

# ¿Qué son las bacterias lácticas?

Rosa Aznar<sup>1,2</sup> y Manuel Zúñiga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpt. Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

<sup>2</sup>Dpto. Microbiología y Ecología. Fac. C. Biológicas. Univ. Valencia

## 1. Las bacterias y su clasificación

Las bacterias son microorganismos unicelulares independientes que se diferencian de las células eucariotas en no poseer un núcleo limitado por una membrana y, en general, carecer de orgánulos intracelulares. Las bacterias son los organismos más abundantes y extendidos de la Tierra. Se pueden encontrar en todos los hábitats incluidos los alimentos y el cuerpo humano. De hecho, se estima que el número de bacterias presentes en el intestino es diez veces superior al de células que forman el cuerpo humano. Esto es posible por la diferencia de tamaño: una bacteria típica como *Escherichia coli* tiene un volumen aproximado de  $4 \times 10^{-9}$  mm<sup>3</sup> frente a  $4 \times 10^{-6}$  mm<sup>3</sup> de una célula humana típica. Así pues, a grandes rasgos, una célula humana tiene un volumen mil veces mayor que una bacteria.

A diferencia de animales o plantas, las bacterias presentan escasos rasgos morfológicos que puedan ser utilizados para su clasificación en especies. Además, su pequeño tamaño dificulta su observación. Sin embargo, se caracterizan por una gran diversidad metabólica y fisiológica. Por ello, la clasificación de las bacterias casi desde los inicios tuvo que incluir también caracteres metabólicos, es decir, ensayos en los que se determina la capacidad de transformar unos compuestos en otros, como por ejemplo, azúcares en ácidos orgánicos. Hay que tener presente que el principal impulso al desarrollo de la taxonomía bacteriana ocurrió en la época en que se imponía la teoría de la evolución de Darwin. La teoría de la evolución llevó a los taxónomos a establecer criterios

de clasificación que permitieran reflejar las relaciones evolutivas entre los organismos. Es decir, organismos que comparten antepasados comunes más recientes deben encontrarse “más próximos” en el esquema de clasificación. Por ejemplo, el león (*Panthera leo*) y el tigre (*Panthera tigris*) pertenecen al mismo género, *Panthera*. El gato doméstico (*Felis silvestris*) pertenece a un género diferente pero a la misma familia, *Felidae*, en concordancia con la mayor distancia evolutiva entre gatos por un lado, y tigres y leones por otro. El lobo (*Canis lupus*) en cambio pertenece a una familia diferente, *Canidae*, pero al mismo orden, *Carnivora*. Así, la pertenencia a una categoría del esquema de clasificación está relacionada con el grado de parentesco, cuanto más restringida es esta categoría (en el ejemplo orden es la más amplia y género la más restringida) mayor es el grado de parentesco.

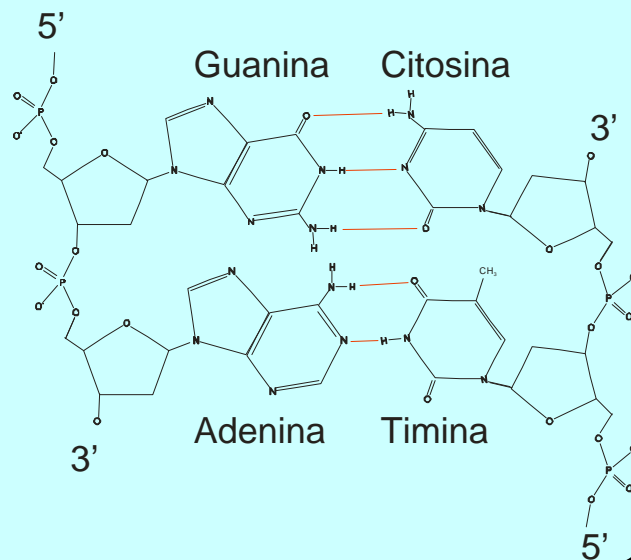
Volviendo a las bacterias, los criterios de clasificación empleados pronto empezaron a mostrar sus limitaciones, debido a que muchas características metabólicas eran variables y daban lugar a considerables controversias y confusiones y al abandono por muchos microbiólogos del intento de obtener una clasificación basada en la teoría de la evolución (1). La inclusión de otros caracteres tales como la determinación del contenido en G+C (Cuadro 1), la hibridación de ADN, serotipado o comparación de patrones de proteínas, si bien demostraron ser útiles sobre todo cuando se comparaban bacterias estrechamente emparentadas, no lograron resolver los problemas de clasificación de las bacterias. Hacia los años 60, comienza el desarrollo de las técnicas de

