handbook of food spoilage yeast. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Deasy, B. M., Rea, M. C., Fitzgerald, G. F., Cogan, T. M. and Beresford, T. P., 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **23**: 510-522.

De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S. L. and Lavermicocca, P., 2010. Probiotic table olives: Microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *International Journal of Food Microbiology*, **140**: 6-13.

De Castro, A., García, P., Romero, C., Brenes, M. and Garrido, A., 2007. Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. *Journal of Food Engineering*, **80**: 1206-1212.

De Castro, A., Montaña, A., Casado, F. J., Sánchez, H. and Rejano, L., 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, **19**: 637-644.

De Kievit, T. R. and Iglewski, B. H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, **68**: 4839-4849.

De Lorenzo, C., González, M., Iglesias, G., Lázaro, E., Valiente, C., Blánquez, N., Vergara, G., 2000. La aceituna de Campo Real. IMIA: Madrid.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications. In De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (eds.), Blackie Academic and Professional, London.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B., 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**: 687-707.

Delgado, A., Arroyo-López, F. N., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P. and Garrido-Fernández, A., 2007. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, **130**: 193-201.

Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Arroyo-López, F. N. and Garrido-Fernández, A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, **22**: 521-528.

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. and Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In De Roissart, H. and Luquet, F. M. (eds.), *Bactéries lactiques*. Vol. I. Lorica, Uriage, Grance, pp. 25-116.

Devriese, L. A., Por, B. and Collins, M. D., 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**: 399-408.

Dewanti, R. and Wong, A. C. L., 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, **26**: 147-164.

Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C. G., Ricciuti, P. and Gobbetti, M., 2010. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, **27**: 381-389.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. and Gobbetti, M., 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, **33**: 1-10.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M. and Gobbetti, M., 2011a. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, **28**: 1062-1071.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Vincentini, O., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., De Vincenzi, M., Dessi, M. R., Guerzoni, M. E. and Bobetti, M., 2010. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, **10**: 2175-2190.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Simonetti, C., Buchin, S. and Gobbetti, M., 2007. Cell-cell communication in sourdough lactic acid bacteria: a proteomic study in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Proetomics*, **7**: 2430-2446.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S. and Gobbetti, M., 2011b. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium L.*) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food microbiology*, **28**: 900-909.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Minervini, G., De Angelis, M., Rizzello, C. G. and Gobbetti, M., 2009. Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum L.*) to be stored at room temperature. *International Journal of Food Microbiology*, **130**: 108-116.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J. -C., Buchin, S., De Gara, L. and Gobbetti, M., 2008b. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *Internacional Journal of Food Microbiology*, **128**: 473-483.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L. and Gobbetti, M., 2008a. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, **127**: 220-228.

Díez-González, F., 2007. Applications of bacteriocinas in livestock. *Current Issues Intestinal Microbiology*, **8**: 15-24.

Diggle, S. P., Crusz, S. A. and Camara, M., 2007. Quorum sensing. *Current Biology*, **17**: 907-910.

Dong, Y. H. and Zhang, L. H., 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology*, **43**:101-109.

Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B. Zhang, X. F. and Zhang, L. H., 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, **411**: 813-817.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. and Zhang, L. H., 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **97**: 3526-3531.

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. and La Du, 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research*, **46**: 1239-1247.

Dubernet, S., Desmasures, N. and Guéguen, M., 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, **214**: 271-275.

Duguid, J. P., Anderson, E. S. and Campbell, I., 1966. Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. *Journal of Pathology and Bacteriology*, **92**: 107-138.

Dunny, G. M. and Winans, S. C. (eds.) 1999a. Cell-cell signalling in bacteria. *American Society for Microbiology Press*, Washington, DC.

Dunny, G. M. and Winans, S. C., 1999b. Bacterial Life: neither lonely nor boring. In G. M. Dunny and S. C. Winans (eds.), Cell-cell signalling in bacteria. *American Society for Microbiology Press*, Washington, D.C., pp. 1-5.

Durán, M. C., García, P., Brenes, M. and Garrido, A., 1993. *Lactobacillus plantarum* survival during the first days of ripe previous termolivenext term brining. *Systematic Applied Microbiology*, **16**: 153-158.

Durán-Quintana, M. C., García-García, P. and Garrido-Fernández, A., 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, **51**: 133-143.

Durán-Quintana, M. C., García-García, P., Brenes, M. and Garrido-Fernández, A., 1994. Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**: 377-382.

E

Egland, P. G., Palmer, R. J. and Kolenbrander, P. E., 2004. Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*-*Veillonella atypica* biofilms: Signaling in flow conditions requires juxtaposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 16917-16922.

Entani, E. and Tsukamoto, Y., 2000: Microbial control of vinegar production. *Journal of the Brewing Society of Japan*, **95**: 39-45.

Etchells, J. L., Borg, A. F., Kittel, I. D., Bell, T. A. and Fleming, H. P., 1966. Pure culture fermentation of green olives. *Applied and Environmental Microbiology*, **14**: 1027-1041.

Etchells, J. L., Fleming, H. P. and Bell, T. A., 1975. In: Carr, J. G., Cutting, C. V. and Whiting, G. C. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria in beverages and food*, Academic Press, London, New York, San Francisco.

F

Federle, M. J. and Bassler, B. L., 2003. Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, **112**: 1291-1299.

Felis, G. E. and Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, **8**: 44-61.

Fernández-Díez, M. J., 1983. Olives. In: Reed, G. (ed.), *Food and Feed Production with Microorganisms*. Verlag Chenie, Deerfield Beach, FL, pp. 379-397.

Fernández-Díez, M. J., de Castro, R., Garrido-Fernández, A., González, F., González-Pellissó, F., Nosti, M., Heredia, A., Mínguez, M. I., Rejano, L., Durán-Quintana, M. C., Sánchez, F., García, P. and de Castro, A., 1985. *Biología de la Aceitunas de Mesa*. CSIC, Madrid.

Fernández-González, M. J., García, P., Garrido-Fernández, A. and Durán-Quintana, M. C., 1993. Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**: 226-233.

Finch, R. G., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W., Williams, P. and Stewart, G. S. A., 1998. Quorum sensing: a novel target for anti-infective therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **42**: 569-571.

Fleming, H. P., 1984. Developments in cucumber fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **34**: 241-252.

Fleming, H. P., 1991. Mixed cultures in vegetable fermentations. In *Mixed cultures in biotechnology*, ed. Zeikus, J. G. and Johnson, E. A. 69-103. New York. McGraw-Hill.

Florian, B., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4883-4890.

Foulquié- Moreno, M. R., Sarantinopoulos, M. R., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, **106**: 1-24.

Fox, P. F. and Wallace, J. M., 1997. Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, **45**: 17-85.

Frank, J. F. and Koffi, R. A., 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, **53**: 550-554.

Franz, C. M., Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, **47**: 1-24.

Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H., 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, **88**: 105-122.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the luxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, **176**: 269-275.

Furukawa, S., Yoshida, K., Ogihara, H., Yamasaki, M. and Morinaga, Y., 2010. Mixed-Species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and Lactic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **74**: 2316-2319.

G

Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas-López, R. and Ben-Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, **120**: 51-70.

García, P., Durán, M. C., Brenes, M. and Garrido, A., 1992. Lactic fermentation during the storage of “Aloreña” cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**: 324-330.

Garrido-Fernández, A., 1990. Controlled fermentation of green table olives. In Zeuthen, P., Cheftel, J. C., Eriksson, C., Gormley, T. R., Linko, P. and Paulus, K. (ed.) *Food Biotechnology: Avenues to healthy and nutritious products, processing and quality of foods. Elsevier Applied Science*, London **2**: 211-218.

Garrido-Fernández, A., Fernández-Díez, M. J. and Adams, M. R., 1997. Table Olives. Production and Processing. *Chapman and Hall, London, UK*, pp. 134-197.

Garrido Fernández, A., García García, P., Brenes Balbuena, M., 1995. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), *Olive Fermentations. Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. VCH, New York, pp. 593-627.

Geis, A., Singh, J. and Teuber, M., 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**: 205-211.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of nutrition*, **125**: 1401-1412.

Gibson, J., Sood, A. and Hogan, D. A., 2009. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 504-513.

Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**: 163-171.

Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **88**: 215-222.

Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**: 251-260.

Giraffa, G., 2012. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*, **12**: 391-398.

Giraffa, G., Chanishvili, N. and Widyastuti, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, **161**: 480-487.

Givskov, M., deNys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. and Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactonemediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology* **178**: 6618-6622.

Goerges, S., Mounier, J., Rea, M. C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., Cogan, T. M., Vancanneyt, M. and Scherer, S., 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south german red smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 2210-2217.

González-Cancho, F., 1963. Microorganismos que se desarrollan en el aderezo de aceitunas verdes estilo español. *Microbiología Española*, **16**: 221-230.

Guarner, F. and Schaafsma, G. J., 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, **39**: 237-238.

Guerrieri, E., Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I. and Bondi, M., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in small-scale model. *Food Control*, **20**: 861-865.

Guinane, C. M., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P., 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocinas for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, **98**: 1316-1325.

Gunduz, G. T. and Tuncel, G., 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**: 329-336.

Guobjornsdottir, B., Einarsson, H. and Thorkelsson, G., 2005. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gramnegative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, **43**: 55-61.

H

Hansen, E. B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods on the future. *International Journal of Food Microbiology*, **78**: 119-131.

Hardie, K. R. and Heurlier, K., 2008. Establishing bacterial communities by “word to mouth”: luxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nature Reviews*, **6**: 635-643.

Harris, L. J., 1998. The microbiology of vegetable fermentations. In: Wood, B. J. B. (ed.), *Microbiology of Fermented*.

Hentzer, M. and Givskov, M., 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, **112**: 1300-1307.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. and Givskov, M., 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO Journal*, **22**: 3803-3815.

Herald, P. J. and Zoottola, E. A., 1988a. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. *Journal of Food Science*, **51**: 445-448.

Herald, P. J. and Zoottola, E. A., 1988b. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, **53**: 1549-1562.

Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F. and Córdoba, M. G., 2007. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, **24**: 346-351.

Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E. and Pérez-Nevado, F., 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green talbe olives. *International Journal of Food Microbiology*, **121**: 178-188.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. and Peterson, S. B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 15-25.

Hogan, D. A. and Kolter, R, 2002. Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, **296**: 2229-2232.

Holzapfel, W. H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, **75**: 197-212.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important fetures of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**: 365-373.

Hood, S. K. and Zottola, E. A., 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, **6**: 9-18.

Hounhouigan, D. J., Nout, M. J. R., Nago, C. M., Houben, J. H. and Rombouts, F. M., 1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria

involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *International Journal of Food Microbiology*, **18**: 279-287.

Huang, CH., Lee, FL. and Liou, J. S., 2010. Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial dnaK sequence and DNA fingerprinting techniques. *Antonie van Leeuwenhoek*, **97**: 289-296.

Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M. T., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, **88**: 223-233.

Huis in't Veld, J. H. J., Hose, H., Schaafsma, G. J., Silla, H. and Smith, J. E., 1990. Health aspects of food biotechnology. In Zeuthen, P., Cheftel, J. C., Ericsson, C., Gormeley, T. R., Linko, P. and Paulus, K. (ed.). Food biotechnology: Avenues to healthy and nutritious products, vol. 2. Processing and quality of foods. *Elsevier Applied Science*, London: 273-297.

Huma, N., Shankar, P., Kushwah, J., Bhushan, A., Joshi, J., Mukherjee, T., Raju, S., Purohit, H. J. and Kalia V. C., 2011. Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**:1001-1011.

Hurtado, A., 2010. Estudio de la microflora asociada al proceso de fermentación de las aceitunas arbequinas de mesa. Ph. D. Thesis. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozès, N., 2010. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives. *Food Microbiology*, **27**: 731-740.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A. and Rozès, N., 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, **31**: 1-8.

Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A. and Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, **41**: 738-744.

I

Imai, T., 1989. Mayoneizu no eisei kanri. *Yushi*, **42**: 59-67.

J

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, **59**: 171-200.

Jay, J. M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**: 525-532.

Jiménez-Díaz, R. and Ruiz-Barba, J. L., 2004. Mejoras introducidas en la patente principal N° 9900740 por: “Procedimiento de obtención de productos vegetales mediante la adición de cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas”.

Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Rejano-Navarro, L., Sánchez-Gómez, A. H. and Floriano-Pardal, B., 1999. Procedimiento de fermentación de productos vegetales. Patente 9900740. Oficina española de patentes y marcas.

Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L. and Piard, J. -C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 1416-1424.

Johnson, M. E. and Lucey, J. A., 2006. Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, **89**: 1174-1178.

K

Kalia V.C., and Purohit, H. J., 2011. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, **37**: 121-140.

Kandler, O., 1983. Carbohydratemetabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwehoek*, **49**: 209-224.

Kandler, O. and Weiss, N., 1982. Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, 212, In. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Williauns and Wilkins, Baltimore, pp. 1209-1234.

Kang, B. R., Lee, J. H., Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, J. S., Cho, B. H. and Kim, Y. C., 2004. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter sp.* strain C1010. *Canadian Journal of Microbiology*, **50**: 935-941.

Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B. and Biggs, C.A., 2011. "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**: 1869-1881.

Kawarai, T., Furudawa, S., Ogihara, H. and Yamasaki, M., 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 4673-4676.

Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**: 39-85.

Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. and Altermann, E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing an health. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 393-409.

Kolter, R. and Greenberg, E. P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature*, **441**: 300-302.

Koser, S. A., 1968. Vitamin requirements of bacteria and yeast. Charles C. Thomas, Springfield, III, p.340-345.

Kotzekidou, P., 1997. Identification of yeast from Black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, **14**: 609-616.

Kowalewska, J., Zelazowska, H., Babuchowski, A., Hammond, E. G., Glat, B. A. and Ross, F., 1985. Isolation of aroma-bearing materials from *Lactobacillus helveticus* culture and cheese. *Journal of Dairy Science*, **68**: 2167-2171.

Krockel, L., Schillinger, U., Franz, C. M., Bantleon, A. and Ludwig, W., 2003. *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 513-517.

Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. and Sela, S., 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 6076-6086.

Kubota, H., Senda, S., Nombra, N., Tozuda, H. and Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistente to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**: 381-386.

Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H. and Nombra, N., 2009. Stress resistance of biofilms and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, **26**: 592-597.

Kulisic, T., Berkovic, K., Pavic, S. and Sustra, A., 2005. Preliminary study of physicochemical and microbiological features of brines in the process of preserving the green olives of oblica cultivar. *Acta Alimentaria*, **34**: 499-505.

Kumar, C. G. and Anand, S. K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **42**: 9-27.

Kumral, A., Basoglu, F. and Sahin, 2009. Effect of the use of different lactic starters on the microbiological and physicochemical characteristics of naturally black table olives of gemlike cultivar. *Journal of Food Processing and Preservation*, **33**: 651-664.

Kurtzman, C. P. and Fell, J. W., 1998. The yeast, a taxonomic study, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C. P. and Fell, J. W., 2006. Yeast systematics and phylogeny-implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C. A. and Peter, G. (eds.), The yeast handbook. Springer-Verlag, Germany, pp. 11-30.

Kurtzman, C. P., Rogers, R. and Hesseltine, C.W., 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Applied and Environmental Microbiology*, **21**: 870-874.

Kusilic, T., Berkovic, K., Pavic, S. and Sustra, A., 2005. Preliminary study of physicochemical and microbiological features of brines in the process of preserving the green olives of oblica cultivar. *Acta Alimentaria*, **34**: 499-505.

Kuusela, P., Moran, A. P., Vartio, T. and Kosunen, T. U., 1989. Interaction of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*, **993**: 297-300.

L

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

Lamzira, Z., Asehraou, A., Brito, D., Oliveira, M., Faid, M. and Peres, C., 2005. Bloater spoilage of green olives. *Food Technology and Biotechnology*, **43**: 373-377.

Lavermicocca, P., 2006. Highlights on new food research. *Digestive and Liver Disease*, **38**: 295-299.

Lavermicocca, P., Rossi, M., Russo, F. and Srirajaskanthan, R., 2010. In: Preedy, V., Watson, R. (Eds.), *Table Olives: A Carrier for Delivering Probiotic Bacteria to Humans. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Chapter 77. Academic Press, London, pp. 735-743.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., de Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L., Rizzello, C. G. and Visconti, A., 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 4233-4240.

Laws, A. P. and Marshall, V. M., 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**: 709-721.

Leal-Sánchez, M. V., Ruiz-Barba, J. L., Sánchez, A. H., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R. and Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, **20**: 421-430.

Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Fadda, A. A., Marchal, K. and Vanderleyden, J. 2007a. Functional analysis of luxS in the probiotic strain

Lactobacillus rhamnosus GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, **189**: 860-871.

Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. J., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**: 728-764.

Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea-Vélez, M., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C. J., 2007b. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6768-6775.

Ledesma, O. V., de Ruíz-Delgado, A.P., Ofilver, A., de Giori, G. S., Raibaud, P. and Galpón, J. V., 1977. A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **42**: 123-133.

Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H. and Lee, J., 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, **145**: 155-161.

Licitra, G., Ogier, J. C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T. M., Falentin, H., Madec, M. N., Carpino, S. and Lortal, S., 2007. Variability of bacterial biofilms of the “Tina” Word vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6980-6987.

Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R. and Zhang, L. H., 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*, **47**: 849-860.

Liu, S. Q., 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **83**: 115-131.

Lyon, G. J., Mayville, P., Muir, T. W. and Novick, R. P., 2000. Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptorhistidine kinase, AgrC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **97**: 13330-13335.

M

Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P., 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, **53**: 742-746.

Makarova, K. S. and Koonin, E. V., 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal Bacteriology*, **189**: 1199-1208.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 2002. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. Plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **77**: 117-124.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., and Jiménez-Díaz, R., 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel co-culture inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 383-389.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 2004a. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Grampositive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*, **186**: 1556-1564.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 2004b. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*, **181**: 8-16.

Maldonado-Barragán, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 2009. Knockout of three-component regulatory Systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *International Journal of Food Microbiology*, **130**: 35-42.

Maldonado-Barragán, A., 2005. Regulación de la producción de bacteriocinas en *Lactobacillus plantarum*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Manuzon, M. Y. and Woang, H. H., 2007. Mixed culture biofilms. En *Biofilms in the food environment* (Eds. H.P. Blaschek, H.H. Wang, and M.E. Agle), pp. 3-17. IFT Press, Blackwell Publishing, Ltd., Oxford, UK.

Marquina, D., toufani, S., Llorente, P., Santos, A. and Peinado, J. M., 1997. Killer activity in yeast isolated from olive brines. *Advances in Food Science*, **19**: 41-46.

Marsilio, V., 1993. Producción, elaboración y reglamentación de las aceitunas de mesa en Italia. *Olivae*, **43**: 6-16.

Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B. and Felicioni, M., 2005. Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L. cv. *Ascolana tenera*) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**: 1084-1090.

McBride, S. M., Fischetti, V. A., Leblanc, D. J., Moellering, R. C. Jr. and Gilmore, M. S., 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE*, **2**: 1-22

Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M. and García, A., 2008. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the *Manzanilla* variety. *Food Chemistry*, **110**: 932-937.

Miller, M. B. and Bassler, B. L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 165-199.

Millsap, K. W., Reid, G., Van Der Mei, H. C. and Busscher, H. J., 1997. Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer silicone rubber and glass under flow. *Biomaterials*, **18**: 87-91.

Monds, R. D. and O'Toole, G., 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, **17**: 73-87.

Montaño, A., Sánchez, A. H. and de Castro, A., 2000. Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *Food Microbiology and Safety*, **65**: 1022-1027.

Montaño, A., Sánchez, A. H., Casado, F., de Castro, A. and Rejano, L., 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, **82**: 297-302.

