

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Microbiología**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS  
 CEPAS DE *LACTOBACILLUS* CON POTENCIAL  
 PROBIÓTICO**

**Agustín Ramón Lasserrot Cuadrado**

**Tesis doctoral**

**Granada, 2015**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Agustín Ramón Lasserrot Cuadrado  
ISBN: 978-84-9125-793-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43512>



A mi Magister Alfonso Ruíz-Bravo López,  
sin él, esta tesis no habría sido posible.



## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi agradecimiento a la codirectora de esta tesis Dra. María Jiménez Valera por la confianza depositó en mí para la realización este trabajo así como por su apoyo y consejo, además de la paciencia mostrada durante estos años, tal vez demasiados, en los que he tenido que compaginar trabajo profesional al frente de Biot e investigación doctoral.

A Josefina Vázquez, cuyo trabajo y estrecha colaboración en Biot, me ha permitido dedicar tiempo a la investigación.

A Marta Hormigo, por el importante apoyo que de ella he recibido en la investigación, siempre con profesionalidad e ilusión.

A mi familia, que comprendieron que este trabajo era importante y necesario.

Granada, a dieciséis de Noviembre del año 2015.

Agustín Lasserrot



El doctorando AGUSTÍN RAMÓN LASSERROT CUADRADO y los directores de la tesis ALFONSO RUÍZ-BRAVO LÓPEZ y MARÍA JIMENEZ VALERA. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA, a 15 de noviembre de 2015

Director/es de la Tesis



Fdo.: Alfonso Ruíz- Bravo López

Doctorando



Fdo.: Agustín Lasserrot Cuadrado

Director/es de la Tesis



Fdo.: María Jiménez Valera



**Parte de los resultados contenidos en esta Tesis ha sido objeto de las siguientes publicaciones:**

Posters y ponencias en las ediciones II (2010), III (2011), IV (2012), V (2014) y VI (2015) de los workshops anuales de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP)

Publicaciones en revistas de difusión internacional:

Bergillos-Meca, T., Navarro-Alarcón, M., Cabrera-Vique, C., Artacho, R., Olalla, M., Giménez, R., Moreno-Montoro, M., Ruiz-Bravo, A., **Lasserrot, A.**, Ruiz-López, M.D. 2013. The probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* D3 increases in vitro the bioavailability of Ca, P, and Zn in fermented goat milk. Biol. Trace Elem. Res. 151:307-314.

Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., Ruiz-López, M.D., **Lasserrot, A.** y Ruiz-Bravo, A. 2014. Lack of correlation between in vitro antibiosis and in vivo protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. Res. Microbiol. 165:14-20.\*

De Montijo-Prieto, S., Moreno, E., Bergillos-Meca, T., **Lasserrot, A.**, Ruiz-López, M.D., Ruiz-Bravo, A. y Jiménez-Valera, M. 2015. A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. Res. Microbiol. 166:626-632.

\*Publicación adjunta a la Tesis, de acuerdo con la normativa vigente.

La cepa D3 ha sido objeto de una Patente Europea PCT/EP 2012058214 titulada "*Lactobacillus fermentum* CECT 7472 strain with probiotic properties".

[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=3&ND=4&adjacent=true&locale=en\\_EP&FT=D&date=20140319&CC=EP&NR=2707476A1&KC=A1](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=3&ND=4&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20140319&CC=EP&NR=2707476A1&KC=A1)



## ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	18
1.1. La colonización microbiana de los humanos	
1.2. La microbiota del sistema digestivo	
1.3. Microbiota intestinal y mucosa intestinal	
1.4. Microbiota intestinal e influencia sobre hospedador humano	
1.5. Raíces y evolución del concepto de probiótico	
1.6. Los conceptos de probióticos, prebióticos y simbióticos	
1.7. Microorganismos probióticos. Taxonomía	
1.8. Lactobacilos y Bifidobacterias	
1.9. Características de los probióticos	
1.10. Efectos beneficiosos de los probióticos	
2. Objetivos.....	94
2.1. Objetivo general	
2.2. Objetivos específicos	
3. Selección de lactobacilos con potencial probiótico.....	97
3.1. Criterios de selección	
3.2. Muestras	
3.3. Aislamiento de lactobacilos	
3.4. Identificación fenotípica	
3.5. Resistencia a pH ácido y a sales biliares	
3.6. Adherencia a células de la mucosa intestinal	
3.7. Inhibición <i>in vitro</i> de bacterias enteropatógenas	
3.8. Resultados y discusión	
3.8.1. Aislamiento e identificación fenotípica	
3.8.2. Resistencia a pH ácido y a sales biliares	

- 3.8.3. Adherencia a células de la mucosa intestinal
- 3.8.4. Inhibición *in vitro* de bacterias enteropatógenas
  
- 4. Identificación molecular de las cepas seleccionadas.....164
  - 4.1. Criterios de identificación molecular
  - 4.2. Secuenciación de DNA que codifica para rRNA 16S
    - 4.2.1. Extracción de DNA
    - 4.2.2. Amplificación específica del fragmento del gen codificante del rRNA 16S
    - 4.2.3. Secuenciación del gen codificante del rRNA 16S
    - 4.2.4. Análisis de la secuencia de DNA y establecimiento de similitudes
  - 4.3. Resultados y discusión
  
- 5. Ensayos tecnológicos de viabilidad industrial.....176
  - 5.1. Conservación de *L. fermentum* D3
    - 5.1.1. Establecimiento de los criterios de conservación de la cepa D3 en medios de cultivo artificiales de laboratorio. Pautas de subcultivo, viabilidad celular y estabilidad morfológica
    - 5.1.2. Mantenimiento de crioteca. Análisis de crioprotectores y estudio de viabilidad
    - 5.1.3. Liofilización de la cepa D3, fase de experimentación
  - 5.2. Curvas de crecimiento
    - 5.2.1. Metodología
    - 5.2.2. Resultados y discusión
  - 5.3. Capacidad fermentadora
    - 5.3.1. Fermentación de leche de cabra con cepa D3
    - 5.3.2. Fermentación de leche de cabra con cepa B16

6. Inmunomodulación <i>ex vivo</i> .....	232
6.1. Objetivo y diseño experimental	
6.2. Animales	
6.3. Administración de lactobacilos	
6.4. Cultivo de esplenocitos	
6.4.1. Obtención de suspensiones	
6.4.2. Recuento de células viables y ajustes de las suspensiones	
6.4.3. Cultivo de esplenocitos	
6.5. Medida de la proliferación celular	
6.6. Cuantificación de citoquinas	
6.7. Resultados y discusión	
7. Protección frente a infecciones experimentales.....	254
7.1. Objetivo y diseño experimental	
7.2. Ensayos de protección frente a <i>Yersinia enterocolitica</i> 09	
7.2.1. Pretratamiento con <i>Lactobacillus fermentum</i> D3.	
7.2.2. Desafío	
7.2.3. Continuación del tratamiento con D3	
7.2.4. Monitorización de la infección	
7.3. Ensayos de protección frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	
7.3.1. Pretratamiento y desafío	
7.3.2. Monitorización de la infección	
7.4. Resultados y discusión	
7.4.1. Infección con <i>Y.enterocolitica</i> 09	
7.4.2. Infección con <i>L.monocytogenes</i>	
8. Bioseguridad.....	271
8.1. Criterios de bioseguridad	
8.2. Detección de enzimas indeseables	
8.3. Prueba de sensibilidad a antimicrobianos	
8.3.1. Antibiograma	

8.3.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB)	
8.5. Ensayo de inocuidad en un modelo experimental de inmunosupresión con ciclofosfamida	
8.6. Resultados y discusión	
8.6.1. Detección de enzimas indeseables	
8.6.2. Sensibilidad a antimicrobianos	
8.6.3. Ensayo de patogenicidad en ratón	
9. Conclusiones.....	293
10. Bibliografía.....	296



## **RESUMEN**

Los probióticos se definen como microorganismos que, administrados vivos por vía oral, a dosis adecuadas, bajo la forma de suplemento dietético, afectan beneficiosamente la salud del hospedador, proporcionando beneficios más allá de los inherentes a la nutrición básica. La Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE) subraya que solo se deberían considerar probióticos aquellos microorganismos cuyos efectos beneficiosos han sido demostrados en estudios controlados con seres humanos. Las investigaciones sobre microorganismos probióticos constituyen un tema de actualidad y de creciente interés. El estudio de lactobacilos probióticos es una de las líneas de investigación del Grupo de Inmunología Microbiana (BIO 201) de la Universidad de Granada, en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral, que se diseñó con el objetivo general de caracterizar nuevas cepas de lactobacilos cuyas propiedades biológicas y robustez tecnológica les confieran un potencial prometedor como candidatos a probióticos.

El primer objetivo concreto fue seleccionar cepas que reuniesen los criterios básicos exigibles para una bacteria probiótica. Se realizaron dos fases de muestreos, el primero con muestras de leche, ubres, calostro y contenido intestinal de ganado caprino; el segundo, con muestras de diversos animales y de seres humanos. Las muestras se sembraron en

Agar MRS y se seleccionaron las colonias de bacilos Gram-positivos, no esporulados, catalasa-negativos, que se identificaron fenotípicamente de acuerdo con sus perfiles bioquímicos obtenidos mediante el sistema API 50 CH. Las cepas se sometieron a ensayos de resistencia a pH ácido y a sales biliares, adherencia a células Caco-2 y antibiosis frente a bacterias patógenas intestinales. En total, se aislaron 57 cepas con características de lactobacilos, con la siguiente distribución en especies: *Lactobacillus fermentum*, 35,1 %; *Lactobacillus plantarum*, 19,3 %; *Lactobacillus salivarius*, 10,5 %; *Lactobacillus acidophilus*, 7 %; *Lactobacillus lactis*, 5,3 %; *Lactobacillus brevis*, 5,3 %; *Lactobacillus reuterii*, 3,5 %; *Lactobacillus paracasei*, 1,8 %; *Lactobacillus animalis*, 1,8 %; y especies no identificadas con fiabilidad, 10,5 %. Las cepas A2 (*L. acidophilus*), D3 (*L. fermentum*), ALH4 (*Lactobacillus sp.*) y C12 (*L. acidophilus*) fueron las únicas que mostraron simultáneamente crecimiento tanto a pH ácido como en presencia de 0.05% de sales biliares. Las cepas A2 y D3, que fueron identificadas con alta fiabilidad (99,9 %), se eligieron para el ensayo de adherencia a células, en el que ambas cepas mostraron capacidad de adherencia aunque la de la cepa D3 fue significativamente mayor. En los ensayos de antibiosis, usando el método de doble capa de agar, todas las cepas ensayadas fueron capaces de inhibir, en mayor o menor grado, el crecimiento de bacterias enteropatógenas. Esta inhibición se debió a la producción de ácidos a partir de la dextrosa presente en el Agar MRS en alta concentración (20 g/L), lo que plantea la significación real de esta prueba, comúnmente aceptada ente los ensayos de cribado de

probióticos. Es improbable que en el ambiente intestinal exista disponibilidad de dextrosa suficiente para producir una cantidad de ácidos que descienda el pH a niveles capaces de inhibir a microorganismos patógenos. Una discusión extensa de estos resultados y del valor real de esta prueba se presenta en la publicación original requerida para la presentación de la tesis (Bujalance et al., 2014). De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de cribado, se seleccionaron las cepas D3 y B16 como las que ofrecía el mejor perfil como candidatas a probiótico. La identificación de ambas cepas como pertenecientes a la especie *L. fermentum* fue confirmada por secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S, utilizándose los *primers* universales fD1 y rD1 sintetizados por Sigma Genosis (UK).

El segundo objetivo concreto se centró en la evaluación de la robustez tecnológica de la cepa D3, aspecto de gran importancia para su aprovechamiento industrial. La cepa mostró mantener una excelente viabilidad cuando se mantuvo por subcultivos seriados en Agar MRS y Agar Rogosa, por períodos superiores a un año. La crioconservación a -80°C se mostró como un excelente método de conservación para la cepa D3, siendo adecuado el uso de crioprotectores del tipo inositol, sacarosa, dimetilsulfóxido y leche descremada, así como mezclas de dimetilsulfoxido-sacarosa; con glicerol y con lactosa se obtuvieron índices de viabilidad aceptables pero inferiores. Finalmente, la liofilización también se aplicó con éxito a la preservación de D3, ya que se obtuvieron niveles excelentes de viabilidad en liófilos conservados a temperatura

ambiente durante más de 30 días, especialmente cuando se usó la mezcla trehalosa + sacarosa como lioprotectores.

El tercer objetivo concreto fue el estudio de la capacidad inmunomoduladora de la cepa D3 mediante ensayos *ex vivo* en ratón. Estos ensayos se diseñaron con dos grupos de ratones BALB/c, uno de los cuales recibió  $10^9$  lactobacilos en leche descremada por animal y día durante 12 días, mientras que el otro recibió la misma pauta con el vehículo lácteo. La administración fue intragástrica. Se compararon las respuestas de los esplenocitos cultivados en presencia de lipopolisacárido (LPS) como mitógeno de linfocitos B y concanavalina A (ConA) como mitógeno de linfocitos T. El tratamiento con D3 causó un incremento general en la capacidad de respuesta de los linfocitos esplénicos, aunque el efecto solo fue significativo sobre linfocitos B. Estos resultados, junto con la potenciación de la producción de IL-10 en los cultivos estimulados con LPS y de IFN- $\gamma$  en los estimulados con ConA, permitieron concluir que en conjunto hubo una potenciación sistémica de la capacidad de respuesta de los linfocitos, con estímulo de la inmunidad celular y, simultáneamente, una acción antiinflamatoria. Este panorama se podría traducir en incremento de la resistencia frente a infecciones, tanto por patógenos extracelulares (potenciación de los linfocitos B, productores de anticuerpos) como por patógenos intracelulares (potenciación de la producción de IFN- $\gamma$ , que asegura la activación de macrófagos), y limitación de los daños causados por las reacciones inflamatorias que

acompañan a la presencia de microorganismos patógenos en los tejidos.

El cuarto objetivo se propuso investigar si la cepa D3 es capaz de modificar la resistencia de ratones BALB/c a la infección experimental por bacterias patógenas intestinales. Se eligieron dos modelos distintos: en el primero, la inoculación intragástrica con *Yersinia enterocolitica* del serotipo O9, que es un patógeno extracelular de moderada virulencia, causa una infección intestinal que persiste más de dos meses, sin sintomatología aparente, pero monitorizable por coprocultivo en medios selectivos; en el segundo, la inoculación por la misma vía de *Listeria monocytogenes*, patógeno intracelular de mayor virulencia, produce una infección sistémica que se monitoriza por cultivos cuantitativos a partir de bazo e hígado. El tratamiento con D3 durante 12 días antes de la inoculación, proseguido después hasta el final del experimento, adelantó significativamente la desaparición de yersinias de las heces, consiguiéndose la negativización de los coprocultivos del 100 % de los animales infectados en el día 50 post-infección, mientras que en los animales testigos se obtuvo en el día 70. En cuanto al modelo de infección con *L. monocytogenes*, la depuración de listerias en bazo y en hígado se vio también significativamente acelerada en los animales tratados con D3 desde los 12 días anteriores a la infección. En ambos casos, el efecto de D3 es atribuible al estímulo de las defensas: en el caso de la infección con *Y. enterocolitica*, el efecto ocurrió a largo plazo, por lo que no parece debido a acciones de antibiosis o de

competencia por receptores de la mucosa. En la infección por *L. monocytogenes*, los efectos fueron a nivel sistémico y se cuantificaron en bazo e hígado, donde los lactobacilos no están presentes. Los efectos inmunomoduladores descritos en el desarrollo del objetivo anterior deben constituir la base del incremento de resistencia a la infección por ambos patógenos.

El último de los objetivos concretos se centró en la evaluación de la bioseguridad de las cepas D3 y B16. La *European Food Safety Authority* incluye la especie *L. fermentum* entre los microorganismos con calificación de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), pero para cepas nuevas siempre es recomendable realizar estudios de bioseguridad. Estos han abordado tres niveles: (1) la ausencia de enzimas indeseables, relacionados con la producción de carcinógenos; (2) la ausencia de resistencias transmisibles frente agentes antimicrobianos de relevancia en clínica humana; y (3) la ausencia de patogenicidad en modelos experimentales de animales inmunocomprometidos. En lo que se refiere a la ausencia de enzimas indeseables, detectadas con el sistema API ZYM, tanto la cepa D3 como la B16 mostraron carecer de  $\alpha$ -quimiotripsina,  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa. Respecto de la posibilidad de transmisión de resistencias a otros microorganismos, se estudió el espectro de sensibilidad de ambas cepas a las familias de antibióticos de mayor relevancia, encontrándose que ambas cepas mostraron resistencia a fluoroquinolonas, fosfomicina y varios aminoglicósidos, pero fueron sensibles a macrólidos,

incluyendo eritromicina, y a tetraciclinas, que son los agentes para los que se ha documentado la existencia de genes de resistencia móviles, transferibles a otras bacterias. Por último, la inoculación de D3 por vía intravenosa en ratones BALB/c normales y neutropénicos por tratamiento con ciclofosfamida mostró que la depuración de lactobacilos en bazo tenía cinéticas similares en ambos grupos, sin verse afectada por el tratamiento inmunosupresor.

El desarrollo de estos objetivos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

Primera: La aplicación de criterios de selección ha permitido caracterizar, a partir de 57 aislados de lactobacilos procedentes de diversas muestras, dos cepas de *Lactobacillus fermentum*, designadas como D3 y B16, que poseen las características básicas para considerarlas candidatas a microorganismos probióticos.

Segunda: Los estudios de antibiosis, comúnmente incluidos entre las pruebas de cribado de nuevas cepas probióticas, tienen un valor limitado, ya que, cuando la bacteria candidata crece en medios con alto contenido en dextrosa, la inhibición de bacterias de prueba ocurre por efecto del descenso de pH causado por la producción de ácidos, que es poco probable que opere *in vivo* y puede enmascarar otros mecanismos de antibiosis.

Tercera: La administración continuada de la cepa D3 a ratones por vía intragástrica incrementa la capacidad de respuesta de los linfocitos esplénicos y modula la producción de citoquinas, potenciando la producción de la citoquina antiinflamatoria interleukina 10 y del interferón gamma, mediador crucial de la inmunidad celular efectiva frente a patógenos intracelulares.

Cuarta: La administración continuada de la cepa D3 a ratones por vía intragástrica incrementa la resistencia a la infección experimental por el patógeno intestinal extracelular *Yersinia enterocolitica* y por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*.

Quinta: Las cepas D3 y B16 mostraron buenos perfiles de bioseguridad, ya que ninguna de las dos expresó enzimas indeseables ni resistencias documentadas como transmisibles dentro del género *Lactobacillus*. Adicionalmente, D3, inoculada a ratones inmunocomprometidos, fue depurada con la misma cinética que en ratones inmunocompetentes.

Publicación original adjunta: Bujalance C, Jiménez-Valera M, Moreno E, Ruiz-López MD, Lasserrot A y Ruiz-Bravo A. 2014. Lack of correlation between in vitro antibiosis and in vivo protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. Res. Microbiol. 165:14-20.

La cepa D3 ha sido objeto de una Patente Europea PCT/EP 2012058214 titulada "*Lactobacillus fermentum* CECT 7472 strain with probiotic properties".

## **ABSTRACT**

Probiotics are microorganisms that confer beneficial effects upon host health when administered as dietary supplements through oral route, at an adequate dosage, thus providing benefits beyond inherent basic nutrition. The World Gastroenterology Organisation (WGO) highlights that only microorganisms whose beneficial effects have been demonstrated in controlled human trials should be denominated probiotics. Research on probiotic microorganisms is a cutting-edge topic and an increasing interest area. The study of probiotic lactobacilli is one of the research lines of the Microbial Immunology research group (BIO 201) of the University of Granada, where this Doctoral Thesis was carried out. The present work was designed with the main aim of characterizing new lactobacillus strains with the biological properties and technological robustness that confer them the potential to be considered promising candidates to probiotics.

The first specific objective was to select strains that meet minimum required criteria for a probiotic bacterium. Two screening phases were performed, the first one focusing on milk samples, colostrum, udder and intestinal content from goat livestock; and the second one using a variety of samples of animal and human origin. Samples were spread in MRS agar and nonsporulated Gram-positive, catalase-negative

bacilli were selected and phenotypically identified based on their biochemical profiles obtained through the API 50 CH System. The strains were assayed for resistance to acidic pH and bile salts, adherence to Caco-2 cells and antibiosis against intestinal pathogenic bacteria. Fifty-seven strains that presented characteristics compatible with lactobacilli were isolated, with the following species distribution: *Lactobacillus fermentum*, 35,1 %; *Lactobacillus plantarum*, 19,3 %; *Lactobacillus salivarius*, 10,5 %; *Lactobacillus acidophilus*, 7 %; *Lactobacillus lactis*, 5,3 %; *Lactobacillus brevis*, 5,3 %; *Lactobacillus reuterii*, 3,5 %; *Lactobacillus paracasei*, 1,8 %; *Lactobacillus animalis*, 1,8 %; and not reliably identified species, 10,5 %. Strains A2 (*L. acidophilus*), D3 (*L. fermentum*), ALH4 (*Lactobacillus sp.*) and C12 (*L. acidophilus*) were the only ones that were able to grow both in acidic pH and in the presence of 0.05% bile salts. Strains A2 and D3 were identified with high reliability (99,9 %) and were chosen for the cell adherence assay: both showed high adherence ability, showing strain D3 a significantly higher adherence capacity. In the antibiosis assays, performed using the double-layer agar method, all the strains were able to inhibit the growth of enteropathogenic bacteria to a greater or lesser extent. This inhibition was due to acid production from dextrose, whose concentration is high (20 g/L) in MRS agar medium, a fact that questions the actual significance of this test, which is widely accepted among probiotic screening assays. The intestinal environment is unlikely to possess dextrose in sufficient amount to yield enough acid to lower pH to a value that inhibits pathogenic microorganisms. An

extensive discussion on these results and on the actual value of this test is presented in the original publication required for the submission of this thesis (Bujalance et al., 2014). In the light of the results in the screening phase, strains D3 and B16 were selected upon their advantageous profiles as the most promising candidates to probiotics. The identification of both strains as belonging to the species *L. fermentum* was confirmed through sequencing of the gene coding for 16S rRNA, using the universal primers fD1 and rD1, synthesized by Sigma Genosis (UK).

The second specific objective was focused on the evaluation of the technological robustness of strain D3, a feature of great importance for its industrial use. This strain showed an outstanding viability when it was serially subcultured in MRS agar and Rogosa agar for a period longer than a year. Cryopreservation at -80°C was proved an excellent conservation method for strain D3 and the use of cryoprotectants, such as inositol, sucrose, dimethylsulfoxide and skimmed milk, as well as mixtures of dimethylsulfoxide-sucrose, was adequate; whereas glycerol and lactose showed acceptable but lower viability indices. Finally, lyophilization was successfully used for the conservation of strain D3, since excellent viability levels were obtained for lyophilisates stored at room temperature for more than 30 days, particularly using a mixture of trehalose + sucrose as lyoprotector.

The third specific objective was the determination of the immunomodulatory activity of strain D3 through *ex vivo*

assays on mice. This assay was designed using two groups of BALB/c mice: in one of them, every animal received a daily dose of  $10^9$  lactobacilli in skimmed milk as a vehicle for 12 days, while mice of the other group received only the vehicle in the same schedule. The administration of dose and vehicle was intragastric. The responses of cultured splenocytes were compared in the presence of lipopolysaccharide (LPS) used as B lymphocyte mitogen and concanavalin A (ConA) as T lymphocyte mitogen. Treatment with D3 led to an increase in the general response of splenic lymphocytes, but this effect was significant only on B-lymphocytes. Along with these results, the enhancement of IL-10 production in cultures stimulated with LPS and IFN-gamma production in cultures stimulated with ConA, lead to the conclusion that there was an overall systemic enhancement in the lymphocyte response, thus both stimulating cell mediated immunity and causing an anti-inflammatory effect. This situation might be interpreted as an increase in the resistance to infections due to extracellular pathogens (enhancement of lymphocyte B, responsible for the production of antibodies) and intracellular pathogens as well (enhancement of IFN-gamma production, ensuring macrophage activation). The anti-inflammatory activity might also lead to a reduction in the harm caused by inflammatory reactions associated to the presence of pathogenic microorganisms in the tissue.

The fourth specific objective was to investigate whether strain D3 was able to modify resistance to experimental infection with enteropathogenic bacteria in BALB/c mice. Two different

infection models were used: the first one consisted in the intragastric inoculation of *Yersinia enterocolitica* serotype O9, an extracellular pathogen with moderate virulence, causing an asymptomatic self-limiting intestinal infection that can be monitored through stool test in selective media during the two-months infection; in the second one, *Listeria monocytogenes* was inoculated through the same route. *L. monocytogenes* is an intracellular pathogen with higher virulence that causes a systemic infection that can be monitored through quantitative spleen and liver cultures. Treatment with strain D3, which started 12 days before inoculation and continued thereafter until the end of the experiment, was able to significantly accelerate yersinia removal from feces, reaching stool test negativization in 100% of infected animals on day 50 post infection, whereas in control animals negativization was achieved on day 70 post infection. Regarding the infection model using the bacterial clearance from spleen and liver was significantly improved in animals treated with strain D3 from 12 days before infection. In both models, D3 effect is attributable to the stimulation of the immune system: for the *Y. enterocolitica* infection, the effect appeared in the long term, reason why this effect does not seem to be related to antibiosis or competition for mucosa receptors. In the *L. monocytogenes* infection model, the effect was systemic and could be quantified in spleen and liver, where lactobacilli were not present. Immunomodulating effects described during the course of the former objective should provide the basis of the increase in resistance to infection caused by both pathogens.

The last specific objective was focused on the biosafety evaluation of strains D3 and B16. The *European Food Safety Authority* applies the *Qualified Presumption of Safety* (QPS) status to *L. fermentum*, but it is recommendable to perform safety assays on new strains. These have been aimed at three levels: (1) absence of undesirable enzymes related to carcinogen production; (2) absence of transferable resistance to antimicrobial agents of relevance to human clinics; and (3) absence of pathogenicity in experimental models using immunocompromised animals. Regarding the absence of undesirable enzymes, detected by the API ZYM system, both strains D3 and B16 were proved to lack  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. With regard to the possibility of transference of resistance to other microorganisms, the sensitivity spectra to the most relevant antibiotic classes was studied in both strains, showing resistance to fluoroquinolones, fosfomycin and several aminoglycosides but they turned out to be sensitive to macrolides, including erythromycin and tetracyclines, agents for which the existence of mobile genes of resistance, transferible to other bacteria, has been reported. Finally, inoculation of strain D3 through intravenous route of normal and cyclofosfamide-treated neutropenic BALB/c mice showed that lactobacilli clearance in spleen followed the same kinetics in both groups and it was not influenced by the immunosuppressive treatment.

The development of these objectives allowed to draw the following conclusions:

First, the application of selection criteria on 57 lactobacilli isolated in a variety of samples, allowed for the characterization of two *Lactobacillus fermentum* strains, designated D3 and B16 that possess the basic characteristics to be considered candidates to probiotic microorganisms.