secuenciación de proteínas y ADN, que tras su aplicación en distintos organismos, ha llevado a generar amplias bases de datos. Los primeros análisis comparativos de secuencias permitieron apreciar una buena correlación entre las filogenias obtenidas

mediante este método y las establecidas mediante métodos clásicos de Anatomía Comparada abriendo así la puerta a la filogenia molecular. En el Cuadro 2 se esboza muy someramente el principio básico de la filogenética molecular.

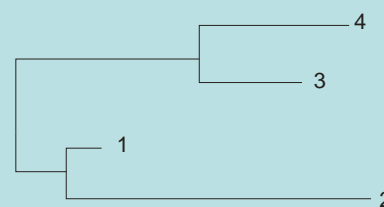
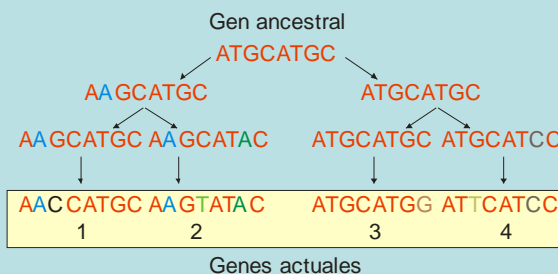
## Cuadro 1

La determinación del contenido en G+C puede hacerse, entre otros métodos, por análisis químico del contenido en bases de la muestra de ADN pero el método más sencillo consiste en la desnaturalización térmica del ADN. La doble hélice de ADN está estabilizada por enlaces de hidrógeno establecidos entre las bases nitrogenadas de las dos cadenas antiparalelas (véase la figura). La ruptura de los enlaces de hidrógeno requiere energía de manera que se puede definir la temperatura de fusión ( $T_m$ ) como la temperatura a la que en promedio el 50% de las moléculas de ADN de la muestra se encuentra formando doble hélice y el 50% se encuentran abiertas. Puesto que los pares GC establecen tres enlaces de hidrógeno mientras que los pares AT sólo dos, la  $T_m$  depende tanto de la longitud de la molécula como de su composición en bases, es decir, de su secuencia. Si la muestra de ADN se trocea en fragmentos de la misma longitud promedio, la  $T_m$  determinada es proporcional al contenido en G+C.



Las células son capaces de copiar su ADN con gran fidelidad. Sin embargo, ocasionalmente se producen errores durante el proceso de copiado o daños debidos a la acción de agentes químicos o físicos que alteran la estructura del ADN y pueden resultar en un cambio en su secuencia. A estas alteraciones de la secuencia de ADN se las denomina mutaciones y su característica principal es que se transmiten a la descendencia. Así pues, las mutaciones, sometidas al proceso de selección natural, son el motor de la evolución de los organismos. Las mutaciones ocurren con una cierta frecuencia a lo largo del tiempo. Por ello, mediante la comparación de las secuencias de genes homólogos, es decir, que se derivan de un ancestro común, se puede estimar el grado de parentesco entre los organismos portadores en función de los cambios observados. Esto es así si la transmisión de genes ha sido estrictamente vertical, es decir no ha habido transferencia desde otros organismos. En la figura adjunta se puede observar una serie hipotética de mutaciones acaecidas en un gen a lo largo de la evolución así como un árbol filogenético generado mediante el programa phym1 ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)). Puede apreciarse que el árbol reproduce las relaciones entre las secuencias.