Moons, P., Michiels, C. W. and Aertsen, A., 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, **35**: 157-168.

Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. and Yura, T., 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, **148**: 64-71.

Muller, T., Ulrich, A., Ott, E. M. and Muller, M., 2001. Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 268-278.

Murray, B. E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, **3**: 46-65.

N

Nadell, C. D., Xavier, J. B. and Foster, K. R., 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, **33**: 206-224.

Naitou, S., 1999. Nyusankin ni yoru shyokuhin no henpai to ozon ni yoru boushi gijyutsu. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, **27**: 171-181.

Navarrete-Bolaños, J. L., 2012. Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Engineering in Life Sciences*, **12**: 410-418.

Navarrete-Bolaños, J. L., Serrato-Joya, O., Botello-Álvarez, E., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manriquez, M., Conde-Barajas, E. and Rico-Martínez, R., 2007. Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design, in: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex, Spain, **1**: 437-449.

Nealson, K. H., 1999. Early observations defining quorum- dependent gene expression. En *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. Dunny, G. M. and S. C. Winans (eds). American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 277-289.

Nealson, K. H. and Hastings, J., 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, **43**: 496-518.

Nes, I. F. and Johnsborg, O., 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**: 100-104.

Nikkuni, S., Ishiyama, T., Suzuki, C., Suzuki, T., Kosaka, N. and Mori, K., 1996. Swelling of packaged processed miso by the heterofermentative lactic acid bacteria *Lactobacillus fructivorans* L-1. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **43**: 910-916.

Niven, C. F., Castellani, A. G. and Allanson, V., 1949. A study of the lactic acid bacteria that cause surface discolorations of sausages. *Journal of Bacteriology*, **58**: 633-641.

Nobile, C. J. and Mitchell, A. P., 2007. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Current Biology*, **17**: 349-353.

Nout, M. J. R. and Rombouts, F. M., 1992. Fermentative preservation of plant foods. *Journal of Applied Bacteriology – Symposium Supplement*, **73**: 136-147.

Nychas, G. -J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W. and Tassou, C. C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, **34**: 173-177.



Offonry, S. U. and Achi, O. K., 1998. Microbial populations associated with the retting of melon pods (*Colocynthis citrullus L.*) during seed recovery. *Plant Foods for Human Nutrition*, **52**: 37-47.

Okada, M., Sato, I., Cho, S. J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D. and Sakagami, Y., 2005. Structure of the *Bacillus subtilis* quórum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, **1**: 23-24.

Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitao, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., Peres, C., 2004. Biotechnology of olive fermentation of “Galega” Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, **55**: 219-226.

- Orla-Jensen, S., 1919 (ed.). The lactic acid bacteria. Høst, Copenhagen, pp. 1-196.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**: 593-604.
- O'Toole, G., Kaplan, HB. and Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, **54**: 49-79.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**: 279-89.
- Oyewole, O. B., 1997. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control*, **8**: 289-297.
- Özay, G. and Borcakli, M., 1995. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International*, **28**: 553-559.
- Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lusic, A. J., Greenberg, E.P. and Zabner, J., 2005. Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiology Letters*, **253**: 29-37.

P

- Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P. and Nychas, G. -J. E., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **25**: 348-358.

Panagou, E. Z. and Tassou, C. C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. *Conservolea* green olives. *Food Microbiology*, **23**: 738-746.

Panagou, E. Z., Tassou, C. C. and Katsaboxakis, C. Z., 2003. Induce lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**: 667-674.

Panizzi, L., Scarpati, M. L. and Oriente, E. G., 1960. Structure of the bitter glucoside oleuropein. Note II. *Gazzetta Chimica Italiana*, **90**: 1449-1485.

Park, S.Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y. and Lee J. K., 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, **149**:1541-1550.

Parsek, M. R. and Fuqua, C., 2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology*, **186**: 4427-4440.

Parsek, M. R. and Greenberg, E. P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, **13**: 27-33.

Pederson, C. S. and Albury, M. N., 1969. Thesauerkraut fermentation. *NY State Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* N° **824**. Geneva, NY.

Peres, C., Catuloa, L., Brito, D. and Pintadoa, C., 2008. *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 starter added to brine as freeze-dried and as culture in the nutritive media for Spanish style green olive production. *Grasas y Aceites*, **59**: 234-238.

Peres, C. M., Peres, C., Herández-Mendoza, A. and Malcasa, F. X., 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science and Technology*, **36**: 31-42.

Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R. and Sinigaglia, M., 2010. Use of *Lactobacillus plantarum* and glucose to control the fermentation of “Bella di Cerignola” table olives, a traditional variety of Apulian region (southern Italy). *Journal of Food Science*, **75**: 430-436.

Plenghvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z. and Fleming, H. P., 2007. DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7697-7702.

Plumed-Ferrer, C., Kivelä, I., Hyvönen, P. and von Wright, A., 2004. Survival, growth and persistence under farm conditions of a *Lactobacillus plantarum* strain inoculated into liquid pig feed. *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 851-858.

Pretzer, G., Snel, J., molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., de Vos, W. M., van der Meer, R., Smits, M. A. and Kleerebezem, M., 2005. Biodiversity-Based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, **187**: 6128-6136.

Psani, M. and Kotzekidou, P., 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**: 1329-1336.

Pulido, R. P., Benomar, N., Cañamero, M. M., Abriouel, H. and Gálvez, A., 2012. Fermentation of caper products. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA: 201-208.

Q

Quadri, L. E., 2002. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**: 133-145.

R

Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D. and Young, J. M., 2005. Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **312**: 417-423.

Randazzo, C. L., Fava, G., Tomaselli, F., Romeo, F. V., Pennino, G., Vitello, E. and Cinzia, C., 2011. Effect of kaolin and copper based products and of starter cultures on green table olive fermentation. *Food Microbiology*, **28**: 910-919.

Rao, D, Webb, J.S. and Kjelleberg, S., 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 1729:1736.

Reid, G., Kirjavainen, P. and Richardson, B., 2007. Beneficial bacterial biofilms. In *Biofilms in the food environment* (Eds. H.P. Blaschek, H.H. Wang, and M.E. Agle), pp. 3-17. IFT Press, Blackwell Publishing, Ltd., Oxford, UK.

Reisner, A., Toiby, N., Tolker-Nielsen, T. and Molin, S., 2005. Microbial pathogenesis and biofilm development. In: *Concepts in bacterial virulence*. Russel, W., Herwald, H., Eds Contrib Microbiol Basel, Karger 2005, **12**: 114-131.

Remis, J. P., Costerton, J. W. and Auer, M., 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. *The ISME Journal*, **4**: 1085-1087.

Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E. and Handley, P. S., 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, **11**: 94-100.

Ryan, R. P. and Dow, J. M., 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, **154**: 1845-1858.

Rejano-Navarro, L., González-Cancho, F. and de la Borbolla y Alcalá, J. M. R., 1977. Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera. *Grasas y Aceites*, **23**: 107-117.

Robinson, R. K., 1988. *Development in Food Microbiology*, **3**. London.

Rodas, A. M., Ferrer, S. and Pardo, I., 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**: 197-207.

Rodrigues, F., Côrte-Real, M., Leão, C., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T., 2001. Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2123-2128.

Rodríguez-Borbolla J. M. and González-Pellisó, F., 1972. Estudios sobre aceitunas envasadas estilo español. XI. La inhibición del sedimento. *Grasas y Aceites*, **23**: 107-117.

Rodríguez-Borbolla, J. M., González-Pellisó, G. and González-Cancho, F., 1971. Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera. *Grasas y Aceites*, **22**: 455-460.

Rogosa, M., Franklin, J. G. and Perry, K. D., 1961. Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* spp. *Journal of General Microbiology*, **25**: 473-482.

Roissart, H. B. D., 1983. Que sont les bactéries lactiques? *Technologie Laitière*, **979**: 41-47.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C., 2008. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Archives of Microbiology*, **189**: 491-499.

Romano, J. D. and Kolter, R., 2005. Pseudomonas-Saccharomyces interactions: Influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *Journal of Bacteriology*, **187**: 940-948.

Romero, C., Brenes, M., García, P. and Garrido, A., 2002. Hydroxytyrosol 4- β -D-glucoside, and important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3835-3839.

Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A. and Garrido, A., 2004. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 479-484.

Romero, M., Martín-Cuadrado, A., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., Otero, A., 2011. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **75**: 205-217.

Rosen, S. and Fabian, F. W., 1953. The importance of biotin, niacin acid pantothenic acid in cucumber fermentation. *Food Technology*, **7**: 244-247.

Ruiz-Barba, J. L., 1991. Estudio de algunos factores que influyen en el desarrollo de una fermentación ácido-láctica apropiada de aceitunas de mesa. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 1994a. Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**: 350-355.

Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 1294-1297.

Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R., 2012. A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, **30**: 253-259.

Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A. and Jiménez-Díaz, J., 2010. Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiology*, **27**: 413-417.

Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J. and Jiménez-Díaz, R., 1994b. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2059-2074.

Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. and Jiménez-Díaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, **347**: 333-335.

S

Sabatini, N., Mucciarella, M. R. and Marsilio, V., 2008. Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. *Moresca* and *Kalamata*). *Food Science and Technology*, **41**: 2017-2022.

Sakamoto, K. and Konings, W. N., 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, **89**: 105-124.

Sánchez, A. H., de Castro, A., Rejano, L. and Montaña, A., 2000b. Comparative study on Chemicals changes in olive juice and brine Turing green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 5975-5980.

Sánchez, A. H., Rejano, L., Montaña, A. and de Castro, A., 2001. Utilization at high pH of starter cultures of Lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **67**: 115-122.

Sánchez-Gómez, A. H., García-García, P. and Rejano-Navarro, L., 2006. Elaboration of table olives. *Grasas y aceites*, **57**: 86-94.

Sánchez, I., Palop, L. and Ballesteros, C., 2000a. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Almagro” eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, **59**: 9-17.

Sank, E. A. and Kolter, R., 2009. New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*, **12**: 1-10.

Sanz, Y., 2007. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, **17**: 1284-1289.

Saravanos, E., Kagli, D., Zoumpopoulou, G., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C., 2008. Use of probiotic lactic acid bacteria as starter cultures in Spanish-style green olive fermentation and determination o their survival using PFGE. *Food Microbiology*, 1-4 September, Aberdeen, UK.

Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, N. J. and Champagne, C. P., 2002. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. *Food Microbiology*, **19**: 363-373.

Schillinger, U., Boehringer, B., Wallbaum, S., Caroline, L., Gonfa, A., Huch, M., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. A. P., 2008. A genus-specific PCR for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, **286**: 222-226.

Schleifer, K. H. and Ludwig, W., 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic Applied Microbiology*, **18**: 461-467.

Schneider, M., 1988. Microbiology of sauerkraut fermented in small ready-to-sell containers. Doctoral dissertation. Hohenheim University, Stuttgart, Germany.

Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposto, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G. F. and Corsetti, A., 2006. The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (cv. *Itrana* and *Lecino*): a pilot-scale application. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**: 3869-3875.

Seseña, S. and Palop, M. L. I., 2007. An ecological study of lactic acid bacteria from Almagro eggplant fermentation brines. *Journal of Applied Microbiology*, **103**: 1553-1561.

Shank, E. A. and Kolter, R., 2009. New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*, **12**: 205-214.

Sharma, M. and Anand, S. K., 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry e a case. *Food Control*, **13**: 469-477.

Sharpe, M. E., 1979. Identification of lactic acid bacteria. In Skinner, F. A. and Lovelock, D. W. (eds.), Identification methods for microbiologists. Technical Series 14 ed. *Academic Press Inc., London*, pp. 223-259.

Sheneman, J. M. and Costilow, R. N., 1955. Sorbic acid as a preservative for sweet cucumber pickles. *Applied and Environmental Microbiology*, **3**: 186-189.

Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. and van Hylckama Vlieg, J. E. T., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 4997-5007.

Smith, J. L., Fratamico, P. M. and Novak, J. S., 2004. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, **67**: 1053-1070.

Smith, J. L. and Palumbo, S. A., 1981. Microorganisms as food additives. *Journal of Food Protection*, **44**: 936-955.

Smith, K. M., Bu, Y. and Suga, H., 2003. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chemistry and Biology*, **10**: 81-89.

Somers, E. B., Johnson, M. E. and Wong, A. C. L., 2001. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, **84**: 1926-1936.

Spyropoulou, K. and Nychas, G-J. E., 1999. Addition of fermentable substrates and thiamine during the fermentation of green olives with or without starter cultures. In: Tuijtelaars, A. C. J., Samson, R. A., Rombouts, F. M. and Notermans, S., Editors, 1999. *17th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)*, Veldhoven, The Netherlands, 13-17 September, 1999, pp. 685-689.

Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N. and Nychas, G-P. E., 2001. Control of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (Conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, **66**: 3-11.

Steinkraus, K., 2002. Fermentations in World Food Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **1**: 23-32.

Stamer, J. R., 1988. Lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Developments in Food Microbiology*, **3**: 67-85.

Stiles, M. E. and Holzapfel, H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**: 1-29.

Stratford, M., 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol, A. and Fleet, H. (eds.), *Yeast in food and beverages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 335-339.

Sturme, M. H. J., Nakayama, J., Molenaar, D., Murakami, Y., Kunugi, R., Fujii, T., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M., 2005. An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *Journal of Bacteriology*, **187**: 5224-5235.

Suezawa, Y., Oro, K. and Ohtani, S. 1993. Spoilage of low salt soy sauce by halotolerant lactic acid bacteria. *Kagawa Shokuhin shi Nenpou*, **86**: 29-31.

Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Salmond, G. P. C. and Williams, P., 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, **45**: 199-270.

T

Tada, S., Katakura, Y., Ninomiya, K. and Shioya, S., 2007. Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **103**: 557-562.

Taga, M. E., 2007. Bacterial signal destruction. *ACS Chemical Biology*, **2**: 89-92.

Taga, M. E. and Bassler, B. L., 2003. Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **100**: 1459-14554.

Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjöblom, M., Joutsen, M., Palva, A. and Ryhänen, E.-L., 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology*, **39**: 439-444.

Tannock, G. W., 2004. A special fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3189-3194.

Tannock, G. W., Ghazally, S., Walter, J., Loach, D., Brooks, H., Cook, G., Surette, M., Simmers, C., Bremer, P., Dal Bello, F. and Hertel, C., 2005. Ecological behaviour of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the luxS gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 8419-8425.

Tassou, C. C., Panagou, E. Z. and Katsaboxakis, K. Z., 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, **19**: 605-615.

Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harás, N., Thurlow, L., Tomich, J. and Hancock, L. E., 2009. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, **72**: 1022-1036.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J. R. and Lasa, I., 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4538-4545.

Tornai-Lehoczki, J. and Dlačny, D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, **56**: 37-45.

Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and

multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 3450-3454.

U

Uroz, S., Dessaux, Y., and Oger, P., 2009. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBioChem*, **10**: 205-216.

USDA. United States Standards for Grades of Canned Ripe Olives, 1983. Disponible online en <http://www.ams.usda.gov/standards/cnoliver.pdf>.

V

Valerio, F., de Candida, S., Lonigro, S. L., Russo, F., Riezzo, G., Orlando, A., De Bellis, P., Sisto, A. and Lavermicocca, P., 2011. Role of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMGP22043 carried by artichokes in influencing faecal bacteria and biochemical parameters in humans subjects. *Journal of Applied Microbiology*, **111**: 155-164.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Review*, **60**: 407-438.

Van Loodsrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A. J., 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, **54**: 75-87.

Vaughn, R. H., 1982. Fermentation of olives. In: Reed, G. (Ed), *Industrial Microbiology*, 4th edition, AVI, Westport, 206-236.

Vaughn, R. H., Jakubczyk, T., Macmillan, J. D., Higgins, T. E., Dave, B. A. and Crampton, V. M., 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, **18**: 771-775.

Vila, J., Soriano, A. and Mensa, J., 2008. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **26**: 48-55.

Viljoen, B. C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, **69**: 37-44.

W

Watnick, P. and Kolter, R., 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, **182**: 2675-2676.

Weber, K. P. and Legge, R. L., 2010. Method for the detachment of culturable bacteria from wetland gravel. *Journal of Microbiological Methods*, **80**: 242-250.

Weisstein, E. W., 2011. Quadratic surface. From MathWorld - A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/QuadraticSurface.html>.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C. and Cámara, M., 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, **362**: 1119-1134.

Wimpenny, J., 2009. Microbial metropolis. *Advances in Microbial Physiology*, **56**: 29-83.

Wood, B. J. B., 1998. Microbiology of fermented foods, Vols. 1-2, second ed. *Blackie Academic and Professional*, London.

X

Xavier, K. B. and Bassler, B. L., 2005. Interference with AI-2-Mediated bacterial cell-cell. *Nature*, **437**: 750-753.

Y

Yang, F., Wang, L. H., Wang, J., Dong, Y. H., Hu, J. Y. and Zhang, L. H., 2005. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Letters*, **579**: 3713-3717.

Yoneyama, H., Ando, T. and Katsumata, R., 2004. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use for food preservation. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, **55**: 51-55.

Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T. and Kuramitsu, H. K., 2005. LuxS-Based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 2372-2380.

Z

Zanoni, P., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A. and Collins, M. D., 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp nov., nom. Rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**: 339-341.

Zhang, L. H., 2003. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Science*, **8**: 238-244.

Zottola, E. A. and Sasahara, K. C., 1994. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, **23**: 125-148.

<p>IX. PUBLICACIONES</p>	



Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation

Jesús Domínguez-Manzano, Carmen Olmo-Ruiz, Joaquín Bautista-Gallego, Francisco Noé Arroyo-López, Antonio Garrido-Fernández, Rufino Jiménez-Díaz*

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Padre García Tejero, 4, Apartado de Correos 1078, 41012 Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2011
Received in revised form 17 April 2012
Accepted 10 May 2012
Available online 16 May 2012

Keywords:

Biofilms
Lactobacillus pentosus
Yeasts
Olive skin
Table olives

ABSTRACT

In this work, the establishment of polymicrobial communities on the surfaces which come into contact with the brine during Spanish style Gordal cv. green olive fermentation when subjected to spontaneous or controlled processes (inoculated with *Lactobacillus pentosus* LPCO10 or 128/2) was studied. Scanning electron microscopy showed that *L. pentosus* and yeast populations were able to form mixed biofilms throughout the fermentation process on both abiotic (glass slide) and biotic (olive skin) surfaces. The biofilm architectures in both supports were completely different: on the glass slides only aggregates of *L. pentosus* and yeasts without any polymeric matrix surrounding them were found while on the skin of the fruits, true mature biofilms were observed. During fermentation, the lactic acid bacteria (LAB) population on the olives remained similar while that of yeasts increased progressively to reach similar levels at the end of the process (8–9 log CFU/cm²). Molecular analysis showed that different populations of *L. pentosus* and yeasts were the only microbial members of the biofilm formed during fermentation, regardless of inoculation. Hence, the green olive surface provides an appropriate environmental condition for the suitable development and formation of complex biofilms during controlled or natural table olive processing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In natural environments, microorganisms do not live as dispersed single cells. Instead, they attach onto solid surfaces which come into contact with a liquid to form polymicrobial aggregates called biofilms. Biofilms are defined as functional, complex microbial communities, generally composed of more than one species, attached to abiotic or biotic surfaces and embedded in extracellular polymeric substances (EPS) produced by microorganisms (Beer and Stoodley, 2006; Costerton, 2009; Davey and O'Toole, 2000; Kolter and Greenberg, 2006; Nobile and Mitchell, 2007; Remis et al., 2010; Wimpenny, 2009). In food systems, microorganisms are attracted to solid surfaces conditioned with nutrients which are sufficient for their viability and growth. These substrates offer the opportunity for the occupation of a particular ecological niche to specific strains, for instance, through the utilization of different carbon, vitamin or amino acid sources (Karunakaran et al., 2011; Kumar and Anand, 1998; Reid et al., 2007; Wimpenny, 2009; Zottola and Sasahara, 1994).