Second, antibiosis assays, usually included in the screening of new probiotic strains, have a limited value given that the growth of the candidate bacteria in high dextrose concentration media leads to the inhibition of test bacteria due to the pH decrease occurred as a consequence of the acid production that would unlikely happen *in vivo*, masking other antibiosis mechanisms.

Third, continuous administration of strain D3 through intragastric route on mice increases the response ability in splenic lymphocytes and modulates cytokines production, enhancing the production of the anti-inflammatory interleukin 10 and gamma interferon, a crucial mediator of the cellular immune response that is effective against intracellular pathogens.

Fourth, the continuous administration of strain D3 through intragastric route on mice increases resistance to the experimental infection with the extracellular enteropathogen *Yersinia enterocolitica* and with the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*.

Fifth, strains D3 and B16 showed good biosafety profiles, since none of them expressed undesirable enzymes or resistances reported as transferable among genus *Lactobacillus*. Furthermore, strain D3 inoculated in immunocompromised mice was cleared with the same kinetics as in immunocompetent mice.

Attached Original Publication: Bujalance C, Jiménez-Valera M, Moreno E, Ruiz-López MD, Lasserrot A y Ruiz-Bravo A. 2014. Lack of correlation between in vitro antibiosis and in vivo protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. Res. Microbiol. 165:14-20.

Strain D3 was the object of European Patent PCT/EP 2012058214 as "*Lactobacillus fermentum* CECT 7472 strain with probiotic properties".

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. La colonización microbiana de los humanos.**

Se estima que la vida empezó sobre la Tierra hace unos 4.000 millones de años. Aunque es un tema propicio a las especulaciones teóricas, desconocemos cómo eran las primeras formas de vida, pero sí resulta evidente que los linajes evolutivos que se fueron estableciendo consistieron en seres unicelulares de organización procariota, es decir, lo que hoy conocemos como arqueas y bacterias.

Las formas de vida más complejas, los actuales vertebrados y, en especial, aves y mamíferos, son unos auténticos recién llegados a un mundo de microorganismos.

El éxito evolutivo de los microorganismos es innegable; independientemente de constituir el origen de los seres vivos más complejos, los microorganismos continúan como tales poblando la superficie terrestre, incluso en ambientes de condiciones extremas. Ese éxito se debió a la capacidad de adaptación a nuevos hábitats merced al potencial de sus genomas. Los fenómenos de endosimbiosis entre estos microorganismos, como es el caso de las mitocondrias, fueron el origen de la organización eucariota, que tiene menos de 2.000 millones de años de edad, y de cuya organización surgieron los primeros seres pluricelulares, hace algo menos de 1.500 millones de años. De otra parte el fenómeno de la

fagocitosis dotó a las células eucariotas de la capacidad para fagocitar bacterias y ha devenido uno de los más eficaces mecanismos defensivos de los vertebrados.

Consecuentemente la aparición de seres pluricelulares cada vez más sofisticados significó también la aparición de nuevos nichos ecológicos que podían ser explotados por los microorganismos, y estos no desaprovecharon la ocasión de establecer todo tipo de relaciones con sus hospedadores. La coevolución de hospedadores pluricelulares y microorganismos es una larga historia que ha dejado sus huellas en los genomas de ambos protagonistas y que ha conferido la posibilidad a algunas bacterias de colonizar tejidos de hospedadores pluricelulares alcanzando así muy diferentes y diversos grados de especialización.

En un primer escalón se sitúan bacterias que pueden subsistir en vida libre, pero que también son capaces de ocupar nichos ecológicos en hospedadores: en estos casos, la versatilidad metabólica exige genomas grandes, que albergan genes necesarios para aprovechar una gran variedad de sustratos y genes reguladores conectados con sensores para que la bacteria se adapte al ambiente en que se encuentre en cada momento.

En escalones sucesivos, se sitúan bacterias cada vez más especializadas para vivir en el hospedador, hasta llegar a casos extremos como las endosimbiontes de algunos artrópodos o los patógenos intracelulares obligados de mamíferos.

La explotación por las bacterias de nuevos nichos ecológicos las llevó también a la colonización de los mamíferos como el ser humano, siendo en algunos casos finalmente reconocidos y tolerados por sus sistemas inmunitarios sin hacer nada por rechazarlos.

Estos procesos de especialización conllevan una progresiva reducción y fragmentación del genoma, ya que se pierden genes implicados en funciones que la bacteria no necesita realizar porque utiliza funciones similares de las células del hospedador.

Así, en todas estas categorías, se establecen relaciones que pueden ser beneficiosas o perjudiciales para el hospedador.

La colonización microbiana del ser humano se inicia en el momento del nacimiento pues en el claustro materno el feto vive en un ambiente estéril, es en el momento del parto cuando entra en contacto con los microorganismos presentes en el canal del parto y en el ambiente exterior, y en los nacidos por cesárea directamente con el ambiente exterior.

Resultado de la colonización progresiva viene pues a establecerse una microbiota de ocupación en las superficies epidérmicas, las mucosas y los aparatos digestivo y genito-urinario. Se trata de una relación con el hospedador de carácter simbiótico mutualista esencial para la vida del mamífero.

Estudios con ratones libres de gérmenes, denominados germen-free, es decir que carecen de microbiota porque han sido obtenidos por cesárea y mantenidos artificialmente en

ambiente estéril, mostraron un desarrollo mínimo del tejido linfoide, especialmente del asociado a mucosas, y son mucho más susceptibles a infecciones.

La microbiota humana se encuentra constituida tanto por especies que pueden ser estables (microorganismos autóctonos o indígenas) como no estables (microorganismos alóctonos), estos últimos acceden al hábitat colonizado por la microbiota autóctona, pero de forma transeúnte, es decir temporal, siendo más duradera si están relacionados con los géneros y especies de la microbiota autóctona; pues una vez estabilizados dichos ecosistemas es difícil modificarlos significativamente por la llegada de nuevas bacterias salvo en casos de infecciones severas, patologías o tratamientos farmacológicos.

Resultado de la importante colonización del ser humano por los microbios, así como de las investigaciones que en los últimos años vienen realizándose en este campo científico, se ha acuñado el término "microbioma humano" para referirse al conjunto de microorganismos que han colonizado nuestro organismo. El rol que juega en la salud y en la enfermedad el microbioma humano es objeto de numerosos estudios especialmente desde hace una década, no obstante su influencia aunque parece cada vez más evidente aún se encuentra lejos de ser bien conocida.

El uso de técnicas de biología molecular a partir de las regiones conservadas del gen 16S rRNA aplicadas al análisis

filogenético ha permitido conocer y detectar bacterias viables no cultivables lo cual ha supuesto un importante avance en el conocimiento de la microbioma así como de sus genomas.

Dichas técnicas han sido utilizadas para mapear la biodiversidad microbiana del organismo humano, las comunidades y sus hábitats en los diferentes ambientes de la anatomía humana, todo ello en el curso de las investigaciones que han sido objeto del HMP, acrónimo de "proyecto microbioma humano", iniciativa del año 2007 del Instituto Nacional de la salud de EEUU y realizado en colaboración entre diferentes países y cuatro centros de estudios genómicos: el Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, el Broad Institute, el J. Craig Venter Institute, y el Genome Center at Washington University (National Institutes of Health, 2007).

Otros importantes proyectos han venido a aumentar el estado global de conocimiento sobre el Microbioma Humano, proyectos todos consorciados y liderados por diferentes países como: Francia (MicroObes), China (MetaGut), Australia (Urogenital Microbiome Consortium), Canadá (Canadá Microbiome Initiative), Japón (Human MetaGenome Consortium) con un importe aproximado de 170 millones de dólares.

Los avances conseguidos a través de los proyectos sobre el Microbioma Humano ha llevado la biología humana hasta una nueva frontera del conocimiento, la de "nuestra historia interior" (Mullard, 2008).

Ahora sabemos que la comunidad microbiana que nos ha colonizado a lo largo de la evolución incluye principalmente bacterias, y minoritariamente, hongos, protozoos y virus, cuyos genomas superan en órdenes de magnitud el genoma humano y que ha sido denominado como el “Microbioma Humano”.

Entre los procariotas encontramos representados los Reinos Bacteria y Archaea, 9 Phylum, 18 Clases y 24 órdenes. Los Phylum mayoritarios encontrados son: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria y entre ellas los géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Anaerococcus*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Acitenobacter*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Propionibacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Desulfurovibrio*, *Flavobacterium*. (Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium *et al.*, 2010)

El papel que juega el microbioma humano en cambios relacionados con la salud y la enfermedad puede ser relevante en función de su biodiversidad y variabilidad debida a cambios en el medio ambiente de los ecosistemas colonizados.

Por todo lo anterior, conocer como se encuentran organizadas las diferentes comunidades bacterianas, sus proporciones relativas y las relaciones existentes entre ellas y con el hospedador en relación con la salud y enfermedad de este son objeto de novedosas y diferentes líneas de investigación a nivel global.

## **1.2. La microbiota del sistema digestivo.**

El tracto digestivo presenta una diversidad de condiciones anatómicas, funcionales y ambientales que permiten diferenciar varias partes: la cavidad bucal, con una ecología muy compleja que incluye protozoos, levaduras y bacterias; el esófago, zona de tránsito, con muy escasos microorganismos autóctonos, el estómago, donde las condiciones de pH ácido y enzimas proteolíticas no favorecen el desarrollo ni el asentamiento de muchos microorganismos; suelen encontrarse *Helicobacter pylori* relacionado con úlceras gástrico-duodenal y algunos *Lactobacillus*.

En el inicio del intestino delgado, el duodeno, el pH se neutraliza, por lo que las poblaciones microbianas se van incrementando conforme se avanza hacia las porciones distales, yeyuno e íleon, aunque los fluidos pancreáticos y la presencia de bilis impide el asentamiento de los microorganismos sensibles a este agente detergente; en yeyuno ya se encuentran lactobacilos y en íleon van aumentando progresivamente para finalmente en el intestino

grueso encontrar la mayor cantidad y biodiversidad de microorganismos indígenas, especialmente desde el ciego al recto.

Junto con el proyecto HMP, el proyecto MetaHIT «metagenómica del tracto intestinal humano», financiado en parte a través del Séptimo Programa Marco Europeo y al que se adjudicaron fondos europeos por valor de 11,4 millones de euros para el período 2008-2012 y en el que participaron 14 socios de China, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Países Bajos, España y Reino Unido, tuvo como principal objetivo intentar averiguar los vínculos que existen entre los genes de la microbiota intestinal humana, la salud y enfermedades importantes (MetaHit, 2012).

Ambos macroproyectos han pretendido dilucidar muchas cuestiones relevantes al microbioma humano y han logrado aportaciones significativas a la vez que focalizar el esfuerzo de muchos grupos de investigación hacia este apasionante y relevante campo de estudio.

En la microbiota intestinal predominan los Phylum Bacteroidetes y Firmicutes, seguidos de Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria, y Verrucomicrobia (Turnbaugh *et al.*, 2007). Respecto del Phylum Archaea hay pocas especies representadas, siendo estas principalmente metanogénicas y minoritariamente en torno al 0.1% levaduras, protozoos y virus tanto bacteriófagos como virus humanos. (Robles-Alonso y Guarner, 2013.)

A nivel del colon encontramos la microbiota intestinal más diversa y abundante, del orden de  $10^{14}$  microorganismos, aproximadamente el 10% del microbioma humano. Esto significa que el conjunto de seres humanos sobre la Tierra constituye un reservorio que se aproxima a  $10^{24}$  células microbianas, cinco unidades logarítmicas por debajo de la masa microbiana presente en toda el agua marina del mundo, lo que le otorga una evidente relevancia dentro de la biosfera (Ley *et al.*, 2006).

Ya en 2005 un estudio de la mucosa colónica y heces de individuos sanos avanzó 13.355 secuencias genéticas procarióticas muchas no cultivables y de nuevos microorganismos, avanzando la enorme biodiversidad microbiana intestinal a nivel del colon (Eckburg *et al.*, 2005).

Estudios posteriores incluyen del orden de 1.000 a 1.150 especies diferentes de bacterias, un 80% no cultivables, todas objeto aún de diferentes estudios, con una media por individuo de 160 especies y que puede llegar a pesar 2 Kg. (Human Microbiome Project Consortium, 2012 b)

El análisis metagenómico de muestras fecales de 124 adultos Europeos ha permitido identificar 3,3 millones de genes no redundantes que se suponen hasta donde según se conoce hoy codifican para aproximadamente 20.000 actividades biológicas bacterianas y con una media de 600.000 genes por

individuo de los cuales 300.000 genes serían comunes al 50% de los individuos. (Qin *et al.*, 2010)

Cantidad ampliada posteriormente merced a las investigaciones del HMP a nivel intestinal, y no solo fecal, han ampliado esta cantidad hasta alcanzar los 5 millones de genes aproximadamente.

Podría afirmarse que el genoma de la microbiota intestinal viene a completar y tal vez a través de determinadas actividades "mejorar" el genoma humano. (Li *et al.*, 2008).

De los genes identificados, el 98% correspondieron a bacterias, anaerobias estrictas o facultativas: Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria y Verrucomicrobium, y siendo los géneros más abundantes Bacteroides, Faecalibacterium y Bifidobacterium, presentando gran diversidad de especies. (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Según Qin *et al.* (2010) los genomas más frecuentes encontrados se corresponden con los géneros mayoritarios: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Butyrivibrio*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Actinomyces*, *Anaerotruncus*, *Blautia*, *Holdemania*, *Subdoligranulum*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Collinsella*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Alistipes*, *Actinobacillus*.

La composición y densidades relativas de esta comunidad bacteriana varía considerablemente entre diferentes personas lo cual podría obedecer, entre otras muchas causas, a la manera en que cada sistema inmunitario acepta o rechaza bacterias al diferenciar entre bacterias «buenas» y «malas». Factores ambientales además de la edad, raza, sexo, índice de masa corporal, lactancia materna, tipo de parto, enfermedades, tratamientos farmacológicos especialmente antimicrobianos, y la susceptibilidad genética, podrían si bien no determinar si influir en el tipo de microbiota intestinal. Encontrando un perfil genético funcional similar en individuos sanos (Human Microbiome Project Consortium, 2012 a).

La microbiota intestinal puede considerarse por tanto un “órgano adquirido” que se estabiliza a partir de los tres años de edad en base a factores genéticos, epigenéticos, geográficos y ambientales (Yatsunenکو *et al.*, 2012).

El proyecto MetaHIIt concluyó que la microbiota intestinal de los seres humanos puede permitir su clasificación, a modo de tarjeta de identidad, en base a marcadores genéticos de dicha microbiota, de manera similar a como ocurre con los grupos sanguíneos (Qin *et al.*, 2010). Podría ser portanto la nueva huella dactilar microbiana del individuo (Franzosa *et al.*, 2015).

De otra parte relevantes investigaciones han encontrado que el ecosistema intestinal humano en el adulto puede clasificarse en tres grandes grupos denominados

“Enterotipos”, según la abundancia relativa de tres Géneros: Bacteroides (E1), Prevotella (E2) y Ruminococcus (E3). Encontrando un núcleo individual, y un núcleo común. (Arumugam *et al.*, 2011). Estos enterotipos al parecer tienen su origen en patrones dietéticos de larga evolución relacionados con la proporción relativa de la ingesta de azúcares, proteínas y grasas.

Una característica esta sorprendente y fundamental en la biología humana que abre nuevos y esperanzadores horizontes para el análisis genómico y funcional de las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal, hasta hace poco una verdadera caja negra, y a la comprensión de su relación con los estados fenotípicos de salud y enfermedad del hospedador, señalando el camino hacia nuevos marcadores predictivos de origen microbiano así como a futuras vías terapéuticas individualizadas y eficaces, además de proporcionar estrategias nutricionales saludables.

Lo cual viene a corroborar aquellas publicaciones científicas, que desde hace más de diez años vienen a fundamentar con base científica la microbiota del intestino grueso con el bienestar, la salud y los estados de enfermedad del hospedador humano. (Bäckhed *et al.*, 2005.), y en definitiva las ideas de Metchnikoff.

### **1.3 Microbiota intestinal y mucosa intestinal.**

La microbiota intestinal no se puede tratar exclusivamente como un nuevo tejido o super-organismo, si no que para comprenderla es preciso abordarla desde una perspectiva integradora, observándola como parte de un ecosistema de estructura y funciones complejas sometido a una dinámica nada sencilla, aún lejos de ser bien conocida, como corresponde al ecosistema intestinal, el cual depende de variables de gran influencia como: secreciones, metabolitos, toxinas, enzimas, ácidos grasos volátiles, amoníaco, metano, oxígeno y anhídrido carbónico además de otros gases, contenido en agua, vitaminas, péptidos, aminoácidos, grasas, azúcares, nucleótidos, urea, nitrógeno no proteico, minerales, electrolitos, pH y potencial redox, entre otros.

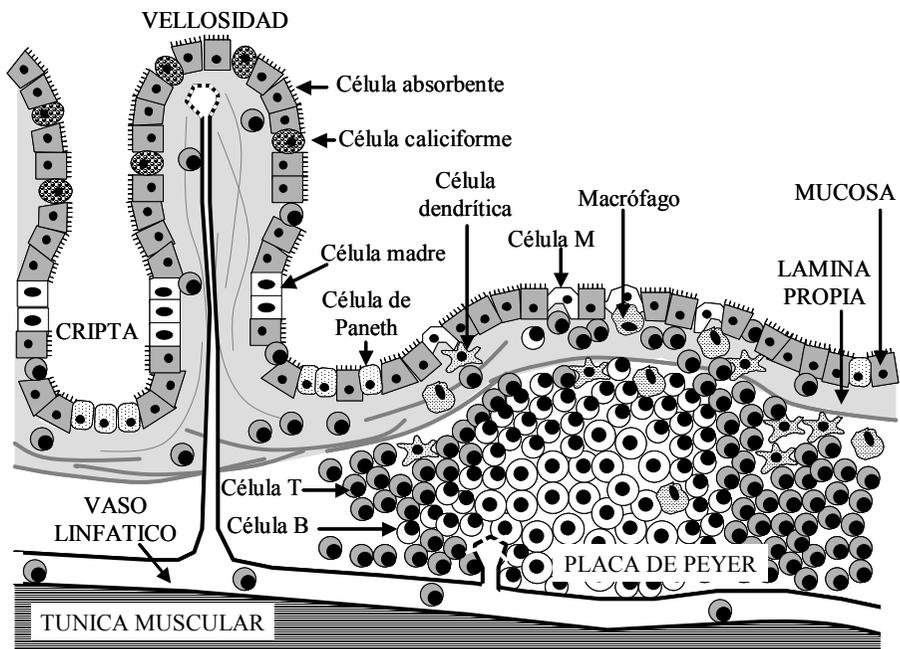
Un ecosistema el intestinal del que forma parte la mucosa intestinal, la cual constituye una frontera semipermeable y una línea defensiva entre un medio externo especial (el espacio luminal) y el medio interno. Esta mucosa constituye la mayor superficie del cuerpo humano en contacto con el ambiente exterior pudiendo alcanzar las 300 m<sup>2</sup>, estableciendo el hábitat óptimo para los numerosos microorganismos de la microbiota, a la vez que presenta eficaces mecanismos antimicrobianos. (Liévin-Le Moal y Servin, 2006).

La Figura 1.1 esquematiza un corte histológico del intestino delgado. Las vellosidades intestinales y las criptas

de Lieberkühn se encuentran recubiertas de un epitelio de células con microvellosidades en la superficie apical, las cuales en continua renovación proceden de células madre pluripotenciales localizadas en el cuello de las criptas. Las células madre se diferencian en cuatro tipos celulares: células absorbentes, células caliciformes (secretoras de mucus), células enteroendocrinas y células de Paneth (secretoras de sustancias antimicrobianas). Bajo este epitelio se encuentra la lámina propia, que rellena el interior de las vellosidades, por donde discurren los conductos quilíferos que drenan en plexos linfáticos.

En una mucosa intestinal intacta, las uniones entre los enterocitos constituyen una excelente barrera que excluye el paso de macromoléculas y patógenos (Dotan y Mayer, 2003). Además, las células de Paneth, abundantes en el fondo de las criptas de Lieberkühn, son protagonistas de importantes funciones defensivas inmunitarias inespecíficas como respuesta a estímulos diversos entre los que pueden incluirse productos bacterianos (lipopolisacárido, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos), neurotransmisores (acetilcolina) o citokinas producidas por linfocitos, produciendo así las células de Paneth una diversidad de agentes antimicrobianos (lisozima, defensinas, fosfolipasa  $A_2$ ), citokinas proinflamatorias y estimuladoras (tumor necrosis factor  $\alpha$  o TNF- $\alpha$ , colony stimulating factor 1 o CSF-1, epithelial growth factor o EGF), además de enzimas y otras moléculas que participan en la defensa frente a microorganismos, la

respuesta inflamatoria, el crecimiento de células epiteliales y otras funciones metabólicas (Keshav, 2004).



**Figura 1.1. Esquema de la organización histológica en el intestino delgado. El dibujo no está realizado a escala y el tamaño de las células se ha exagerado por razones de claridad.**

La mucosa intestinal se encuentra protegida por dos capas de glicoconjugados unidas a la superficie celular: las glicoproteínas y glicolípidos del glicocálix, y por encima de éstas, la secreción mucosa de las células caliciformes (Freitas

y Cayuela, 2000), secreción que posee naturaleza de gel y cuya composición incluye mucinas y glucoproteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a aminoácidos del tipo: serinas, prolinas y treonina, pudiendo representar la parte glucídica hasta el 80% de la masa molecular (Liévin-Le Moal y Servin, 2006).

Además de poseer una función protectora y lubricante de la superficie de la mucosa, el gel constituye una barrera para ciertos enteropatógenos como *Yersinia enterocolitica* o *Shigella flexneri*, así como para los rotavirus (Liévin-Le Moal y Servin, 2006).

Las mucinas sin embargo pueden ser degradadas por glicosidasas y esterasas de bacterias de la microbiota (Freitas y Cayuela, 2000), suministrando como productos de la degradación nutrientes para el crecimiento bacteriano, que pueden ser aprovechados por algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus (Macfarlane *et al.*, 2000), o bien oportunistas facilitándose un sobrecrecimiento microbiano excesivo, que a nivel del intestino delgado provoca un síndrome heterogéneo que presenta síntomas diversos incluidos malabsorción y desnutrición.

Como otras mucosas del cuerpo, la del tracto digestivo se encuentra asociada a elementos de tejido linfoide (MALT, de *mucosa-associated lymphoid tissue*) que defienden estas críticas zonas fronterizas.

El MALT del tracto digestivo incluye tejido linfoide anatómicamente estructurado como: amígdalas, apéndice y placas de Peyer, y tejido linfoide difuso (linfocitos

intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia). El MALT del intestino ha sido denominado GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) (Bujalance, 2006).

En el ser humano adulto, el GALT llega a ser el principal órgano linfopoyético, donde se producen tanto células B como T (Sell, 2001). La mayoría de los linfocitos intraepiteliales son células T CD8<sup>+</sup>, con el receptor específico (TCR, de *T-cell receptor*)  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ , encontrándose también fenotipos que son infrecuentes en las células T circulantes, como el "doble negativo" CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR  $\gamma/\delta$  (Dotan y Mayer, 2003). Los linfocitos de la lámina propia constituyen por si mismos una población heterogénea, con proporciones relativas de células B y T, y, como subpoblaciones de estas células: T, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, similares a las encontradas en otros órganos linfoides (Dotan y Mayer, 2003).

Las placas de Peyer funcionan como un "*locus* inductivo", donde se inician las respuestas a muchos antígenos (Simpson y Wetzler, 2004), pero también constituyen el principal "*locus*" donde se determina la tolerancia o ausencia de respuesta a antígenos administrados por vía oral, a dosis altas o bajas (en función de las dosis óptimas para inducir respuesta) (Dotan y Mayer, 2003). La llegada de antígenos desde la luz intestinal se realiza preferentemente a través de las células M (inicial de *microfolds*, en referencia a los pliegues que muestra la superficie de estas células), localizadas en el epitelio que recubre la parte luminal de las placas de Peyer. Las células M están especializadas en la endocitosis de macromoléculas y partículas desde la luz

intestinal y su posterior exocitosis, a través de su membrana basal, hacia la lámina propia: por tanto, es una vía para la translocación de antígenos a través de la mucosa. La cara basal de las células M muestra grandes invaginaciones, donde vienen a situarse macrófagos y células dendríticas con capacidad endocítica de los antígenos translocados, así como de procesamiento y presentación de los correspondientes oligopéptidos con valor de epítopos a las células T (Simpson y Wetzler, 2004).

Junto con las células M, los propios enterocitos pueden también capturar antígenos lumbinales, procesarlos y presentarlos a linfocitos T; destacar en este sentido que los enterocitos, al igual que otras células del organismo pueden expresar constitutivamente moléculas codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, MHC-I, (*major histocompatibility complex*), lo que les dota de capacidad para presentar antígenos procesados por vía endógena a las células CTL CD8<sup>+</sup> (CTL, de *cytotoxic T lymphocytes*), pero también, en respuesta a estímulos, expresan moléculas MHC-II, por lo que pueden procesar antígenos por la vía exógena y presentar los correspondientes oligopéptidos a células T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub> o *T helper*) (Dotan y Mayer, 2003).

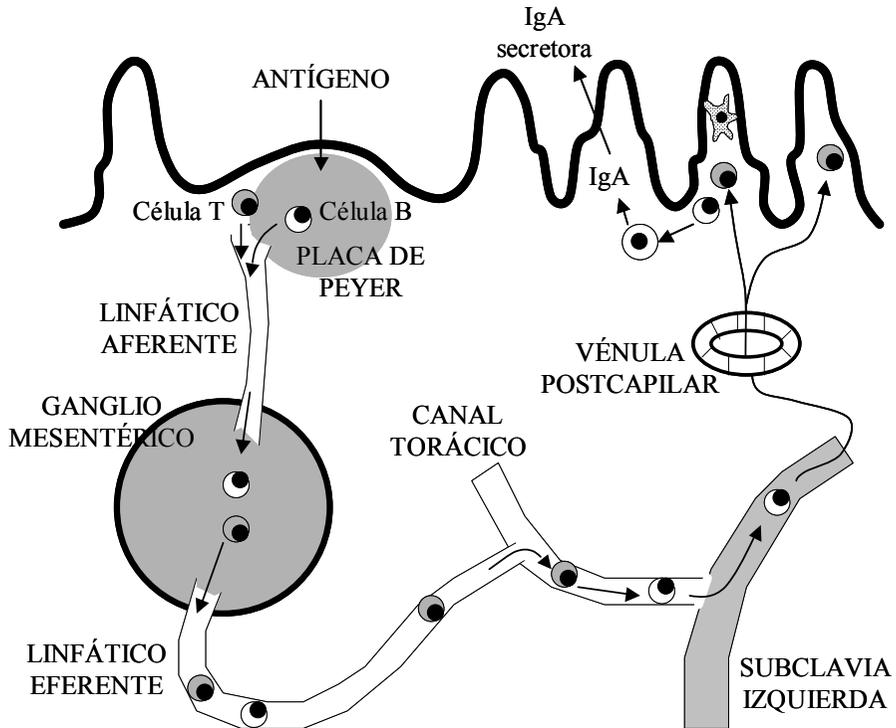
La presentación antigénica a través de una célula "no profesional", como el enterocito, podría formar parte de las vías de inducción de "tolerancia oral" inducida por dosis altas de antígeno, ya que una presentación inadecuada (por ejemplo, en ausencia de señales coestimuladoras) puede provocar anergia en las células T (Dotan y Mayer, 2003). Es

precisamente en la tolerancia oral inducida por dosis bajas de antígeno donde juega un papel clave la producción de citocinas supresoras como la interleukina 10 (IL-10), producida por las células  $T_H2$ , y la producción de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), producido por las células  $T_H3$ ; por tanto, esta tolerancia afecta a la inmunidad celular proinflamatoria (inhibición de las células  $T_H1$ ), pero no a la cooperación de células  $T_H2$  con los linfocitos B, con lo que se acompaña de una respuesta de anticuerpos secretores (inmunoglobulina A, IgA) (Dotan y Mayer, 2003).