## Cuadro 2



En el caso de las bacterias, la filogenia molecular no empezó a cobrar importancia hasta la publicación de los trabajos de Carl Woese sobre la comparación de secuencias de ARN ribosómico. Los ARN ribosómicos forman parte de los ribosomas, las fábricas moleculares de proteínas que se encuentran en

todos los seres vivos. Este hecho, junto al de ser moléculas de gran tamaño y tener una secuencia conservada (es decir, que acumula pocos cambios a lo largo del proceso evolutivo) las hacía idóneas para los análisis comparativos de secuencias. Además, el hecho de formar parte de una estructura muy compleja

(3 moléculas distintas de ARN y 55 proteínas) y esencial para la célula hacía verosímil la hipótesis de que no hubiera sido afectada por transferencias horizontales. La elección de esta molécula como marcador filogenético revolucionó el campo de la taxonomía bacteriana y permitió por primera vez disponer de un sistema de clasificación evolutivo. Sin embargo, la investigación continuada en filogenética molecular ha mostrado que la utilización de un solo gen para el análisis filogenético es en muchas ocasiones insuficiente. En la actualidad se dispone de técnicas de secuenciación masiva, secuencias de genomas completos, nuevos algoritmos para el análisis filogenético y ordenadores con mayor poder de cálculo. Estos avances facilitan el análisis simultáneo de todos los genes homólogos de un grupo de organismos lo que permite establecer sus relaciones evolutivas con un grado de fiabilidad sin precedentes. La filogenética molecular es, por tanto, la base para la identificación y clasificación de nuevas especies bacterianas.

## 2. Bacterias lácticas

El término bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Las bacterias lácticas se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años para la producción de alimentos tales como queso y yogur. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en fermentaciones se debía a la acción de microorganismos (fermentos lácticos). El aislamiento y obtención de un cultivo puro de *Bacterium lactis* por Joseph Lister marcó el inicio del estudio microbiológico de las bacterias lácticas. En 1900 Henry Tissier aisló de las heces de un lactante la primera bifidobacteria a la que llamó

*Bacillus bifidus*. Se trataba de un organismo Gram positivo y productor de ácido láctico por lo que en la primera clasificación se incluyó con las bacterias lácticas. En 1917 Winslow propuso la familia *Lactobacillaceae* para agrupar bacterias con los siguientes rasgos: bacilos Gram positivos, a menudo largos y delgados, inmóviles, no esporulados, comúnmente producen ácido láctico a partir de azúcares, pueden producir gas (dióxido de carbono), no producen hidrógeno, ocasionalmente termófilos, difícilmente cultivables en medio gelificado incubado en atmósfera microaerófila. Dentro de esta familia se incluía *Bacillus bifidus*.

Durante buena parte del siglo XX se mantuvieron los lactobacilos y las bifidobacterias agrupados en el esquema de clasificación. Por ello, tradicionalmente se ha utilizado el nombre de bacterias lácticas aludiendo a ambos grupos de microorganismos, en cuanto a su capacidad para producir ácido láctico. Sin embargo, a comienzos de los años 30 ya empezaron a obtenerse datos que señalaban que las bifidobacterias estaban más próximas a *Actinomyces* que a los lactobacilos, si bien estos estudios no modificaron el esquema de clasificación. Los estudios moleculares llevados a cabo en los años 60 mostraron que las bifidobacterias eran muy diferentes de las restantes bacterias lácticas a pesar de las similitudes fenotípicas (2). El contenido en G+C de las bifidobacterias es superior al 50% mientras que el de *Lactobacillales* es inferior al 50%, lo que las aproximaba al grupo de los actinomicetos. Los análisis de la composición de la pared celular también mostraron que las bifidobacterias poseían características particulares que las separaban de las restantes bacterias lácticas. Sin embargo, las evidencias obtenidas no se consideraron suficientes y persistió la controversia concerniente a la posición de las bifidobacterias. En los años 60 y 70 continuaron acumulándose evidencias que indicaban que

bifidobacterias y lactobacilos constituían grupos distintos. Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias de ARN ribosómico permitió establecer convincentemente la clasificación de las bifidobacterias como un orden separado dentro de la clase *Actinobacteria*.

En la actualidad lo que se conoce como bacterias lácticas agrupa a bacterias del orden *Lactobacillales* y bacterias del orden *Bifidobacteriales*. En el Cuadro 3 se muestra la clasificación de ambos grupos con los géneros más relevantes en alimentación y salud.