Spanish-style green olives are of great economical importance in the international market of fermented vegetables (IOOC, 2010) and have been subjected to numerous studies (Garrido Fernández et al.,

1995, 1997; Hurtado et al., 2008, 2010; Hurtado, 2010; IOOC (International Olive Oil Council), 2010; Panagou and Tassou, 2006; Panagou and Katsaboukakis, 2006; Panagou et al., 2008). Their elaboration is a well established process based on a traditional method using non-sterilized raw material in which both the fruits and the environmental conditions are manipulated in order to favor the development of a lactic fermentation. In short, after harvesting, the olives are treated with an NaOH solution (1.8–2.2%, vol/vol) in order to hydrolyze the phenolic compounds which are bactericidal for lactic acid bacteria (LAB), washed to eliminate the excess NaOH and finally, placed into 10,000–15,000 kg glass fiber containers. Then, the debittered fruits are covered with brine (8–10% NaCl, wt/vol) in which a population of LAB progressively develops. Initially, the most abundant microbiota is composed of *Enterobacteriaceae* while LAB are present as a contaminant at very low initial numbers. Later, yeasts initiate their growth (Garrido Fernández et al., 1997). However, due to environmental conditions, 2–3 weeks after olive brining, *Lactobacillus pentosus* usually becomes dominant over Gram-negative bacteria and other LAB. Usually, *Lactobacillus* coexists in the cover brine with a diverse yeast population during the fermentation process (Garrido Fernández et al., 1997). However, technological control procedures such as the systematic use of suitable *L. pentosus* starter cultures are often necessary to prevent the development of undesirable bacteria and to preserve the quality of the final product (Hurtado et al., 2008, 2010; Hurtado, 2010; Jiménez-Díaz et al., 1993; Panagou and Tassou, 2006; Panagou et al., 2008;

* Corresponding author. Tel.: +34 00 954692516; fax: +34 00 954691262.
E-mail address: rjimenez@cica.es (R. Jiménez-Díaz).

Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 2012; Ruiz-Barba et al., 1994). By fermenting the sugars contained in the fruits, *L. pentosus* provides the large amount of lactic acid needed for olive preservation (Garrido Fernández et al., 1997; Ruiz-Barba et al., 1994; Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 2012).

Apart from contributing to the sensorial attributes of the final product, yeasts have been shown to play a role in encouraging the growth of *L. pentosus* in brines through the production of essential B-group vitamins to this bacterial species (Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 1995). Some interactions between yeasts and LAB in table olive fermentations have already been described (Arroyo-López et al., 2008; Nychas et al., 2002; Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 1995) but their interactions during fermentation are still an unexplored field. Moreover, no information is currently available about the spatial distribution of LAB and yeasts on the numerous solid surfaces provided by the fermentation environment (e.g. inner fermenter walls and olive surface).

The aim of this work was to investigate the formation of mixed-species (LAB and yeast populations) biofilms for developing a stable environment to assure their survival during processing in the natural ecological niche of inoculated or spontaneous table olive fermentations.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria and culture medium

The *L. pentosus* LPCO10 and 128/2 strains used in this work were originally isolated from Spanish-style green olive fermentations in two different factories in southern Spain (Ruiz-Barba, 1991; Ruiz-Barba et al., 1991). They were grown at 30 °C in an MRS ((De Man et al., 1960); Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) medium as static cultures and they were maintained as frozen stocks at –20 °C in distilled water plus glycerol (20%, vol/vol).

2.2. Brining procedure of the olives

Small-scale fermentations at the pilot plant of the Instituto de la Grasa were carried out. The traditional Spanish-style green olive brining procedure was followed (Garrido Fernández et al., 1995, 1997). Whole green olives (ca. 14 kg), Gordal cv., were treated with an NaOH solution (1.8% NaOH [wt/vol]) for 8 h, followed by two washes in tap water for 18 h to remove the excess alkali and then covered with ca. 10 L of brine (10% NaCl [wt/vol]). They were then immediately divided into six equal portions and placed into 5 L polyethylene fermenters. Then, 14 glass slides for microscopy were placed in plastic bags and submerged into each fermenter.

2.3. Preparation of bacterial inocula for olive fermentation

L. pentosus LPCO10 and 128/2 strains were subcultured overnight at room temperature in a 50 mL MRS broth containing 4% NaCl (wt/vol) to allow for adaptation to the saline environment. After pre-incubation in MRS broth plus NaCl, cultures in the log phase of growth ($A_{600} = 1.0$ to 1.2) were centrifuged, washed in a saline solution, and finally resuspended in brine. The inoculation of brined olives proceeded as follows: two fermenters were inoculated with *L. pentosus* LPCO10 to a final concentration of ca. 10^5 CFU/mL; two other fermenters were inoculated with *L. pentosus* 128/2 (final concentration of ca. 10^5 CFU/mL); and finally two other fermenters were left to ferment spontaneously. The fermenters were maintained at room temperature (which ranged from 20 to 27 °C throughout the fermentation process) at the pilot plant of the Instituto de la Grasa, Seville, for ca. 3 months. At specific time intervals during the fermentation (from day 10 to day 80), two slides were taken from each fermenter and processed for analysis by scanning electron microscopy (SEM) as described in Section 2.7 below.

2.4. Detachment of microorganisms from olive skin

The protocol for this analysis was adapted from the methods developed by Böckelmann et al. (2003) and Weber and Legge (2010). Briefly, 200 g of olives (about 8–10 olives) were withdrawn at specific time intervals during the fermentation, washed three times in a phosphate-buffer solution (PBS) of 10 mM, pH 7.0, and then placed in a 1 L Erlenmeyer flask containing 250 mL of PBS with a mixture of enzymes which included per mL: lipase (50 U), β -galactosidase (10 U), and α -glucosidase (1 U) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). For a complete detachment and suspension of the biofilms, the flasks were shaken at 100 rpm for 16 h at 20 °C. After that, the suspensions were centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min, 4 °C) the pellets were washed twice in PBS and finally resuspended into 10 mL of the same buffer.

2.5. Plate counts

To determine the number of CFU per cm² of the different microbial populations of LAB and yeasts in the biofilms formed on the surface of the olives, detached biofilms were vortexed for 30 s, diluted in a sterile saline solution and then spread on solid culture media with a Spiral Plater model Wasp 2 (Don Whitley Sci. Ltd., Shirley, U.K.). Yeasts were counted at 25 °C in an oxytetracycline-glucose-yeast extract (OGYE) agar (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) and LAB at 30 °C on MRS (Oxoid) agar plus 0.02% (wt/vol) sodium azide (MRS-sa) (Sigma-Aldrich). All the samples were analyzed in triplicate and the plate counts averaged.

2.6. Molecular identification and characterization of the lactobacilli isolates

To monitor the populations of *L. pentosus* in each treatment throughout the fermentation process, ten isolated colonies were randomly selected for each plate at time intervals (see Table 1) and their genomic DNA was extracted according to Ruiz-Barba et al. (2005). Briefly, single colonies growing on solid media were picked up with a sterile plastic tip and resuspended into 100 μ l of sterile deionized water plus 100 μ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1), the mixture was vortexed for a few seconds and then centrifuged at $16,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. For PCR or RAPD-PCR applications, 5–10 μ l of the upper aqueous fraction was used.

For the identification of the isolates at the species level, the *recA*-based method (Torriani et al., 2001), and the *dnaK*-based method (Huang et al., 2010) were followed. In addition, in order to reliably distinguish between strains, the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprint technique using the primer OPL5 (5'-ACG-CAGGCAC-3') (Rodas et al., 2005) was used and the resulting profiles were analyzed with the Bionumerics 6.6™ software package (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) for the cluster analysis. Similarities among digitalized profiles were calculated using the Pearson correlation and an average linkage (UPGMA) dendrogram was derived from the profiles.

2.7. Scanning electron microscopy

At different time intervals, the olives and glass slides were removed from fermentation and processed for analysis by scanning electron microscopy (SEM). The suspension of biofilms detached from the surface of the olives and the olives after detaching the biofilms were processed for SEM.

For observation of the detached biofilms and the biofilms on the glass slides, the method of Kubota et al. (2008) was followed with modifications. Prior to fixation, detached biofilms were spread onto the surface of a glass slide. Then, the glass slides were rinsed twice for 15 min each in PBS and then fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS for 16 h at 4 °C. The fixed bacteria were rinsed twice for 15 min in

Table 1
Colony forming units of *Lactobacillus pentosus* and yeast populations^a detached from the olive surface throughout the fermentation of Spanish-style green olives in both inoculated and spontaneous processes.

Time (days)	Inoculated with LPCO10 strain		Inoculated with 128/2 strain		Spontaneous	
	<i>L. pentosus</i>	yeasts	<i>L. pentosus</i>	yeasts	<i>L. pentosus</i>	yeasts
0	0	0	0	0	0	0
7	$5.50 (\pm 0.12) \times 10^9$	$1.10 (\pm 0.16) \times 10^4$	$2.20 (\pm 0.44) \times 10^9$	$9.70 (\pm 1.01) \times 10^4$	$6.90 (\pm 0.11) \times 10^9$	$1.10 (\pm 1.61) \times 10^4$
14	$1.20 (\pm 0.67) \times 10^8$	$1.80 (\pm 0.30) \times 10^6$	$6.14 (\pm 0.61) \times 10^7$	$2.70 (\pm 0.25) \times 10^7$	$1.00 (\pm 0.32) \times 10^8$	$8.50 (\pm 0.44) \times 10^6$
19	$1.45 (\pm 2.34) \times 10^8$	$1.20 (\pm 1.79) \times 10^7$	$1.45 (\pm 1.94) \times 10^8$	$3.60 (\pm 0.95) \times 10^7$	$9.40 (\pm 0.88) \times 10^7$	$3.05 (\pm 0.29) \times 10^6$
28	$2.00 (\pm 1.07) \times 10^8$	$3.30 (\pm 0.91) \times 10^6$	$8.90 (\pm 0.73) \times 10^6$	$7.40 (\pm 1.65) \times 10^6$	$1.50 (\pm 0.95) \times 10^7$	$8.80 (\pm 0.27) \times 10^5$
47	$4.90 (\pm 0.46) \times 10^7$	$8.10 (\pm 0.77) \times 10^7$	$1.25 (\pm 0.50) \times 10^7$	$7.60 (\pm 0.58) \times 10^6$	$1.20 (\pm 0.18) \times 10^7$	$1.70 (\pm 0.23) \times 10^7$
62	$9.00 (\pm 0.55) \times 10^6$	$6.75 (\pm 0.74) \times 10^8$	$4.90 (\pm 0.39) \times 10^7$	$1.26 (\pm 0.51) \times 10^8$	$9.00 (\pm 0.22) \times 10^6$	$5.10 (\pm 0.49) \times 10^8$
81	$1.05 (\pm 0.70) \times 10^8$	$2.90 (\pm 0.42) \times 10^8$	$1.70 (\pm 0.46) \times 10^8$	$2.90 (\pm 0.67) \times 10^8$	$1.50 (\pm 1.82) \times 10^8$	$6.40 (\pm 0.33) \times 10^8$

^a Mean of the populations of 8–10 fruits, expressed as CFU/cm². The olive area was calculated as described by Weisstein (2011) for the surface of a prolate spheroid. All samples were analyzed in triplicate and the plate counts averaged.

PBS by gentle mixing at room temperature and then dehydrated through a graded ethanol series as follows: 15 min each at 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 100%. Finally, slides were treated three times (15 min each) in t-butyl alcohol (Sigma).

The methodology of Kroupitski et al. (2009) was used with slight modifications for visualization of the biofilms on the olive surface. Whole fruits (one piece at every time interval) were washed twice in PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS for 2 h. The pieces were washed five times (5 min each) in PBS, dehydrated by washing with increasing concentrations of ethanol (5 min each at 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 100%), and treated for 20 min in t-butyl alcohol. For SEM observation, 2-mm² slices were taken and placed on glass slides.

All samples were coated with gold in a Scancoat Six SEM sputter coater (Edwards, Crawley, England) and images were taken with a JEOL JSM-6460LV scanning electron microscope (JEOL USA, Inc., Peabody, MA) in the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), Seville, Spain.

3. Results and discussion

3.1. Biofilm development on abiotic surfaces during fermentation

After 10 days of olive brining, microorganisms irreversibly attached to the surface of the glass slides were observed (Fig. 1A). Although most

of the bacteria and yeasts appeared to be individually adhered to the surface, mixed-species microcolonies composed of both microorganisms were often found. As the fermentation progressed, the microcolonies grew in number to finally form macrocolonies which covered most of the glass slide surface (Fig. 1B and C, at 37 and 57 days of fermentation, respectively). At the end of the process (ca. 80 days), the biofilms appeared disrupted and only a few mixed-species colonies could be observed (Fig. 1D). Regardless of inoculation, no differences in the biofilm formation rate or in its shape and components were noticed.

How lactobacilli and yeasts start to adhere to the glass slide surface, what kind of sticky substance is produced and which microorganism is producing it, remain unknown at the moment. It has been extensively shown that immersing a solid substrate into almost any aqueous liquid leads to a rapid attachment of organic molecules to the surface to form what is known as a “conditioning film” (Costerton, 2009; Wimpenny, 2009; Zottola and Sasahara, 1994). These “conditioning films” facilitate the binding of microorganisms which, after a period of time, form a strong association as a specific adhesion which is mediated by adhesive cell products generated by the microorganisms themselves (Beer and Stoodley, 2006; Davey and O’Toole, 2000; Karunakaran et al., 2011; Kolter and Greenberg, 2006; Kumar and Anand, 1998; Nobile and Mitchell, 2007; Reid et al., 2007; Remis et al., 2010; Wimpenny, 2009).

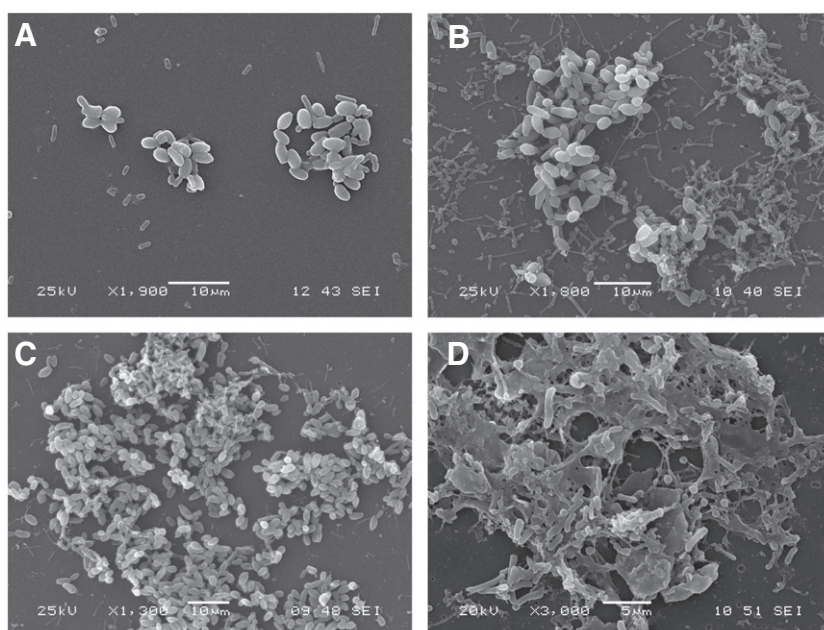


Fig. 1. Development of mixed microbial communities of *Lactobacillus pentosus* and yeasts on an abiotic surface (glass slides) during the fermentation of Spanish-style Gordal green olives in *L. pentosus* LPCO10-inoculated fermenters. SEM micrographs A, B, C and D are from olive surface biofilms after 10, 37, 57 and 80 days of fermentation, respectively.

The olive brine is a very rich environment in which a wide range of nutrients is discharged from the fruits. They possibly contribute to forming a “conditioning film” on the surface of the glass. In fact, the glass slides appeared to be opaque when they were removed from the fermenters and were rinsed in PBS prior to fixation. Typically the microorganisms forming a biofilm are embedded in an extracellular polymeric substance called matrix, which the cells themselves excrete (Beer and Stoodley, 2006; Karunakaran et al., 2011; Nobile and Mitchell, 2007). However, no matrix surrounding the biofilms was observed on the slides. Interestingly, a sort of sticky material joining the microorganisms in the microcolonies was observed, suggesting that an adhesive substance is being produced by the microorganisms to allow the cells to remain stuck to each other and perhaps fix the colonies to the solid substrate (Fig. 1A).

3.2. Biofilm development on biotic surfaces during fermentation

The architecture of the microbial biofilm communities on the surface of the olives was completely different from those observed on the glass slides. True mature biofilms on the whole surface of the fruits could be observed by SEM after 37 days of fermentation (Fig. 2A1, B1, and C1) and remained throughout the fermentation process (Fig. 2A2, B2, and C2, at day 55 of fermentation). The morphology of the resulting biofilms was fluffy looking, where bacteria and yeasts appeared embedded in a matrix which keeps them in close proximity, perhaps even

attached to each other. Also, the morphology of the microorganisms in this community would be very different from the bacteria and yeasts in the biofilms on the glass slides. In fact, whereas the appearance of the cell surface was smooth on the slides, with yeasts showing few fruity bodies in some cases (Fig. 1), the morphology of the matrix-embedded microorganisms did not always allow for differentiating yeasts from bacteria (Fig. 2). Although the microorganisms were predominantly seen growing in the biofilm, it was also noted that individual yeasts and bacteria occasionally appeared outside of the matrix (Fig. 2). As was described for a number of microorganisms growing in microbial communities (Costerton, 2009; Davey and O’Toole, 2000; Wimpenny, 2009), it seems that sessile cells on the skin of the olives probably produce occasional planktonic cells which detach from the matrix and then migrate to establish new communities on the different surfaces available in the environment.

No differences among biofilms were noticed regardless of inoculation, as was also observed for the biofilms developed on the glass slides.