A pesar del fenómeno de tolerancia oral, que presenta un papel crucial en la inhibición de respuestas indeseables frente a antígenos incorporados con la dieta o a través de la microbiota intestinal, es bien sabido que determinados antígenos administrados por vía oral pueden inducir una vigorosa respuesta inmune, sin que se conozcan aún en profundidad los mecanismos que determinan un resultado u otro (Simpson y Wetzler, 2004).

A raíz de lo anteriormente expuesto, las placas de Peyer constituyen una de las principales localizaciones donde se inician las respuestas a estos antígenos, presentados por macrófagos o células dendríticas; pues parte de los linfocitos T y B activados en las placas de Peyer pasarán a la circulación linfática y de ella a la sanguínea, para retornar posteriormente a los sitios efectores del GALT (lámina propia), donde tiene lugar la producción de anticuerpos en forma de Inmunoglobulinas de tipo A secretoras (IgA

secretora) (Simpson y Wetzler, 2004), como se muestra en la Figura 1.2.



**Figura 1.2. Recirculación de linfocitos tras la activación en placas de Peyer.**

#### **1.4 Microbiota intestinal e influencia sobre el hospedador humano.**

La microbiota intestinal es pues una comunidad ecológica dinámica y compleja, que participa en la digestión de los alimentos, la producción y descomposición de toxinas, la producción de algunas vitaminas B y K, y aminoácidos esenciales y la formación de barreras contra organismos invasores manteniendo la integridad de la mucosa intestinal y combatiendo las agresiones de otros microorganismos, entre otras importantes funciones que iremos exponiendo seguidamente. La microbiota puede ejercer efectos beneficiosos y/o perjudicial estando dichos efectos balanceados en función de su propio balance microbiano (Neu, 2014).

Puede afirmarse por tanto que el ecosistema intestinal posee una homeostasis propia resultado de múltiples interacciones entre la microbiota intestinal, los productos y sustancias presentes en el lumen intestinal, la barrera epitelial y la inmunidad mucosal, mereciendo estas dos últimas detenerse para una descripción más detallada dada su elevada importancia.

La barrera epitelial, reforzada por la inmunidad mucosal, intenta proteger la homeostasis del medio interno de los posibles efectos nocivos de los componentes de la microbiota, pero a su vez estos ejercen una serie de funciones importantes para la salud del hospedador relacionadas con el

sistema inmune, entre los que destaca el desarrollo del GALT al inicio de la vida del neonato, además de la regulación de los mecanismos inmunitarios, la potenciación de la inmunidad mucosal, (Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000; Liévin-Le Moal y Servin, 2006) y la resistencia a infecciones intestinales por mecanismos directos como la competencia por nutrientes o la producción de sustancias con carácter antibiótico y también por mecanismos indirectos como podría ser a través de la regulación de la expresión de genes en las células de Paneth, que tal vez impliquen a los linfocitos T intraepiteliales, como ha podido demostrarse en experiencias utilizando ratones axénicos y gnotobióticos (Keshav, 2004).

Los efectos de la microbiota intestinal sobre la inmunidad mucosal están mediados por componentes y metabolitos microbianos que incluyen un amplio abanico de antígenos, además de otros componentes diversos capaces de ejercer efectos sobre las células y los mecanismos de la inmunidad, tanto innata como específica. Los componentes bioactivos son comunes a grandes grupos microbianos y han sido denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Medzhitov y Janeway, 2000), aunque el hecho de que muchos de ellos estén presentes igualmente en bacterias no patógenas sugiere que una denominación más precisa sería la de MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004). Estas estructuras son reconocidas por receptores denominados PRRs (*pattern recognition receptors*), presentes como proteínas plasmáticas o en la superficie de diversos tipos celulares (macrófagos,

células dendríticas, mastocitos, enterocitos), con distribución no clonal (a diferencia de los receptores específicos de linfocitos). Especial interés presentan los PRR celulares conocidos como receptores tipo Toll o TLRs (*toll-like receptors*) (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005). Entre los TLRs conocidos y sus ligandos destacaremos: TLR-1/Lipopéptidos de bacterias Gram negativas, el TLR-4/Lipopolisacárido de Gram negativas y el TLR-5/Flagelina. (Bujalance Martínez-Cañavate, 2006). Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos animales inmunocompetentes e inmunocomprometidos.

La interacción de la microbiota con la mucosa la mantiene en un permanente estado de inflamación que ha dado en llamarse de "inflamación fisiológica" ocasionado por la infiltración de linfocitos y macrófagos. Las quimiocinas producidas por los enterocitos atraen células inflamatorias, y citocinas, que pueden actuar sobre ellos de forma autocrina; es el caso del TGF- $\alpha$  (mitogénico) y TGF- $\beta$  (antiproliferativo), que regulan la diferenciación celular en el epitelio de vellosidades y criptas, además de la acción antiinflamatoria de TGF- $\beta$ ; IL-6, con acción proinflamatoria; TNF- $\alpha$  con acción proinflamatoria; IL-10 con acción antiinflamatoria (Colgan *et al.*, 2003).

La unión de bacterias, productos bacterianos, virus o citocinas a receptores presentes en la superficie del enterocito, genera señales bioquímicas de activación que son

transferidas a través de vías de señalización, hasta el núcleo celular, desde donde se inician las correspondientes respuestas.

La presencia de microorganismos enteropatógenos ocasiona la aparición de intensas reacciones inflamatorias, es decir de inflamación patológica, las cuales usualmente se autolimitan restaurándose el estado de inflamación fisiológica (Dotan y Mayer, 2003) pero que también pueden degenerar y ser causa de diferentes desórdenes, síndromes y enfermedades como es el caso de la EII y la obesidad (Hattori y Taylor, 2009; Ley *et al.*, 2006).

Otras funciones atribuidas a la microbiota intestinal están relacionadas con su capacidad para modificar el contenido del lumen intestinal así como para producir modificaciones anatómico-funcionales del tracto digestivo tales como: disminución del volumen fecal por acción mucolítica, y aceleración del tránsito intestinal.

La microbiota intestinal como tal ecosistema se encuentra sometida a variaciones a las que como todo sistema biológico puede adaptarse en un cierto rango de cambio de las variables del medio, internas y externas, sin embargo como consecuencia de algunas situaciones puede verse afectada la homeostasis del ecosistema intestinal, desequilibrándose entonces los porcentajes relativos y tipos de poblaciones microbianas, dando lugar a lo que ha venido en llamarse como "disbiosis intestinales" y que en definitiva consisten en cambios en la estabilidad estructural y funcional de la

microbiota intestinal. Las disbiosis intestinales se encuentran en la etiología de diferentes alteraciones fisiológicas, síndromes y enfermedades entre las que se han descrito con mayor frecuencia son: Enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, diabetes, obesidad, cáncer colorectal, entre otras (Peterson *et al.*, 2015).

En la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de etiología desconocida, que agrupa a la enfermedad de Crohn y a la colitis ulcerosa el papel que juega la microbiota intestinal es clave, (Hold *et al.*, 2014).

Y si bien numerosos estudios han abordado ya el conocimiento de estas enfermedades estableciendo el origen multifactorial, pues para su desarrollo e instauración precisan de factores genéticos individuales, junto con otros ambientales y de hábitos de vida como: tabaquismo, alcohol, higiene, alimentación, los cuales por sí solos no son suficientes dado que se requiere de una importante implicación de la barrera epitelial y el sistema inmune a través de los procesos de inmunomodulación, con participación de células dendríticas y células presentadoras de antígenos (Baumgart y Carding, 2007).

La EII también ha sido descrita asociada a disbiosis intestinal por incremento de la presencia del Phylum Firmicutes y en particular de *Clostridium leptum* (Kabeerdoss *et al.*, 2013)

Otros estudios revelan desequilibrios en los géneros *Faecalibacterium*, *ruminococcus*, *bifidobacterium* en relación con controles sanos en la enfermedad de Crohn. (Joossens *et al.*, 2011). En muestras de mucosa de pacientes con colitis ulcerosa también se ha encontrado una mayor densidad de poblaciones bacterianas de *Fusobacterias* y del grupo *Bacteroides* - *Prevotella* - *Porphyromonas* (Sánchez-Calvo, 2012).

El Síndrome del intestino irritable SII no se entiende como una enfermedad propiamente dicha, por lo que no se la incluye en la EII, pues consiste en un conjunto de trastornos funcionales del intestino, bastante frecuentes, que se caracterizan por la presencia de episodios recurrentes de dolor abdominal, molestias acompañadas de hinchazón abdominal y alteraciones en la frecuencia y/o en la consistencia de las deposiciones.

Los pacientes con SII tienen menos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp. que los controles sanos (Kassinen *et al.*, 2007). Se han demostrado diferencias importantes en la microbiota de los pacientes con SII en comparación con los controles sanos, apreciándose un incremento en la relación *Firmicutes* / *Bacteroidetes* (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2011)

En el caso del hígado graso de origen no alcohólico y de la obesidad se han asociado patrones en el cambio de la composición y densidad de la microbiota intestinal. Ya desde hace décadas se conocía que la endotoxina LPS lipopolisacárido bacteriano de algunos componentes de la

microbiota puede constituir una “segunda causa” etiológica del hígado graso de origen no alcohólico (Day y James, 1998), en cuyo origen puede hallarse en un sobrecrecimiento de la microbiota a nivel del intestino delgado con toxemia asociada e inflamación (Duseja y Chawla Obesity, 2014)

Diferentes estudios en modelos murinos han correlacionado cambios en la microbiota intestinal con la esteatosis hepática de origen no alcohólico y con incremento del flujo en la circulación portal de agonistas de TLR4 y TLR9, y al aumento del TNF- $\alpha$  (Henaó-Mejía *et al.*, 2012)

La obesidad se viene explicando tradicionalmente en base al exceso en la ingesta de calorías, grasas y azúcares principalmente, pero nuevas opiniones consideran que esta causa no es suficiente para justificar la actual epidemia de obesidad que afecta a los países industrializados. Ensayos en roedores no han correlacionados dieta con obesidad pero si con microbiota intestinal. (Icaza-Chávez, 2013).

La obesidad considerada de causalidad multifactorial, incluye entre estas causas cada vez más un rol relevante de la microbiota intestinal, es decir tanto de sus cambios en composición como en los efectos fisiológicos que provocan esos cambios a través de diferentes vías; cambios en la permeabilidad intestinal, endotoxemia metabólica, alteración en el tejido adiposo al verse afectada la lipogénesis

Estudios en ratones genéticamente obesos presentaron un 50% menos de *Bacteroidetes* y más *Firmicutes* que sus hermanos delgados. Además se comprobó que la microbiota de los ratones obesos era más exotérmica durante el proceso de digestión que la de los delgados, y aún los autores fueron más allá al observar que la transferencia de microbiota obesogénica generaba en los animales transplantados el fenotipo obeso (Turnbaugh *et al.*, 2006).

De manera paralela a los estudios con roedores ha sido propuesta una microbiota humana de "tipo obeso", que vendría asociada al exceso de peso y al síndrome metabólico, y caracterizada por una razón Firmicutes / Bacteroidetes más elevada que la de la microbiota correspondiente al normopeso (Raoult, 2008).

A medida que estas investigaciones iban siendo ampliadas y completadas comenzó a considerarse que tanto *Bacteroides* como Bifidobacterias podrían ser preventivas de la obesidad. (Ley *et al.*, 2006).

Estudios posteriores confirmaron que dentro de la biodiversidad de la microbiota intestinal puede encontrarse un núcleo a nivel funcional, y que las desviaciones de dicho núcleo pueden asociarse con los estados fisiológicos de obesidad y delgadez. (Turnbaugh *et al.*, 2009)

Es bien conocido que la capacidad para fermentar hidratos de carbono de la dieta varía ampliamente entre microorganismos lo cual podría indicar que los individuos con sobrepeso tendrían más capacidad para obtener energía al degradar los hidratos de carbono no digeribles de los vegetales gracias a

una mayor eficiencia de su microbiota intestinal (Jumpertz *et al.* 2011).

Ha sido señalado también como una causa más de la obesidad la interacción de la microbiota con el sistema endocannabinoide, grupo de lípidos inmunomoduladores cuyos receptores se encuentran implicados en diferentes procesos fisiológicos incluyendo apetito, sensación de dolor, estado de ánimo, y la memoria. (Boroni-Moreira *et al.*, 2012).

La interacción de la microbiota intestinal con el sistema endocannabinoide establece una ruta a través de la cual puede alterarse la permeabilidad celular aumentando la entrada de endotoxinas proinflamatorias (Muccioli *et al.*, 2010).

También se ha sugerido una resistencia a la insulina mediada por la microbiota intestinal y la capacidad de absorción de energía por el hospedador, el tejido adiposo y la inflamación (Dumas *et al.*, 2006)

Alteraciones en la microbiota intestinal implicadas en la resistencia a la insulina y en la diabetes tipo II serían debidas a aminoácidos resultantes del metabolismo bacteriano que servirían de precursores de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (Neis *et al.*, 2015).

Los mecanismos por los que la microbiota intestinal interviene en la regulación del metabolismo energético del hospedador, la obesidad, la inflamación, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo II han sido postulados como mecanismos dependientes del LPS y/o la activación por ácidos grasos del complejo receptor CD14/TLR4 (Cani y Delzenne, 2009).

Con la finalidad de aclarar el papel de la microbiota en la obesidad y la resistencia a la insulina han sido realizados trasplantes fecales con efectos positivos sobre la producción de insulina (Vrieze *et al.* 2012). Si bien hay que tener en cuenta otros muchos factores adversos que podrían derivarse de estos trasplantes (Brandt, 2015).

En definitiva la microbiota intestinal se revela como un objetivo importante en el tratamiento de enfermedades como la obesidad y otras relacionadas (Delzenne *et al.*, 2011), si bien la influencia de la colonización en estadios iniciales de la vida podría tener relevancia (Manco *et al.*, 2010)

En la enfermedad celíaca activa un marcador de la enfermedad es la producción de citocinas por los linfocitos T intestinales en individuos aportadores de ciertos alelos del MHC-II. Por lo que se ha propuesto la disbiosis intestinal como un factor de riesgo (Icaza-Chávez, 2013). Lo cual se

ve reforzado por la descripción de la epidemia sueca de enfermedad celíaca» (Ivarsson *et al.*, 2000)

Aislados posteriores de bacterias de individuos que padecieron la epidemia han sido asociadas a la enfermedad celíaca (Sjöberg *et al.*, 2013).

Recientes estudios postulan incremento en el riesgo de padecer Alzheimer debido a alteraciones en la microbiota (Alam *et al.*, 2014), así como modulación de funciones endocrinas por la microbiota intestinal a través del eje: intestino - cerebro - sistema immune - sistema endocrino. (Chen *et al.*, 2015)

Diferentes trabajos realizados con animales libres de gérmenes y otros sometidos a diferentes infecciones bacterianas o tratamientos con probióticos han demostrado influencias en el comportamiento, la ansiedad, la capacidad cognitiva y la percepción del dolor (Cryan y Dinan, 2012).

Múltiples vías, aún hoy inextricables, podría utilizar la microbiota intestinal para interconectar intestino y cerebro especialmente en situaciones de estrés: sistema adrenal con estimulación de la producción de cortisol y sistema inmune con producción de citocinas en respuesta al cortisol con acción sobre el cerebro, además de sistema nervioso entérico, nervio vago y los niveles de triptófano circulante, así como metabolitos bacterianos tales como los ácidos grasos de cadena corta con funciones neuroactivas (Cryan y Dinan, 2012).

Una nueva era se abre ante nosotros (Corthier y Doré, 2010). Esta nueva era viene a adjudicar a la microbiota humana un papel protagonista en la vieja y a la vez siempre nueva tragedia que enfrenta salud y enfermedad, pues por más importancia y valor que se otorgue a nuestra era tecnológica y globalizada, recordaremos las palabras de Stephen Jay Gould: "*En la Tierra no vivimos en la Era del Hombre o de los humanos, vivimos hoy, y siempre, en la Era de la Bacterias*".

### **1.5. Raíces y evolución del concepto de probiótico.**

En un sentido amplio podemos decir que las actividades de los grupos de bacterias intestinales de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son claramente favorables para el hospedador, mientras que otras bacterias, también indígenas, deben considerarse potencialmente perjudiciales e incluso patógenos oportunistas, puesto que en determinadas condiciones, como cuando su número se eleva considerablemente, pueden causar infecciones, siendo este el caso de algunas cepas de enterococos, de *Escherichia coli* o de *Staphylococcus aureus*.

150 años antes de conocerse los muy diferentes y abundantes estudios con base genómica y genética sobre la microbiota intestinal, en su percepción genial el Nobel ruso Ilya Ilyich Metchnikoff nacido en 1845 avanzó como hipótesis

la percepción que actualmente se tiene de la microbiota intestinal.

Metchnikoff fue una de las figuras señeras que aprovecharon la nueva forma de hacer y entender las ciencias biomédicas instaurada por Pasteur, para establecer los pilares de la Microbiología y la Inmunología. Metchnikoff, que fue también colaborador de Pasteur en su Instituto, destaca por muy diversas aportaciones de entre las que merece mención especial su estudio de la fagocitosis, finalmente reconocida con el Premio Nobel de 1908. Un año antes había aparecido en Londres el libro "The prolongation of life", en el que Metchnikoff exponía algunas reflexiones sobre las posibilidades de alcanzar la longevidad en buenas condiciones vitales, pretensión hoy de máxima actualidad particularmente en los países ricos.

La cantidad de microorganismos presentes en el intestino llamó la atención de Metchnikoff, que postuló la existencia de dos grandes grupos: las bacterias beneficiosas, caracterizadas por su metabolismo fermentativo, cuyos productos finales, como el ácido láctico, no son perjudiciales para la salud; y las bacterias perjudiciales o de la putrefacción, productoras de metabolitos tóxicos entre los que se incluyen fenoles, índoles y amoníaco entre otros, cuya acción sobre la mucosa o su absorción a través de ella contribuye a diversas alteraciones orgánicas y, en suma, al acortamiento de la vida. El balance entre ambas poblaciones bacterianas tendría, por tanto, una influencia decisiva sobre

la salud del hospedador y sus perspectivas de longevidad. Pero Metchnikoff especuló también sobre las posibilidades de modificar este balance para mejorar dichas perspectivas. Había observado que los casos de vida duradera y en buenas condiciones eran frecuentes entre los habitantes de los Balcanes, en cuya dieta habitual figuraba la leche fermentada en forma de yogur. El científico ruso propuso una relación causa-efecto entre ambos hechos: el consumo regular de yogur, con su carga de bacterias fermentadoras, modificaría el balance intestinal a favor de la población fermentadora (las "bacterias buenas"), lo que tendría como consecuencia la prevención de enfermedades y la prolongación de la vida (Podolsky, 1998). En las observaciones de Mechnikoff y en la explicación propuesta para las mismas reside la raíz del actual concepto y aplicación de los microorganismos probióticos (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Coetáneo de Metchnikoff, el médico francés Henry Tissier (Instituto Pasteur), realizó también una interesante observación relacionada con la microbiota intestinal. En una época en la que las diarreas infantiles eran desdichadamente frecuentes, Tissier observó que en preparaciones microscópicas de las heces de niños sanos aparecían con frecuencia unas bacterias con morfología bacilar típica, bifurcada en los extremos, por lo que se las había denominado "bifidobacterias"; por el contrario, en las heces diarreicas no había rastro de tales bacterias. Tissier propuso que las bifidobacterias debían ser bacterias beneficiosas y que

su administración a los niños enfermos podría acortar el periodo diarreico y mejorar su situación (Tissier, 1906).

También médico, el alemán Alfred Nissle se guiaba por una idea similar a la de Tissier: debía ser posible eliminar del intestino bacterias enteropatógenas mediante la administración de bacterias intestinales antagónicas. En 1917, Nissle tuvo la oportunidad de atender un brote de disentería bacilar en un grupo de soldados alemanes, y centró su atención en el hecho de que un soldado del grupo no se vió afectado; de las heces de este soldado aisló una cepa de *Escherichia coli*, planteando la hipótesis de que esta cepa hubiese protegido a su hospedador de la infección. Desde entonces, la denominada cepa Nissle ha sido objeto de numerosos estudios que apoyan sus efectos beneficiosos y, de hecho, forma parte de un preparado comercial, que aún se comercializa Mutaflor<sup>®</sup>, entre cuyas indicaciones figura el tratamiento de procesos diarreicos.

### **1.6. Los conceptos de probiótico, prebiótico y simbiótico.**

El término "probiótico" (*pro bios*, favorecedor de la vida) ha sido utilizado sucesivamente con diferentes significados. En 1965, Lilly y Stillwell (Lilly y Stillwell, 1965) lo emplearon para designar factores capaces de estimular el crecimiento de protozoos. La primera acepción relacionada con el concepto actual fue la de Parker (Parker, 1974), que definió a los

probióticos como "organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano en el intestino". Esta definición es bastante imprecisa y confunde los conceptos actuales de probióticos (microorganismos beneficiosos) y prebióticos (sustratos que favorecen el crecimiento de los probióticos).

Posteriormente, Fuller (Fuller, 1989) acotó el término probiótico para referirse a "microorganismos vivos, que suministrados como suplemento dietético afectan beneficiosamente al hospedador porque mejoran el balance intestinal".

Entre las sucesivas redefiniciones registradas por la bibliografía, cabe destacar la de Schaafsma (Schaafsma, 1996): los probióticos son "microorganismos vivos que, una vez ingeridos en cierto número, ejercen efectos saludables más allá de los inherentes a la nutrición básica". Incluye el factor dosis, de importancia decisiva, y se refieren a beneficios no nutricionales, es decir, no se trata del aporte de calorías o de nutrientes, sino de efectos que previenen la aparición de enfermedades o que, incluso, pueden acortar y mejorar el curso de una enfermedad.

Según las directrices de la FAO, los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deben ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de sales biliares. Los probióticos serían microorganismos vivos que cuando se administran en

una cantidad adecuada, confieren un beneficio de salud en el hospedador" (FAO/OMS 2001).

Además, los probióticos deben ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped mediante su crecimiento y/o actividad en el cuerpo humano (Morelli, 2000).

El concepto de probiótico, según las definiciones anteriores, ha sido criticado por ser demasiado amplia, Vendenplas afirma que "*Esta definición complica el proceso de caracterización funcional de los probióticos.*" (Vendenplas *et al.*, 2015)

Los microorganismos muertos y los subproductos metabólicos, o moléculas bioactivas producidas por bacterias, como las proteínas, polisacáridos, nucleótidos, y péptidos, aunque sean sustancias terapéuticas potencialmente útiles quedarían descartadas como probióticos según los anteriores criterios.

Consecuentemente tampoco serían incluidos como probióticos los productos, los trasplantes de microbios fecales y los alimentos fermentados, al tratarse de consorcios microbianos no definidos.

Shanahan y Quigley no son conformes con esta definición de probióticos pues consideran que las moléculas bioactivas producidas por bacterias y las derivadas de los organismos muertos pueden presentar actividad biológica (Shanahan y Quigley, 2014).

Un término más amplio propuesto por O'hara y Shanahan (O'hara y Shanahan, 2006) es el de "Pharmabiotic", término muy general en el que se incluirían bacterias de la microbiota no patógenas y vivas, modificadas genéticamente o no, además de metabolitos de origen probiótico que fuesen biológicamente activos e incluso prebióticos y simbióticos.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria EFSA, autoridad de ámbito Europeo, aún no ha aceptado ninguna de las reivindicaciones sobre probióticos que le han sido planteadas Regulation (EC) No. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods (OJL 404, 30.12.2006). La EFSA solo se ha pronunciado positivamente aceptando que los cultivos de yogurt mejoran la digestión de la lactosa (EFSA, 2010).

Recientemente un panel de expertos ha revisado la definición del concepto de probiótico con vistas a actualizar la definición de consenso. La revisión sigue en la línea del consenso establecido previamente por la ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) y de la FAO /WHO y la aceptada por la SEPYP (Sociedad española de probióticos y prebióticos), sugiriendo y recomendando que se consideren como probióticos a las cepas de microorganismos vivos que suministrados en las cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador. Los efectos son atribuibles a cada cepa, en cultivos definidos, quedando descartados por tanto trasplantes fecales y

alimentos fermentados. Además, los efectos de cada cepa no pueden ser generalizados a otras cepas de la misma especie, así mismo los efectos debe haber sido posible demostrarlos en estudios científicos bien planteados, es decir, se les exige un grado de evidencia científica y no solo sobre sus bondades sino sobre su seguridad y eficacia, (Hill *et al.*, 2014), extremo este que no recoge aún la definición consensuada en España por la SEPYP, a pesar de que en sus diferentes workshops y seminarios se ha expuesto que los probióticos no deben presentar efectos indeseables o perjudiciales.

No obstante la SEPYP, matiza y considera por consenso, que los efectos beneficiosos del probiótico sobre el hospedador deben demostrarse en relación a la población objetivo a la que se le va a administrar, no solo en humanos sino previamente en animales, pues los efectos y dosis podrían ser muy diferentes según la edad o estado fisiológico, por ejemplo en niños, ancianos o mujeres embarazadas. Sin embargo la SEPYP deja fuera de su definición de probiótico aquellos que no se administren vía oral, por lo que la importancia y relevancia que los probióticos pueden tener sobre la microbiota vaginal, particularmente en los casos de las vaginitis y las vaginosis inespecíficas queda al margen de este criterio.

Diferentes aspectos e intereses científicos, industriales, regulatorios y relacionados con los consumidores influyen poderosamente sobre el consenso de la definición de probiótico, que aún ni es definitivo ni es global.

De otra parte el consenso sobre prebióticos es más reciente, y en cierto modo mucho más simple, pues no trata de seres vivos sino de ingredientes alimentarios que deben de cumplir unos requisitos, en este sentido la SEPYP estableció en 2015 que un prebiótico debería ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y además no absorberse en el intestino delgado siendo fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal. Finalmente y al igual que lo exigido a los probióticos; el prebiótico para poder ser considerado como tal, debe tener la capacidad de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud del hospedador demostrables (SEPYP, 2014).