**Cuadro 3\***

Reino	Filo	Clase	Subclase	Orden	Familia	Género
<i>Bacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteridae</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>		<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i> <i>Carnobacteriaceae</i> <i>Enterococcaceae</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Leuconostocaceae</i> <i>Streptococcaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i> <i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i>

\*Clasificación de la base de datos Taxonomy del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>)

Por ello actualmente el término bacterias lácticas tiene un significado ambiguo pudiendo referirse tanto a bacterias del orden *Lactobacillales* exclusivamente como al conjunto de *Lactobacillales* y bifidobacterias. Además, el hecho de que durante muchos años se les haya considerado como organismos afines ha llevado al establecimiento de un área de conocimiento en Bacterias Lácticas dentro de la Microbiología que si bien no está definida como una disciplina de esta ciencia a efectos prácticos opera como tal, existiendo congresos que reúnen a estudiosos de ambos grupos. Esa afinidad se refleja también en la Red Española de Bacterias Lácticas, formada por grupos de investigación especializados en bacterias lácticas, en el sentido más amplio, incluyendo ambos grupos de microorganismos.

### 3. Características de *Bifidobacteriales*

El orden *Bifidobacteriales* incluye una única familia con dos géneros, *Bifidobacterium* y *Gardnerella*. El género *Bifidobacterium* corresponde a lo que conocemos como bifidobacterias y engloba más de 30 especies. Las bifidobacterias son bacilos de 2–5 µm de longitud que suelen presentar una protuberancia en un extremo, a modo de bastón o espátula. Son frecuentes las formas en V o T, pero también se encuentran formas más regulares o cocoides que se observan en ocasiones en el mismo cultivo (Foto 1). Por ello se definen como “pleomórficas” y, además, pueden aparecer aisladas, en cadenas pluricelulares o formando grupos. En algunas especies la morfología celular es tan característica que permite su identificación.

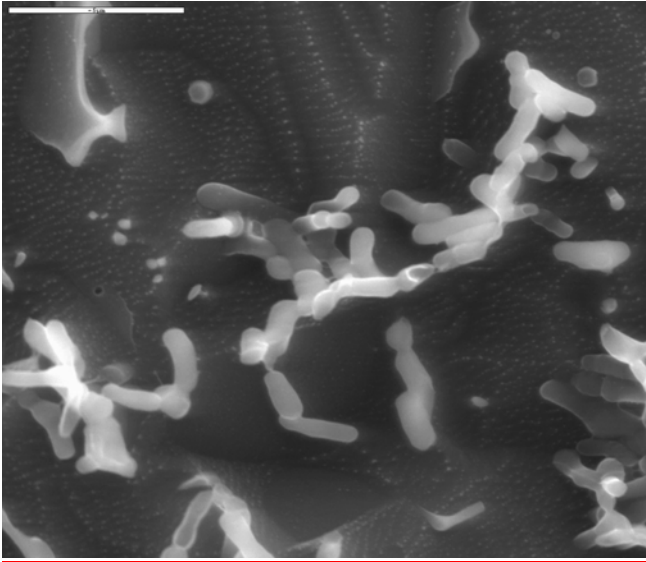


Foto 1. *Bifidobacterium lactis*. Microfotografía de barrido cedida por el grupo de Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos del IPLA-CSIC (Asturias).

Las bifidobacterias no forman cápsulas ni esporas, carecen de flagelos y no forman filamentos. Son Gram-positivas, catalasa negativas, oxidasa negativas y anaerobias. Algunas especies pueden crecer en presencia de  $O_2$  si también hay  $CO_2$ . Su temperatura óptima de crecimiento está entre 35-39 °C. El contenido en G+C varía entre 42-67%. Son quimioorganotrofos (sus fuentes de carbono y energía son compuestos orgánicos) de metabolismo fermentativo. Producen ácido pero no gas de una gran variedad de carbohidratos, siendo lactato y acetato los principales productos finales de la fermentación.