3.3. Plate counts, characterization and visualization of detached microorganisms from olive skin

By combining both chemical and mechanical methods (Costerton, 2009; Davey and O’Toole, 2000; Wimpenny, 2009), it was possible to detach the biofilms from the surface of the olives and number the

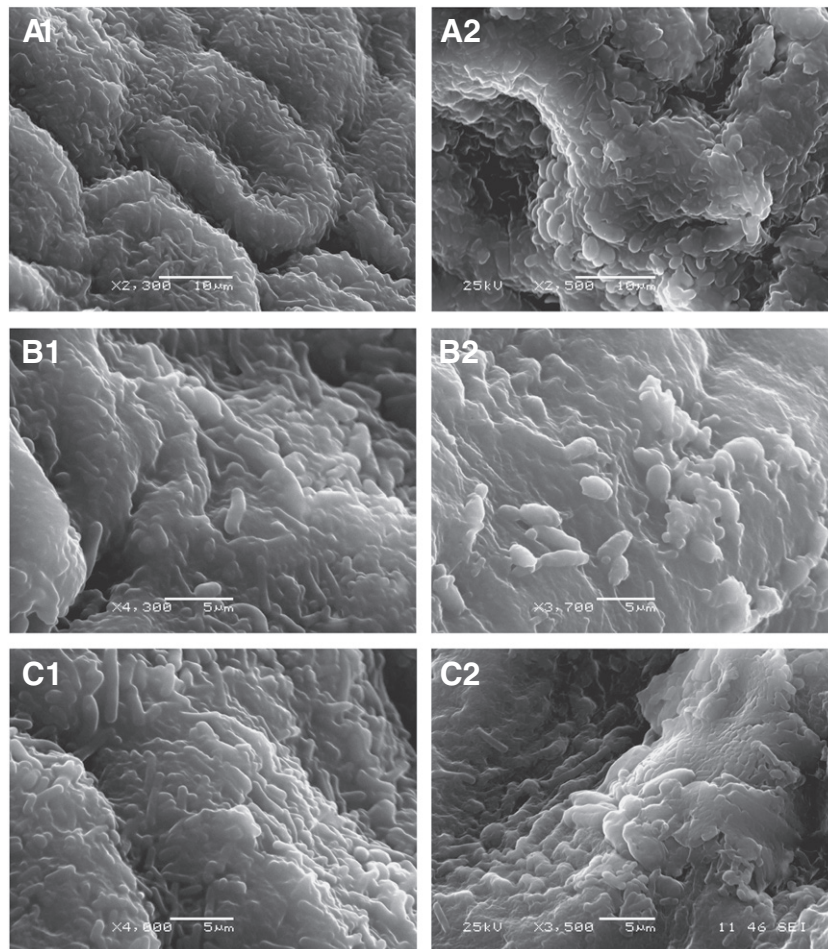


Fig. 2. Development of mixed microbial communities of *Lactobacillus pentosus* and yeasts on a biotic surface (olive epidermis) during the Spanish-style Gordal green olive fermentation in *L. pentosus* LPCO10-inoculated fermenters. SEM micrographs A1 and A2 are olive surface biofilms, after 37 and 55 days of fermentation respectively, from *L. pentosus* LPCO10-inoculated fermented fruits; SEM micrographs B1 and B2 are olive surface biofilms from *L. pentosus* 128/2-inoculated fermented fruits, after 37 and 55 days of fermentation, respectively; SEM micrographs C1 and C2 are olive surface biofilms from spontaneous fermented fruits after 37 and 55 days of fermentation, respectively.

different populations of LAB and yeasts throughout the fermentation process in both inoculated and spontaneous fermenters. In all cases, 7 days after olive brining, a high number of LAB and yeasts were recovered from the surface of the olives and both populations appeared together throughout fermentation till the end of the process (Table 1). Taking into account that the external area of one Gordal olive (Weisstein, 2011) was estimated to be ca. $23.35 \pm 4.34 \text{ cm}^2$, the average number of bacteria and yeasts per fruit at the end of the fermentation was higher

than 10 and 11 log CFU, respectively. Thus, if the weight of one Gordal olive is estimated to be $9.6 \pm 0.4 \text{ g}$ and one fermenter contains ca. 3.7 kg of fruits, the total number of bacteria and yeasts per fermenter is higher than 13 log CFU. *L. pentosus* and yeast populations in Spanish-style green olive brines have been reported to be of about 10 and 6 CFU/mL, respectively (Garrido Fernández et al., 1995, 1997; Hurtado et al., 2008, 2010; Hurtado, 2010; Panagou and Tassou, 2006; Panagou et al., 2008); therefore, considering that there were about

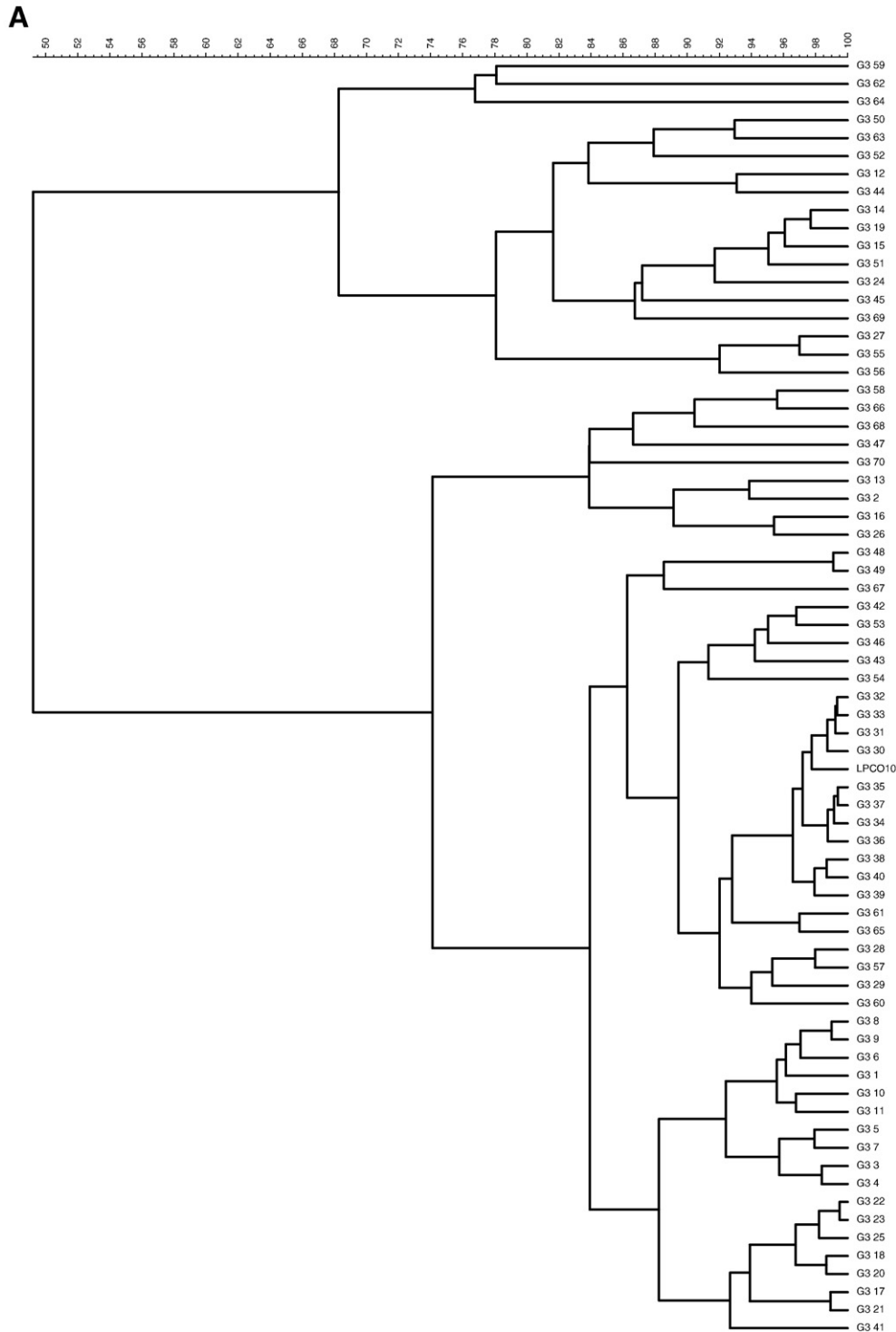


Fig. 3. Cluster analysis of RAPD-PCR profiles of *Lactobacillus pentosus* strains isolated from Spanish-style Gordal green olive fermentations. Graph A corresponds to the *L. pentosus* LPCO10-inoculated fermenter; graph B to the *L. pentosus* 128/2-inoculated fermenter; and graph C to the spontaneous fermenter.

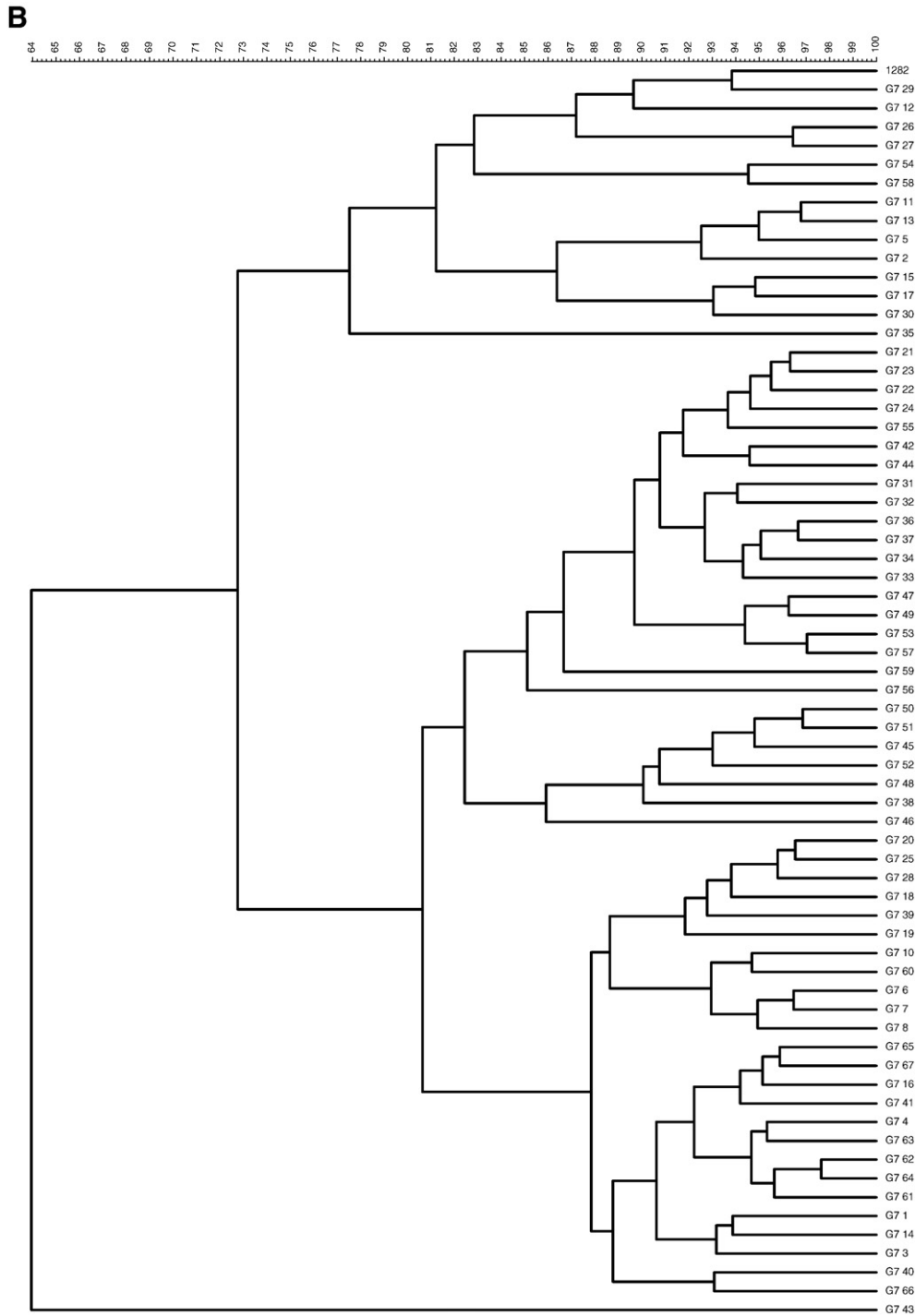


Fig. 3 (continued).

2.5 L of brine per fermenter, the total *L. pentosus* and yeast populations could be estimated at about 13 and 9 log CFU, respectively. These estimations lead to the conclusion that fruits and brines are similar sources of LAB but olives are a higher source of yeasts.

Using both the *recA*-based method developed by Torriani et al. (2001) and the *dnaK*-based method developed by Huang et al. (2010) PCR approaches for ten selected LAB isolates detached from the surface of the olives at different fermentation times, it was confirmed that all LAB strains belonged to the *L. pentosus* species (data not shown). Hence, the only species present in the olive biofilms was *L. pentosus*, regardless of the type of fermentation process. The homology between the *L. pentosus* strains from each fermenter

(Fig. 3) was studied by analysis of the RAPD-PCR fingerprinting profiles obtained from these isolates by the Bionumerics 6.6™ software, which built the corresponding dendrogram. After arbitrarily selecting a similarity coefficient of 80%, the results indicated that in the inoculated sets, neither the LPCO10 nor the 128/2 strains were able to dominate over the indigenous *L. pentosus* strains in the biofilms because different clusters were obtained (Fig. 3A and B, respectively). Furthermore, differences between both dendrograms were highly marked. LPCO10 belongs to a cluster with about half the number of total profiles but 128/2 was not similar to the majority of profiles. In the spontaneous fermenters, different separated clusters of wild *L. pentosus* strains were also obtained (Fig. 3C).

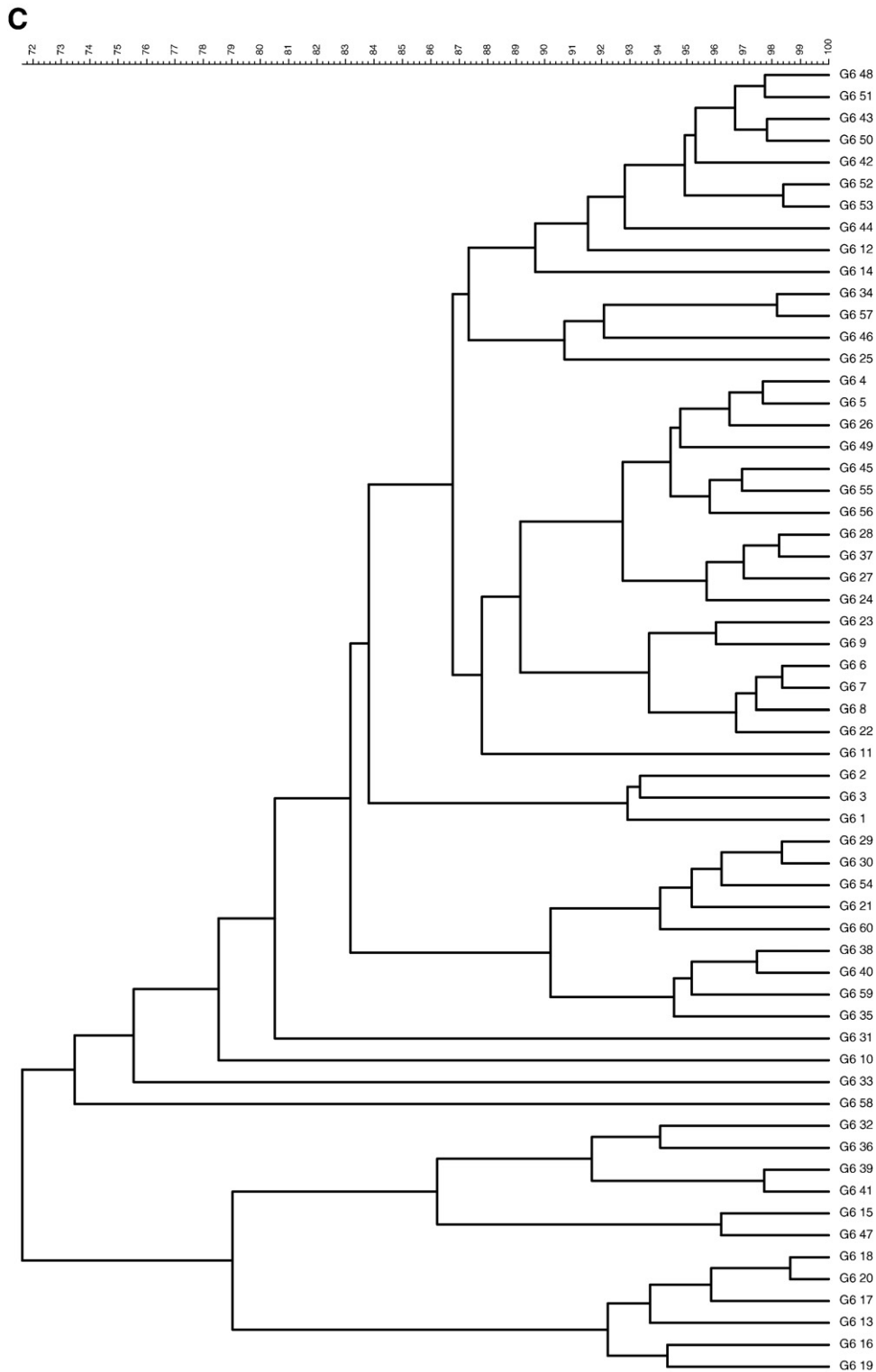


Fig. 3 (continued).

SEM micrographs of the extracted biofilms from olive epidermis (Fig. 4) showed that in contrast to that observed for intact biofilms on the skin of the olives (Fig. 2), here it was possible to distinguish the morphology of the microorganisms as being part of the biofilms, *L. pentosus* and yeasts (Fig. 4A, solid white arrows). In addition, the biofilm matrix surrounding the microorganisms could be displayed (Fig. 4A). Bacteria and yeasts, apart from sticking to the biofilm matrix, clearly appeared to be attached to each other (Fig. 4B and C).

These connections between *L. pentosus* and yeasts were more evident than those observed in the glass slide biofilms, perhaps contributing to maintaining both microorganisms in close proximity while embedded into the biofilm matrix.

For decades, it has been assumed that the different microbial populations of *L. pentosus* and yeasts, the main microorganisms present in the Spanish-style green olive fermentation, exclusively appeared in a planktonic state (Garrido Fernández et al., 1995, 1997; Hurtado et al.,

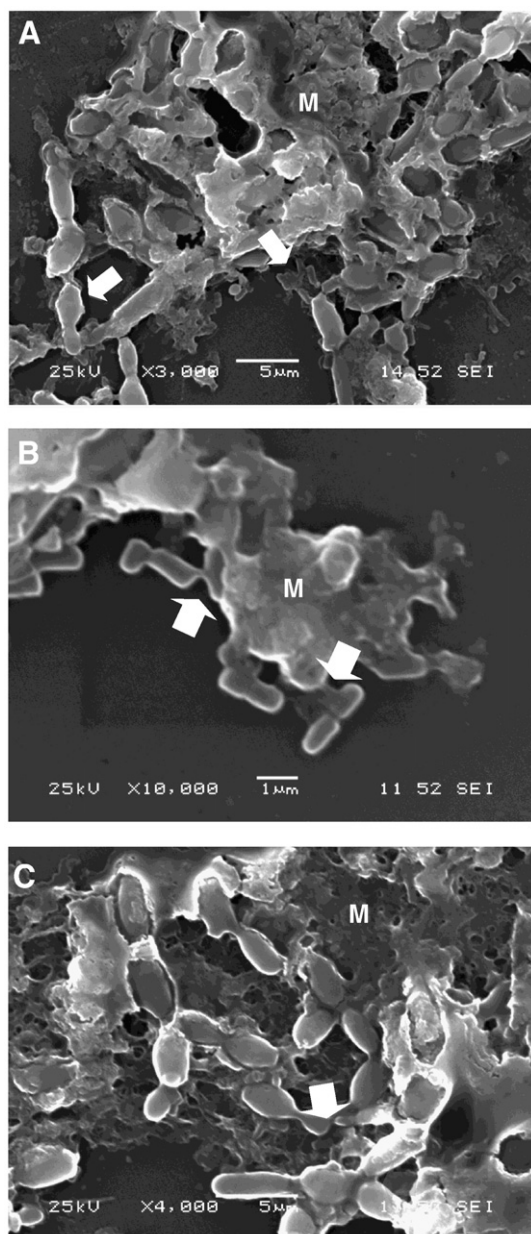


Fig. 4. SEM micrographs of pieces of biofilms detached from the olive skin. Solid white arrows indicated junctions among microorganisms. M, matrix surrounding yeasts and lactobacilli.