Ejemplos de prebióticos serían: inulina, oligofruktosa, galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS), Lactulosa y oligosacáridos de la leche materna.

Fermentaciones en el colon atribuidas a los prebióticos podrían desencadenar determinados efectos fisiológicos entre los que se han referenciado:

- Aumento del número de bífidobacterias en el colon
- Aumento de la biodisponibilidad de minerales calcio y magnesio
- Acortamiento del tiempo del tránsito gastrointestinal
- Reducción de los niveles sanguíneos de amonio.

(WGO. Practice Guideline: Probiotics and prebiotics 2001 Organización Mundial de Gastroenterología).

Por su parte los Simbióticos son combinaciones apropiadas de prebióticos y probióticos que pueden ejercer ambos efectos.

### **1.7. Microorganismos probióticos. Taxonomía.**

Los numerosos ya microorganismos candidatos a probióticos, o bien considerados como tales, incluyen tanto procariontas como eucariotas, pero mayoritariamente los primeros.

Entre los eucariotas principalmente:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces boulardii*
- *Candida pintolopesii*
- *Kluyveromyces lactis*
- *Yarrowia lipolytica*
- *Debaryomyces occidentalis*

Y entre los procariontas la mayoría de las cepas bacterianas descritas y utilizadas a nivel industrial y comercial, pertenecen al grupo de "bacterias del ácido láctico" (BAL), siendo miembros de este grupo de bacterias los géneros: (Klein *et al.*, 1998).

- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*
- *Enterococcus*
- *Streptococcus*
- *Pediococcus*

- *Leuconostoc*
- *Weissella*
- *Carnobacterium*
- *Tetragenococcus*
- *Bifidobacterium*

Y siendo de entre ellos los más frecuentemente utilizados y citados como probióticos los géneros:

- *Lactobacillus*
- *Bifidobacterium*

Y de entre estos las especies que a continuación se relacionan:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus sporogenes*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus salivarius*
- *Lactobacillus johnsonii*
- *Lactobacillus delbrueckii*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus lactis,*
- *Lactobacillus cellobiosus*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus farciminis*

- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus gasseri*
- *Lactobacillus crispatus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium infantis*
- *Bifidobacterium adolescentis*
- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium thermophilum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium lactis*
- *Bifidobacterium animalis*
- *Bifidobacterium clausii*

Además de estos géneros, han sido descritas con propiedades probióticas diferentes cepas de las siguientes especies:

- *Streptococcus lactis*
- *Streptococcus faecium*
- *Streptococcus cremoris*
- *Streptococcus salivarius*
- *Streptococcus intermedius*
- *Streptococcus thermophilus*
- *Streptococcus diacetylactis*
- *Enterococcus faecium*
- *Leuconostoc mesenteroides*
- *Pediococcus acidilactici*

Otras especies no incluidas en el grupo de las BAL descritas con propiedades probióticas son:

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*
- *Bacillus coagulans*
- *Escherichia coli*
- *Propionibacterium freundenreichii*

(Tuhoy *et al.*, 2003), (Sanders *et al.*, 2003), (Amores *et al.*, 2004), (Kumura *et al.*, 2004), (Amara y Shibl, 2015), (Sánchez *et al.*, 2015).

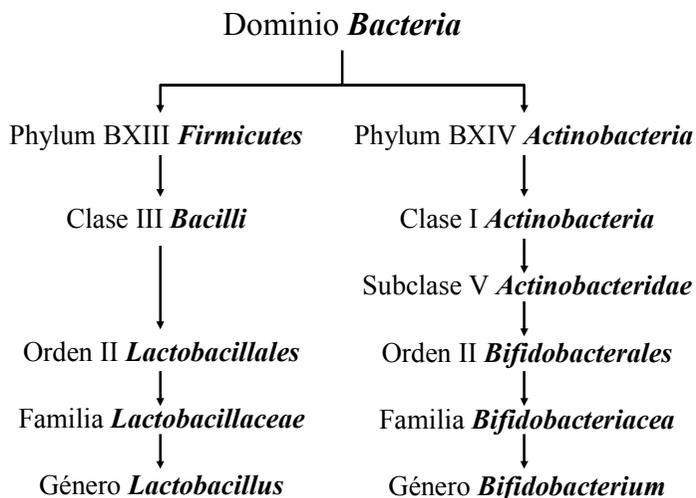
### **1.8. Lactobacilos y Bifidobacterias.**

Lactobacilos y Bifidobacterias son tradicionalmente incluidos entre las bacterias lácticas, pues ambos géneros comparten la capacidad de generar ácido láctico como principal producto de su metabolismo fermentativo.

Los Lactobacilos son los microorganismos más ampliamente descritos y usados comercialmente como probióticos desde que Metchnikoff ya eligiera el “*Bacillus bulgaricus*” (*Lactobacillus bulgaricus*) como la especie para alcanzar la salud y el equilibrio (Podolsky, 1998).

Los Lactobacilos además son muy importantes en la producción de alimentos fermentados y en los procesos de alteración fermentativa de los alimentos.

La taxonomía y complejidad del género no es sencilla, lo cual ya fue señalado por Klein *et al.* (1998), por lo que la identificación de cepas basada en perfiles de fermentación de azúcares y otros criterios fenotípicos (Wijtzes *et al.*, 1997) puede que sea en muchos casos, aproximativa, requiriéndose por tanto combinaciones de métodos fenotípicos y genotípicos (Yeung *et al.*, 2004).



**Figura 1.3. Ubicación de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los taxones superiores del dominio *Bacteria*.**

La especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Leichmann 1896) (Beijerinck 1901) emend. (Cai *et al.* 2012).

El National Center for biotechnology information (NCBI) a la fecha consultada listaba 204 especies no modificadas genéticamente (NCBI, 2015).

Algunas de las características del género *Lactobacillus* se relacionan a continuación:

- Bacterias cocoides o bacilares, no esporulados, Gram positivas, catalasa negativas, inmóviles presentándose al microscopio aisladas o en cadenas, forman colonias pequeñas blanco-lechosas.
- Genomas muy variables en contenido de información así el genoma de *L. plantarum* destaca por su tamaño de 3.35 Mb, frente a un promedio de 2 Mb para otras especies.
- Colonizan hábitats muy variados, ricos en fuentes de carbono: alimentos, frutas y verduras, especialmente leche y sus derivados, y en lo que a esta tesis concierne colonizan el organismo de los mamíferos formando parte de su microbiota (Tannock, 2004). Su capacidad de colonización viene favorecida por el hecho de tolerar bien concentraciones relativamente altas de ácidos y consecuentemente valores de pH más bajos que el resto de las bacterias.
- Anaerobios o aerotolerantes.

- Incapaces de respiración, fermentadores estrictos, por su imposibilidad para sintetizar compuestos porfirínicos, por lo que también son catalasa negativas dado que esta enzima precisa de un grupo porfirínico. Obtienen por tanto su energía exclusivamente vía fermentación de azúcares y pueden formar en ocasiones polímeros extracelulares de dextrano. Se distinguen especies homofermentadoras estrictas (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de la glucosa) y heterofermentadoras estrictas y facultativas (producen láctico, CO<sub>2</sub>, etanol y/o acético en proporciones equimoleculares).
- Presentan escaso rendimiento al cultivarse pues son exigentes en factores nutritivos: azúcares, bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas, de hecho los medios que se utilizan para su cultivo en laboratorio son medios muy enriquecidos.

Las bifidobacterias fueron reconocidas en 1900 como miembros dominantes en la microbiota fecal de niños sanos por Tissier, con la denominación de *Bacillus bifidus*; pues son de las primeras bacterias en colonizar el intestino del recién nacido favorecidas por los oligosacáridos de la leche materna (Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000). Tissier propuso su administración como forma de combatir infecciones intestinales (Tissier, 1906).

El género *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, hasta los años 1930 se consideraron lactobacilos, las técnicas

moleculares de los años 60 demostraron que su contenido en bases G y C era mayor que el de los lactobacilos, así como diferencia en la composición de la pared celular. 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, siendo incluido como tal en la 8ª edición del Manual de Bergey aparecida en 1974 y que incluye unas cuarenta especies.

Las bifidobacterias son bacilos Gram-positivos y con morfología bacilar típica de 2–5 µm que suele ramificarse en los extremos terminando en una protuberancia, pudiendo encontrar en un mismo cultivo formas pleomórficas en V o T y en general pueden aparecer aisladas y en cadenas pluricelulares o grupos.

Son bacterias anaerobias, no esporuladas e inmóviles, catalasa y oxidasa negativas, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales (Prescott *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006).

Utilizan para la fermentación de las hexosas una ruta especial que se conoce como la "ruta Bifidus" o de la derivación de fructosa 6-fosfato.

Sus genomas son del orden de 2MB. (Zhu *et al.*, 2003; Sakata *et al.*, 2006).

### **1.9. Características de los probióticos.**

Parece lógico afirmar que las características que debería reunir una cepa de un microorganismo para ser considerado probiótico, o que posee propiedad probióticas, serían el resultado de las exigencias y criterios que el consenso sobre la definición y concepto de probiótico han establecido. A la vista de todo lo anteriormente expuesto este consenso que implica: a la comunidad científica, a los consumidores, a la industria y las autoridades sanitarias con capacidad para reglamentar, no es un consenso global, ni firme, encontrándose en continua evolución.

No obstante tras la actualizada revisión bibliográfica realizada en este sentido podemos decir que una cepa probiótica debería reunir las siguientes características:

- **Taxonómica.** La cepa debe estar correctamente identificada a nivel de especie, fenotípica y genotípicamente, y debe haber sido depositada en una colección con rango de autoridad internacional de depósito para poder verificar sus atributos. La cepa debe poder distinguirse de otras cepas de la misma especie por criterios taxonómicos objetivos, de consenso científico y verificable, aspecto este de especial relevancia en relación con la propiedad industrial de la cepa y especialmente en el caso de aquellas cepas que van a ser objeto de patente.

- **Genómica.** La cepa debe poseer buena estabilidad a nivel genómico y no presentar una deriva importante fuera del ámbito del que se aisló; así como también, tras los procesos de conservación que se requieren para mantener los cultivos y subcultivos, y otros procesos como son aquellos a los que se somete la cepa en los procesos industriales.
- **Bioseguridad.** La cepa debe ser “biosegura”, es decir no presentar patogenicidad en sentido amplio, lo que incluye comprobar la ausencia de: producción de toxinas, resistencias antibióticas transmisibles, actividad hemolítica y de infectividad, en modelos exigentes como pueden ser animales experimentalmente inmunocomprometidos. Además debería evaluarse en la medida de lo posible el potencial genómico de patogenicidad.
- **Viabilidad.** La cepa debe ser tolerante a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal para que pueda llegar viable a las zonas de acción, dicha resistencia no debe entenderse en términos absolutos pero si al menos en la medida que de la dosis suministrada, aunque se hayan perdido varias unidades logarítmicas, al menos un número suficiente de las unidades formadoras de colonias (UFC), tengan capacidad de resistencia para asegurar la viabilidad en las zonas de acción. En particular, deben resistir el pH gástrico, las enzimas digestivas, y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.

- **Adherencia.** La cepa debe poseer capacidad de adherencia al epitelio intestinal pues, como microorganismos alóctonos, los probióticos podrían ejercer sus efectos siendo transeúntes, si bien en la medida que puedan adherirse a los enterocitos podrán permanecer más tiempo en el intestino, con lo cual la probabilidad de ejercer sus efectos y la intensidad de los mismos puede ser mayor, máxime si los efectos saludables que presenta la cepa vienen mediados principalmente por su interacción con el enterocito.
- **Antibiosis.** La cepa debe tener la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas, máxime al considerarse este uno de los mecanismos de acción por los que los microorganismos probióticos suministran protección al hospedador frente a los enteropatógenos; antibiosis que puede ser ejercida a nivel metabólico general como la producción de ácidos orgánicos y/o de radicales oxidantes, o bien por la producción de antibióticos o bacteriocinas.
- **Interfaz Metabólico.** La cepa debe poseer capacidad para actuar como interfaz metabólico en algún grado, es decir de actuar como un escudo metabólico que impida la llegada de agentes nocivos o indeseables a los enterocitos, interfiriendo positivamente para el hospedador; tal podría ser el caso de algún proceso como: la asimilación excesiva de colesterol, la hidrólisis de la lactosa, la generación de gases por la microbiota intestinal, o la inactivación de agentes del tipo procarcinogénicos.

- **Inmunomodulación.** La modificación de la respuesta biológica inmunitaria se considera uno de los efectos más relevantes atribuidos a determinados probióticos inmunomoduladores. La importancia radica en que la capacidad probiótica de inmunomodulación se encuentra directamente conectada con la protección del hospedador frente a infecciones intestinales o extraintestinales, además de con efectos antiinflamatorios y antialérgicos, así como con la inhibición de tumores ya establecidos.

- **Robustez tecnológica.** Una cepa probiótica que no pueda hacerse llegar al usuario final en una formulación que permita garantizar la dosificación en las condiciones de viabilidad necesarias para realizar los efectos beneficiosos que se le atribuyen, será inviable a nivel industrial y comercial.

De otra parte el proceso industrial en sí mismo llevará seguramente asociados procesos de conservación en frío, de crecimiento industrial de la cepa en grandes fermentadores y liofilización posterior, además de los procesos tecnológicos farmacéuticos asociados para la elaboración de cápsulas o comprimidos; todo lo anterior sin descartar otros, por todo lo cual la cepa deberá demostrar un comportamiento "robusto" en lo que a estabilidad y viabilidad se refiere.

Análogamente deberá ser robusta frente a los diferentes procesos de la industria alimentaria, cuando la cepa vaya a ser incluida en algún alimento ya sea de tipo fermentado o

no, tanto durante el proceso tecnológico alimentario como al final del mismo, donde la cepa en cuestión se verá sometida a interacción con otras y ello con las posibles interferencias asociadas.

El nivel alimentario puede además exigir a la cepa el cumplimiento de criterios organolépticos relacionados con los hábitos y preferencias de consumo que no se vean afectados por subproductos metabólicos de la cepa.

Conviene señalar que el cumplimiento de cualesquiera de las características probióticas anteriores deben documentarse bajo criterios científicos rigurosos tanto a nivel de laboratorio, *in vitro* y *ex vivo*, así como de experimentación con animales y en clínica, incluyendo sistemáticamente grupos tratados con un placebo apropiado y con terapia estándar (Reid *et al.*, 2003).

Los estudios científicos deben haber sido confirmados por grupos de investigación independientes sin conflicto de intereses, sin menoscabo de aquellos otros que por su destino final la industria exija.

Los estudios científicos deben además distinguir con precisión el carácter probiótico que se reivindica con indicación de la edad, grupo poblacional, estado fisiológico del colectivo objeto del estudio.

No obstante, la interpretación de estas investigaciones no es definitiva en muchos casos debido a la influencia que pueden tener las condiciones ambientales intestinales y la microbiota del hospedador, además de otras que conviene

conocer y acotar, así por ejemplo es el caso de las enzimas digestivas que aun cuando no inactiven a un determinado microorganismo, pueden eliminar de su superficie las adhesinas por las que se une a células epiteliales en los ensayos *in vitro* (Salminen *et al.*, 2005).

Una amplia gama de productos probióticos se encuentran actualmente en los mercados, habiendo crecido de una forma notable en los últimos seis años, incluido el Español (Sánchez *et al.*, 2015), a los que si se les aplicaran los criterios anteriores no podrían ser en la mayoría de los casos calificados de probióticos, por no comentar el etiquetado deficiente o engañoso, y ello aun tratándose de productos comercializados por relevantes laboratorios farmacéuticos.

La descripción de un producto comercial probiótico debería incluir, al menos, la siguiente información: (Vandenplasa *et al.*, 2015).

- Género, especie, colección donde se encuentra depositada la cepa y número del depósito.
- Número mínimo de organismos viables de la cepa al final de la vida útil del producto.
- Dosis recomendada para el efecto fisiológico declarado
- Condiciones de almacenamiento recomendadas.
- Bioseguridad de la cepa bajo las condiciones de uso recomendadas.

- Información de contactos para la vigilancia tras la comercialización.

### **1.10 Efectos beneficiosos de los probióticos**

Desde hace más de una década existen evidencias científicas de los efectos beneficiosos de los probióticos. (Dunne y cols., 2001; Marteau y cols., 2002; Ouwehand y cols., 2002). Si bien los conocimientos actuales sobre los mecanismos de acción se encuentran aún lejos de ser bien conocidos y de un consenso científico internacional, considerando además que debe avanzarse simultáneamente en el conocimiento de su bioseguridad, pues el hecho de ser denominados como probióticos no les exime de la garantía que deben ofrecer de ser, sino completamente inocuos al menos suficientemente, lo que nos lleva al importante aspecto de la dosis mínima necesaria para ejercer cualquier efecto beneficioso o no.

Las características que debe reunir una cepa probiótica, citadas en el apartado anterior, se encuentran en la base que fundamenta los posibles efectos beneficiosos; así pues, su capacidad de adherencia a la mucosa intestinal facilitará de un lado; la colonización por adhesión a esta y/o receptores celulares, abriéndose paso entre la microbiota autóctona y desplazando a otros miembros de la microbiota, alterando las composiciones relativas bacterianas, también por competición

por los nutrientes; y de otro lado, las reacciones que puedan desencadenarse a raíz de la interacción con el enterocito, incluidas las reacciones de inmunomodulación.

La propia capacidad enzimática y metabólica de la cepa mediará los posibles procesos tanto de interfaz metabólica como de antibiosis, bien por la acidificación del medio luminal ocasionada por la producción de ácidos orgánicos derivados de la fermentación de fibras que podría inhibir el crecimiento de bacterias perjudiciales (Morrison DJ *et al.*, 2006), o también por la producción de bacteriocinas o agentes reactivos como el peróxido de hidrógeno. (Jack RW *et al.*, 1995)

No obstante, no puede olvidarse que los efectos beneficiosos de los probióticos sobre el hospedador van a venir condicionados tanto por la propia microbiota del hospedador como por otros, así: la dieta, edad, estado fisiológico, sexo, factores genéticos del hospedador y de la cepa probiótica, en particular su capacidad de represión y/o expresión génica en respuesta al medio ambiente intestinal y a su microbiota. (Sanders ME, 2015)

**Los efectos beneficiosos** podrían agruparse en:

**a) Nutricionales.**

Entre los efectos nutricionales beneficiosos que se atribuyen a algunas cepas probióticas pueden destacarse:

**b) Función barrera.**

Determinadas cepas probióticas podrían contribuir a mantener la integridad de la barrera epitelial intestinal, que separa el medio interno y externo, permitiéndole a esta incluso prevenir y reparar daños, a la vez que ejercer su permeabilidad intestinal fisiológica y su función defensiva íntegra, favoreciendo de este modo la protección del hospedador ante diferentes agresiones, como podría ser el caso de: infecciones por patógenos entéricos, alérgenos alimentarios, xenobióticos y citocinas de tipo proinflamatorio.

La alteración de la barrera intestinal afectaría a las uniones celulares estrechas, las cuales interconectan la capa continua de células epiteliales, y limitan la permeabilidad tanto transcelular como paracelular de las moléculas por ello las alteraciones de la función barrera se relacionan con: una mayor propensión a las infecciones entéricas, las enfermedades inflamatorias intestinales Crohn y colitis ulcerosa (Meddings JB, 1997), celiaquía, enfermedades autoinmunes e ictericia extrahepática obstructiva (Welsh FK.S *et al.*, 1998).

Los mecanismos de acción implicados en este beneficio de los probióticos podrían ser explicados en base a la modulación de la fosforilación de proteínas, la secreción de mucina y el aumento de la resistencia transepitelial (Ohland y MacNaughton, 2010), así como a la capacidad de producir

sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas, que inhiben la proliferación de otras bacterias, y también a la competición entre bacterias por los recursos nutritivos y los espacios físicos del ecosistema. (Brook I. Bacterial interference. Crit Rev Microbiol 1999; 25:155-172.)

### **c) Interfaz metabólica a nivel intestinal.**

Los microorganismos probióticos podrían actuar como un escudo metabólico que impide la acción deletérea de moléculas perjudiciales, habiéndose encontrado evidencias experimentales de que esto se produce en situaciones de interés clínico tales como:

- **Aumentar la Biodisponibilidad** de vitaminas y minerales: calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo, cuando se ingieren con productos lácteos, posiblemente debido a las sales solubles más fácilmente asimilables que se producen en un medio acidificado (Bergillos-Meca *et al.*, 2013), (Ortega RM *et al.*, 2002).
- **Mejorar la Producción de Ácidos Linoléicos Conjugados** que promueven la salud (CLA) ha sido reportado para cepas de *Bifidobacterium* (Gorissen L *et al.*, 2010) y de *Lactobacillus* (Ando *et al.*, 2003).
- **Obtener Energía** a partir de ácidos grasos de cadena corta: butirato, propionato y acetato, que son resultado

de la fermentación de hidratos de carbono de la dieta no digeridos.

- **Detoxificar** por biotransformación determinadas moléculas que ingeridas o formadas en la luz intestinal podrían ser nocivas para el organismo.
- **Mejorar el Intercambio de Iones** a través de la mucosa y reducir la producción de gases a nivel del lumen intestinal. (Borthakur *et al.*, 2008)
- **Mejorar la Intolerancia a la Lactosa**, dado que durante la lactancia, el ser humano como otros mamíferos expresa altos niveles de lactasa en las microvellosidades de los enterocitos pero a partir del destete la expresión de lactasa decae de forma irreversible en la mayor parte de la población [Montalto *et al.*, 2006], existiendo diversos fenotipos de expresión principalmente a partir de la edad adulta. (Swallow, 2003).
- La intolerancia a la lactosa produce distensión abdominal, gases, diarrea y náuseas, si bien los síntomas son muy variables en cada individuo.  
Las bacterias lácticas fermentadoras de la lactosa presente en la leche habrían sido un resultado de la domesticación humana (Brüssow, 2013).  
Una cepa probiótica que fuese buena fermentadora de la lactosa facilitaría su digestión por el consumo fermentativo que de ella hacen, mejorando por tanto el

confort intestinal, lo cual ha confirmado recientemente la autoridad Europea EFSA. (Morelli, 2014),(de Vrese *et al.*,2015), (de Vrese *et al.*, 2001), es por ello que se postuló el yogurt como producto probióticos *per se* (Guarner *et al.*, 2005).

- **Disminuir la Hipercolesterolemia**, al facilitar la eliminación de colesterol por desconjugación de las sales biliares de glicinas y taurinas, y también disminuir la toxicidad de estas sales al descender el Ph y con ello su solubilidad y absorción intestinal. (De Boever *et al.*, 2000), (De Smet *et al.*,1998)

Este efecto hipocolesterolemia, estudiado en individuos hipercolesterolémicos, a nivel plasmático se produciría a través de subproductos metabólicos bacterianos del tipo ácidos grasos de cadena corta, propionato y butirato, por vía de acción endógena al ser el acetato precursor de la síntesis hepática de colesterol, y el propionato inhibidor; (Wong *et al.*, 2006) lo cual ya fue recogido en la revisión de Fuller (1989), y posteriormente en individuos con sobrepeso tratados con *E. faecium* (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000).

Pacientes hipercolesterolémicos después de seguir un tratamiento de seis semanas, con una combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, experimentaron un descenso en los niveles de colesterol plasmático total, LDL-colesterol y HDL-

colesterol y no mostraron efectos sobre los triglicéridos séricos en ayunas ni los niveles de glucosa en sangre (Park *et al.*, 2008), (Guo *et al.*, 2011), (Sanguansak *et al.*, 2015).

- **Influencia sobre la Obesidad**, si bien van siendo cada vez más frecuentes los trabajos en esta dirección es esta una influencia no bien conocida. Resultados como la administración de una cepa de *Lactobacillus gasseri* en los obesos y en diabéticos tipo II han demostrado disminuir la masa de grasa, visceral y subcutánea (Kadooka *et al.*, 2010).

Con *Lactobacillus spp.* se han demostrado efectos positivos sobre la sensibilidad a la insulina y la respuesta a la inflamación (Andreasen *et al.*, 2010) anuncian un futuro esperanzador si bien hasta hoy pocos estudios de intervención se han publicado en personas con sobrepeso y de ellos la mayoría se han centrado en Lactobacilos y Bifidobacterias (Vandenplas *et al.*, 2015)

Así pues, aún hoy el conjunto de evidencias que intentan relacionar probióticos con modulación de la microbiota intestinal y efectos positivos sobre la obesidad no son concluyentes, si bien como se ha descrito anteriormente al hablar de la microbiota intestinal y de las distintas proporciones relativas entre Firmicutes y Bacteroidetes en personas obesas, queda abierta una puerta a una futura modulación probiótica.

- **Disminución del Estrés Oxidativo**, el cual juega un papel crucial en desórdenes y patologías como : arterioesclerosis, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular, Alzheimer, Parkinson, cirrosis, osteoartritis, dermatitis, diabetes mellitus, síndrome metabólico, obesidad, envejecimiento prematuro, retinopatías, desarrollo de tumores y enfermedades inflamatorias intestinales, entre otras (Craft, 2005), (Breidert *et al.*, 2003).

Diferentes probióticos han sido ya descritos con actividad antioxidante como *Lactobacillus fermentum* ME-3, el cual reduce los índices de estrés oxidativo de la sangre y la orina en voluntarios sanos (Songisepp *et al.*, 2005).

Recientes estudios han observado que la administración de una mezcla de lactobacilos a ratas Fisher envejecidas puede mejorar la memoria dependiente de la edad y la lipidemia al inhibir la expresión del TNF- $\alpha$  y la IL-6, ambas citocinas proinflamatorias, e inhibir la activación en el hipocampo cerebral del factor NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), complejo proteico que controla la

transcripción del ADN responsable de la inflamación crónica por estrés oxidativo, lo cual caería fuera de la

acción dentro de la interfaz metabólica, al menos en parte.(Jeong *et al.*, 2015),y en esta misma dirección de mejora de perfil lipídico y diabetes tipo II podemos citar la investigación de (Ejtahed *et al.*, 2011)

#### **d) Carcinogénesis en la mucosa intestinal.**

En cuyo origen podrían encontrarse diferentes mutágenos endógenos y químicos exógenos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA), compuestos nitrosos (NOC), acrilamida, aflatoxinas y mutágenos endógenos, podrían encontrarse en la etiología multifactorial de esta enfermedad unidos a la dieta y estilos de vida (nutrición, consumo de alcohol y tabaco, actividad física, estrés) (Sankpal *et al.*, 2012),(Jägerstad *et al.*, 2005).