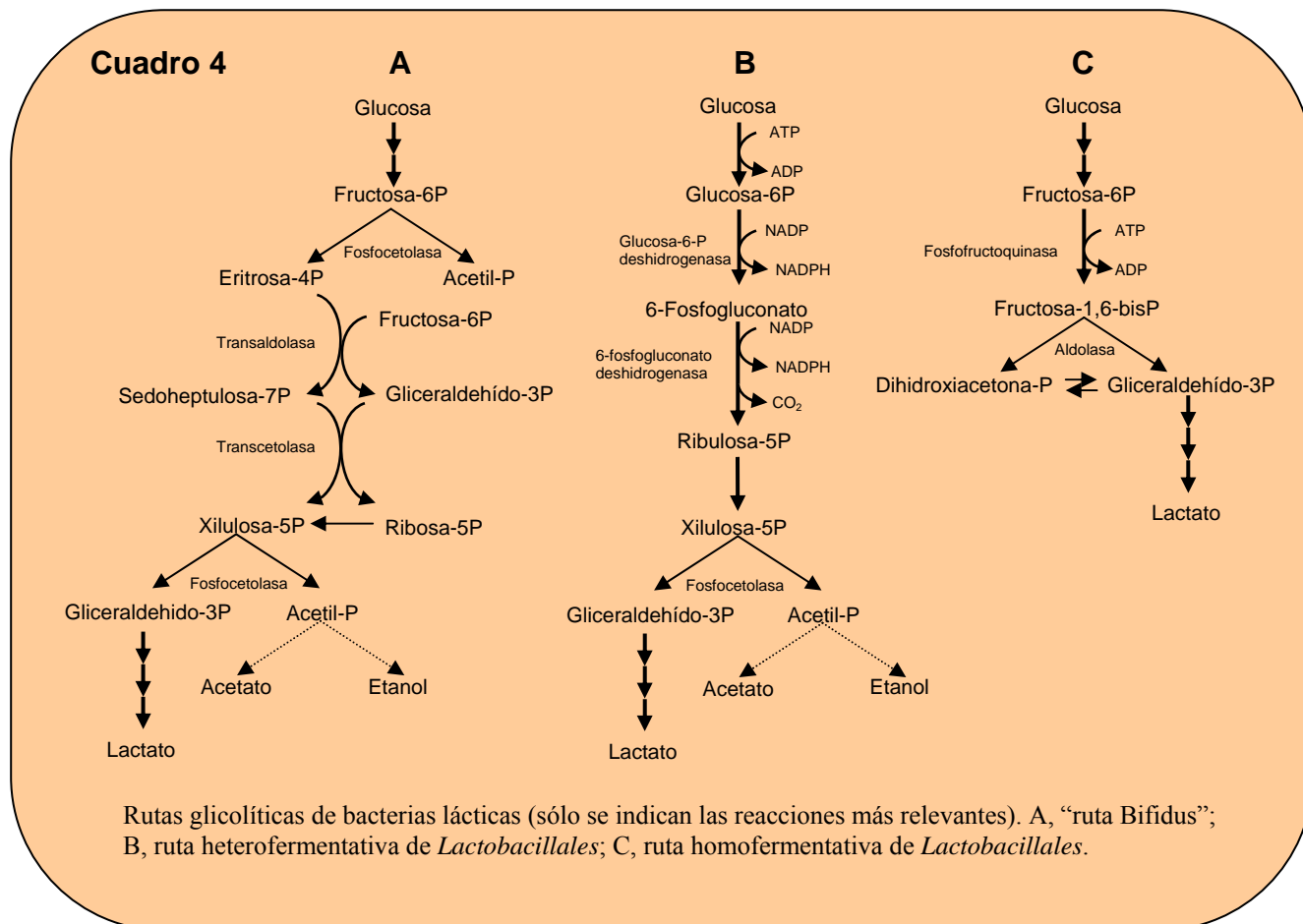
Las bifidobacterias se caracterizan además por utilizar una ruta especial para la fermentación de las hexosas que se conoce como la "ruta Bifidus" o de la derivación de fructosa 6-fosfato (Cuadro 4). Se debe a que estos microorganismos poseen el enzima fructosa 6-fosfato fosfoacetolasa que rompe la fructosa 6-fosfato en acetilfosfato y eritrosa-4-fosfato y la presencia de dicha

actividad enzimática es una característica que permite diferenciarlas del resto de bacterias lácticas (*Lactobacillales*).