2008, 2010; Hurtado, 2010; Panagou and Tassou, 2006; Panagou et al., 2008; Ruiz-Barba et al., 1994) because, until now, the development of these populations had been mainly monitored in the cover brines. For the first time, the results obtained in this work clearly demonstrate the ability of *L. pentosus* and yeasts to colonize both the abiotic and biotic surfaces which are in contact with the brine, establishing true mixed species biofilms in Gordal Spanish table olive fermentations. Some reports about microbial adherence to the skin of olives have been published to date (De Bellis et al., 2010; Lavermicocca et al., 2005, 2010; Lavermicocca, 2006; Nychas et al., 2002). However, the results presented in this study represent substantial advances with respect to the others. In these previous works only LAB appeared attached to the surface of the olives but no association or physical interaction between bacteria and yeasts had been communicated and, more importantly, the microorganisms did not appear to live embedded in a biofilm matrix as was observed here. It might be speculated that the absence of true biofilms in such cases was caused by the

addition of the bacteria to already processed table olives and that those bacteria (*L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*, and *B. longum*) were not natural inhabitants of the olive fermentation environment (De Bellis et al., 2010; Lavermicocca et al., 2005, 2010). Thus, they were adhered to the skin of the olives but they could not interact with the spontaneous microbiota to form true biofilms. In the case of spontaneous fermentations such as those described by Nychas et al. (2002), the olives were not pre-treated with lye to disrupt the cuticle as that which occurs in the Spanish-style method. In these cases, the cuticle of the olives could act as a barrier for the release of nutrients from the fruits. In our work, the microorganisms were in direct contact with the source of nutrients and this circumstance probably plays an essential role in constructing microbial biofilms on the olive skin. These microbial communities probably play an important role in the process thus providing a guarantee of proper fermentation.

4. Conclusion

The environment of olive fermentation provides plenty of solid surfaces. Supposedly, *L. pentosus* and yeasts take advantage of this circumstance to establish complex, multi-species associations in both abiotic and biotic supports, particularly on the external surface of the fruits. The reason why the structure of these biofilms appears to be more complex and consistent on the skin of the fruits than on slides remains unknown at the moment. However, it might be speculated that the explanation for the enhanced attachment of the microorganisms among themselves and to the olive surface would be due to a high availability and concentration of nutrients, e.g., sugars, amino acids and vitamins, at the olive/brine interface. Probably, the microorganisms would sense this concentration gradient and migrate toward the surface thus establishing such complex communities. Further research is needed to investigate the signals which lead to the development of these microbial associations, the mechanisms that favor adhesion between *L. pentosus* and yeasts to the surfaces, as was recently described for *L. casei* subsp. *rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae* (Kawarai et al., 2007), and the nature and authorship of the biofilm matrix. This would contribute to a better understanding of the formation of biofilms in this natural ecological niche and, particularly, their role in the development of proper table olive fermentation procedures.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Government through MICIIN Projects AGL2009-08016 and AGL2010-15529. J. D.-M. and J. B.-G were the recipient of grants JAE-predoc from the C.S.I.C. C. O.-R. was the recipient of a contract from MICIIN. F.N. Arroyo-López thanks CSIC for a JAE-DOC postdoctoral research contract.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.011>.

References

- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189–196.
- Beer, D., Stoodley, P., 2006. Microbial biofilms. *Prokaryotes* 1, 904–937.
- Böckelmann, U., Szwedzyk, U., Grohmann, E., 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 55, 201–211.
- Costerton, J.W., 2009. In: Costerton, J.W. (Ed.), *The Biofilm Primer*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 847–867.
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L., Lavermicocca, P., 2010. Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentations sets inoculated with

- the probiotic strains *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. International Journal of Food Microbiology 140, 6–13.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology 154, 1347–1355.
- Garrido Fernández, A., García García, P., Brenes Balbuena, M., 1995. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), Olive Fermentations. Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed. VCH, New York, pp. 593–627.
- Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, R.M., 1997. Table Olives: Production and Processing. Chapman & Hall, London; New York, pp. 134–197.
- Huang, C.C., Lee, F.L., Liou, J.S., 2010. Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial dnaK sequence and DNA fingerprinting techniques. Antonie Van Leeuwenhoek 97, 289–296.
- Hurtado, A., 2010. Estudio de la microflora asociada al proceso de fermentación de las aceitunas arbequinas de mesa. Ph. D. Thesis. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. Food Research International 41, 738–744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2010. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. Food Microbiology 27, 731–740.
- IOOC (International Olive Oil Council), 2010. Key figures on the world market for table olives. Data Adopted at the 98th Session of the IOC, Madrid (Spain), 22–26 November.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.-C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Applied and Environmental Microbiology 59, 1416–1424.
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., Biggs, C.A., 2011. “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. Applied Microbiology and Biotechnology 90, 1869–1881.
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. Applied and Environmental Microbiology 73, 4673–4676.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. Nature 441, 300–302.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S., 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. Applied and Environmental Microbiology 75, 6076–6086.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. Journal of Bioscience and Bioengineering 106, 381–386.
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 42, 9–27.
- Lavermicocca, P., 2006. Highlights on new food research. Digestive and Liver Disease 38, S295–S299.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizello, C.G., Visconti, A., 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. Applied and Environmental Microbiology 71, 4233–4240.
- Lavermicocca, P., Rossi, M., Russo, F., Srirajaskanthan, R., 2010. In: Preedy, V., Watson, R. (Eds.), Table Olives: A Carrier for Delivering Probiotic Bacteria to Humans. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, Chapter 77. Academic Press, London, pp. 735–743.
- Nobile, C.J., Mitchell, A.P., 2007. Microbial biofilms: e pluribus unum. Current Biology 17, R349–R353.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. Letters in Applied Microbiology 2002, 173–177.
- Panagou, E.Z., Katsabokakis, C.Z., 2006. Effect of different treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. Food Microbiology 23, 199–204.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2006. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. Food Microbiology 23, 738–746.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Nychas, G.-J.E., 2008. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. Food Microbiology 25, 348–358.
- Reid, G., Kirjavainen, P., Richardson, B., 2007. In: Blaschek, H.P., Wang, H.H., Agle, M.E. (Eds.), Biofilms in the Food Environment. Beneficial Bacterial Biofilms, Chapter 7. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 153–165.
- Remis, J.P., Costerton, J.W., Auer, M., 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. The ISME Journal 4, 1085–1087.
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 197–207.
- Ruiz-Barba, J. L., 1991. Estudio de algunos factores que influyen en el desarrollo de una fermentación ácido-láctica apropiada de aceitunas de mesa. Ph. D. Thesis. University of Seville, Spain.
- Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., 1995. Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. Applied and Environmental Microbiology 61, 1294–1297.
- Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., 2012. A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. Food Microbiology 30, 253–259.
- Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.-C., Jiménez-Díaz, R., 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. Journal of Applied Bacteriology 71, 417–421.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J., Jiménez-Díaz, R., 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentation. Applied and Environmental Microbiology 60, 2059–2064.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical Biochemistry 347, 333–335.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. Applied and Environmental Microbiology 67, 3450–3454.
- Weber, K.P., Legge, R.L., 2010. Method for the detachment of culturable bacteria from wetland gravel. Journal of Microbiological Methods 80, 242–250.
- Weisstein, E.W., 2011. Quadratic surface. From MathWorld — A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/QuadraticSurface.html>.
- Wimpenny, J., 2009. Microbial metropolis. Advances in Microbial Physiology 56, 29–84.
- Zottola, E.A., Sasahara, K.C., 1994. Microbial biofilms in the food processing industry — should they be a concern? International Journal of Food Microbiology 23, 125–148.



Corrigendum

Corrigendum to “Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during the Spanish style green table olive fermentation”

[Int.J. Food Microbiol. 157 (2012) 230–238]

Jesús Domínguez-Manzano, Ángela León-Romero, Carmen Olmo-Ruiz, Joaquín Bautista-Gallego, Francisco Noé Arroyo-López, Antonio Gakrrido-Fernández, Rufino Jiménez-Díaz*

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Padre García Tejero, 4, Apartado de Correos 1078, 41012 Seville, Spain

The authors regret that during the publication of the above article, the co-author, Angela Leon-Romero's name was not included. The amended author list is reproduced correctly above.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.011>.

* Corresponding author. Tel.: +34 954692516; fax: +34 954691262.

E-mail address: rjimenez@cica.es (R. Jiménez-Díaz).



Formation of lactic acid bacteria–yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations

F.N. Arroyo-López*, J. Bautista-Gallego, J. Domínguez-Manzano, V. Romero-Gil, F. Rodríguez-Gómez, P. García-García, A. Garrido-Fernández, R. Jiménez-Díaz

Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero n° 4, 41012 Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2011

Received in revised form

27 June 2012

Accepted 4 July 2012

Available online 14 July 2012

Keywords:

Biofilms

Olive surface

Yeasts

Lactic acid bacteria

Spanish-style fermentation

ABSTRACT

This work examines the formation of poly-microbial communities adhered to the surface of Manzanilla olive fruits processed according to the Spanish style. The experimental design consisted of four pilot fermenters inoculated with four *Lactobacillus pentosus* strains, plus another fermenter which was not inoculated and fermented spontaneously. Lactic acid bacteria and yeasts were analysed in depth on olive epidermis throughout fermentation by plate count, molecular techniques and scanning electron microscopy. Data show that in all cases high population levels (above $8 \log_{10}$ CFU per olive) were reached for both groups of microorganisms at the second week of fermentation and that these counts never fell below $6 \log_{10}$ CFU per olive during the 3 months that fermenters were monitored. *In situ* observation of olive epidermis slices revealed a strong aggregation and adhesion between bacteria and yeasts by the formation of a matrix which embedded the microorganisms. *Geotrichum candidum*, *Pichia galeiformis* and *Candida sorbosa* were the main yeast species isolated from these biofilms at the end of fermentation (confirmed by RFLP analysis of the 5.8S-ITS region), while molecular characterization of lactobacilli isolates by means of RAPD-PCR with primer OPL₅ showed in many cases a high similarity in their banding profiles with the inoculated strains. Results obtained in this survey show the importance of studying the olive epidermis throughout fermentation, because ultimately, olives are ingested by consumers.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Table olives are probably the main fermented vegetable of the food industry, with an estimated production of 2,200,000 tonnes per year (IOOC, 2010). The elaboration of this food is mainly related to the Mediterranean Basin, but there are also important producer regions in Australia, USA and South-America. Thus, table olive elaboration is widespread around the world and represents an important economic source for producing countries.

There are several ways to elaborate table olives, but the most prominent industrial elaboration is the green Spanish style, which accounts for about 50–60% of the world-wide production. Briefly, fruits meant for this type of elaboration (Manzanilla, Gordal or Hojiblanca, among other cultivars) are picked at the green ripening stage and treated with lye for debittering (1.8–2.2% NaOH) until the solution reaches 2/3 of the flesh. The process produces hydrolysis of the glucoside oleuropein. Then, fruits are washed to remove excess alkali and brined in 8–10% NaCl, where they usually undergo

a spontaneous lactic acid fermentation (Garrido-Fernández et al., 1997).

Biofilms are superficial microbial colonies found on solid surfaces, mainly at the solid–liquid interface (Davey and O'Toole, 2000; Beer and Stoodley, 2006; Kolter and Greenberg, 2006; Nobile and Mitchell, 2007; Costerton, 2009; Wimpenny, 2009; Remis et al., 2010). The biofilm not only includes microorganisms, but also describes all of the extracellular material produced by them on the surface and any material trapped within the resulting matrix. Whereas bacteria may adhere to a surface within minutes, it is generally assumed that true biofilms take days to develop (Hood and Zottola, 1995). Although studies of biofilm formation were primarily focused on biofilms formed by a single species of microorganism, several recent studies have been pioneering in the study of the formation of mixed-species biofilms because, in practice, in natural environments and foods more than one species is present (Adam et al., 2002; Kawari et al., 2007; Furukawa et al., 2010).

This is also true for table olive fermentations where diverse groups of microorganisms play an important role during fermentation determining the quality and flavour of the final product. Lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, which coexist during practically all the process, are among the most relevant microorganisms

* Corresponding author. Tel.: +34 954 692 516; fax: +34 954 691 262.
E-mail address: fnarroyo@cica.es (F.N. Arroyo-López).

found in this fermented vegetable. It is generally accepted that yeasts are able to produce compounds with important organoleptic attributes (Querol and Fleet, 2006). Homofermentative LAB (*Lactobacillus* species) metabolize the sugars available during fermentation, producing lactic acid which originates the rapid and safe acidification of brines (Fernández Díez et al., 1985; Garrido-Fernández et al., 1997). The necessity to have a certain level of assurance in the identification and characterization of both LAB and yeasts involved in food fermentation, has promoted the development of several molecular methods for this purpose. Among others techniques, like sequencing of 26S and 16S ribosomal genes for eukaryotic and bacteria, respectively, RFLP analysis of the 5.8.S-ITS region in the case of yeasts (Esteve-Zarzoso et al., 1999) and multiplex-PCR of the *recA* gene with specific primers for *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* (Torriani et al., 2001a), have been widely used for species identification. For LAB characterization, RAPD-PCR analysis is also commonly applied (Rossi et al., 1998; Rantsiou et al., 2006; Torriani et al., 2001b; Urso et al., 2006).

Microbial monitoring of table olive fermentations is mainly carried out by spreading of the cover brines onto appropriate culture media. But olives are, in the end, the food ingested by consumers, so the analysis of the microbiota adhered to fruits (population levels, species, associations, etc.) is also very important. Incomprehensibly, this point has received scarce attention by researchers. In this sense, Nychas et al. (2002) reported the presence of endogenous bacteria and yeasts on and within naturally fermented black olives, which was accomplished by scanning electron microscopy (SEM). Lavermicocca et al. (2005) studied the ability of exogenous lactobacilli and bifidobacteria species to adhere and survive in olive samples. More recently, De Bellis et al. (2010) studied the dynamics of the microbiota adhered to the surface of debittered green olives cv. Bella di Cerignola in fermentation sets inoculated with the probiotic strain of human origin *Lactobacillus paracasei* IPMC2.1. In all these studies, the olive surface proved to be a good substrate to support microbial growth.

Thus, the main goal of the present work was an in-depth analysis of the olive epidermis in order to study: a) the evolution throughout fermentation of the main group of microorganisms associated to this food, and b) the formation of mixed-species biofilms among them. For this purpose, molecular (for identification and characterization of microorganisms) and SEM analyses (for *in situ* observations) were performed.

2. Material and methods

2.1. Olive fermentations

Manzanilla fruits (4.05 ± 0.49 g size) were obtained during the 2009/2010 season at the green ripening stage from JOLCA, S.A. (Huévar del Aljarafe, Seville, Spain), and transported to the laboratory, where they were debittered according to the Spanish style (lye treatment with 2.3% NaOH). After washing (12 h) to remove excess alkali, the fruits were brined in polyethylene fermenters with a capacity for 5.2 kg of fruits and 3.4 L of brine (10% NaCl). After 2 days to reach equilibrium, CO₂ was bubbled into fermenters to lower the initial pH to below 6.0 units. Then, four fermenters were independently inoculated at approximately 5 log₁₀ CFU mL⁻¹ with the following *L. pentosus* strains: TOMC LAB2, TOMC LAB3, TOMC LAB4 and TOMC LAB5 (henceforth LAB2, LAB3, LAB4 and LAB5). All the LAB strains were previously isolated from diverse table olive processing brines and they belong to the Table Olive Microorganisms Collection (TOMC) of Instituto de la Grasa (CSIC, Seville, Spain). They were selected as a function of diverse phenotypical tests related to their probiotic potential, such as auto-aggregation,

hydrophobicity, antibiotic and bile resistance, inhibition of pathogens, haemolytic activity and resistance to pancreatic and gastric digestions. Table 1 shows the most promising results obtained from these assays. At the same time, another fermenter was not inoculated and left to ferment spontaneously. Thus, a total of 5 different treatments (F1, F2, F3, F4 and F5, for LAB2, LAB3, LAB4, LAB5 and spontaneous control, respectively) were carried out. Each fermenter was analysed at least in duplicate.

2.2. Study of the microbial populations

Brine samples were taken at different times throughout fermentation and diluted, if necessary, in a sterile saline solution (0.9% NaCl, wt/vol). Then, they were plated using a Spiral System model dwScientific (Dow Whitley Scientific Limited, England) on appropriate media. Enterobacteriaceae were counted on Crystal-violet Neutral-Red bile glucose (VRBD) agar (Merck, Darmstadt, Germany), LAB were spread onto de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Oxoid) supplemented with 0.02% (wt/vol) sodium azide (Sigma, St. Luis, USA), and yeasts were grown on yeast–malt–peptone–glucose medium (YM) agar (Difco, Becton and Dickinson Company, Sparks, MD, USA) supplemented with oxytetracycline and gentamicin sulphate (0.005%, wt/vol) as selective agents. The plates were incubated at 30 °C for 48–72 h and counted using a CounterMat v.3.10 (IUL, Barcelona, Spain) image analysis system. Brine counts were expressed as log₁₀ CFU mL⁻¹.

At the same time, to determine microorganisms adhered to olive epidermis, the protocol developed by Böckelmann et al. (2003) was slightly adapted to the specific case of table olives. Briefly, two fruits from each fermenter were randomly taken at different sampling times and washed for 1 h with 250 mL of a sterile PBS buffer solution. Then, olives were transferred to 50 mL of a PBS solution with the following enzymes: 14.8 mg L⁻¹ lipase (L3126), 12.8 mg L⁻¹ β-galactosidase (G-5160) and 21 μL L⁻¹ α-glucosidase (G-0660) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). To achieve biofilm disintegration and removal of the adhered cells, the fruits were incubated at 30 °C in this enzyme cocktail with slight shaking (150 rpm). After 12 h, the olives were removed and the resulting suspension was centrifuged at 9000 × g for 10 min at 4 °C. Finally, the pellet was re-suspended in 2 mL of PBS and spread onto the different culture media described above. Olive counts were expressed as log₁₀ CFU per olive.

Changes in the microbial populations versus time in both brines and olive surface were assessed by estimating the area under the corresponding growth/decline curves. Areas were calculated by integration using OriginPro 7.5 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA). This parameter has proven to be a good indicator of the overall microbial growth due to its relationship with the biological growth parameters maximum specific growth rate,

Table 1

Main 'in vitro' phenotypic characteristics related to the probiotic potential of the *Lactobacillus pentosus* strains isolated from table olives and used in the present work to inoculate fermenters.

Strain	Survival to gastric and pancreatic digestions (%)	Auto-aggregation (%)	Hydrophobicity (%)
* <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	0.001	39.1	0.2
LAB2	0.003	53.3	5.2
LAB3	0.008	76.5	8.5
LAB4	0.004	58.1	25.7
LAB5	0.007	27.0	1.3

*Note: *L. rhamnosus* GG was used as reference strain because of its well known probiotic characteristics.

lag phase and maximum population level (Bautista-Gallego et al., 2008; Arroyo-López et al., 2009).

2.3. Molecular identification and characterization of the microbial populations

For identification of the yeast biodiversity present on the olive surface at the end of fermentation, ten isolates were picked randomly for each treatment from the suspension obtained after detachment of biofilms. Identification was based on the RFLP analysis of the 5.8S-ITS region with endonucleases *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the protocol described by Esteve-Zarzoso et al. (1999). The obtained banding profiles (a total of fifty) were compared for homology in the Yeast-id database (<https://yeast-id.com>, University of Valencia and IATA-CSIC, Spain).

For characterization of the lactobacilli strains, a RAPD-PCR analysis with primer OPL₅ was followed according to the protocol described by Rossi et al. (1998). This methodology was used to assess the percentage of similarity of the LAB population at the end of fermentation with the inoculated strains. As in the previous case, ten LAB isolates (named from A to J) were randomly picked from the suspension obtained after detachment of biofilms and their banding profiles (from 100 up to 4000 bp) compared with the inoculated strain for each treatment. For this purpose, PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel and visualized under ultraviolet light by staining with ethidium bromide. The resulting fingerprints were digitally captured and analysed with the BioNumerics 6.6 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The similarity among digitalized profiles was calculated using the Pearson product–moment correlation coefficient. The dendrogram was generated by means of the Unweighted Pair Group Method using the Arithmetic Average (UPGMA) clustering algorithm. All LAB isolates obtained at the end of fermentation, a total of fifty, were also identified by multiplex PCR of *recA* gene with species-specific primers for *L. pentosus*, *L. plantarum* and *L. paraplantarum* (Torriani et al., 2001a) to corroborate that they also belonged to the inoculated *L. pentosus* species.