La progresión del carcinoma viene regulada por la activación de diferentes oncogenes y/o la inactivación de diversos genes supresores [Ruiz-Bravo *et al.*, 1992], siendo esencial el balance entre DNA dañado y DNA reparado. (Wood *et al.*, 2001)

Desde principios de este siglo (Brady *et al.*, 2000) concluyeron, a partir de modelos animales, que existe una relación inversa entre el consumo de probióticos y la aparición de criptas aberrantes o el desarrollo de tumores en el colon, así como evidencias sobre el sinergismo antitumoral del consumo de probióticos y prebióticos del tipo de los fructooligosacáridos (FOS), si bien los mecanismos que

subyacen a estos efectos antitumorales son diversos y complejos.

Algunos autores han apuntado hacia la capacidad del probiótico para proteger el enterocito y atenuar el poder mutagénico observado en ciertas heces, sería el caso de la espermidina (Brady *et al.*, 2000).

Otros efectos del probiótico vendrían por la degradación del mutágeno y la inhibición de la mutagénesis por unión al mutágeno a través de elementos de la superficie celular y degradación por los probióticos (Sreekumar *et al.*, 1998)

El probiótico también podría actuar por conversión de procarcinógenos tóxicos y altamente reactivos a otros menos tóxicos, como se ha observado en diferentes cepas de Lactobacilos frente a NQO (nitroquinolina 1-oxido) y MNNG (N-metil N'-nitro-N-nitrosoguanidina)(Caldini *et al.*, 2005).

Y como podría ser también el caso de algunas de las enzimas consideradas como indeseables, ( $\beta$ -glucuronidasa, azorreductasa, ureasa, nitrorreductasa, glicocolatorreductasa) (Ouwehand *et al.*, 2002), (Parvez *et al.*, 2006), (Wollowski *et al.*, 2001).

Así mismo la disminución del pH intestinal debida a los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producida durante la degradación de los hidratos de carbono no digeribles y la acción favorable de los probióticos sobre el balance de las

poblaciones de la microbiota intestinal que segregan sustancias procarcinogénicas, favorecerían positivamente los efectos contra el cáncer colorectal.

Otros autores sugieren que el probiótico induciría, en lugar de proliferación, la apoptosis en los enterocitos a través de la proteína p21, , por acción no ya de ácidos grasos de cadena corta sino de citokinas como TNF- $\alpha$  (LeBlanc y Perdigon 2004), así como también promovería la estimulación de los sistemas de defensa inmunitaria por cualquier vía, lo cual permitiría limitar asimismo la incidencia de tumores extraintestinales.

Los probióticos también podrían modular y mejorar la inmunidad innata del huésped mediante la secreción de moléculas anti-inflamatorias, a través de complejos mecanismos en cascada entre los que se ha referenciado la regulación de la maduración de las células mieloides hacia la posterior actuación de las células Th1, Th2 y NK (Commane *et al.*, 2005),(Christensen *et al.*, 2002),(Raman *et al.*, 2013).

### **e) Protección frente a Diarreas e Infecciones Gastrointestinales.**

Al ser la diarrea uno de los episodios más frecuentes que se presentan en la práctica clínica digestiva cuyas causas pueden ser diversas, pero principalmente:

- La invasión por bacterias principalmente y otros microorganismos.
- La acción de toxinas.
- Las alteraciones de la microbiota intestinal como pueden ser las ocasionadas por tratamientos antimicrobianos de amplio espectro o durante los viajes.
- Tratamientos oncológicos y radiaciones.
- Estrés.

Los desequilibrios en el ecosistema microbiano intestinal desencadena otros procesos, como se viene explicando a través de esta introducción, y entre ellos:

- Daños y/o destrucción de enterocitos.
- Daños y alteraciones en la barrera de permeabilidad con pérdida de líquido y electrolitos.
- Translocación de antígenos y toxinas de forma indiscriminada a través de la mucosa alterada pudiendo ocasionar respuestas inflamatorias patológicas tanto en la lámina propia como en la submucosa
- Disminución de la resistencia a la colonización por enteropatógenos.
- Sobrecrecimiento de patógenos oportunistas como, clostridios, estafilococos y candidas entre otros.

- Disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta y acumulación de moléculas parcialmente o mal digeridas en el lumen intestinal, las cuales podrían ser sustrato de fermentaciones no deseadas, generando un incremento de la presión osmótica con salida de fluidos al lumen intestinal.

Una abundante bibliografía recoge que los microorganismos probióticos pueden prevenir y/o mejorar los cuadros patológicos diarreicos. De hecho ha sido tradicionalmente una de sus primeras aplicaciones siendo muy conocidos en España desde hace más de cincuenta años los productos Ultralevura® (*Saccharomyces boulardii*) y Lacteol® (*Lactobacillus Acidophilus*). (Hungu *et al.*, 2013) (Cruchet *et al.*, 2015) (Issa *et al.*, 2014)



**Figura 1.4. Ejemplo de algunos productos comerciales.**

Aunque al día de la fecha no existen estudios concluyentes, sí podemos considerar que existe un grado de evidencia significativo sobre la utilidad de los probióticos (Díaz *et al.*, 2015) en las siguientes entidades clínicas, especialmente si se administran precozmente:

- Tratamiento coadyuvante de la diarrea infecciosa (WGO guides 2011)
- Prevención de la diarrea asociada a disbiosis y a tratamiento por antibióticos. (Johnston *et al.*, 2011)(Makino *et al.*, 2010)
- Prevención de la diarrea nosocomial y en particular por *Clostridium difficile*. (Surawicz *et al.*, 2000)
- Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Crohn y colitis ulcerosa. (Moayyedi *et al.*, 2010) (Jonkers *et al.*, 2012) (Orel *et al.*, 2014)
- Tratamiento del síndrome de intestino irritable. (Ford *et al.*,2014) (Didari *et al.*, 2015)
- Prevención de la enterocolitis necrotizante. (Holubar *et al.*, 2010) (Alfaleh *et al.*,2011)
- Tratamiento de diarreas de origen idiopático.

- Tratamiento del sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado.

Si bien la explicación de los mecanismos de acción de los probióticos no es sencilla, tampoco en este caso, pueden avanzarse entre otros mecanismos sobre los que aún se estudia, los siguientes:

- Bloqueo de los *locus* de adhesión de los enteropatógenos junto con producción incrementada de mucinas lo que dificultaría la adhesión a las células de la mucosa intestinal de bacterias y virus enteropatógenos como ha sido descrito para cepas de lactobacilos capaces de inducir expresión génica en células Caco-2. (Mattar *et al.*, 2002)
- Inhibición de los enteropatógenos por competencia por los nutrientes.
- Producción de metabolitos microbicidas tipo bacteriocinas o peróxido de hidrógeno.
- Producción de ácidos orgánicos que disminuyen el pH intestinal (Asahara *et al.*, 2001).

- Producción de enzimas con capacidad de hidrólisis de los polisacáridos no digeribles acumulados en la luz intestinal.
- Restauración de las funciones intestinales mediada por la producción de sustratos biorreguladores de los enterocitos, como el butirato.
- Estimulación de los mecanismos de la inmunidad, tanto innata como específica (Lorca *et al.*, 2001), (Gibson *et al.*, 2005), (Parvez *et al.*, 2006), facilitando el probiótico la eliminación de enteropatógenos y neutralización de sus toxinas.

Merecen ser destacados los estudios realizados sobre la capacidad de algunos probióticos, principalmente *Lactobacillus*, para prevenir y para coadyuvar en el tratamiento de la infección gástrica ocasionada por *H. pylori*, asociado a diversas patologías gástricas, como gastritis, úlcera péptica y carcinoma; sobre la base de los mismos mecanismos expuestos con anterioridad.(Wang *et al.*, 2013), (Dang *et al.*, 2014), (Zhang *et al.*, 2015).

## **f) Modificación de la Respuesta Biológica. Inmunomodulación.**

Quizás esta sea una de las más importantes, relevantes y complejas capacidades de los probióticos.

La modificación de la respuesta biológica a través del sistema inmune atribuida a poco numerosos probióticos les permitiría poder actuar sobre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o específica, a través de diferentes mecanismos, muchos interrelacionados y en cascada, y puede deberse tanto a la propia funcionalidad del probiótico como a estructuras microbianas y metabolitos bioactivos. (Werner y Haller, 2007).

Mayor relevancia adquiere esta funcionalidad probiótica al saber las estrechas relaciones existentes entre sistema inmune, sistema nervioso y sistema endocrino, así ha sido descrito que, ciertas cepas probióticas podrían ejercer mediación en funciones analgésicas, a nivel abdominal, al actuar sobre receptores opioides y canabinoides de las células del epitelio intestinal (Rousseaux *et al.*, 2007).

Las estructuras que para destruir necesita reconocer de modo específico el sistema inmune son los epítopos, presentes en antígenos; estructuras microbianas estas reconocidas por receptores no clonales PAMPs (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005).

Muy diversos agentes exógenos puede influir sobre la funcionalidad inmunitaria, bien potenciando o deprimiendo los mecanismos de respuesta: a estos agentes se les denomina "modificadores de la respuesta biológica" o BRMs (*biological response modifiers*) (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005).

Numerosos PAMPs, a través de su interacción con células productoras de citocinas inmunorreguladoras, ejercen actividad como BRMs tales como: el LPS, fracciones de mureína (muramil-dipéptido), el dimicolato de trehalosa, la bestatina y algunos exopolisacáridos (Ruiz-Bravo *et al.*, 1998). En algunos casos, se ha demostrado que la actividad BRM puede conseguirse con preparaciones de lactobacilos muertos [Erickson y Hubbard, 2000], si bien la efectividad de los probióticos muertos aún no ha sido demostrada, además de caer fuera de las definiciones mayoritarias de consenso.

Abundantes publicaciones vienen a documentar los efectos inmunomoduladores de microorganismos probióticos, encontrándose estos al menos parcialmente, en el origen de otros efectos como la resistencia a infecciones, como ha sido explicado anteriormente.(Hardy *et al.*, 2013)

En términos generales cabe afirmar que la inmunomodulación por probióticos puede manifestarse como:

- Potenciación de la inmunidad mucosal, medida por la producción de IgA. (Kabeerdoss *et al.*, 2011)
- Otros mecanismos relacionados con la inmunidad mucosal como el incremento de los linfocitos TCD4+ (Valeur *et al.* 2004)
- Proliferación y producción de citocinas de los linfocitos esplénicos como respuesta a mitógenos de células B y de células T, como se ha observado en respuesta a LPS (mitógeno B) y concanavalina A (mitógenoT), así como incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y de la IL-12.
- Estimulación inespecífica de la citotoxicidad natural, mediada por células NK (*natural killer*).
- Depresión de la producción local de citocinas proinflamatorias. (efectos anti-inflamatorios).
- Disminución de las respuestas de hipersensibilidad.
- Potenciación de la actividad fagocítica.

## **¿Y Mañana ?**

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la microbiota intestinal y los probióticos desde aquellas primeras ideas visionariamente acertadas de Metchnikoff a principios del siglo XX, gracias especialmente a los avances en biología molecular y metagenómica.

De una parte la clínica, para atender los cuadros gastroentéricos, y de otra parte la industria alimentaria y farmacéutica han supuesto, cada una desde sus respectivos intereses, un impulso espectacular en la investigación y en la puesta en el mercado de multitud de productos, cuya tendencia es creciente.

Los probióticos han entrado en los canales veterinarios, no solo en la ganadería de mamíferos y aves principalmente, sino también en el mundo de las mascotas y en el sector de la acuicultura.

Podemos decir que hoy los probióticos “están de moda”.

Sin embargo un largo y nada fácil camino queda por recorrer, que seguramente nos deparará importantes sorpresas.

Se requieren más estudios rigurosos que expliquen los mecanismos y los efectos, particularmente ensayos clínicos, pues aún la heterogeneidad de las publicaciones impide una valoración clínica objetiva y en los que quede bien definida el segmento poblacional al que se dirige la cepa probiótica, la dosificación y en definitiva el tratamiento, así como su bioseguridad.

Áreas nuevas vienen recogiendo cada vez más investigaciones prometedoras para las cepas probióticas; como son las relacionadas con las alergias, la rinitis y el asma, el eczema y la dermatitis atópica, los coadyuvantes de vacunas, la recuperación del ecosistema vaginal alterado y las infecciones del aparato respiratorio y del tracto urinario.

Nuevos avances tecnológicos vendrán a facilitar la comprensión de las interacciones probiótico-microbiota-hospedador.

La Probiogenómica surge en el horizonte como un enfoque basado en la genómica que permitirá predecir funciones fisiológicas mediante la detección de similitud de secuencias; aunque no podemos olvidar que las secuencias solo son información, que puede ser expresada o no según el medio ambiente, y de algún modo también de cuanto el microorganismo considere oportuno hacer en base al conjunto de información del que puede disponer y procesar en un momento dado, como han demostrado los estudios de *quorum sensing*.

La industria, en sus actuaciones, deberá mejorar aspectos como la información al consumidor y el etiquetado, cuya normativa consideramos es insuficiente, y ante lo cual las administraciones competentes deberían ser sensibles y proactivas.

Confiamos que este campo de investigación básica y aplicada, apasionante y relevante por sus implicaciones, continúe siendo objeto de interés de todos los "stakeholder" implicados, de tal manera que no sea una moda pasajera y

no olvidemos la verdad científica que encierran aquellas ideas con las que en su genialidad nos obsequiara Metchnikoff.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo general.**

La presente tesis doctoral se planificó con la finalidad de realizar cribados y estudios posteriores que permitiesen caracterizar nuevas cepas de lactobacilos cuyas propiedades biológicas y robustez tecnológica les confieran un potencial prometedor como candidatos a probióticos.

### **2.2. Objetivos específicos.**

Para la consecución del objetivo general propuesto se diseñó un plan de trabajo que respondió a los siguientes objetivos concretos:

2.2.1. Selección de cepas que reuniesen los criterios básicos exigibles para una bacteria probiótica.

2.2.2. Evaluación de la robustez tecnológica de la cepa D3.

2.2.3. Investigación de la capacidad inmunomoduladora de la cepa D3 mediante ensayos *ex vivo* en ratón.

2.2.4. Investigación de la capacidad de la cepa D3 para modificar la resistencia de ratones BALB/c a la infección experimental por bacterias patógenas intestinales.

2.2.5. Evaluación de la bioseguridad de las cepas D3 y B16.

## **2. OBJECTIVES.**

### **2.1. General Objective.**

Characterization of new lactobacilli strains with the biological properties and technological robustness that confer them the potential to be considered promising candidates to probiotics.

### **2.2. Specifics Objectives.**

2.2.1. Selection of *Lactobacillus* strains that meet the minimum required criteria for a probiotic bacterium.

2.2.2. Evaluation of the technological robustness of strain D3.

2.2.3. Determination of the immunomodulatory activity of strain D3 through *ex vivo* assays on mice.

2.2.4. Determination strain D3 to modify resistance to experimental infection with enteropathogenic bacteria in BALB/c mice.

2.2.5. Biosafety evaluation of strains D3 and B16

### **3. SELECCIÓN DE LACTOBACILOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO.**

#### **3.1. Criterios de selección.**

Los criterios para la selección de cepas de lactobacilos potencialmente probióticas se establecieron de acuerdo con dos premisas: en primer lugar, aislar bacterias cuyo fenotipo fuese compatible con el género *Lactobacillus*; en segundo lugar, seleccionar de entre las cepas aisladas aquellas que pudiesen aceptarse como potencialmente probióticas.

Para la primera condición, los aislamientos se realizaron en el medio de cultivo Agar MRS. Este medio fue diseñado originalmente por De Man, Rogosa y Sharpe como selectivo para lactobacilos, ya que aporta los nutrientes necesarios (peptona, extractos de carne y de levadura y una concentración de dextrosa muy superior a la de los medios ordinarios de cultivo), mientras que otros componentes (monoleato de sorbitán, acetato, manganeso, magnesio), además de promover el crecimiento de algunas especies de *Lactobacillus*, inhiben el de otros microorganismos, a lo que contribuyen también el citrato de amonio y el pH ligeramente ácido (De Man *et al.*, 1960; Zimbro *et al.*, 2009). Sin embargo, la selectividad del Agar MRS es moderada, y pueden crecer en él otros miembros del orden Lactobacillales, como *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, e incluso

levaduras. Por ello, solo se seleccionaron, en el primer muestreo, colonias formadas por bacilos Gram-positivos no esporulados que dieran negativa la prueba de la catalasa (Moncla y Hillier, 2003). La mayoría de estas cepas se identificaron provisionalmente a nivel de especie según sus perfiles bioquímicos.

En relación con la segunda premisa, se han tenido en cuenta los requisitos habitualmente establecidos en los muestreos de bacterias con potencial probiótico. Dado que tras ser ingeridos, los microorganismos probióticos han de mantenerse viables en el intestino, es necesario que sean suficientemente resistentes al pH gástrico y a la acción detergente de las sales biliares (Dunne *et al.*, 2001).

Se ha postulado además que, para ejercer sus actividades beneficiosas para el hospedador, las bacterias probióticas deben ser capaces de adherirse a las células intestinales. Este es un aspecto controvertido, ya que hay evidencias de que la adherencia *in vitro* no garantiza la posterior capacidad de colonización: estudios con cepas de *E. coli* han mostrado que hay pares adhesina/receptor que confieren capacidad de colonización, mientras que otros no (Adlerberth *et al.*, 2000).

En lo que se refiere a los lactobacilos, Reuter (2001) afirma que las especies diferentes a *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus reuteri* son meros transeúntes en el ecosistema intestinal humano. De la misma manera que no está claro si las bacterias autóctonas de la microbiota intestinal necesitan

o no adherirse a la mucosa (Walker y Buckley, 2006), también queda abierta la cuestión de si la colonización por bacterias probióticas es necesaria para que puedan ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador.

Las evidencias actuales indican que la mayoría de las bacterias probióticas no son capaces de colonizar el intestino de forma perdurable; por ello, para que lleguen a ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador, deben ingerirse con regularidad y en cantidad adecuada durante un cierto tiempo (Kligler y Cohrssen, 2008). Sin embargo, la adherencia a células de la mucosa intestinal podría constituir un mecanismo de exclusión de microorganismos patógenos, por competición por los mismos receptores o por formación de una barrera biológica que impida la colonización por los patógenos (Collado *et al.*, 2010). Por tanto, al formalizar los criterios de selección de cepas en el presente trabajo, se decidió que la capacidad de adherencia *in vitro* también se incluiría entre los requisitos. Finalmente, las baterías de pruebas utilizadas en muestreos de bacterias probióticas incluyen habitualmente ensayos de antibiosis *in vitro* (Dunne *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2003; Timmerman *et al.*, 2007). Aunque también este es un requisito controvertido, ya que no parece existir una correlación significativa entre la capacidad de un probiótico para inhibir el crecimiento de un agente patógeno *in vitro* y su capacidad para incrementar la resistencia a la infección por el mismo agente en modelos experimentales *in vivo* (Bujalance *et al.*, 2014), se decidió incluirlo en los criterios de selección del presente trabajo.

Por tanto, el estudio se planificó partiendo de un muestreo por aislamiento en Agar MRS, selección de bacilos Gram-positivos, no esporulados, catalasa-negativos; los cuales se sometieron a un proceso de selección integrado por ensayos *in vitro* de resistencia a pH ácido, resistencia a sales biliares, adherencia a células de mucosa intestinal y antibiosis frente a bacterias enteropatógenas.

### **3.2. Muestras.**

En una primera fase del trabajo se realizaron aislamientos de un total de 380 muestras de leche y ubres de cabra y de calostros, porciones de intestino y rumen de lactantes caprinos.

En una segunda fase se realizaron aislamientos de muestras de procedencia muy heterogénea: saliva humana, heces de mamíferos (humanos, cabras, cerdos, ovejas, caballos) y leche (humana, de cabra, de oveja y de yegua). En esta fase se analizaron un total de 96 muestras.

### **3.3. Aislamiento de lactobacilos.**

Los aislamientos se realizaron en Agar MRS de REMEL (Lenexa, USA), por siembra en estrías y posterior incubación a 37°C durante 48 h. De las colonias desarrolladas se efectuaron tinciones de Gram y a las colonias

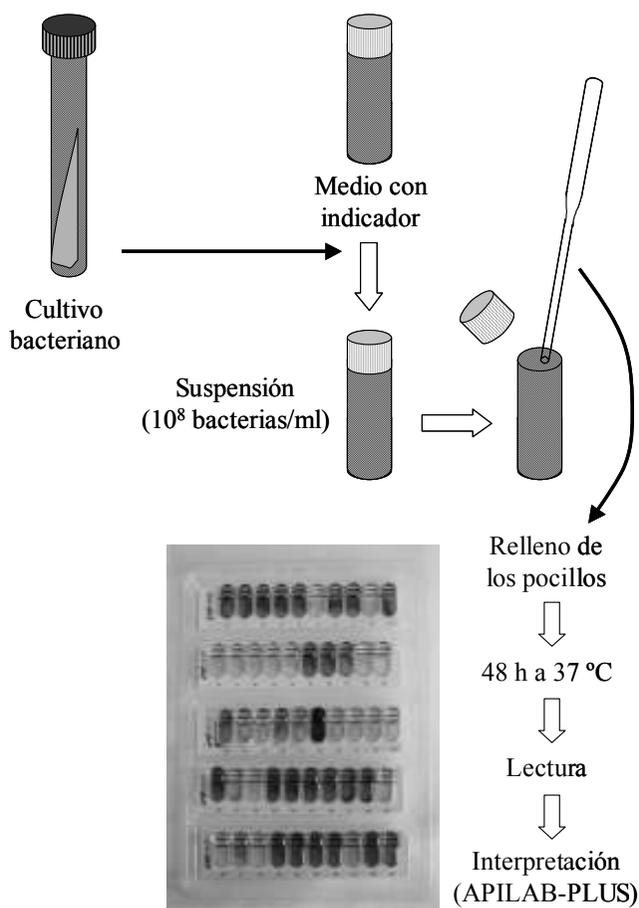
correspondientes a bacilos no esporulados Gram-positivos se les practicó la prueba de la catalasa.

### **3.4. Identificación fenotípica.**

La identificación de las especies de lactobacilos se realizó mediante el sistema API 50 CH de Biomérieux (Marcy-L'Étoile). El sistema está constituido por 50 pocillos (cinco filas de 10 pocillos cada una) dispuestos en unas láminas de plástico. Cada uno de estos pocillos contiene como sustrato un azúcar distinto que se encuentra deshidratado en el fondo. La casa comercial proporciona también viales que contienen un medio líquido adecuado para estudiar la fermentación de los distintos sustratos. Este medio consta, entre otros componentes, del indicador púrpura de bromocresol, que vira de púrpura a amarillo cuando el medio se acidifica como consecuencia de la fermentación de los azúcares presentes en los pocillos.

Para establecer el perfil bioquímico de las cepas, se prepararon inóculos en el medio proporcionado por la casa comercial, ajustados por turbidez a  $10^8$  bacterias viables por ml. Con la suspensión obtenida fueron inoculados los pocillos de las tiras API evitando la formación de burbujas y empleando pipetas Pasteur estériles. A continuación se cubrieron las cúpulas de los pocillos con parafina estéril y se incubaron las tiras durante 48 h a 37°C. Como consecuencia de la fermentación se forman ácidos que provocan el viraje

del indicador. Este viraje permitió conocer el patrón de fermentación de cada bacteria. El proceso se esquematiza en la Figura 3.1. Para la interpretación de los resultados se empleó el software APILAB-PLUS proporcionado por la casa comercial y que permite la identificación de cada bacteria en base a los azúcares que fermenta.



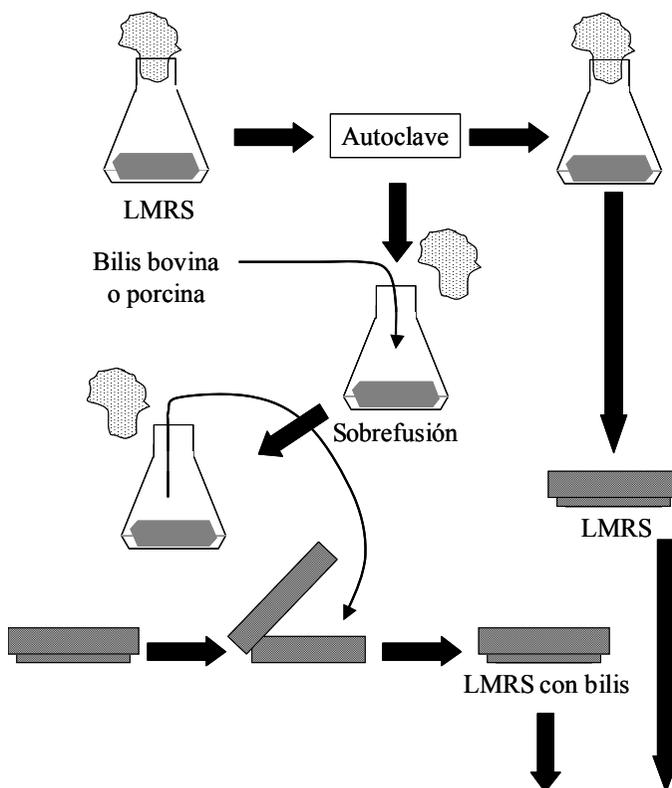
**Figura 3.1. Identificación fenotípica de lactobacilos.**

### **3.5. Resistencia a pH ácido y a sales biliares.**

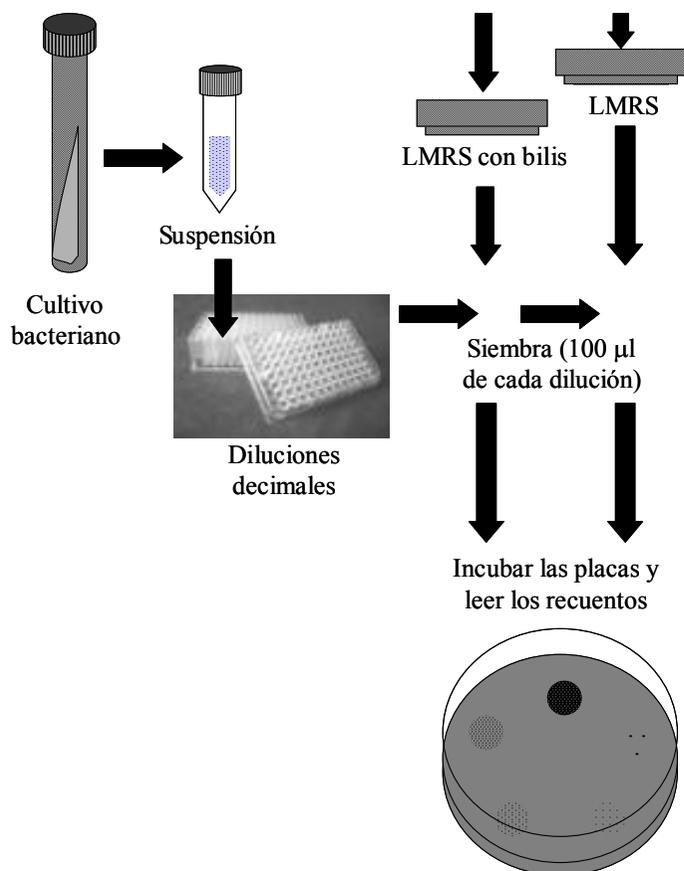
Para determinar la capacidad de las cepas probióticas para resistir un pH ácido similar al del estómago se trabajó con cultivos de 24 h obtenidos en Agar MRS. A partir de ellos fueron preparadas suspensiones en PBS estéril con una concentración aproximada de  $10^8$  bacterias viables por ml. De cada suspensión se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l que se distribuyeron en tubos eppendorf estériles que contenían 400  $\mu$ l de solución salina acidificada por adición de 75  $\mu$ l de ácido clorhídrico 0.15 N a 400  $\mu$ l del vehículo, resultando un pH de aproximadamente 2.0. El contenido de los eppendorf se homogeneizó por agitación y los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se tomaron 10  $\mu$ l de cada eppendorf y se realizaron diluciones decimales en PBS. De cada una de las diluciones, así como de la suspensión original, fueron sembrados 10  $\mu$ l en placas de Agar MRS con el objetivo de comprobar la supervivencia de la cepa probiótica en los distintos sustratos.