Se encuentran habitualmente asociadas al tracto intestinal o genital del hombre y animales, aunque algunas bifidobacterias se han aislado únicamente de aguas fecales, si bien no se ha determinado si éste es su hábitat natural. En general no son patógenos aunque algunas bifidobacterias han sido aisladas de caries dental. Su presencia en el tracto intestinal de humanos, adultos y niños, despertó el interés de bacteriólogos y nutricionistas por este grupo de microorganismos. Efectivamente son de los primeros colonizadores del intestino, encontrándose en mayor proporción en bebés amamantados, y siendo algunas especies exclusivas de infantes. Así mismo, las poblaciones de estas bacterias en el intestino humano de adultos parecen tener un papel relevante en la salud del individuo. Entre otras funciones, se les ha atribuido un efecto regulador sobre las poblaciones bacterianas que constituyen la "microbiota" intestinal, prevención de la diarrea, potenciación del sistema inmune estimulando la síntesis de compuestos de defensa, mejora de la intolerancia a la lactosa contribuyendo a su digestión, producción de sustancias antimicrobianas que mantienen bajo control a otras bacterias i.e. patógenos, producción de vitaminas esenciales para el huésped y actividad anticarcinogénica. Por todo ello, se utilizan como "probióticos", microorganismos que ingeridos vivos y en cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso para la salud. Existen en el mercado

bifidobacterias que se presentan liofilizadas, es decir, en forma de polvo que se rehidrata antes de su ingestión, y son de uso clínico. También se utilizan en la fabricación de leches fermentadas,

tipo yogur, que tienen gran aceptación por su menor acidez, y a su vez ejercen el papel de “alimento funcional”.



#### 4. Características de *Lactobacillales*

Las bacterias lácticas propiamente dichas pertenecen a 19 géneros distribuidos en 6 familias dentro del orden *Lactobacillales*. Forman un grupo muy heterogéneo de bajo contenido en G+C dentro del filo *Firmicutes*. La mayor parte de estas bacterias comparten el hecho de ser bacilos o cocos Gram-positivos, catalasa-negativos (aunque en algunos casos pueden presentar una actividad pseudocatalasa), anaerobios facultativos, microaerófilos o

aerotolerantes, desprovistos de citocromos, no esporulados, acidófilos o acidotolerantes, de metabolismo quimioorganotrofo y estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como principal producto final de la fermentación de azúcares. Los géneros con morfología celular esférica, o cocoide “cocos” son entre otros, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* o *Streptococcus*, con número de especies limitado, y el género que reúne mayor número de especies, *Lactobacillus*, se caracteriza por la forma de bastoncillo “bacilos”. En la

actualidad son más de 100 las especies que han sido descritas como pertenecientes al género *Lactobacillus* y se encuentra en continuo aumento.

La principal característica del metabolismo de las bacterias lácticas es la fermentación de los azúcares, siendo su producto final, en la mayor parte de los casos, el ácido láctico. Pueden fermentar hexosas como glucosa, manosa,

galactosa o fructosa utilizando la llamada "vía homofermentativa", en la que el único producto final es ácido láctico, o la "vía heterofermentativa" en la que, además de ácido láctico, se forman etanol (o ácido acético) y CO<sub>2</sub> (Cuadro 4). La utilización de una u otra vía depende de la presencia de los enzimas que intervienen en la transformación del azúcar en ácido, la fructosa-1,6-bifosfato-aldolasa en el primer caso, y una fosfoctolasa, en el segundo.

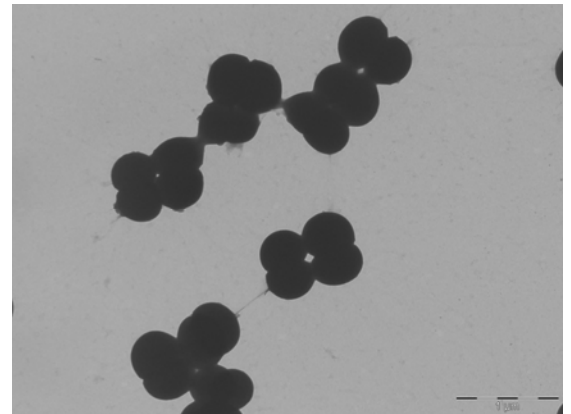
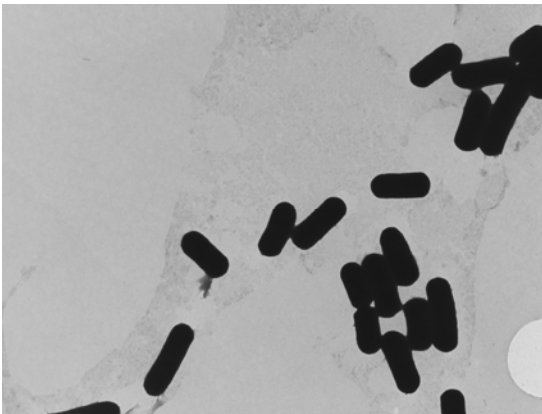