2.4. Scanning electron microscopy

For “*in situ*” observations of the microbiota adhered to olive epidermis, the method developed by Kubota et al. (2008) was

followed. Olives were taken from each fermenter at the end of fermentation and washed twice for 1 h with a 100 mM phosphate buffer (pH 7.0). Then, the fruits were placed for 2 h in the same phosphate buffer with 5% glutaraldehyde and then washed several times. Slices (0.5 cm²) of the olive epidermis were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (50, 70, 80, 90, 95 and 100%) and fixed onto glass slides. Finally, samples were sputtered with gold using a Scancoat Six SEM sputter coater equipment (Edwards, Gat, Israel) for 180 s and observed with a scanning electron microscopy model JSM-6460LV (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

3. Results

In this work, the in-depth formation of mixed-species biofilms on the olive epidermis of Manzanilla fruits processed according to the Spanish style was examined. To prove that the formation of these biofilms was a generalized process, we adopted the strategy to carry out five different and independent fermentation processes inoculated with four *L. pentosus* strains (all of them isolated from diverse table olive processing), while the other fermentation was left to ferment spontaneously. The formation of biofilms on fruits is an important finding, because olives could be the vehicle of entry of probiotic microorganisms to the human body. Below, the main results obtained from the microbial, molecular and SEM analyses independently performed for each treatment are shown, identifying and characterizing the microbial populations on the olives at the end of fermentation when fruits are ready for consumption.

3.1. Evolution of the microbial populations in both fermentation brines and olive surface

Fig. 1 shows the changes in the LAB and yeast populations in the cover brines of the five treatments. LAB population showed a lag phase of approximately 5 days in the spontaneous and non-inoculated fermentation. After this period, LAB began to actively grow. However, in the inoculated fermenters, the inocula showed a first phase of inactivation (more evident in the case of F3 with a reduction of 3 decimal logarithm), followed by a vigorous phase of growth after this adaptation period. In any case, the maximum population level reached ($\sim 8.5 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$) was noticed at the same time (around day 10 of fermentation) for all fermenters. Then, the population slightly decreased, but a level above 6

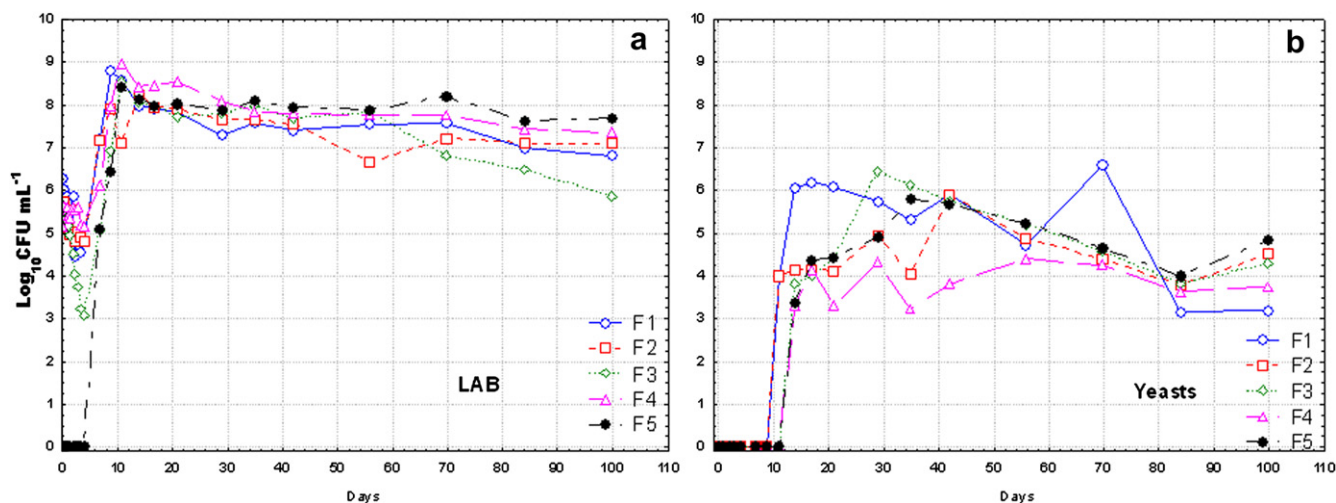


Fig. 1. Lactic acid bacteria (a) and yeast (b) counts in the cover brine of the different treatments analysed in the present study. Values are the average of duplicate measurements. Measurement errors were intentionally omitted to favour readability of the graphs but they were always below 10%.

\log_{10} CFU mL⁻¹ was always noticed even after three months of fermentation (Fig. 1a). In the case of yeasts, the growth in brine was more variable with marked serrated peaks (Fig. 1b). A lag phase of approximately 10 days was found in all treatments, and the maximum population level reached was lower than LAB (around 6 \log_{10} CFU mL⁻¹, except for F4 which was even lower with ~ 4 \log_{10} CFU mL⁻¹). These maximum population levels were kept constant between approximately the 15th and the 40th day of fermentation, with a slight trend to decrease later. These data clearly show that yeast growth in the fermentation brines was less vigorous than LAB. Finally, Enterobacteriaceae growth was not significant in the present study, and only at the beginning of fermentation low population levels (<3 \log_{10} CFU mL⁻¹) were detected in the cover brines, which rapidly disappeared at the end of the second week of fermentation because of the low pH obtained (data not shown).

Fig. 2 shows the evolution of the LAB and yeast populations *versus* time on the olive epidermis for the five assayed treatments. Olive surfaces were completely absent of microorganisms at the beginning of fermentation for both LAB (Fig. 2a) and yeasts (Fig. 2b). However, at day 10 of fermentation, a considerable number of microbial cells had already colonized the olive epidermis, reaching their maximum population levels at day 20 of fermentation with approximately 9 \log_{10} CFU per olive for LAB, and 8 \log_{10} CFU per olive for yeasts. Even after 3 months of fermentation, a high number of microorganisms could still be recovered from the olive skin. From Fig. 2a and b, it can be clearly deduced that LAB and yeast growth on the olive surface was much more homogeneous (similar population levels and growth evolution) compared to the fermentation brines. This was possible because of the fact that yeasts grew much better on the olive skin than in the cover brines. No Enterobacteriaceae were recovered from the olive epidermis.

Unfortunately, it was not possible to fit any primary model to the microbial growth in brine or adhered to the olive surface data. For this reason, the study of the evolution of LAB and yeast populations in both brines and olive epidermis was analysed by means of the area obtained under their respective counts *versus* time curves as a valuable parameter to compare among microorganism populations. Fig. 3a shows how, overall, LAB growth in the cover brines was statistically more vigorous (higher areas, mean value of 870) than yeasts (499) and Enterobacteriaceae (45), but on the contrary, the area values obtained for the olive surface for both LAB and yeasts were rather similar and not statistically different (801 vs. 741,

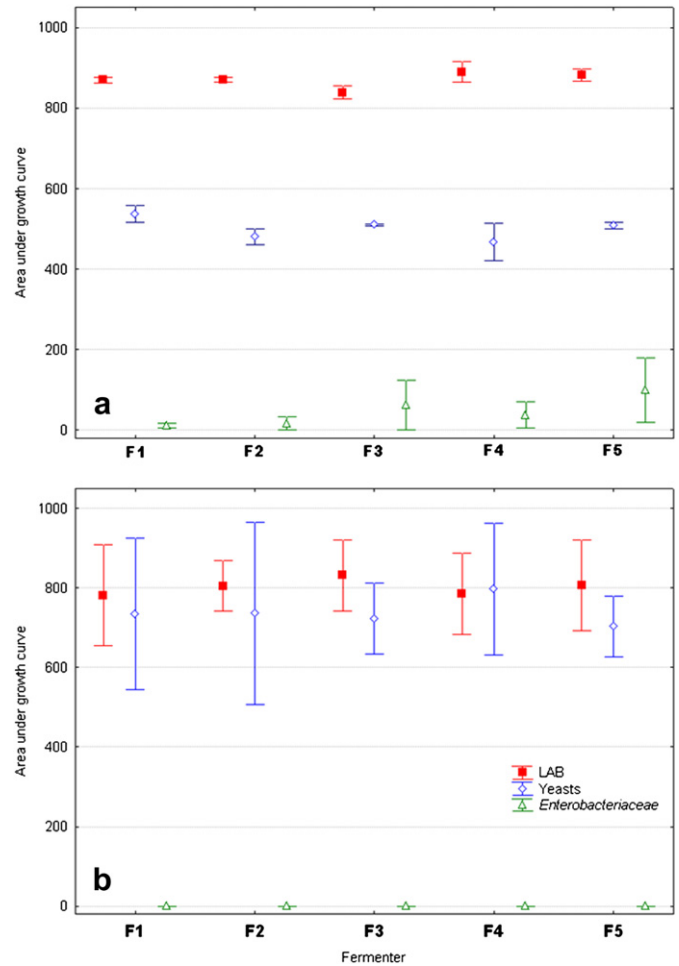


Fig. 3. Areas under microbial growth/curves for lactic acid bacteria (LAB), yeasts and Enterobacteriaceae in the cover brines (a) and olive epidermis (b) of the different treatments analysed in the present study.

respectively) (Fig. 3b). These data confirm the results previously shown in Figs. 1 and 2. Finally, no significant differences were found among fermenters for any LAB and yeasts in the cover brines or olive epidermis.

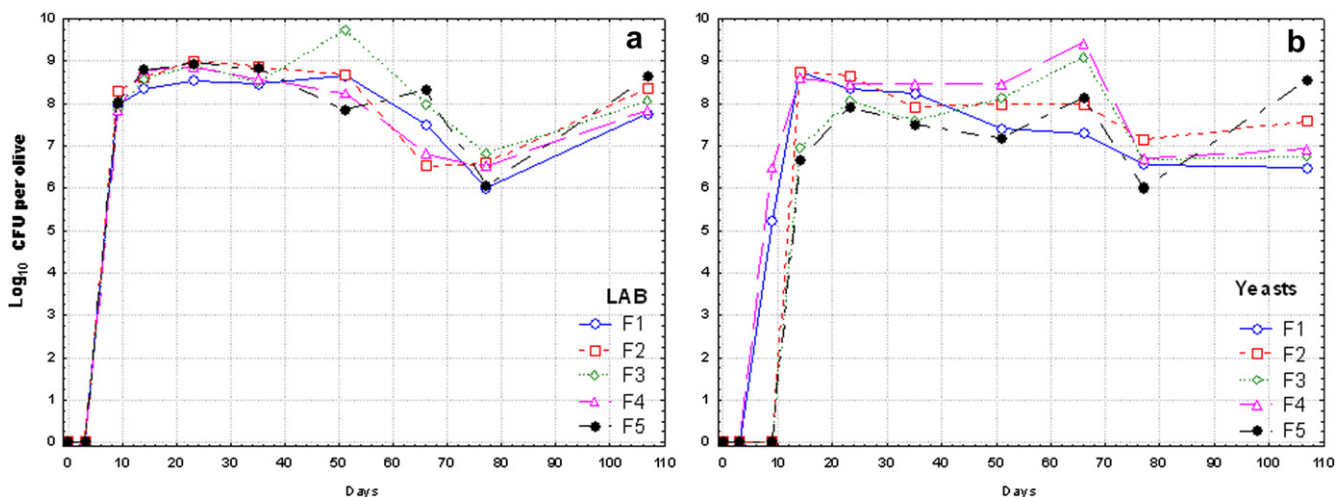


Fig. 2. Lactic acid bacteria (a) and yeast (b) counts in the olive epidermis of the different treatments analysed in the present study. Values are the average of duplicate measurements. Measurement errors were intentionally omitted to favour readability of the graphs, but they were always below 10%.

3.2. Identification and characterization of microorganisms adhered to the olive surface

As shown above, the olive epidermis was mainly colonized by LAB and yeasts. But it is also interesting to know which yeast species are present on olive epidermis as well as the percentage of similarity of the LAB population with respect to the inoculated strains, which give us an idea of the imposition of the selected microorganisms over the native LAB microbiota at the end of fermentation. This task was accomplished by a molecular approach, using RFLP analysis of the 5.8S-ITS region for yeast identification and RAPD-PCR analysis with primer OPL₅ for LAB characterization.

In a first step, it was confirmed that all the LAB isolates belonged to the same inoculated species, *L. pentosus*. This task was achieved using specific primers for *L. pentosus*, *L. plantarum* and *L. paraplantarum* (data not shown). Then, a dendrogram was generated using the patterns of the fifty LAB isolates randomly obtained from olive epidermis plus the four inoculated strains (Fig. 4). The cluster analysis shows that the isolates obtained from the F3 fermenter formed a group clearly differentiated from the rest of the lactobacilli, sharing only 64% similarity in their banding profile with the isolates obtained from the rest of treatments (except for F4-E strain where the coefficient of correlation was 78%). Within this separated cluster, the strain used to inoculate the F3 fermenter, LAB4, was also included. Eight isolates of this cluster and the inoculum were quite similar among themselves, with a coefficient of correlation above 87%. Isolates of the spontaneous treatment (F5) formed another cluster clearly differentiated from F1, F2, and F4 isolates using 78% as coefficient of the correlation (except for F1-E, F1-F and F1-D where the coefficient of correlation was 88%). The dendrogram also shows that F5 isolates were quite similar among themselves, with a coefficient of similarity above 93%. LAB5 and practically all the isolates obtained from the fermenter where this strain was inoculated (F4), formed a separate cluster using 85% as the coefficient of correlation. All these strains shared an 89% coefficient of similarity. Finally, LAB2 together with the majority of isolates obtained from the F1 and F2 fermenters, formed another separate cluster sharing a 90% coefficient of similarity among themselves.

Regarding the yeast species isolated from olive biofilms, a relatively low biodiversity was noticed with only three different species found. Their PCR products ranged from 390 (*Geotrichum candidum*) to 480 bp (*Candida sorbosa*) (Table 2). *G. candidum* was isolated at high frequencies in four of the five fermenters (F1, F2, F3 and F4), *Pichia galeiformis* in three of five (F1, F2 and F3) while *C. sorbosa* was only isolated in two of five (F2 and F5). Table 2 shows the frequencies obtained for each yeast species in each fermenter and their restriction banding profiles. *G. candidum* was the most frequent species found in F1, F3 and F4 treatments (always above 70%), while *C. sorbosa* was in F2 (50%) and especially in F5 (100%).

3.3. In situ observations of the olive epidermis

Slices (0.5 cm²) of olive epidermis from all fermenters were analysed to prove the *in situ* presence of the mixed-species biofilms between yeasts and LAB at the end of fermentation. Previously, fruits were washed to remove non-adhering cells and then observed by SEM. As can be seen in Fig. 5 as an example, a considerable amount of LAB and yeasts were strongly adhered to the olive surface in the spontaneous fermenter F5. This micrograph shows that the microorganisms were strongly embedded in an exopolysaccharide matrix, with some cells leaving the biofilm. Similar pictures were also taken for the rest of fermenters, which confirm the high values obtained from the plate count of the olive surface.

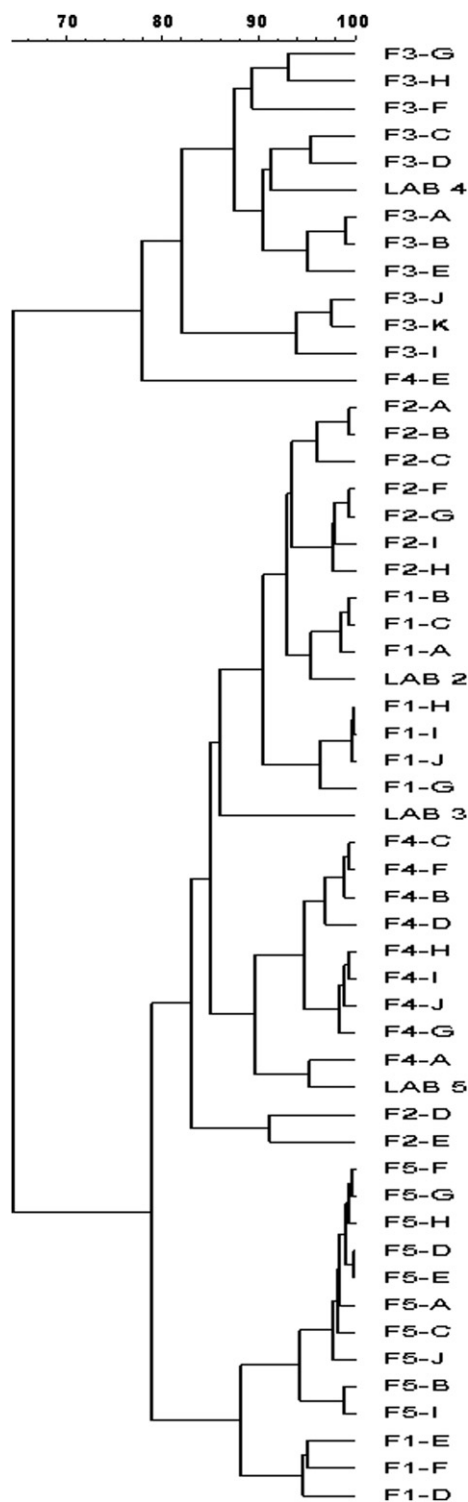


Fig. 4. Dendrogram generated after cluster analysis of the digitalized PCR fingerprints with primer OPL₅. Reference for treatments is from F1 to F5, while A–J is the reference for the isolate obtained within each fermenter. LAB2, LAB3, LAB4 and LAB5 are the potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains used to inoculate F1, F2, F3 and F4, respectively.

4. Discussion

In the early 1970s, researchers had already mentioned that microorganisms might attach to foods and food contact surfaces (for a complete review see Hood and Zottola, 1995). In the specific

Table 2

Yeast species and frequencies of their presence at the end of fermentation on the olive skin in the different treatments assayed in the present work.

Fermenter	Species	PRC product (bp)	Banding profiles for the restriction enzymes (bp)			
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>	% Frequency ^a
F1	<i>Geotrichum candidum</i>	390	390	390	200 + 110 + 80	70%
	<i>Pichia galeiformis</i>	450	250 + 110 + 90	310 + 90 + 70	250 + 200	30%
F2	<i>Candida sorbosa</i>	480	250 + 110 + 90	310 + 100 + 70	210 + 100 + 70	50%
	<i>Geotrichum candidum</i>	390	390	390	200 + 110 + 80	40%
F3	<i>Pichia galeiformis</i>	450	250 + 110 + 90	310 + 90 + 70	250 + 200	10%
	<i>Geotrichum candidum</i>	390	390	390	200 + 110 + 80	70%
F4	<i>Pichia galeiformis</i>	450	250 + 110 + 90	310 + 90 + 70	250 + 200	30%
	<i>Geotrichum candidum</i>	390	390	390	200 + 110 + 80	100%
F5	<i>Candida sorbosa</i>	480	250 + 110 + 90	310 + 100 + 70	210 + 100 + 70	100%

^a Frequencies in each treatment were determined by comparing the RFLP analysis of the 5.8 ITS region of 10 yeast isolates taken randomly from the olive surface.

case of table olives, the presence of indigenous bacteria and yeasts colonizing the olive skin was mentioned for the first time by Nychas et al. (2002) in fermented black olives. These authors used SEM analysis to show that yeasts tended to predominate on the skin surface and in the stomal opening, whereas bacteria predominated in the intercellular spaces of the sub-stomal cells. In this work, we also prove that both groups of microorganisms easily colonize (before the second week of fermentation) the olive epidermis of Manzanilla fruits processed according to the Spanish style, which is the main type of table olive elaboration. Both groups of microorganisms reached high population levels in the skin of the fruits (above 8 log₁₀ CFU per olive). However, these counts could be even underestimated because when cells are removed from a surface, some clumps may not be dispersed. The study of Lavermicocca et al. (2005) also shows that olive surface could be colonized by exogenous microflora not isolated originally from table olive fermentations. These authors added high inoculum levels of different probiotic strains to several table olive elaborations, obtaining high counts from the olive surface, especially for *L. paracasei* IMPC2.1, a human-origin isolate.