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas potencialmente probióticas en presencia de sales biliares, se prepararon placas de agar MRS suplementadas con bilis bovina o porcina (ambas de Sigma) a distintas concentraciones, como se muestra en el esquema de la Figura 3.2. Se dispusieron matraces con 100 ml de agar MRS estéril, mantenido a sobrefusión y se añadió a cada uno de ellos una cantidad de 0.5 ó 0.05 g de bilis bovina. El medio así preparado se distribuyó en placas Petri estériles

adecuadamente identificadas. Se prepararon inóculos a partir de cultivos de 24 h en PBS estéril. De cada inóculo, ajustado previamente para contener alrededor de  $10^8$  bacterias por ml, se realizaron diluciones decimales en PBS y de cada dilución se sembraron 10  $\mu$ l en las placas del medio suplementado con bilis así como en placas control de agar MRS sin bilis. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y transcurrido este tiempo se evaluó la supervivencia de los lactobacilos en los distintos medios, realizando recuentos comparativos de colonias.



**Figura 3.2. Ensayo de crecimiento en presencia de sales biliares.**



**Figura 3.2. (Continuación).**

Alternativamente, el análisis de la resistencia a los jugos gástricos y a la presencia de bilis se realizó utilizando el método Jacobsen. Se trata de una metodología en la que se pueden estudiar la resistencia a jugos gástricos y a sales biliares simultáneamente además de supervivencia y crecimiento en cada una de las condiciones con la ayuda de

un lector multipocillo ELISA (Thermo Fisher Scientific, España). (Jacobsen *et al.*, 1999).

A continuación se describe la metodología a seguir para la realización del ensayo:

En primer lugar, se preparó una suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^7$  UFC/mL) sobre la que se realiza el estudio. Para ello, se partió de un cultivo puro en MRS caldo (Oxoid, U.K) de 24 horas aproximadamente, tiempo en el que el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. Tras realizar los lavados pertinentes, la biomasa recuperada se resuspende en solución salina estéril.

Al mismo tiempo, se prepararon los medios de cultivo necesarios para simular las situaciones a las que se enfrenta el microorganismo en el aparato digestivo. Los medios de cultivo fueron:

- MRS caldo; se utilizó como control positivo de crecimiento.
- MRS caldo a pH 2,5; el medio de cultivo se acidifica con ácido clorhídrico para simular los jugos gástricos y comprobar su resistencia.
- MRS caldo con 0,3% de bilis bovina; para comprobar el crecimiento de la bacteria en presencia de sales biliares.

A continuación se dispensaron los medios en placas microtiter, inoculándose en cada pocillo la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron en aerobiosis en una estufa a 37°C durante 24 horas. Tras cada hora de

incubación se realizó una lectura de absorbancia en el lector multipocillos ELISA (Thermo Fisher Scientific, España) a una longitud de onda de 620nm, en cada una de las condiciones descritas anteriormente. Los datos obtenidos en cada una de las lecturas fueron sometidos a tratamientos matemáticos y estadísticos sencillos: conversión a UFC/mL, promedios y desviaciones típicas, estimándose si existió crecimiento del microorganismo y/o tipo de crecimiento en cada una de las condiciones a estudiar.

La capacidad de supervivencia que presentaron las distintas cepas frente a los jugos gástricos y las sales biliares fue realizada mediante recuento de colonias en agar MRS. Para ello, tras un período de cuatro horas de incubación, se procedió a tomar un volumen de 100 µl de cada uno de los pocillos designados para el estudio de supervivencia. Se realizó una batería de diluciones decimales seriadas. Dichas diluciones se sembraron por extensión con ayuda de un asa de vidrio (espátula de Drigalski) en placas de agar MRS (Oxoid, U.K.) y se incubaron en estufa a 37° C. Se realizaron dos lecturas de los resultados, a las 24 horas y a las 48 horas de incubación. Con los datos obtenidos en sendas lecturas, tras el tratamiento estadístico pertinente: promedios, desviaciones típicas y cálculo de porcentajes, se estimó el índice de supervivencia.

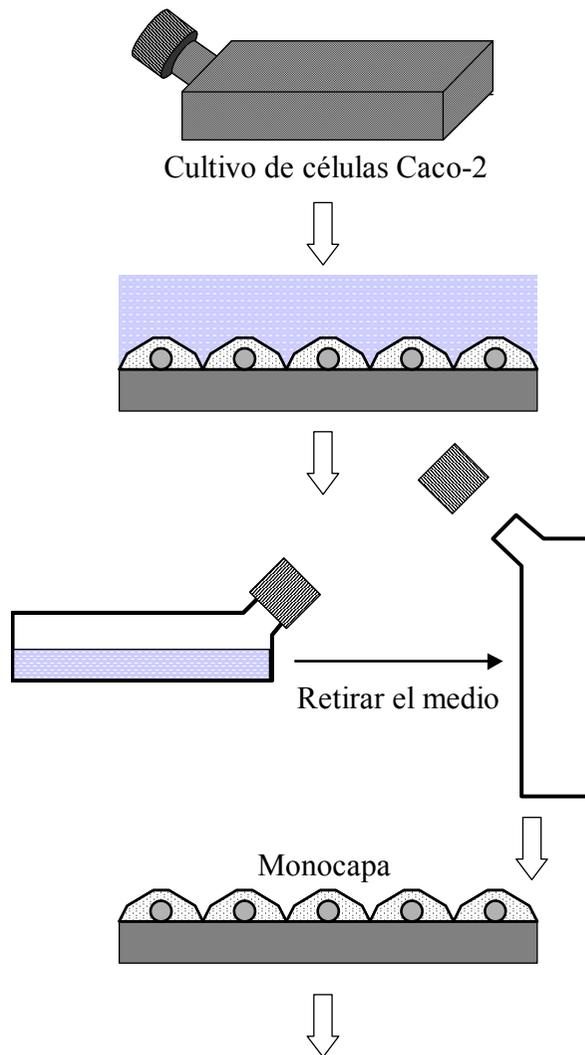
Todo el experimento, tanto en el estudio de supervivencia como en el de crecimiento, se realizó por triplicado para que los resultados fueran significativos.

### **3.6. Adherencia a células de mucosa intestinal.**

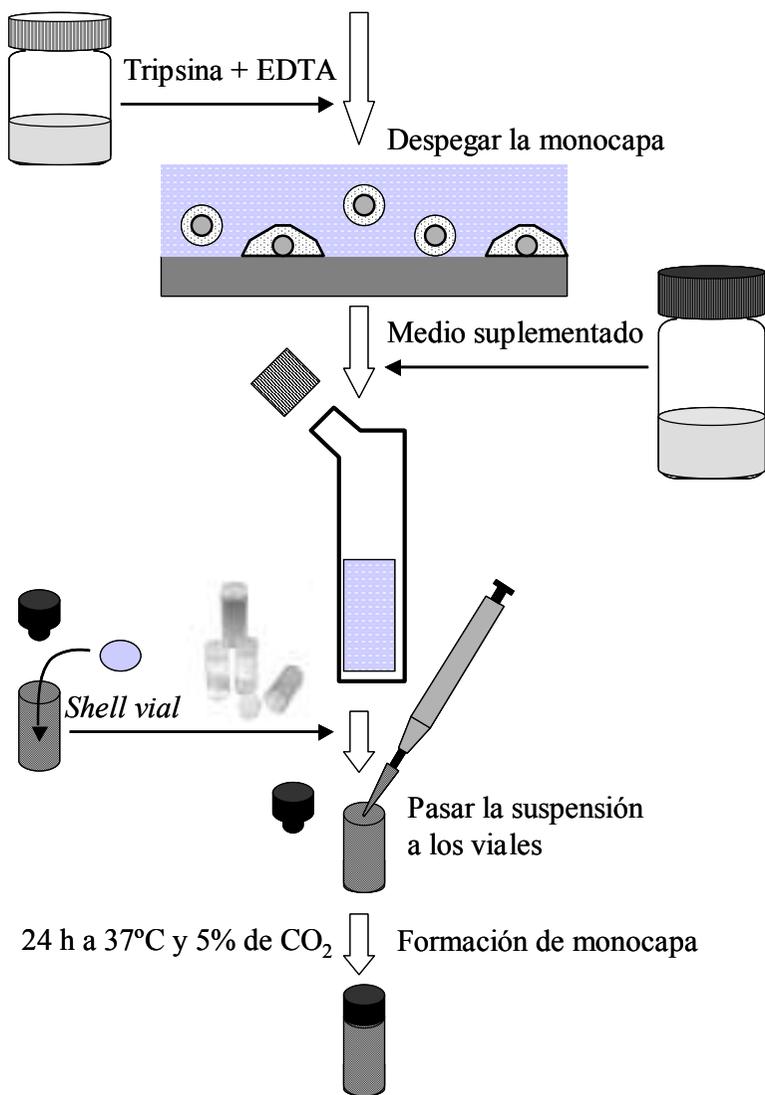
Para la realización de este ensayo de adherencia se utilizaron células Caco-2, las cuales constituyen una línea celular continua procedente de adenocarcinoma de colon humano, y que fueron amablemente cedidas por el Dr. J. M. Navarro (Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada). Las células se descongelaron en baño de agua a 37°C y se lavaron tres veces por centrifugación a 1000 r.p.m. con medio RPMI 1640 (Sigma), suplementado con FCS al 10%; estos lavados tuvieron como objeto eliminar el agente crioprotector (dimetilsulfóxido) que es tóxico para las células. Con la suspensión celular obtenida se inició el cultivo en frascos Falcon (Costar) a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se observaron diariamente y cambiándose el medio de cultivo cuando este viraba a amarillo por la acidificación. Una vez obtenida una monocapa continua se procedió a despegar las células, mediante la acción de una solución de Tripsina-EDTA (750 mg de tripsina y 200 mg de EDTA por litro de PBS, ambos productos de Sigma) esterilizada por filtración a través de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro y calentada en un baño a 37°C. Las células despegadas se suspendieron en medio fresco y se tomó un volumen suficiente para propagar el cultivo, o, en su caso, para la realización del ensayo. Todas las manipulaciones de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar para asegurar la esterilidad. El ensayo de adherencia se realizó según el procedimiento conocido como "técnica del shell vial", descrito para el cultivo e identificación de virus y adaptado para nuestros fines como

se indica en la Figura 3.3. Un shell vial es un vial estéril de poliestireno con tapón a presión, que lleva en el fondo un cubreobjetos de vidrio estéril que cubre toda la base del vial. Cada vial recibió 1 ml de una suspensión de células Caco-2 en medio RPMI suplementado. Los viales se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para obtener una monocapa continua de células sobre el cubreobjetos existente en la base del shell vial. Las monocapas se lavaron varias veces con medio RPMI 1640 suplementado pero sin mezcla antibióticos/antimicótico (para evitar interferencias con las bacterias a añadir), y finalmente se añadió 1 ml de este medio a cada shell vial.

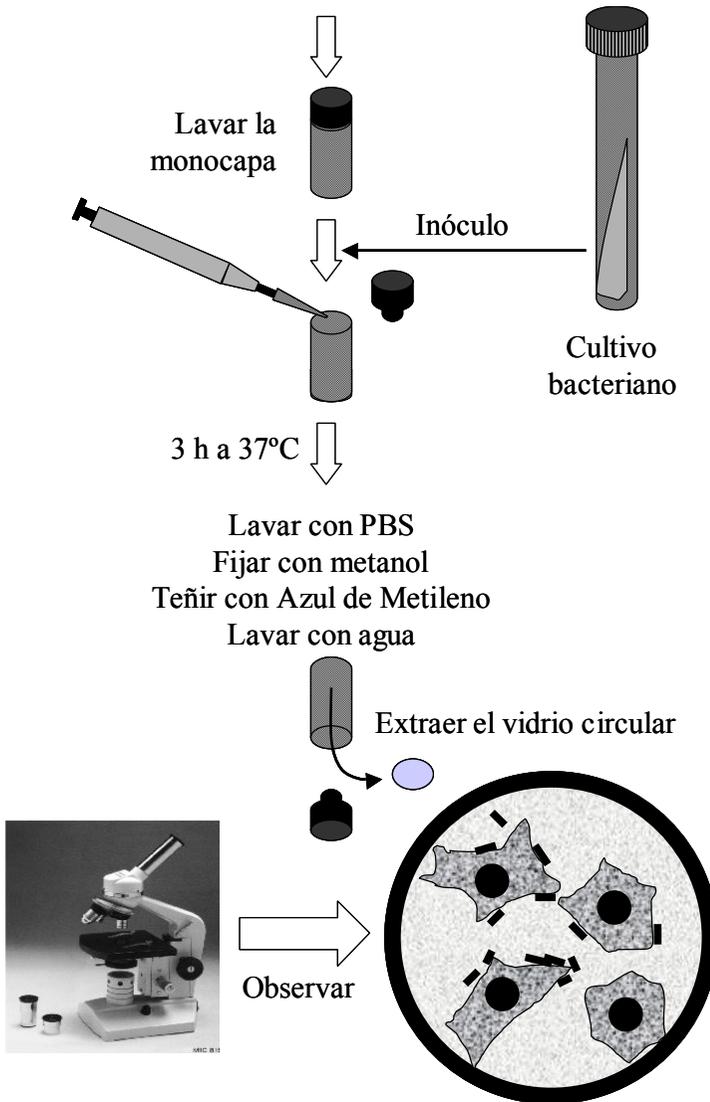
Se prepararon cultivos de las distintas bacterias cuya adherencia a células Caco-2 iba a ser estudiada. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones bacterianas en medio RPMI 1640 sin antibiótico, estandarizadas a 10<sup>8</sup> bacterias viables por ml. De cada una de ellas se tomó 1 ml que se añadió a los correspondientes viales. Se realizó una nueva incubación, 3 h a 37°C, tras lo cual se repitieron los lavados de las monocapas, con PBS, para eliminar las bacterias que no se hubiesen unido a la superficie celular. Una vez lavados los viales, se fijaron las muestras con metanol y se realizó una tinción con azul de metileno. Para poder observar la muestra teñida, se extrajo el cubreobjetos del vial y se procedió a su observación al microscopio óptico.



**Figura 3.3. Ensayo de adherencia de lactobacilos a células Caco-2.**



**Figura 3.3. (Continuación).**



**Figura 3.3. (Continuación).**

### **3.7. Inhibición *in vitro* de bacterias enteropatógenas.**

La antibiosis se define como una interacción biológica entre dos o más organismos que causa perjuicio por lo menos a uno de ellos, o una asociación antagónica entre un organismo y las sustancias metabólicas producidas por otro.

Existen numerosos métodos descritos para el estudio de estas actividades biológicas. En nuestro caso, hemos utilizado un método *in vitro* (Jacobsen, 1999), ampliamente usado para la evaluación de la capacidad de producción de sustancias inhibitoras del crecimiento de un microorganismo frente a otro.

La técnica utilizada se basa en la difusión del elemento inhibitor en el medio de cultivo desde un punto central. La metodología seguida (denominada de doble capa) se resume a continuación:

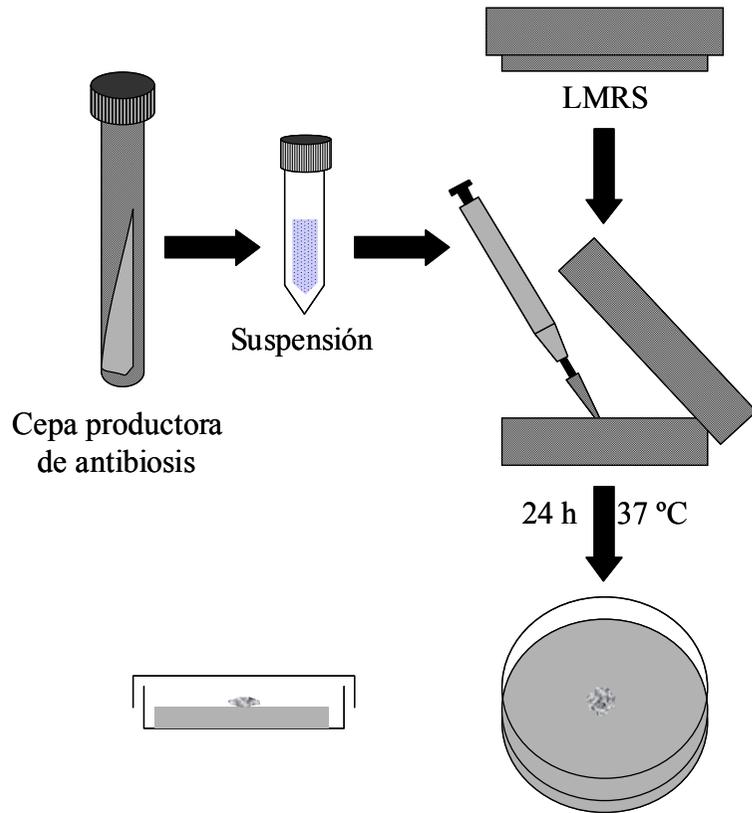
Se preparan placas Petri con medio de cultivo Agar MRS donde se sembraron en el centro de la placa volúmenes conocidos (10  $\mu$ L) de inóculos densos de las cepas de lactobacilos a estudiar. Seguidamente se incuban las placas a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener una masa localizada de crecimiento bacteriano.

Una vez transcurrido un tiempo de incubación 24 h, se preparan suspensiones de concentración conocida ( $10^8$  UFC/mL) de los enteropatógenos a ensayar.

En nuestro caso se utilizaron los siguientes microorganismos:

- *Yersinia enterocolitica* serotipo O9 cepa IP383
- *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.
- *Salmonella enteritidis* subespecie enterica Serotipo London (cedida por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada)
- *Staphylococcus aureus* CECT 976 (productor de la enterotoxina tipo A).

A continuación, se procedió a la inoculación de tubos de ensayo a sobrefusión conteniendo medio de cultivo agar TSA con cada una de las suspensiones obtenidas. Seguidamente, los tubos inoculados se vertieron sobre placas de MRS tamponado en la que previamente se había cultivado la cepa de lactobacilo a ensayar. De esta manera se formó en las placas una doble capa: la inferior, de agar MRS conteniendo (en su superficie) el cultivo de la bacteria potencialmente productora de antibiosis, y una capa superior de agar TSA que contiene el inóculo de la bacteria enteropatógena a ensayar, como se muestra en la Figura 3.4. Una vez gelificada la capa superior, las placas se incuban durante 24 h a 37°C. Transcurridas las 24 horas de incubación de los medios en doble capa, se examinó la presencia de halos de inhibición de crecimiento y se tomaron las medidas de su diámetro. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis matemáticos y estadísticos sencillos.



**Figura 3.4. Ensayo de antibiosis.**

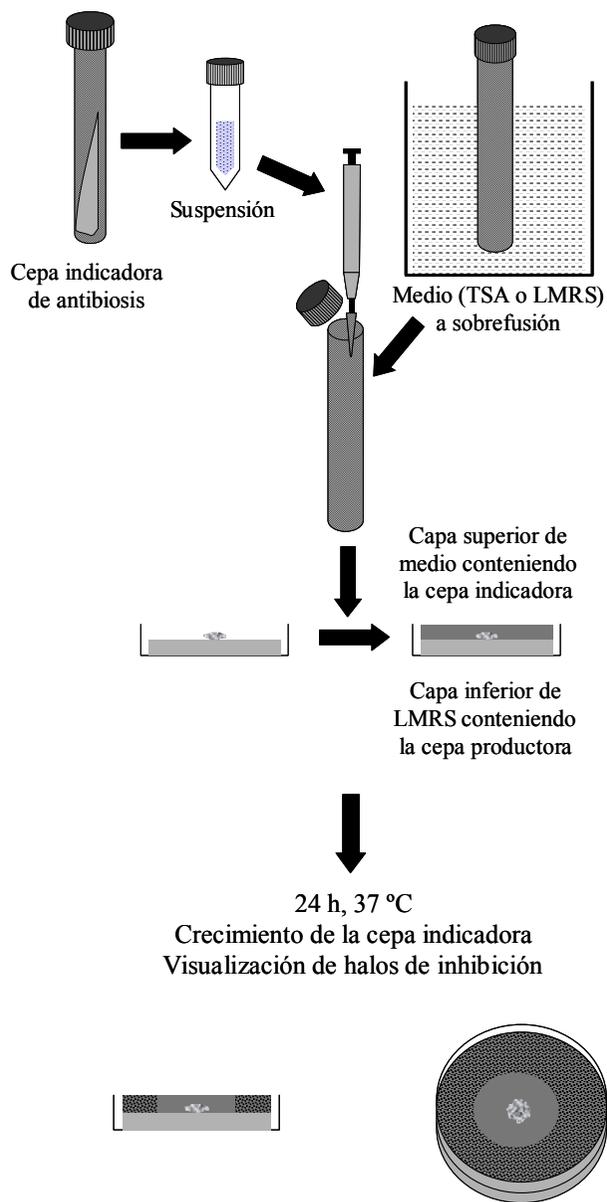


Figura 3.4. (Continuación).

### 3.8. Resultados y discusión.

#### 3.8.1. Aislamiento e identificación fenotípica.

En los ensayos correspondientes a la primera fase (380 muestras de origen caprino) fueron aisladas 21 cepas de bacilos Gram-positivos no esporulados, catalasa negativos, que se identificaron a nivel de especie mediante los perfiles bioquímicos obtenidos con el sistema API 50 CH. Las especies identificadas se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Identificación de especies aisladas de origen caprino.**

ESPECIE	Nº DE CEPAS	%
<i>L. plantarum</i>	8	38.1%
<i>L. acidophilus</i>	3	14.3%
<i>L. lactis</i>	3	14.3%
<i>L. brevis</i>	2	9.5%
<i>L. paracasei</i>	1	4.8%
<i>L. salivarius</i>	1	4.8%
<i>L. fermentum</i>	1	4.8%
No identificados	2	9.5%
Total	21	100%

En los ensayos correspondientes a la segunda fase (96 muestras de orígenes diversos) se aislaron 36 cepas de bacilos Gram-positivos no esporulados, catalasa negativos, de los cuales se identificaron a nivel de especie 13 mediante los perfiles bioquímicos obtenidos con el sistema API 50 CH y las 23 restantes fueron identificadas por secuenciación del rRNA 16S (procedimiento descrito en el capítulo 4). Las especies identificadas se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Identificación de especies aisladas de origen diverso.**

ESPECIE	Nº DE CEPAS		%
	API 50 CH	rRNA 16S	
<i>L. plantarum</i>	1	2	8.3%
<i>L. acidophilus</i>	1		2.8%
<i>L. fermentum</i>	4	15	52.8%
<i>L. salivarius</i>	2	3	13.9%
<i>L. brevis</i>	1		2.8%
<i>L. reuteri</i>		2	5.6%
<i>L. animalis</i>		1	2.8%
No identificados	4		11.1%
Total	13	23	100%

### 3.8.2. Resistencia a pH ácido y sales biliares.

Los resultados de resistencia a pH ácido y sales biliares realizados con las cepas de la primera fase del muestreo se presentan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3. Resistencia a pH ácido y sales biliares.**

Cepa	Bacterias viables (log) por mL en las siguientes condiciones <sup>a</sup>				
	Solución salina <sup>b</sup>	Solución salina acidificada (pH 2) <sup>b</sup>	Medio sin sales biliares <sup>c</sup>	Medio con sales biliares (0.05%) <sup>c</sup>	Medio con sales biliares (0.5%) <sup>c</sup>
A1	8.00	<2.00 <sup>d</sup>	>8.00	<2.00	<2.00
A2	6.81	6.70	7.92	7.54	3.00
A4	5.90	<2.00	>8.00	7.30	7.39
B1	>8.00	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
B2	7.56	2.58	4.82	5.59	2.34
B3	7.79	2.28	>8.00	>8.00	<2.00
C1	6.58	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
C2	6.23	<2.00	7.68	7.61	<2.00
C6	>8.00	2.89	>8.00	6.70	>8.00
D1	>8.00	2.49	>8.00	>8.00	>8.00
D3	6.45	5.90	>8.00	>8.00	<2.00
D5	6.46	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00

D6	7.36	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
ALH1	6.25	2.11	6.95	7.00	6.68
ALH2	>8.00	4.46	>8.00	6.84	<2.00
ALH3	7.34	<2.00	>8.00	2.28	2.28
ALH4	7.18	6.38	>8.00	>8.00	<2.00
Xa	6.90	<2.00	7.36	7.48	7.28
C12	5.38	5.49	6.45	6.08	<2.00
H22	6.25	3.49	7.38	7.46	3.08
I12	6.38	<2.00	7.46	7.40	7.45
I31	6.34	4.50	>8.00	>8.00	7.49

- a. Se parte de inóculos iniciales de aproximadamente  $10^8$  bacterias viables por mL
- b. Viabilidad medida después de 30 minutos de incubación
- c. Viabilidad tras incubación de placas durante 24 horas
- d. Límite de detección de recuentos

De las 21 cepas estudiadas, 8 cepas (38.1%) mostraron una reducción igual o mayor a dos unidades logarítmicas tras la incubación a pH ácido y otras 9 (42.8%) no crecieron en absoluto. Las cepas A2, D3, ALH4 y C12 no fueron afectadas de forma apreciable por el pH ácido (variaciones inferiores a dos unidades logarítmicas respecto del inóculo inicial).

Solo una (A2) de las 21 cepas fue incapaz de crecer en presencia de 0.05% de sales biliares. La cepa ALH3 mostró una gran sensibilidad a las sales biliares puesto que su crecimiento fue mínimo. Las restantes (incluyendo las cepas A2, D3, ALH4 y C12) mostraron un crecimiento satisfactorio

en estas condiciones. Solo 14 cepas crecieron en presencia de 0.5% de sales biliares.

Las cepas A2, D3, ALH4 y C12, mencionadas anteriormente, fueron las únicas que mostraron simultáneamente crecimiento tanto a pH ácido como en presencia de 0.05% de sales biliares. La identificación de estas cepas se muestra en la Tabla 3.4. Solamente las cepas A2 y D3, que fueron identificadas con alta fiabilidad, se eligieron para el ensayo de adherencia a células.