Foto 2. Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) mediante tinción con acetato de uranilo de *Lactobacillus plantarum* (izquierda) y *Pediococcus parvulus* (derecha). Ceditas por el grupo de Taxonomía Molecular del IATA-CSIC (Valencia).

Algunas especies poseen sólo uno de los tipos de enzima y se denominan homofermentadoras o heterofermentadoras estrictas, mientras que otras pueden poseer ambos y utilizar una u otra ruta dependiendo del azúcar que se encuentre presente. Todas las bacterias lácticas, excepto los lactobacilos homofermentadores estrictos, pueden fermentar las pentosas. La razón de ello es que las pentosas sólo pueden ser degradadas por la ruta heterofermentativa en bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas se encuentran en una amplia variedad de hábitats, especialmente aquellos ricos en carbohidratos. Así pues se encuentran en

alimentos como productos cárnicos fermentados, derivados lácteos, masa panadera, vegetales fermentados, ensilaje o bebidas; en plantas, en aguas residuales, y también en los tractos intestinal, genital y respiratorio del hombre y de animales.

Los productos derivados del metabolismo de las bacterias lácticas tienen un papel decisivo y les confieren sus características distintivas a gran variedad de alimentos tales como yogur, queso y otros productos lácteos fermentados, encurtidos, etc. En otros, si bien juegan un papel secundario, tienen repercusiones beneficiosas para su calidad,

como es el caso de los vinos tintos, aceitunas, productos cárnicos fermentados, etc. Sin embargo, en ocasiones son responsables de la alteración del producto como por ejemplo la formación de CO<sub>2</sub> en productos cárnicos envasados al vacío que lleva a la hinchazón del envase, la producción de ácidos orgánicos como acético o fórmico que dan lugar a malos olores o la formación de limos que confieren viscosidad en productos cárnicos y en bebidas.

Además, a comienzos del siglo XX Metchnikoff propuso su teoría de que el consumo de bacterias lácticas presentes en leches fermentadas (yogur) mejoraba la salud. Posteriormente, Shirota continuó esta línea y aisló la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota que comenzó a comercializar como Yakult. Este fue el punto de partida del reconocimiento de las propiedades probióticas de algunas cepas de bacterias lácticas. Actualmente ésta es una de las áreas más activas en investigación básica, tanto en el campo de las bacterias lácticas como en el campo de Tecnología de Alimentos, llevando al desarrollo de nuevos alimentos con componentes que mejoran la salud del consumidor (alimentos funcionales).

## Referencias

1. Woese, Carl (2006). How we do, don't and should look at Bacteria and Bacteriology. En The Prokaryotes 3<sup>a</sup> Ed. Vol 1. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer y E. Stackebrandt (eds.). Springer Science and Business Media Inc. Pp. 3-23.
2. Poupard, J.A.; Husain, I.; Norris, R.F. (1973). Biology of the bifidobacteria. Bacteriol. Rev. **37**, 136-165.
3. Axelsson, L. (2002) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Eds. Salminen, S. & von Wright, A. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. Pp. 1-63.
- 4.- Schleifer, K.H. & Ludwig; W. (1995) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Eds. Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK. Pp. 7-18.
- 5.- Biavati, B. & Mattarelli, P. (2006) The Family Bifidobacteriaceae. En: The Prokaryotes (3<sup>a</sup> edición) Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. & Dworkin, M (Eds). Springer, New York. Vol. 3, pp. 322-382.
- 6.- Hammes, W.P. & Hertel, C. (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The Prokaryotes (3<sup>a</sup> edición) Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. & Dworkin, M (Eds). Springer, New York. Vol. 4, pp. 320-403.