In the present survey, a mixed-species biofilm between yeasts and LAB were found in five different treatments independently performed, including both inoculated and spontaneous fermentations. This is indicative that biofilm formation in table olive processing may be a generalized process, at least for the *L. pentosus* species. Mixed-species biofilm formation between LAB and yeasts has been described by several authors. Kawari et al. (2007) mentioned the production of an active substance (between 3 and 5 kDa) which favoured the formation of protrusions on the yeast

surface facilitating adhesion between *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* and *Saccharomyces cerevisiae* Kyokay-10. Furukawa et al. (2010) also mentioned the formation of mixed biofilms between *L. plantarum* ML11-11 and *S. cerevisiae* Y11-43, but in this case a direct cell–cell contact was suggested.

We have molecularly identified the yeast population present in olive biofilms, which was mainly formed by the species *G. candidum*, *P. galeiformis* and *C. sorbosa*. These species have already been previously isolated from diverse table olive processing by Arroyo-López et al. (2006) and Rodríguez-Gómez et al. (2010). On the contrary, the only LAB species isolated from biofilm in this survey was *L. pentosus*. The molecular characterization by RAPD-PCR of the LAB isolates obtained from the biofilms showed that in many cases the majority strain at the end of fermentation on the olive epidermis was the strain initially inoculated in the cover brine, which is indicative that certain lactobacilli strains have a good predisposition to colonize olive epidermis and to predominate during fermentation. This is an important aspect because only well adapted and competitive strains should be considered in the case of starter culture development, particularly if the product is intended for probiotic purposes. Torriani et al. (2001b) used RAPD-PCR to differentiate among different *L. pentosus*, *L. plantarum* and *L. paraplantarum* strains, found a high reproducibility of this technique (92%).

In F3 and F4 fermenters, the banding profiles of the LAB isolates showed a high similarity with the inoculated strains for these treatments (LAB4 and LAB5, respectively). However, in F1 and F2 treatments, the molecular characterization shows that lactobacilli isolates obtained from these fermenters shared a high similarity in their banding profiles only with the inoculated strain LAB2, thus indicating that LAB3 was probably displaced from the F2 fermenter. Our results contrast with those obtained by De Bellis et al. (2010), who showed a considerable genetic biodiversity among LAB species that colonized Bella di Cerignola olive surface, although *L. pentosus* was also the most frequently found Italian native species showing a high intra-diversity throughout fermentation.

The *in situ* observation of biofilms showed that cells were embedded in an exopolysaccharide matrix, which could help microorganisms to survive for long time periods or to resist the environmental stresses that usually govern table olive fermentations (low pH, high salt concentration and presence of phenolic compounds). This concept was already proposed by Hood and Zottola (1995), who mentioned that adherent microorganisms included in food biofilms may be more resistant to sanitizers than free-living cells. Years later, Kubota et al. (2008) proved that *L. plantarum* JCM1149 cell biofilms were more resistant to environmental stresses than the planktonic cells. Moreover, another reason for microorganisms to colonize the olive epidermis could be because the fruits are the source of substrates (vitamins, amino-acids, sugars, etc.) that microorganisms need to grow, so the

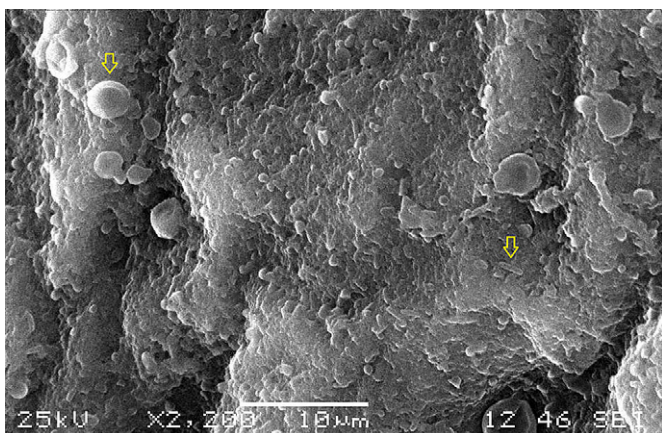


Fig. 5. Yeasts and bacteria (marked with arrows) adhering to the olive surface in the spontaneous treatment F5. Picture was taken by scanning electronic microscopy and show at the bottom, from left to right, the used voltage, the scale, the distance in mm from microscopy to the sample and the spot size.

colonization of olive skin by certain strains could mean an adaptive advantage over other non-forming biofilm strains. This way, Hood and Zottola (1995) mentioned the role of nutrient limitation in biofilm formation.

5. Conclusions

In summary, the results obtained in this work show that fermented olive epidermis should be studied further because of the high number of microorganisms isolated and because they can form complex mixed biofilms on the surface of the fruits. This represents an important finding because if probiotic strains had this capacity, olives could be the vehicle for the entry of autochthonous table olive microorganisms into the human body. However, further research must be carried out to elucidate the physiological and genetic reasons for biofilm formation by native or inoculated olive microflora.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the EU's Seventh Framework Programme ([FP7/2007–2013]) under grant agreement n° 243471 (PROBIOLIVES). We also thank the Spanish Government for financial support (projects AGL2006-03540/ALI, AGL2009-07436/ALI, and AGL2010-15529/ALI partially financed by European regional development funds, ERDF), and the Junta de Andalucía (through financial support to group AGR-125). Thanks to JOLCA and ASEMESA for supplying the fruits and their own experience for the development of this work. J. Bautista-Gallego, J. Domínguez and F.N. Arroyo-López would also like to thank for their JAE-PRE fellowship and Ramón y Cajal postdoctoral research contract, respectively.

References

- Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J., 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 344–349.
- Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2006. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791–796.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Barrio, E., 2009. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 663–669.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2008. Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Journal of Food Protection* 71, 1412–1421.
- Beer, D., Stoodley, P., 2006. Microbial biofilms. *Prokaryotes* 1, 904–937.
- Böckelmann, U., Szewzyk, U., Grohmann, E., 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 55, 201–211.
- Costerton, J.W., 2009. *The Biofilm Primer*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 847–867.
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lisa Linigro, S., Lavermicocca, P., 2010. Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *International Journal of Food Microbiology* 140, 6–13.
- Esteve-Zaroso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S. rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329–337.
- Fernández Díez, M.J., Castro y Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., González Pellisó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M.L., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M.C., Sánchez Roldán, F., García García, P., Castro Gómez-Millán, A., 1985. *Biocología de la Aceituna de Mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Gráficas Urpe, Madrid, Spain.
- Furukawa, S., Yoshida, K., Ogihara, H., Yamasaki, M., Morinaga, Y., 2010. Mixed-species biofilm formation by direct cell–cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74, 2316–2319.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M., 1997. *Table Olives. Production and Processing*. Chapman & Hall, London, UK.
- Hood, S.K., Zottola, E.A., 1995. Biofilms in food processing. *Food Control* 6, 9–18.
- IOOC (International Olive Oil Council), 2010. Key Figures on the World Market for Table Olives. Data adopted at the 98th session of the IOOC (Madrid, Spain), 22–26 November.
- Kawari, T., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2007. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied Environmental and Microbiology* 73, 4673–4676.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 381–386.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lisa Lonigro, S., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M.L., Rizzello, C.G., Visconti, A., 2005. Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied Environmental and Microbiology* 71, 4233–4240.
- Nobile, C.J., Mitchell, A.P., 2007. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Current Biology* 17, R349–R353.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173–177.
- Querol, A., Fleet, G., 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Rantsiou, K., Drosinos, E., Gialitaki, M., Metaxopoulos, I., Comi, G., Cocolin, L., 2006. Use of molecular tools to characterize *Lactobacillus* spp. isolated from Greek traditional fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 112, 215–222.
- Remis, J.P., Costerton, J.W., Auer, M., 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell–cell interactions. *The ISME Journal* 4, 1085–1087.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2010. Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology* 27, 604–612.
- Rossi, F., Torriani, S., Dellaglio, F., 1998. Identification and clustering of dairy propionibacteria by RAPD-PCR and CGE-REA methods. *Journal of Applied Microbiology* 85, 956–964.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2001a. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3450–3454.
- Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoster, B., Dellaglio, F., Kerster, K., 2001b. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 554–560.
- Urso, R., Comi, G., Cocolin, L., 2006. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic Applied Microbiology* 29, 671–680.
- Wimpenny, J., 2009. Microbial metropolis. *Advances in Microbial Physiology* 56, 29–84.



Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria

Jesús Domínguez-Manzano, Rufino Jiménez-Díaz*

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Padre García Tejero, 4, Apartado de Correos 1078, 41012 Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2012

Received in revised form

5 September 2012

Accepted 11 September 2012

Keywords:

Lactic acid bacteria

Bacteriocins

Co-culture

Inhibition

ABSTRACT

In the present work, the effect of co-culture on bacteriocin production by selected lactic acid bacteria (LAB) was studied. Thus, the co-culture of two bacteriocin-producer strains, *Lactobacillus plantarum* NC8C and *Enterococcus faecium* 6T1a, resulted in a significant reduction or even suppression of bacteriocin production by both strains. The phenomenon was not restricted to these two strains since we have further proved that it was more general and also occurred in several other co-cultures with LAB isolated from different food fermentations. This decrease in bacteriocin production was confirmed to be non cell–cell contact-dependent by using a two-compartment system in which the microorganisms were separated by a 0.2- μm -pore-size membrane. In addition, cell-free supernatants from certain co-cultures were able to suppress bacteriocin production in other strain cultures. In light of these findings, we hypothesize that such interactions between microorganisms should be taken into account to improve the development of bacteriocin-producing starter cultures used in food fermentations in order to avoid a negative effect on the quality of the fermented product.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are ubiquitous microorganisms frequently associated with fermented foods and beverages including dairy products, sausages, and vegetables (Giraffa, Chanishvili, & Widyastuti, 2010; Hugas & Monfort, 1997). Many of these processes are based on traditional methods that use non-sterilized raw materials which cause spontaneous fermentations due to different populations of microorganisms. In the case of vegetables, and particularly in olive fermentations, a heterogeneous LAB population coexists in high density with a diverse yeast population throughout the fermentation process (Arroyo-López, Querol, Bautista-Gallego, & Garrido-Fernández, 2008). Although many foods are still fermented naturally, selected autochthonous LAB are often used as specific starter cultures. In addition to their contribution to the development of the specific properties of the final product, LAB starter cultures prevent food spoilage and prolong the shelf life of foods through the production of a wide range of antimicrobial substances. Among these, bacteriocins have been shown to be very useful for allowing the producing strain to control the fermentative process

(Ruíz-Barba, Cathcart, Warner, & Jiménez-Díaz, 1994; Ruiz-Barba & Jiménez-Díaz, 2012).

Bacteriocins are peptides or proteins with antimicrobial activity mainly directed against related species. Recently, a number of bacteriocins from LAB have been biochemically and genetically characterized (Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012). Most of the bacteriocins described in *Lactobacillus* to date are constitutively produced and only a few are regulated (Diep, Straume, Kjos, Torres, & Nes, 2009; Rojo-Bezares et al., 2007). Among these, plantaricin NC8 (PLNC8), a quorum sensing-regulated class IIb bacteriocin, is particularly relevant because it was produced by *Lactobacillus plantarum* NC8 only after co-cultivation with specific Gram-positive strains (Maldonado, Ruiz-Barba, & Jiménez-Díaz, 2004). A similar phenomenon has been recently described for *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Tabasco, García-Cayuela, Peláez, & Requena, 2009). In addition to PLNC8, the strain NC8 produced two other regulated class IIb bacteriocins, named plantaricins EF (PLEF) and JK (PLJK) (Maldonado et al., 2004). Along with the induced bacteriocins, an autoinducer peptide (PLNC8IF) was produced upon co-culture of the NC8 strain. More recently, it has been shown that the growth and survival of *L. plantarum* NC8 in olive fermentations was greatly enhanced when it was co-inoculated with bacteriocin-production inducing bacteria possibly due to a stimulus involving the enhancement of bacteriocin production, among other responses (Ruíz-Barba, Caballero-Guerrero, Maldonado-Barragán, & Jiménez-Díaz, 2010). These findings led to the postulate that bacteriocin

* Corresponding author. Tel.: +34 00 954692516; fax: +34 00 954691262.
E-mail address: rjimenez@cica.es (R. Jiménez-Díaz).

producing and bacteriocin-inducing strains could be associated in mixed starter cultures for food fermentation.

Since microorganisms grow in poly-microbial communities in nature, it is possible that interactions between community members influence their behaviour (Paramithiotis, Gioulatos, Tsakalidou, & Kalantzopoulos, 2006; Sieuwerts et al., 2010; Smith, Fratamico, & Novak, 2004). Such interactions could involve inter-species signalling due to diffusible molecules (di Cagno et al., 2007, 2010). Recently, a number of papers dealing with such interactions between LAB and yeast in food fermentations have been published (Kawarai, Furukawa, Ogihara, & Yamasaki, 2007; Tada, Katakura, Ninomiya, & Shioya, 2007). Most of those interactions had beneficial effects on the implicated strains (increased production levels of proteins related to stress responses, facilitated biofilm formation, etc...) and consequently, for the fermentation process. However, in some cases these interactions may produce undesirable side effects and thus negatively influence the fermentation process (Giraffa et al., 2010; Savard, Beaulieu, Gardner, & Champagne, 2002; Smith et al., 2004). In the present study we show that the co-culture of two bacteriocin-producer strains, *L. plantarum* NC8C and *Enterococcus faecium* 6T1a, results in a significant reduction or suppression of bacteriocin production. We further show that this phenomenon is not restricted to these two strains and that it also occurs in several other co-cultures with selected LAB isolated from different food fermentations. We propose that if bacteriocin-producing starter cultures are going to be used in food fermentations, such interactions should be previously checked in order to avoid failure from the starter, which could negatively affect the quality of the final product.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and media

L. plantarum NC8C is an *L. plantarum* NC8-derivative strain carrying the plasmid pSIG308, which confers to the former constitutive production of the plantaricins PLNC8, PLEF, and PLJK, together with the autoinducer peptide PLNC8IF (Maldonado et al., 2004). *E. faecium* 6T1a is a constitutively enterocins L50A- and L50B-producer and *E. faecium* 6T1a-20 is its non-bacteriocin-producing, bacteriocin sensitive derivative (Floriano, Ruiz-Barba, & Jiménez-Díaz, 1998). 159 additional LAB strains belonging to our collection were used, most of them previously isolated from different food fermentations, mainly vegetable fermentations. Among them, the plantaricin S producer strains *Lactobacillus pentosus* LPCO10 or LPP3 (Jiménez-Díaz, Ríos-Sánchez, Desmazeaud, Ruiz-Barba, & Piard, 1993), *L. pentosus* LPS2005 (produces an unknown bacteriocin, unpublished results), and *L. plantarum* strains Lb5p, Lb5q, 57/1, 57/2, and 44/1 (PLEF and PLJK producers, unpublished results). The bacterial strains shown in Table 1 were used as indicator organisms in bacteriocin assays. All LAB strains were maintained as frozen stock at -20°C in distilled water plus 20% (vol/vol) glycerol and propagate in MRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) at 30°C before use.

2.2. Bacteriocin assays

To test bacteriocin activity in co-cultures, overnight cultures of each strain in MRS broth (Oxoid) were inoculated in fresh MRS broth at ca. 10^7 CFU/ml. After incubation at 30°C for 6 h or 24 h, the cultures were centrifuged ($15,000 \times g$, 5 min, 4°C), and then the supernatants were filter sterilized through a 0.22- μm -pore-size Millex-GV filter (Millipore Iberica, Madrid, Spain). Cell free supernatants (CFS) were assayed for bacteriocin activity by the agar drop diffusion test, using *L. pentosus* 128/2 as an indicator strain

Table 1

Differential sensitivity of indicator strains to bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* NC8C and *Enterococcus faecium* 6T1a.

Indicator strain	<i>Lactobacillus plantarum</i> NC8C		<i>Enterococcus faecium</i> 6T1a
	Plantaricin NC8	Plantaricins EF and JK	Enterocins L50A and L50B
<i>Lactobacillus pentosus</i> 128/2	+	+	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB63	–	+	+
<i>Lactobacillus pentosus</i> 55/1	+	+	–
<i>Lactobacillus plantarum</i> VI1	–	–	+

Ten microlitres of MRS-broth cell-free culture supernatants from *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a were spotted on lawns of the indicator strains in MRS agar plates. The plates were incubated overnight at 30°C and then examined for inhibition halos. +, presence and –, absence of inhibition halos.

(Jiménez-Díaz et al., 1993). After incubation at 30°C , the plates were examined for clear inhibition halos with regular edges. As controls, monocultures of each strain were assayed for bacteriocin production as described above.

To specifically quantify the different bacteriocins produced by *L. plantarum* NC8C and *E. faecium* 6T1a in co-culture, a set of four indicator strains were selected from our strain collection on the basis of their ability to detect one bacteriocin or the other (Table 1). Bacteriocin activity was quantified in a microtiter plate assay system and the activity was expressed as bacteriocin units per ml (BU/ml) as described previously (Jiménez-Díaz et al., 1995). One BU was arbitrarily defined as the amount of bacteriocin that inhibited the growth of the indicator strain by 50% (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

2.3. Partial characterization of the inhibition of bacteriocin production in co-cultures

To investigate whether cell–cell contact was necessary for the inhibition of bacteriocin production, a co-culture method was used consisting of a two-compartment system in which each well of a 96-well polystyrene plate was separated into two compartments of 0.2- μm -pore-size Anopore membranes (Nunc tissue culture inserts, eight-well strip; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) (Yoshida, Ansai, Takehara, & Kuramitsu, 2005). The NC8C strain was inoculated into the upper compartment and *E. faecium* 6T1a was added into the lower compartment, and vice versa, both strains being at a final concentration of ca. 10^7 CFU/ml. After incubation for 6 h at 30°C , samples of both compartments were diluted in saline and spread onto MRS agar for the enumeration of each strain. The rest of the culture media in both compartments were then mixed and centrifuged at $15,000 \times g$ for 5 min at 4°C , and the CFS were tested for bacteriocin activity using the set of indicator strains as mentioned above. In control assays, the NC8C and the 6T1a strains were individually inoculated either in the upper or the lower compartment at identical CFU/ml just as for the co-cultures. Each assay was repeated eight times in separate experiments, at least in triplicate.

The ability of CFS from *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a co-cultures to inhibit bacteriocin production by *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a monocultures was assayed. One hundred microlitres of CFS from each strain were added to fresh MRS broth (900 μl) containing ca. 10^7 CFU/ml from an overnight culture of *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a and incubated at 30°C for 6 h. Samples were taken, diluted in saline and spread onto MRS to count cells. Bacteriocin activity in the CFS was assayed using the agar drop diffusion test as described above. CFS from the co-cultures of

L. plantarum NC8C or *E. faecium* 6T1a in combination with those LAB from the 159 tested which showed inhibition of bacteriocin production were also assayed.

Heat-treated LAB cultures were tested for their ability to inhibit bacteriocin production by *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a monocultures. For this purpose, overnight broth cultures of each 159 LAB were incubated at 65 °C for 1 h, centrifuged, and the pellets were suspended in the same, fresh MRS initial volume. Then, 100 µl of the various heat-treated cultures were added to fresh MRS broth containing ca. 10⁷ CFU/ml of an overnight culture of *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a. The mixtures were incubated at 30 °C for 6 h and the bacteriocin activity was assayed as described above.