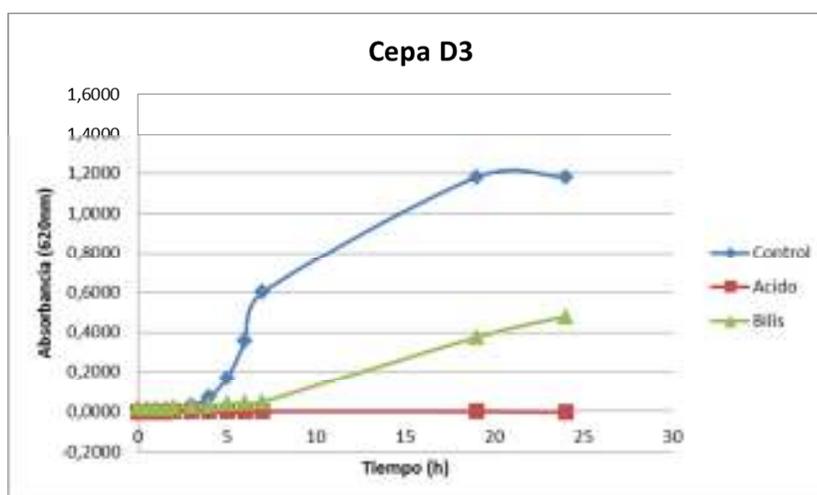
**Tabla 3.4. Identificación fenotípica de las cepas que mostraron resistencia a pH ácido y a 0.05 de sales biliares.**

CEPA	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA (API 50 CH)	FIABILIDAD (%)
A2	<i>L. acidophilus</i>	99.9
D3	<i>L. fermentum</i>	99.9
ALH4	<i>No identificado</i>	
C12	<i>L. acidophilus</i>	90.5

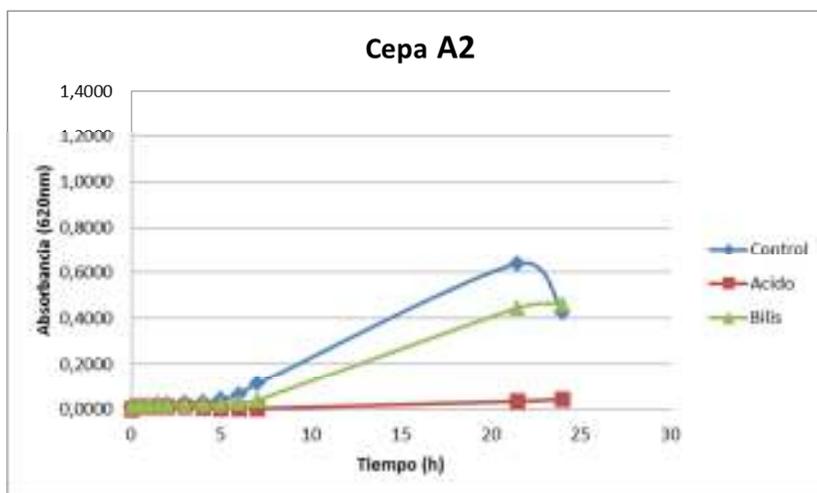
En una segunda serie de ensayos se utilizó el procedimiento de cultivo en pocillos y lectura espectrofotométrica y de viabilidad, descrito en el apartado 3.4.

En las Figuras 3.5 y Figura 3.6 se muestran las gráficas de lectura espectrofotométrica correspondientes a las cepas D3 y A2 respectivamente, como representativas de los ensayos realizados con el conjunto de cepas. El procedimiento se

muestra adecuado para examinar la cinética de crecimiento de la bacteria en las distintas condiciones experimentales (medio de cultivo, medio a pH 2,5 y medio adicionado de sales biliares al 0.3%). Sin embargo, es imprescindible realizar los recuentos para tener una estimación de la viabilidad, puesto que las bacterias muertas si no se lisan siguen ofreciendo turbidez. Las dos gráficas revelan la capacidad para crecer en presencia de sales biliares de ambas cepas. La cepa D3 mantuvo su turbidez constante a pH 2.5 y los recuentos de viables confirmaron que aunque no hubo crecimiento la viabilidad se conservó (datos no mostrados). La cepa A2 también creció en presencia de sales biliares y a pH 2.5 mostró un ligero incremento de turbidez, lo que concuerda con su excepcional resistencia en condiciones ácidas mostrada en los ensayos anteriores (Tabla 3.3).



**Figura 3.5. Lecturas espectrofotométricas de la cepa D3 en distintas condiciones de cultivo.**



**Figura 3.6. Lecturas espectrofotométricas de la cepa A2 en distintas condiciones de cultivo.**

Dado el interés de los recuentos de viabilidad en relación de los objetivos del presente trabajo en la Tabla 3.5 se presentan los resultados correspondientes a 22 cepas de las aisladas en la segunda fase de muestreo. Es de destacar el excelente comportamiento de la cepa B16, en la que además concurre el hecho favorable de haber sido identificada mediante secuenciación del rRNA 16S como *Lactobacillus fermentum* con un altísimo porcentaje de fiabilidad.

**Tabla 3.5. Viabilidad de 23 cepas de lactobacilos aisladas en la segunda fase de muestreo, cultivadas en distintas condiciones.**

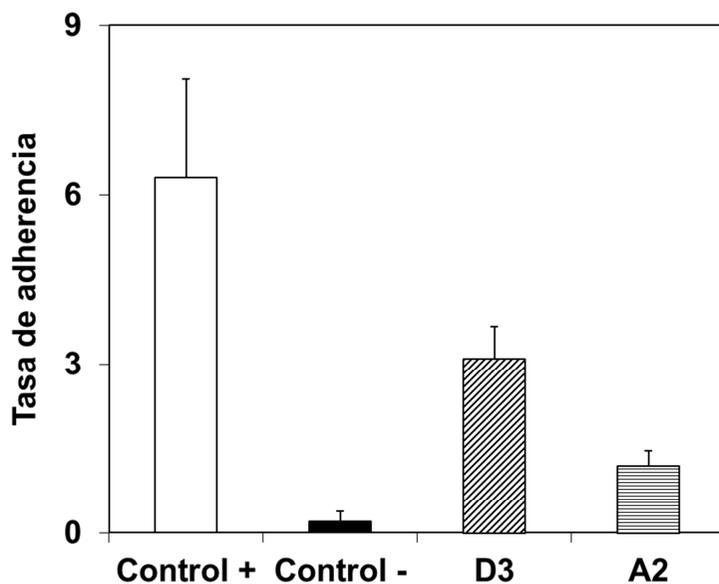
Cepa	Bacterias viables (log) por mL en las siguientes condiciones <sup>a</sup>		
	MRS <sup>b</sup>	MRS a pH 2,5 <sup>b</sup>	MRS con 0.3% de sales biliares <sup>b</sup>
B6	7,17	6,13	6,45
B7	8,88	6,71	7,37
B8	7,15	5,90	6,42
B10	7,78	5,70	7,96
B14	8,37	7,03	8,27
B15	8,11	6,42	8,31
B16	7,78	6,71	7,92
B17	7,70	6,75	7,87
B21	7,38	6,39	7,38
B22	8,39	7,36	8,37
B24	7,80	6,82	8,43
B25	7,98	6,87	8,64
B26	7,93	7,33	8,48
B29	8,25	7,22	8,22
B34	8,18	6,99	7,98
B35	8,30	6,95	8,08
B39	8,33	7,11	8,21

B49	7,87	7,33	7,96
B52	8,14	7,61	8,29
B62	7,71	7,36	7,08
NN-1	8,01	7,20	7,61
P-681-1-2	5,31	4,60	5,48

- a. Se parte de inóculos iniciales de aproximadamente  $10^8$  bacterias viables por mL
- b. Viabilidad tras incubación durante 4h

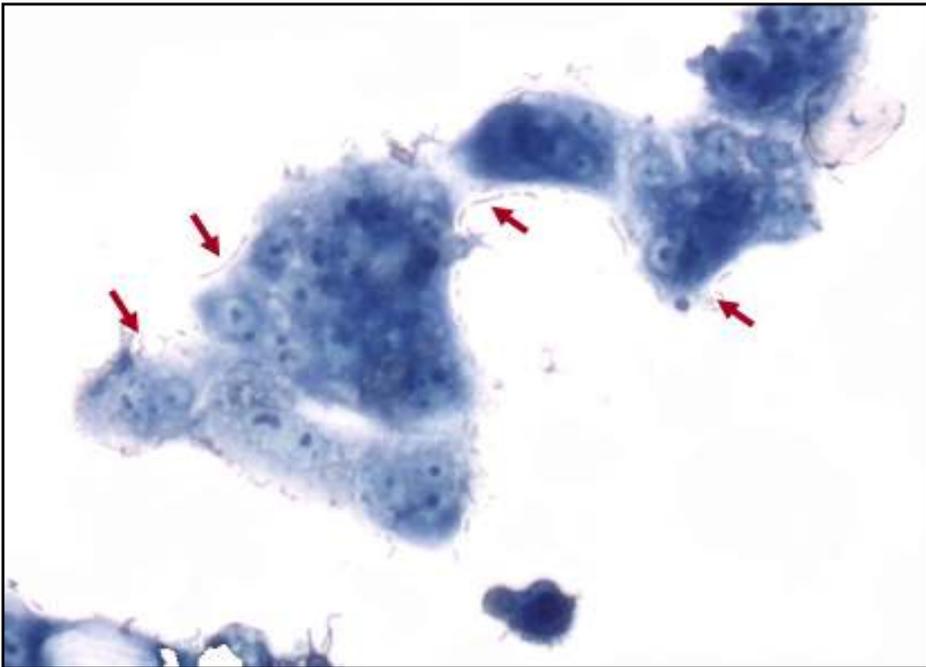
### 3.8.3. Adherencia a células epiteliales

Como se ha indicado en la sección 3.8.2, las cepas A2 y D3 fueron las seleccionadas para los ensayos de adherencia a células Caco-2. En estos ensayos se utilizó como control positivo la cepa IP383 de *Y. enterocolitica*, especie cuyas cepas de origen humano poseen adhesinas bien conocidas (Leo y Skurnik, 2011). Como control negativo se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* que por su procedencia ambiental carece de adhesinas. Los resultados de los ensayos realizados por triplicado se presentan en la Figura 3.7. Como puede observarse ambas cepas mostraron capacidad de adherencia aunque la de la cepa D3 fue significativamente mayor.



**Figura 3.7. Capacidad de adherencia.**

A continuación, en la Figura 3.8, se muestra una imagen característica de estos ensayos concretamente realizados con la cepa D3.



**Figura 3.8. Microfotografía (x 1000, tinción con azul de metileno) de células Caco-2 mostrando bacterias adheridas. Ensayo realizado con la cepa D3.**

#### **3.8.4. Inhibición *in vitro* de bacterias enteropatógenas.**

Para los ensayos de antibiosis se eligieron las cuatro cepas que mostraban buena resistencia a pH ácido y sales biliares (mostradas en la Tabla 3.4) y siete cepas que aunque

perdieron 2 o más unidades logarítmicas de viabilidad tras incubarse a pH ácido, crecieron en presencia de 0.05% de sales biliares, con la excepción de la cepa H22 (*L. salivarius*) que fue excluida por su extremada sensibilidad a pH ácido.

Los resultados de los ensayos de inhibición de crecimiento de *Y. enterocolitica* se presentan en la Tabla 3.6. Todas ellas mostraron mayor o menor actividad inhibidora, lo que concuerda con el hecho de que en el medio MRS, que tiene un alto contenido en dextrosa (20g/L), los lactobacilos producen gran cantidad de ácido que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias enteropatógenas y que enmascara la posible antibiosis debida a otros factores como producción de bacteriocinas o antibióticos. Una discusión extensa de estos resultados se presenta en la publicación original requerida para la presentación de la tesis (Bujalance *et al.*, 2014).

**Tabla 3.6. Inhibición del crecimiento de *Y. enterocolitica* por cepas de lactobacilos.**

CEPA	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
A2	30
A4	50
B2	18
D3	54
B3	51
C6	59
D1	60
ALH1	64
ALH2	42
ALH4	38
C12	30

Posteriormente, se amplió el estudio de antibiosis incluyendo nuevas bacterias de prueba para la cepa D3, seleccionada en base a su óptimo comportamiento en todas las pruebas realizadas, y para la cepa B16, procedente de la segunda fase del muestreo, la cual mostró buena resistencia a pH ácido y sales biliares y un buen comportamiento en cuanto a facilidad de cultivo y robustez tecnológica, aspectos estos que

consideramos de especial interés para su futura utilidad industrial. Los resultados de antibiosis se presentan en la Tabla 3.7.

De nuevo las dos cepas mostraron actividad inhibidora atribuible a la producción de ácidos en Agar MRS. Es interesante señalar que en este ensayo la actividad inhibidora de la cepa D3 fue notablemente superior a la de B16, aunque dado que el inóculo central de la bacteria inhibidora no está estandarizado, este método no permite hacer comparaciones cuantitativas plenamente significativas.

**Tabla 3.7. Antibiosis de las cepas D3 y B16 frente a diversos enteropatógenos.**

CEPA	BACTERIA DE PRUEBA	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
D3	<i>Y. enterocolitica</i>	54
	<i>S. enterica</i>	30
	<i>L. monocytogenes</i>	65
	<i>S. aureus</i>	55
B16	<i>Y. enterocolitica</i>	21
	<i>S. enterica</i>	15
	<i>L. monocytogenes</i>	13
	<i>S. aureus</i>	14

### **3. SELECTION OF *LACTOBACILLUS* STRAINS WITH PROBIOTIC POTENTIAL.**

#### **3.1. Selection Criteria.**

Criteria for the selection of potentially probiotic lactobacilli strains were established in accordance to two conditions: first, the isolation of bacteria with a phenotype compatible with the genus *Lactobacillus*; second, the selection of those strains that might be considered as potentially probiotic among the isolated strains.

In order to meet the first condition, the isolation was carried out in culture MRS Agar medium. This was originally designed by De Man, Rogosa and Sharpe as a selective medium for lactobacilli, since it contains all the required nutrients (peptone, meat and yeast extracts, and a dextrose concentration higher than in other common culture media), whereas other components (sorbitan monooleate, acetate, manganese and magnesium), in addition to promoting the growth of some *Lactobacillus* species, inhibit the growth of other microorganisms. This inhibition is also enhanced by ammonium citrate and the slightly acidic pH (De Man et al., 1960; Zimbro et al., 2009). However, the selectivity of MRS Agar is moderate as it allows for the growth of other members of the order Lactobacillales, such as *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, or even yeasts. For this reason,

only colonies formed by nonsporulating Gram-positive, catalase-negative bacilli were chosen in the first sampling (Monclay Hillier, 2003). Most of these strains were provisionally identified at the species level in accordance to their biochemical profiles.

Regarding the second condition, the usual requirements for the screening of potentially probiotic bacteria were considered. Given that after the ingestion, probiotic microorganisms must remain viable in the intestine, it is necessary that they are resistant to gastric pH and the detergent action of bile salts (Dunne et al., 2001).

It has also been proposed that probiotic bacteria should be able to adhere to intestinal cells in order to produce a beneficial effect on the host. This is a controversial issue, since there is evidence that in vitro adherence does not guarantee colonization ability: some adhesion/receptor pairs have been shown to confer colonization capacity, while others have not, as reported in studies with *E. coli* (Adlerberth et al., 2000).

With regard to lactobacilli, Reuter (2001) affirms that species other than *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus reuteri* are just transient in the human intestinal ecosystem. Likewise, it is not clear if autochthonous bacteria of gut microbiota need to adhere to the mucosa (Walker y Buckley, 2006), furthermore, it is open to a question whether colonization by

probiotic bacteria is necessary to produce beneficial effects on the host's health.

Current evidence suggests that most of the probiotic bacteria are not capable of durably colonizing the intestine; for that reason, in order for them to produce their beneficial effects on the host's health, they must be ingested regularly in a proper amount for some time (Kligler y Cohrssen, 2008). However, adherence to intestinal mucosa cells might constitute a mechanism of exclusion of pathogenic microorganisms, by the competition for receptors or by the formation of a biological barrier that prevents pathogens from colonizing (Collado et al., 2010). Therefore, when establishing the selection criteria in the present work, *in vitro* adherence capacity was included among them. Finally, standard batteries of tests used in the screening of probiotic bacteria usually include *in vitro* antibiosis tests (Dunne et al., 2001; Fernández et al., 2003; Timmerman et al., 2007). This is also a questionable requirement, given that the capacity of a probiotic strain to inhibit the *in vitro* growth of a pathogenic agent does not seem to correlate significantly with the ability of the probiotic strain to increase the resistance to the infection by the same agent in *in vivo* experimental models (Bujalance et al., 2014). Nevertheless, it was included among the selection criteria in the present work.

Therefore, the study was planned starting from a screening based on isolation on MRS Agar, selection of nonsporulated Gram-positive, catalase-negative bacilli; then, they underwent a selection process comprising the following *in*

*in vitro* assays: resistance to acidic pH, resistance to bile salts, adherence to intestinal mucosa cells and antibiosis against enteropathogenic bacteria.

### **3.2. Samples.**

In the first stage of the work, 380 samples of goat milk, udder and colostrum, and intestine and rumen from nursing goats, were used for performing isolations.

The second phase consisted in performing isolations from heterogeneous samples: human saliva, feces from a variety of mammals (human, goat, pig, sheep and horse) and milk (human, goat, sow, ewe and mare). Ninety-six samples were analyzed in this step.

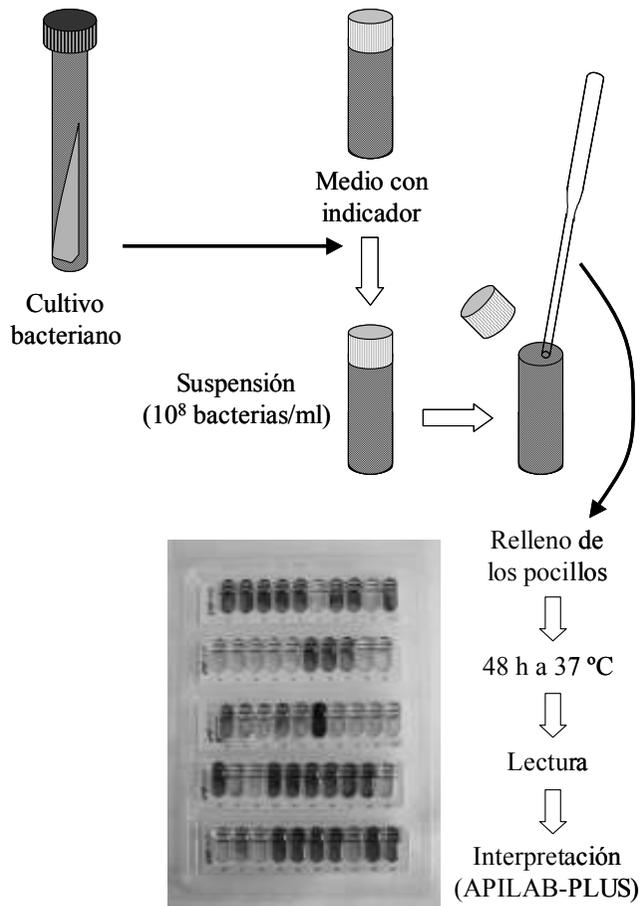
### **3.3. Lactobacillii isolation.**

Isolation was carried out in REMEL MRS Agar (Lenexa, USA) using the streak inoculation technique and then incubating the plates at 37 °C for 48 h. After colonies had grown, Gram stain was used to pick nonsporulated Gram-positive bacilli colonies that were subsequently submitted to the catalase test.

### **3.4. Phenotypic identification.**

Lactobacillii identification was carried out through the Biomérieux API 50 CH system (Marcy-L'Etoile). This system consists of 50 wells (five rows, 10 wells each) disposed on a plastic film. Each of these wells contains a different dehydrated sugar at the bottom of the well to serve as a substrate. The manufacturer also provides vials containing a proper liquid medium for studying the fermentation of different substrates. Among others, this medium includes bromocresol purple, that turns yellow at acidic pH as a consequence of the fermentation of sugar contained in the wells.

To determine the biochemical profile of the strains, inocula were made using the medium supplied by the manufacturer and they were adjusted to  $10^8$  viable bacteria per milliliter through turbidity. This suspension was inoculated into the API strip wells using a Pasteur pipette taking care to avoid bubbles. Then, the cupules of the wells were overlaid with sterile liquid paraffin and incubated at 37°C for 48h. As a consequence of fermentation, acids that are produced make the indicator turn. This change in color showed the sugar fermentation pattern of each bacterium. This process is shown as a diagram in Figure 3.1. The results interpretation was performed using the APILAB-PLUS software, provided by the manufacturer, which allows for the identification of bacteria based on the carbohydrates they can ferment.



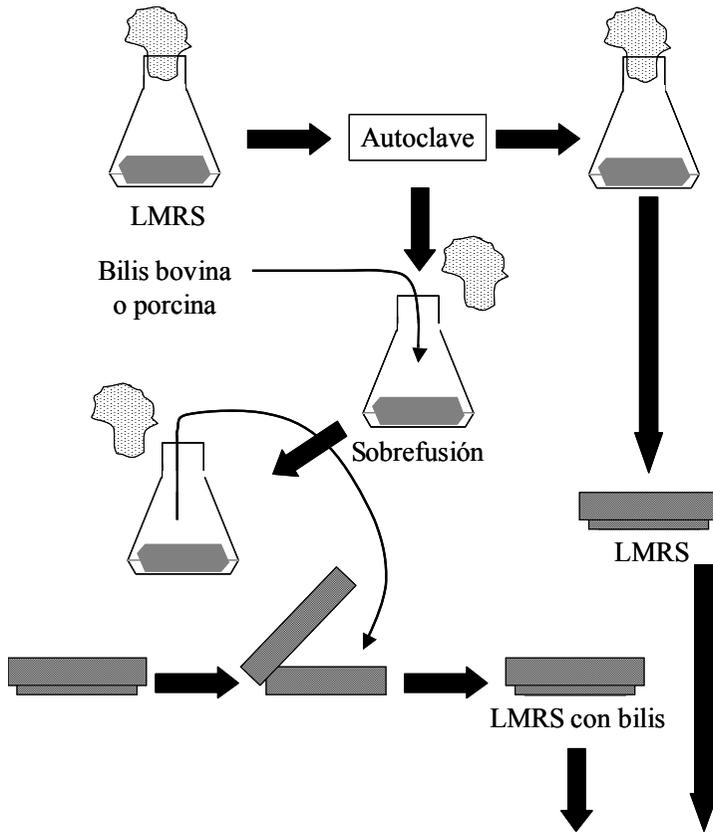
**Figure 3.1. Phenotypic identification of lactobacilli.**

### **3.5. Resistance to acid pH and bile salts .**

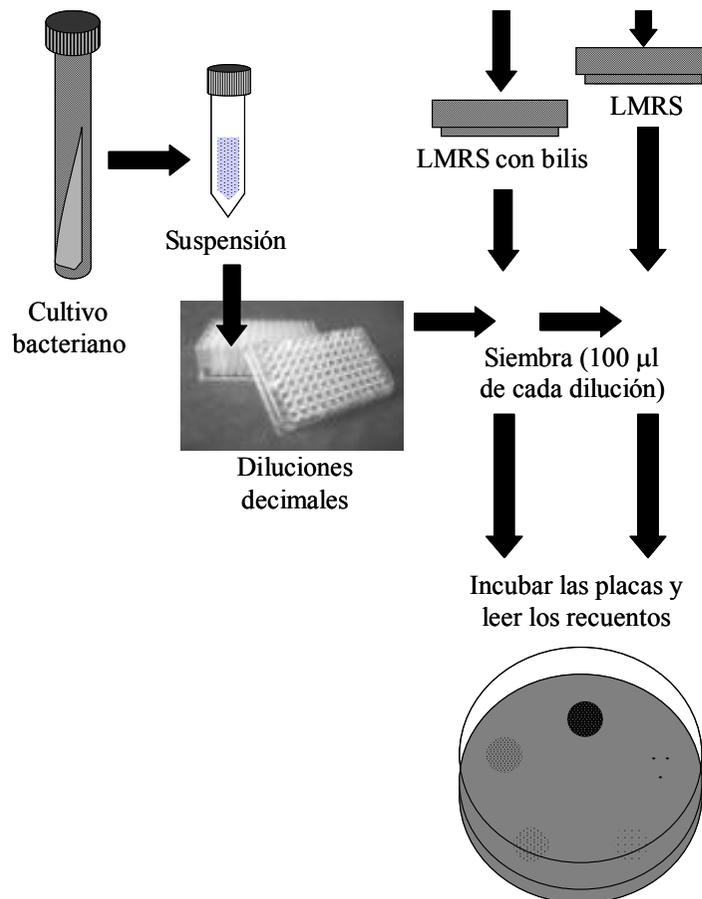
For the determination of the ability of the probiotic strains to resist low pH similar to that in the stomach, 24h-old MRS agar cultures were used. Suspensions were prepared diluting them in sterile PBS to an approximate concentration of  $10^8$

viable bacteria per mL. One hundred microliter aliquots from each suspension were added to sterile eppendorf tubes containing 400  $\mu$ L saline solution, that was acidified by adding 75  $\mu$ L hydrochloric acid 0.15 N, resulting the approximate pH value in 2.0. The content was homogenized by agitation and the eppendorf tubes were incubated at 37°C for 30 min. Then, 10  $\mu$ L of each tube were used to make decimal dilutions in PBS. Ten microliters of each dilution, including the original one, were spread over MRS agar in order to assess the survival of the probiotic strain in different substrates.

To assess the growth ability of the potentially probiotic strains in the presence of bile salts, culture plates were made of MRS agar supplemented with bovine or porcine bile (both purchased from Sigma) at different concentrations, as shown in Figure 3.2. Thus, 0.5 or 0.05 g porcine bile were added to 100 mL of MRS agar that was kept supercooled in conical flasks. This medium was distributed in properly identified sterile Petri dishes. Inocula from 24h-old cultures were prepared and adjusted to  $10^8$  bacteria per mL and then decimally diluted with PBS. Ten microliters of each dilution were spread in MRS agar plates supplemented with bile or in MRS agar control plates without bile. The plates were incubated at 37°C for 24h and then the survival of lactobacilli in different media was evaluated by comparative counting of colonies.



**Figure 3.2. Growth assay of in the presence of bile salts.**



**Figure 3.2. Continuation.**

Alternatively, resistance to gastric juice and bile analyses were carried out by using the Jacobsen method. This methodology allows for the simultaneous assessment of resistance to gastric juice, bile salts as well as survival and growth in different conditions by using an ELISA microplate

reader (Thermo Fisher Scientific, Spain) (Jacobsen et al., 1999).

The methodology for this assay is described as follows:

First, a bacterial suspension of a precisely known concentration ( $10^7$  UFC/mL) was prepared from a pure 24h-old MRS broth culture that the bacteria had reached the stationary phase of growth. The culture was washed and the bacterial biomass was resuspended in sterile saline solution.