2.4. Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gels (SDS-PAGE)

Detection of the antimicrobial activity by *L. plantarum* NC8C and by *E. faecium* 6T1a in CFS from 6 h-MRS monocultures and co-cultures was achieved by SDS-PAGE using 18.5% acrylamide gels (Bhunja & Ray, 1987; Jiménez-Díaz et al., 1993). Briefly, three gels were run in parallel and after electrophoresis they were fixed in a solution of 20% isopropanol and 10% acetic acid for 2 h and washed in deionized water for 6 h. The gels were placed in a sterile petri dish and overlaid with 5 ml of MRS soft agar (MRS broth plus 0.8% agar) containing about 10⁵ cells of the indicator bacteria. The plate was incubated at 30 °C for 18 h and examined for a zone of inhibition. Three different indicator strains, *L. pentosus* 55/1, *L. plantarum* V11 as specific bacteriocin-sensitive strains (Table 1), and *L. pentosus* 128/2 as a universal bacteriocin-sensitive strain were used.

2.5. Bacteriocin activity in pH 5.0-regulated *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a co-cultures

We further studied bacteriocin production in *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a co-cultures at a pH regulated at 5.0. A 2-liter Biostat MD fermentor (B. Braun-Biotech, Melsungen, Germany) containing 1 L of MRS broth was used, the initial pH was adjusted to 5.0 and this value was maintained during the fermentation by adding 2 M sodium hydroxide. The temperature was held at 30 °C and agitation was set at 40 rpm. In co-culture experiments, the NC8C and 6T1a strains were each inoculated at ca. 10⁷ CFU/ml and samples were taken at 2-h intervals, diluted in saline, and spread onto MRS agar for the determination of CFU/ml. Colonies from *L. plantarum* NC8C and *E. faecium* 6T1a growing in MRS agar are morphologically different and one strain can be easily distinguished from the other. For the quantification of bacteriocin production, the indicator strains *L. pentosus* 55/1 and *L. plantarum* V11 were used. As controls, monocultures of both strains were created under the same conditions.

3. Results and discussion

3.1. Co-culture of *L. plantarum* NC8C with *E. faecium* 6T1a results in a significant reduction in bacteriocin production by both strains

In this work we show that the co-culture of the bacteriocin-producer *L. plantarum* NC8C, a derivative from the quorum sensing-regulated bacteriocin producer *L. plantarum* NC8 (Maldonado et al., 2004) with *E. faecium* 6T1a, an enterocin-producer, results in a significant reduction in bacteriocin production by both strains. When the bacteriocin activity in co-cultures was assayed by the agar drop diffusion test, it could be observed that the diameters of the inhibition halos were smaller in co-cultures than in single strain cultures, thus indicating a reduction in bacteriocin production in co-cultures as compared to their monoculture counterparts (Fig. 1). This decrease in bacteriocin activity was not attributed to a significant

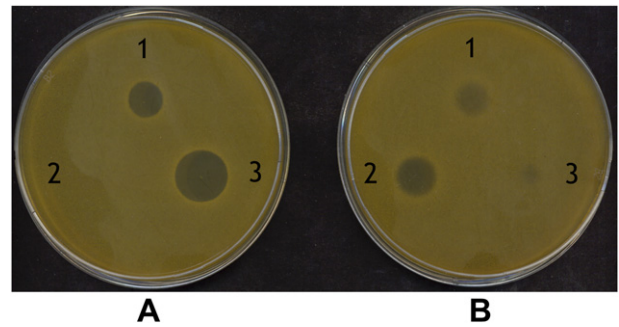


Fig. 1. Bacteriocin activity of CFS from *L. plantarum* NC8C and *E. faecium* 6T1a against *L. plantarum* V11 (A), or against *L. pentosus* 55/1 (B), generated in a two-compartment system (see text). In 1, bacteriocin activity of co-cultures by NC8C and 6T1a; in 2, bacteriocin activity of NC8C single cultures; and in 3, bacteriocin activity of 6T1a single cultures.

reduction in the number of viable bacteria in co-cultures as very similar CFU/ml levels were obtained for each strain either in co-culture or in single cultures (see supplementary material). The quantitative bacteriocin assay revealed a decrease in bacteriocin activity from 5420 BU/ml in single cultures to 720 BU/ml in the corresponding co-culture in the case of *E. faecium* 6T1a. For *L. plantarum* NC8C, bacteriocin activity was reduced from 160 BU/ml in a single culture to 0 BU/ml in co-cultures.

It has been previously shown that *E. faecium* 6T1a-20, a non-bacteriocin-producer *E. faecium* 6T1a derivative (Floriano et al., 1998), enhances the production of bacteriocins by *L. plantarum* NC8 in co-cultures (Maldonado et al., 2004). Therefore, it could be deduced that *E. faecium* 6T1a also enhanced bacteriocin production by *L. plantarum* NC8C. In that case, the phenomenon of interference in the production of bacteriocins by the NC8C strain became more evident because the inhibitory activity detected should be the difference between the amount of induced and that of the repressed bacteriocins. In fact, as shown in Fig. 2A and C (lane 4), the co-culture of *L. plantarum* NC8C with *E. faecium* 6T1a resulted in a slight decrease in bacteriocin production by *L. plantarum* NC8C (180 BU/ml) whereas bacteriocin production by *L. plantarum* NC8C increased in co-cultures with *E. faecium* 6T1a-20 (360 BU/ml) (lane 2). This suggests that the level of bacteriocin produced by *L. plantarum* NC8C in a co-culture with *E. faecium* 6T1a is the result of a balance between the inducing and inhibitory activities exerted by *E. faecium* 6T1a. Also, *L. plantarum* NC8C negatively impacted the production of enterocins in *E. faecium* 6T1a as shown in Fig. 2A and B (lanes 4 and 5). Taking into account that only 1/10 volume of the corresponding CFS was run in lane 5, the inhibition of bacteriocin production in *E. faecium* 6T1a in co-culture was very strong.

3.2. Production of bacteriocins by both strains dramatically falls in co-culture at regulated pH of 5.0

Bacteriocin production in *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a co-cultures was studied at a regulated pH of 5.0. We selected this pH (within the range 6.4–4.0) because, at this level, there was no detrimental effect on the survival of the co-cultured strains but, on the contrary, the inhibition of bacteriocin production was higher than at any other assayed pH.

As shown, the production of bacteriocins by the two strains dramatically falls in the co-culture as compared with its respective monocultures (Fig. 3B). Here, it is interesting to note not only the differences in bacteriocin activity shown by both strains in co-culture with respect to its respective single cultures but also in the different kinetics of bacteriocin production observed in single

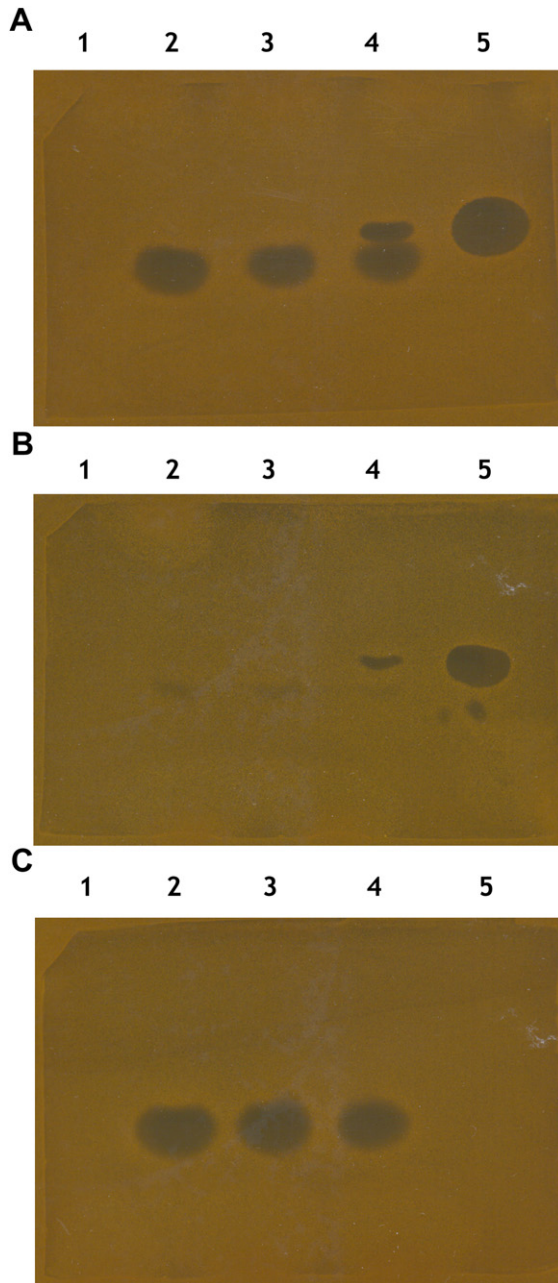


Fig. 2. Detection of the bacteriocins produced by *L. plantarum* NC8C or *E. faecium* 6T1a in single culture or in co-culture by SDS-PAGE. In each gel, lane 1, CFS from a *E. faecium* 6T1a-20, a non-bacteriocin-producer *E. faecium* LP6T1a derivative, single culture; lane 2, CFS from a *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a-20 co-culture; lane 3, CFS from a *L. plantarum* NC8C single culture; lane 4, CFS from a *L. plantarum* NC8C–*E. faecium* 6T1a co-culture; lane 5, CFS from a *E. faecium* 6T1a single culture. In A, the indicator strain *L. pentosus* 128/2 was used; in B, *L. plantarum* V11 was used as an indicator strain for enterocins from *E. faecium* 6T1a; in C, *L. pentosus* 55/1 was used for specific detection of plantaricins from *L. plantarum* NC8C.

and co-cultures. In the case of the NC8C strain, there is a clear growth-associated plantaricin production in single cultures (with a maximum of ca. 600 BU/ml at 8 h) whereas the bacteriocin production is delayed (maximum at 10–12 h) in co-cultures. In the case of enterocin production by *E. faecium* 6T1a, the opposite happens; bacteriocin activity was detected after the stationary phase was reached in single cultures (with a maximum of 150,000 BU/ml). This high activity was then maintained until the end of the incubation period. In contrast, a peak of activity of about

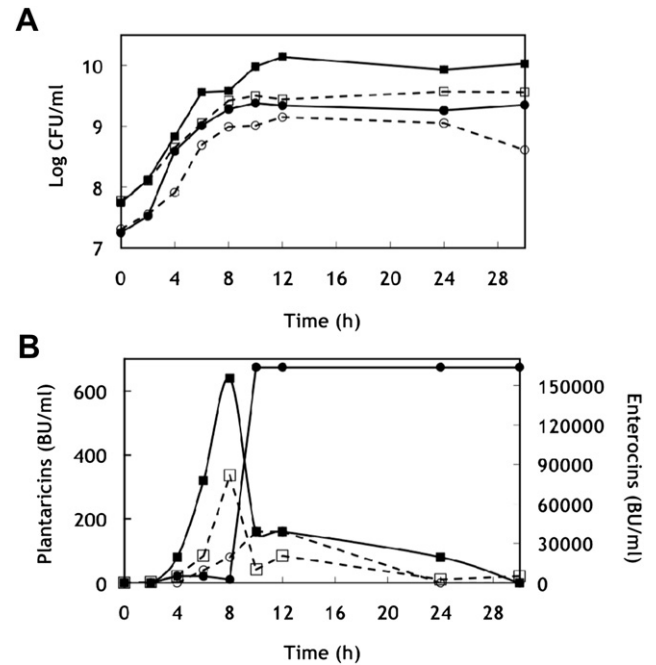


Fig. 3. Growth curves and bacteriocin activity of *L. plantarum* NC8C and *E. faecium* 6T1a in co-culture or in single cultures in MRS broth at pH regulated 5.0. Enterocins produced by *E. faecium* 6T1a and plantaricins produced by *L. plantarum* NC8C were differentially assayed against *L. pentosus* 55/1 and *L. plantarum* V11, respectively. In A, growth curves of *L. plantarum* NC8C (■—■) and *E. faecium* 6T1a (●—●) in single cultures, and of *L. plantarum* NC8C (□—□) or *E. faecium* 6T1a in co-culture (○—○). In B, bacteriocin activities in *L. plantarum* NC8C (■—■) or in *E. faecium* 6T1a single cultures (●—●), and enterocins (□—□) and plantaricins (○—○) activities in the co-culture.

360 BU/ml occurred at 8 h of incubation in co-cultures, decreasing afterwards.

The drop in bacteriocin activity and the different kinetics of the bacteriocins in co-cultures cannot be attributed to the decay of viable counts since high count levels were detected throughout the incubation period regardless of whether the strains had been single or co-cultured (Fig. 3A). We do not have any explanation for these two phenomenons at the moment but it could be due to some kind of regulation of the bacteriocin production exerted by each strain against the other. Further work is necessary to clarify this point.

3.3. Inhibition of production of bacteriocins in co-culture is not restricted to the NC8C and 6T1a strains

In order to study whether the phenomenon of the inhibition of bacteriocin production was specific of these two strains or if it occurred in other bacteriocin-producing LAB, we co-cultured eight bacteriocin producers with 159 other LAB strains belonging to our collection. In Table 2, the strains among the 159 tested that interfere in bacteriocin production are shown. In most cases there was a clear reduction in bacteriocin activity in the CFS of the bacteriocin-producing co-cultures as compared to that in single strain cultures. In some instances, antimicrobial activity was undetectable thus indicating that the production of bacteriocin had been completely suppressed. Interestingly, the reduction or suppression of bacteriocin production was a common trait of all co-cultures regardless of whether the co-inoculated strain was a bacteriocin producer or not.

The decrease/suppression of bacteriocin activity in co-cultures could not be attributed to the presence of extracellular proteolytic enzymes secreted by the co-cultured strains which degrade the produced bacteriocins. If so, a co-culture of any bacteriocin-producing LAB with a given strain would probably result in the

Table 2
Bacteriocin activity in co-culture cell-free supernatants.^{a,b}

	<i>L. pentosus</i>					<i>L. plantarum</i>					<i>L. sakei</i>						
	LPD5	55/1	LPS2005*	LPCO10*	LPP3*	Lb5q*	Lb5p*	CECT4185	57/2*	57/1*	44/1*	Lb31g	L11g	L3p	Lb38p	Lb20g	MMH(2)19
MMH(2)19	–	–	9	–	10	–	10	–	11	10	(–)	–	–	–	–	–	NA
Lb20g	–	–	9	–	10	(–)	10	–	10	11	(–)	–	–	–	–	NA	
Lb38p	–	–	8	–	10	(–)	10	–	10	10	(–)	–	–	–	NA		
L3p	–	–	8	–	10	(–)	(–)	–	11	10	(–)	–	–	NA			
L11g	–	–	8	–	11	–	(–)	–	9	11	(–)	–	NA				
Lb31g	–	–	8	–	11	(–)	(–)	–	11	10	(–)	NA					
44/1*	(–)	(–)	–	10	–	11	10	–	11	10	11**						
57/1*	(–)	(–)	–	10	–	11	10	(–)	10	11**							
57/2*	(–)	(–)	–	10	–	10	10	(–)	10**								
CECT4185	–	–	9	–	11	–	(–)	NA									
Lb5p*	(–)	(–)	(–)	10	–	9	10**										
Lb5q*	(–)	(–)	–	9	–	11**											
LPP3*	10	10	10	10	10**												
LPCO10*	–	–	11	8**													
LPS2005*	9	10	8**														
55/1	–	NA															
LPD5	NA																

*Bacteriocin producer.

**Values in single cultures.

–, no inhibition zone; (–) zone of inhibition was hazy, not clear; NA, not applicable.

In grey, co-cultures in which the production of bacteriocin was suppressed.

Results indicated mean of at least three independent experiments.

^a All assays were conducted with *L. pentosus* 128/2 as indicator strain.

^b Diameter of the inhibition zone (in mm).

inhibition of bacteriocin production. However, as shown in Table 2, this is not the case. On the other hand, the only difference between *E. faecium* 6T1a and its derivative *E. faecium* 6T1a-20 is the absence of the bacteriocin-encoding plasmid pEF1 in the strain 6T1a-20. This plasmid has been completely sequenced and no homology with any known protease has been reported (Ruíz-Barba, Floriano, Maldonado-Barragán, & Jiménez-Díaz, 2007). Therefore, the presence of a proteolytic enzyme in the NC8C–6T1a co-cultures is unlikely, as can be deduced from the results presented in Fig. 2.

4. Conclusion

In this study, a type of interaction among LAB which most likely occurs under natural conditions is described for the first time. Our data suggest that the relationship between inoculated microorganisms and the spontaneous microbiota naturally developing in the fermentation could be relevant for the final result of the process, as has been shown for other food fermentations (di Cagno et al., 2010; Charlet, Duboz, Faurie, Le Quéré, & Berthier, 2008; Goerges et al., 2008; Somers, Johnson, & Wong, 2001). In light of our results we hypothesize that this “natural co-culture” among the inoculated bacteriocin-producing strain and the autochthonous LAB could lead to the modification of the environment and to the repression of bacteriocin synthesis/secretion. This would reduce or cancel the selective advantage of the bacteriocin producer strain over the original LAB population. In this regard, single or mixed-species bacteriocin-producer starter cultures should be previously evaluated in order to prevent any detrimental interaction with the original microbiota. Further work focussing on the nature of the inhibitory substance and on its mechanism of inhibition of bacteriocin production is now in progress.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government through MICIIN Projects AGL2009-08016 and AGL2010-15529. We thank Mrs. Carmen Olmo Ruiz for her skilful assistance.

J.D.-M. was the recipient of a grant JAE-predoc from the C.S.I.C.

References

- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189–196.
- Bhunia, M. C., & Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 319–322.
- di Cagno, R., de Angelis, M., Calasso, M., Vincentini, O., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., et al. (2010). Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, 10, 1–16.
- di Cagno, R., de Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Simonetti, C., Buchin, S., et al. (2007). Cell–cell communication in sourdough lactic acid bacteria: a proteomic study in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Proteomics*, 7, 2430–2446.
- Charlet, M., Duboz, G., Faurie, F., Le Quéré, J.-L., & Berthier, F. (2008). Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 10–19.
- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30, 1562–1574.
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel anti-listerial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4883–4890.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161, 480–487.
- Goerges, S., Mounier, J., Rea, M. C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., et al. (2008). Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south german red smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2210–2217.
- Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59, 547–554.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L., & Piard, J. C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1416–1424.
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H., et al. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4459–4463.
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4673–4676.
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (2004). Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*, 186, 1556–1564.

- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, *41*, 2429–2433.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, *4*, 124–140.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2007). Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, *24*, 482–491.
- Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Jiménez-Díaz, R. (2010). Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiology*, *27*, 413–417.
- Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J., & Jiménez-Díaz, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 2059–2064.
- Ruiz-Barba, J. L., Floriano, B., Maldonado-Barragán, A., & Jiménez-Díaz, R. (2007). Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid*, *57*, 175–181.
- Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (2012). A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, *30*, 253–259.
- Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. (2002). Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. *Food Microbiology*, *19*, 363–373.
- Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S. A. F. T., Beerthuyzen, M., Stevens, M. J. A., Janssen, P. W. M., et al. (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*, 7775–7784.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Novak, J. S. (2004). Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, *67*, 1053–1070.
- Somers, E. B., Johnson, M. E., & Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, *84*, 1926–1936.
- Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., & Requena, T. (2009). *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *132*, 109–116.
- Tada, S., Katakura, Y., Ninomiya, K., & Shioya, S. (2007). Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefirifaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefir. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *103*, 557–562.
- Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T., & Kuramitsu, H. K. (2005). LuxS-based signalling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 2372–2380.