In parallel, necessary culture media mimicking the different conditions that a microorganism will encounter in the gastrointestinal tract were made, namely:

- MRS broth; used as a growth positive control.
- MRS broth, pH 2.5; acidified with hydrochloric acid to simulate gastric juice and assess their resistance.
- MRS broth, supplemented with 0.3% bovine bile; to assess bacteria growth in the presence of bile salts.

Then, each medium was distributed in microtiter plates, inoculating the bacterial suspension into each well. Plates were incubated at 37°C for 24h. Absorbance measurements at a wavelength of 620 nm were made hourly using the ELISA microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Spain) for each of the conditions described above. Data obtained for every measurement were submitted to simple mathematical and statistical data processing: conversion to CFU/mL, mean and standard deviation calculation, in order to assess microbial growth and the growth type in every studied condition.

Survival ability of every strain in the presence of gastric juice and bile salts was assessed by colony counting in MRS agar culture: after incubation for 4h, 100  $\mu$ L of each well of the survival assay were taken and decimally diluted. These dilutions were spread in MRS agar plates using a glass spatula (Drigalski spatula) and incubated at 37°C. Measurements were made at two incubation times: after 24 and 48h. Data from both measurements were collected and processed for the calculation of means, standard deviations and percentages, and these statistical data were used for the estimation of the survival index.

The survival and growth assays were performed in triplicate in order to obtain significant results.

### **3.6. Adherence to intestinal mucosa cells.**

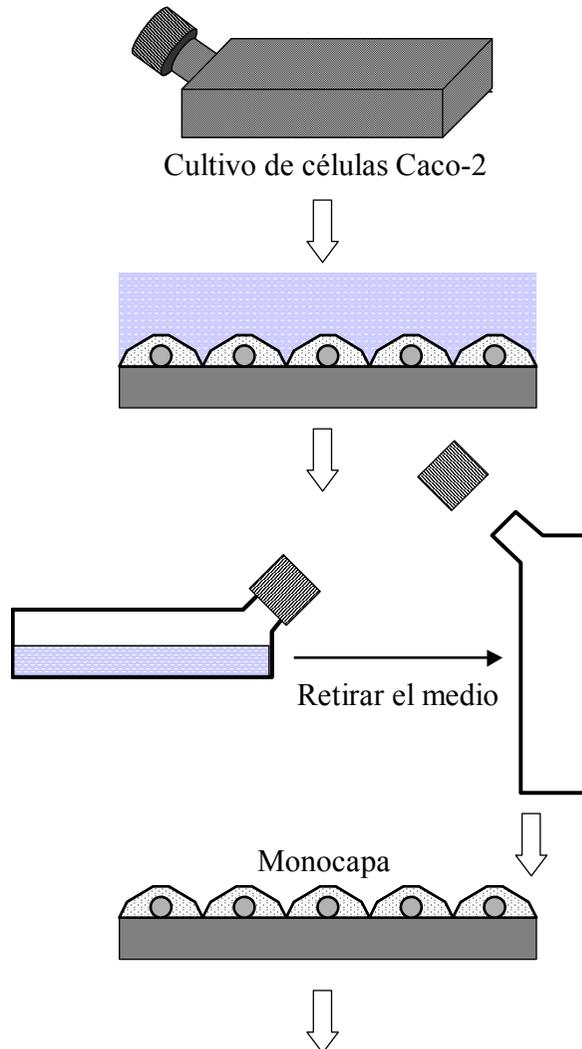
For the in vitro adherence assay, Caco-2 cells were used: this is a continuous cell line from a human colon adenocarcinoma, this cell line was kindly donated by Dr. J. M. Navarro (Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada). The cells were thawed in waterbath at 37°C, they were washed thrice by centrifugation at 1000 r.p.m. with RPMI-1640 medium (Sigma), supplemented with 10% FCS; these washings were made to remove the cryopreserving agent (dimethylsulfoxide), which is toxic to cells. This cell suspension was cultured in Falcon flasks (Costar) at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. These cultures were checked daily and the medium was renewed when it turned yellow due to its acidification. Once a

continuous monolayer was obtained, cells were detached by using a Trypsin-EDTA solution (750 mg/L trypsin and 200 mg EDTA/L in PBS, both purchased from Sigma) that had been sterile-filtered using a 0.22 µm pore size filter and warmed in waterbath at 37°C. Detached cells were resuspended in fresh medium and a small aliquot was used to make subcultures or to perform the assay. A laminar flow cabinet was used to preserve sterile conditions during the work with this cell culture.

The adherence assay was carried out using the Shell Vial Technique, previously described for the culture and identification of viruses, and adjusted for our purpose, as shown in Figure 3.3. A shell vial is a sterile polystyrene vial with a pressure cap and a sterile microscope slide that covers the bottom of the vial. One milliliter of Caco-2 cell suspension in supplemented RPMI-1640 was put into each vial and they were incubated at 37°C 5% CO<sub>2</sub> for 24h in order to obtain a continuous cell monolayer on the slide at the bottom of the shell vial. The monolayers were washed thrice with supplemented RPMI 1640 medium without antibiotic/antimycotic (to prevent interference with added bacteria) and 1 mL of this medium was added to each shell vial.

Cultures of the test bacteria were prepared. Then, bacterial suspensions were obtained in RPMI-1640 medium without antibiotic standardized at 10<sup>8</sup> viable bacteria per mL. One milliliter of each suspension was inoculated into the corresponding vial and then they were incubated again at

37°C for 3h. Following incubation, the unattached bacteria were removed by washing the monolayers with PBS. After the washings, samples were fixed with methanol and stained with methylene blue. The slide was extracted from the vial in order to observe it through optical microscopy.



**Figure 3.3. Continued on next page.**

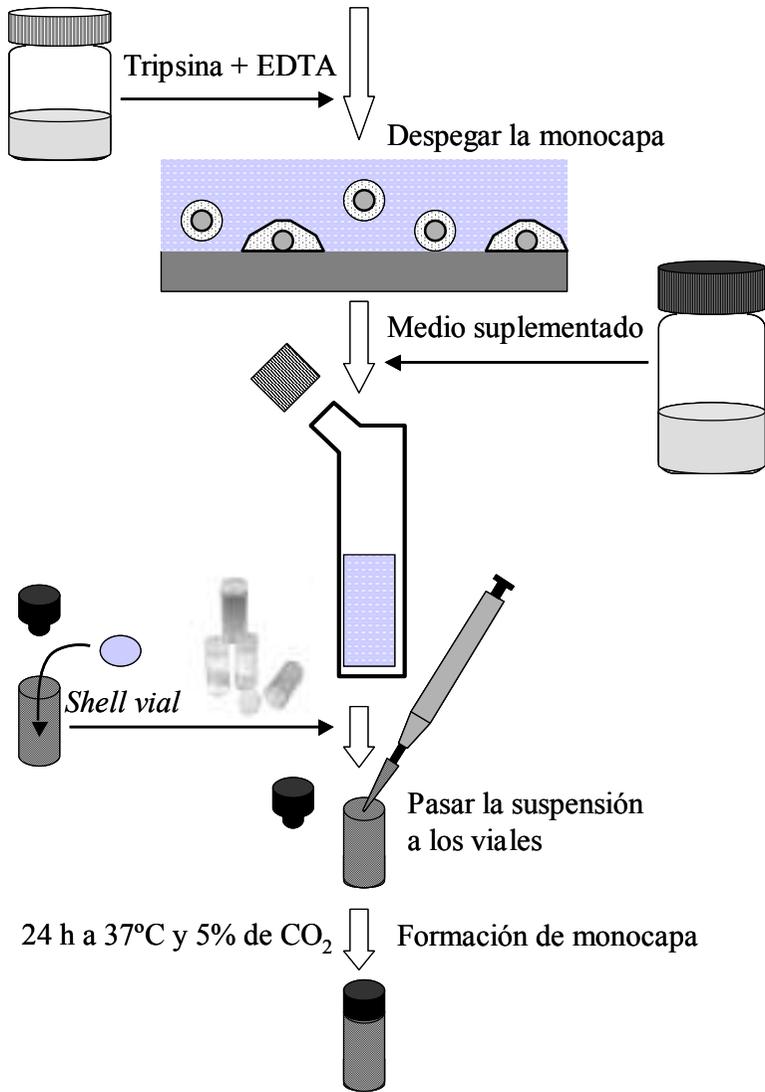
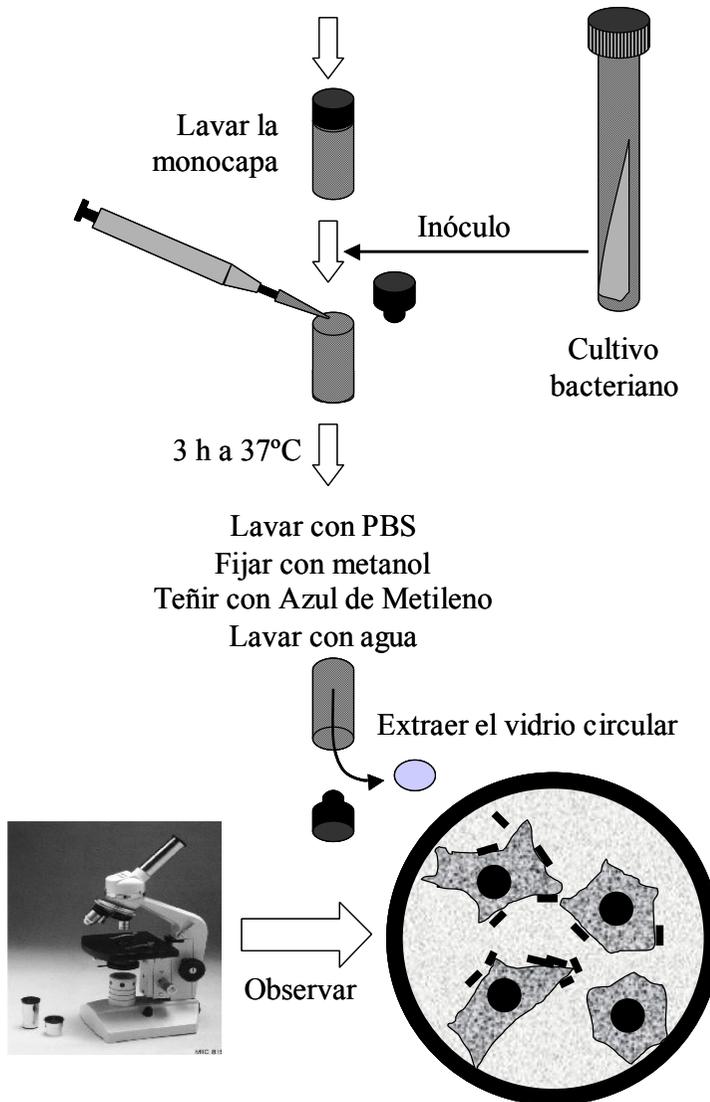


Figure 3.3. Continued on next page.



**Figure 3.3. Adherence of lactobacilli to Caco-2 cells assay.**

### **3.7. *In vitro* growth inhibition of enteropathogenic bacteria.**

Antibiosis is a biological interaction between two or more organisms in which, at least one of them is inflicted harm, or an antagonistic association between an organism and the metabolic products of the other one.

A number of methods for the investigation of these biological activities have been described. In this case, an *in vitro* method has been used (Jacobsen, 1999), that is widely used for the evaluation of the production capacity of substances that inhibit the growth of a microorganism over another.

The technique is based on the diffusion of an inhibitory element in the culture medium from the center of the culture. This methodology (namely, Double-layer agar) is summarized as follows:

Petri dishes were prepared with MRS agar medium and then spread with a known volume (10 µL) of high density inocula of test lactobacilli on the center of the plate. Then, the plates were incubated at 37°C for 24h in order to obtain a localized bacterial growth mass.

After 24h, suspensions of a known concentration ( $10^8$  CFU/mL) of test enteropathogens are made.

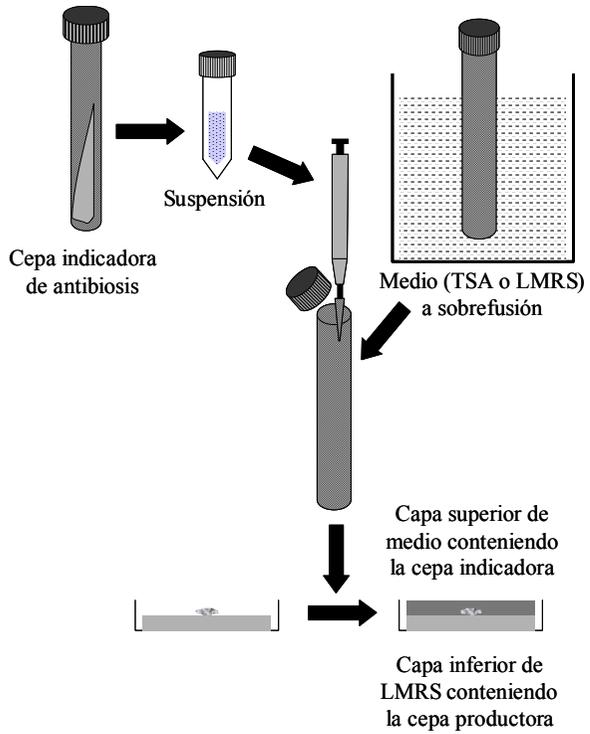
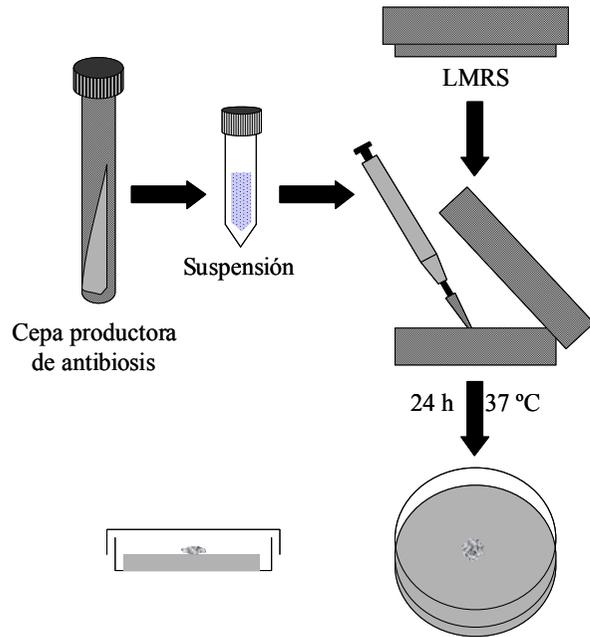
The following microorganisms were assayed in our study:

- *Yersinia enterocolitica* serotype O9 strain IP383
- *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.

- *Salmonella enteritidis* enteric subspecies Serotype London (donated by Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Nieves, Granada)
- *Staphylococcus aureus* CECT 976 (producer of enterotoxin type A).

Afterwards, tubes containing supercooled TSA agar were inoculated with each of the suspensions. Following the inoculation, inoculated tubes were poured on plates with buffered MRS agar plates previously inoculated with a test *Lactobacillus*. Therefore, a double layer was made on the plate: a lower layer, made of MRS agar that has the potential antibiosis-producer bacteria culture on its surface, and an upper layer made of TSA agar containing the indicator or test enteropathogenic bacteria inoculum, as shown in Figure 3.4. After the gelation of the upper layer, plates are incubated at 37°C for 24h. Following the 24h incubation of the double-layer media, the presence of inhibition zones was assessed and their diameter measured. Data obtained were submitted to simple mathematical and statistical processing.

Selection of *Lactobacillus* strains with probiotic potential





**Figure 3.4. Antibiosis assay.**

### **3.8. Results and discussion.**

#### **3.8.1. Isolation and phenotypic identification.**

In the first phase, corresponding to the assays on 380 samples of goat origin, 21 nonsporulated Gram-positive, catalase-negative bacillus strains were isolated and identified at the species level through biochemical profiles obtained using the API 50 CH system. Species identified are shown in table 3.1.

**Table 3.1. Species identified in samples of goat origin**

SPECIES	NO. OF STRAINS	%
<i>L. plantarum</i>	8	38.1%
<i>L. acidophilus</i>	3	14.3%
<i>L. lactis</i>	3	14.3%
<i>L. brevis</i>	2	9.5%
<i>L. paracasei</i>	1	4.8%
<i>L. salivarius</i>	1	4.8%
<i>L. fermentum</i>	1	4.8%
Not identified	2	9.5%
Total	21	100%

In the second phase assays (96 samples of diverse origin), 36 nonsporulated Gram-positive, catalase-negative bacillus strains were isolated, 13 of them were identified at the species level through biochemical profiles obtained using the API 50 CH system and the remaining 23 strains were identified through 16S rRNA sequencing (this procedure is described in chapter 4). Species identified are shown in table 3.2.

**Table 3.2. Identification of species isolated in diverse origin samples.**

SPECIES	NO. OF STRAINS		%
	API 50 CH	16S rRNA	
<i>L. plantarum</i>	1	2	8.3%
<i>L. acidophilus</i>	1		2.8%
<i>L. fermentum</i>	4	15	52.8%
<i>L. salivarius</i>	2	3	13.9%
<i>L. brevis</i>	1		2.8%
<i>L. reuteri</i>		2	5.6%
<i>L. animalis</i>		1	2.8%
Not identified	4		11.1%
Total	13	23	100%

### 3.8.2. Resistance to acidic pH and bile salts.

Results of the acidic pH and bile salts resistance assays that were performed on the strains from the first screening phase are shown in Table 3.3.

**Table 3.3. Resistance to acidic pH and bile salts.**

Strain	Viable bacteria (log) per mL in the following conditions <sup>a</sup>				
	Saline solution <sup>b</sup>	Acidified saline solution (pH 2) <sup>b</sup>	Medium without bile salts <sup>c</sup>	Medium with bile salts (0.05%) <sup>c</sup>	Medium with bile salts (0.5%) <sup>c</sup>
A1	8.00	<2.00 <sup>d</sup>	>8.00	<2.00	<2.00
A2	6.81	6.70	7.92	7.54	3.00
A4	5.90	<2.00	>8.00	7.30	7.39
B1	>8.00	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
B2	7.56	2.58	4.82	5.59	2.34
B3	7.79	2.28	>8.00	>8.00	<2.00
C1	6.58	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
C2	6.23	<2.00	7.68	7.61	<2.00
C6	>8.00	2.89	>8.00	6.70	>8.00
D1	>8.00	2.49	>8.00	>8.00	>8.00
D3	6.45	5.90	>8.00	>8.00	<2.00
D5	6.46	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
D6	7.36	<2.00	>8.00	>8.00	>8.00
ALH1	6.25	2.11	6.95	7.00	6.68
ALH2	>8.00	4.46	>8.00	6.84	<2.00
ALH3	7.34	<2.00	>8.00	2.28	2.28
ALH4	7.18	6.38	>8.00	>8.00	<2.00
Xa	6.90	<2.00	7.36	7.48	7.28

C12	5.38	5.49	6.45	6.08	<2.00
H22	6.25	3.49	7.38	7.46	3.08
I12	6.38	<2.00	7.46	7.40	7.45
I31	6.34	4.50	>8.00	>8.00	7.49

- a. Initial inocula were approximately  $10^8$  viable bacteria per mL
- b. Mean viability after 30 min incubation
- c. Viability after 24h plate incubation
- d. Detection limit of counting

Eight out of the 21 studied strains (38.1%) showed a reduction equal or greater than two logarithmic units after incubation in acidic pH and 9 strains (42.8%) did not grow whatsoever. Strains A2, D3, ALH4 and C12 were not noticeably affected by acidic pH (variations lower than two logarithmic units in comparison to the initial inoculum). Only one (A2) out of the 21 strains was unable to grow in the presence of 0.05% bile salts. Strain ALH3 showed a high sensitivity to bile salts, as its growth was minimal. The remaining strains (including strains A2, D3, ALH4 y C12) showed satisfactory growth under these conditions. Only 14 strains were able to grow in the presence of 0.5% bile salts.

Strains A2, D3, ALH4 and C12, mentioned above, were the only strains that showed growth both in acidic pH and in the presence of 0.05% bile salts. The identification of these strains is shown in Table 3.4. Only strains A2 and D3, that

were identified in a highly reliable way, were chosen for the cell adherence assay.

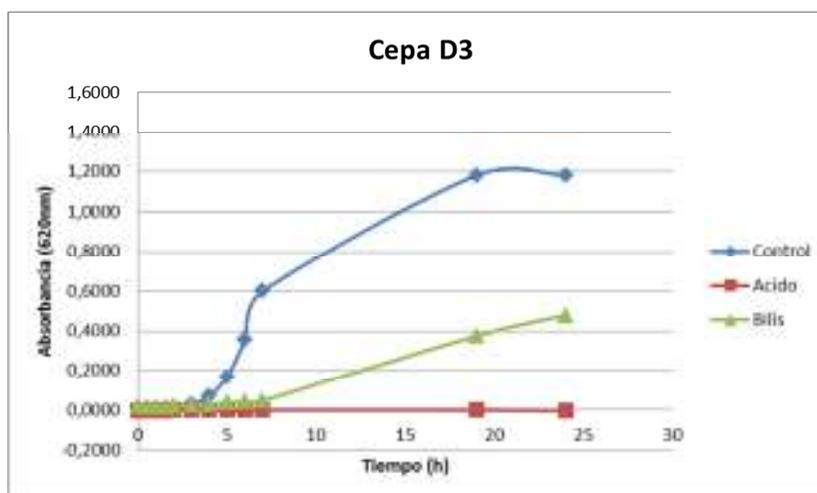
**Table 3.4. Phenotypic identification of the strains that showed resistance to acidic pH and 0.05% bile salts.**

STRAIN	PHENOTYPIC IDENTIFICATION (API 50 CH)	RELIABILITY (%)
A2	<i>L. acidophilus</i>	99.9
D3	<i>L. fermentum</i>	99.9
ALH4	Not identified	
C12	<i>L. acidophilus</i>	90.5

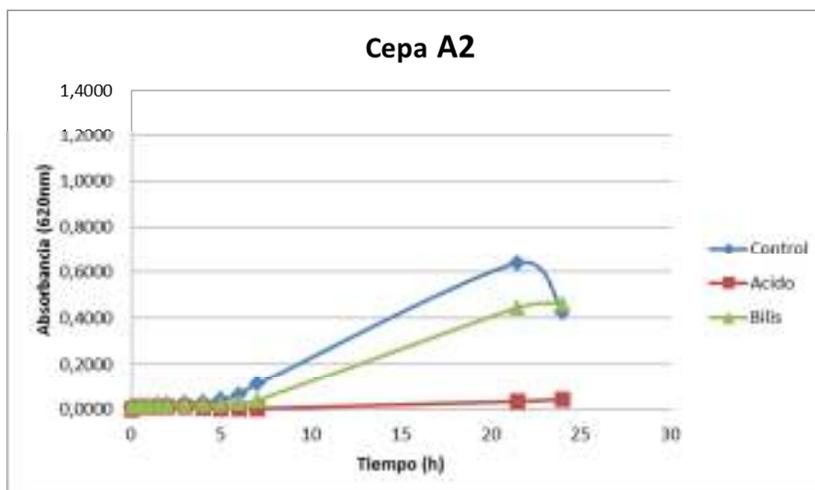
For the second series of assays, microwell growth procedure and spectrophotometric and viability measurements were used, as described in section 3.4.

Figure 3.5 and Figure 3.6 show the spectrophotometric measurements of strains D3 and A2, respectively, and they are representative of the assays performed on the rest of the strains. This procedure proved adequate to examine bacteria growth kinetics under different experimental conditions (culture medium, medium at pH 2.5, and medium supplemented with 0.3% bile salts). However, it is crucial to carry out countings to get an estimation of the viability, given that non-lysed dead bacteria contribute to the turbidity. The graphics show the ability to grow in the presence of bile salts of both strains. The turbidity of strain D3 remained constant

at pH 2.5 and viable cell counting revealed that the viability was preserved even though there was no growth (data not shown). Strain A2 was able to grow in the presence of bile salts as well and it showed a slight increase in turbidity at pH 2.5, this fact is in agreement with its outstanding resistance to acidic conditions showed in previous assays (Table 3.3).



**Figure 3.5. Spectrophotometric measurements of strain D3 at different culture conditions.**



**Figure 3.6. Spectrophotometric measurements of strain A2 at different culture conditions.**

Given the interest of viability countings regarding the objectives of the present work, Table 3.5 shows the results corresponding to the 22 strains isolated in the second screening phase. The excellent behavior of strain B16 is a remarkable fact, which is stressed by its identification through 16S rRNA sequencing as *Lactobacillus fermentum* with very high reliability.

**Table 3.5. Viability of 23 lactobacillus strains isolated in the second screening phase, cultured in different conditions.**

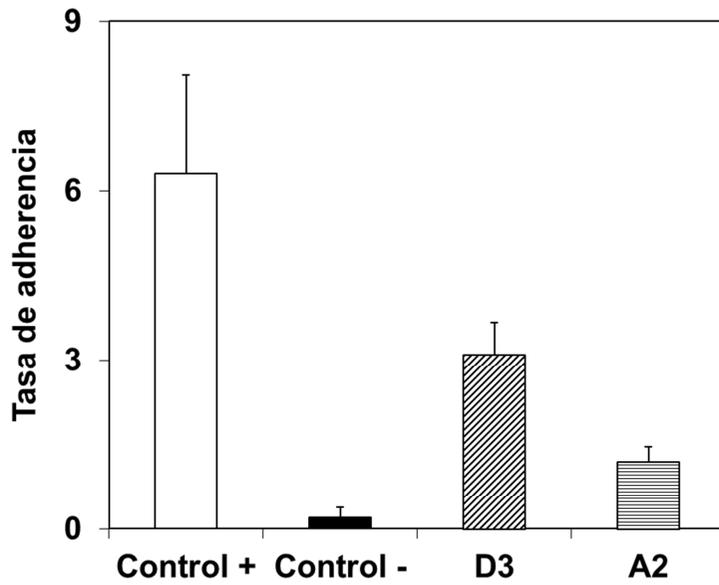
Strain	Viable bacteria (log) per mL in the following conditions <sup>a</sup>		
	MRS <sup>b</sup>	MRS at pH 2,5 <sup>b</sup>	MRS with 0.3% bile salts <sup>b</sup>
B6	7,17	6,13	6,45
B7	8,88	6,71	7,37
B8	7,15	5,90	6,42
B10	7,78	5,70	7,96
B14	8,37	7,03	8,27
B15	8,11	6,42	8,31
B16	7,78	6,71	7,92
B17	7,70	6,75	7,87
B21	7,38	6,39	7,38
B22	8,39	7,36	8,37
B24	7,80	6,82	8,43
B25	7,98	6,87	8,64
B26	7,93	7,33	8,48
B29	8,25	7,22	8,22
B34	8,18	6,99	7,98
B35	8,30	6,95	8,08
B39	8,33	7,11	8,21
B49	7,87	7,33	7,96

B52	8,14	7,61	8,29
B62	7,71	7,36	7,08
NN-1	8,01	7,20	7,61
P-681-1-2	5,31	4,60	5,48

- a. Initial inocula were approximately  $10^8$  viable bacteria per mL
- b. Viability after 4h incubation

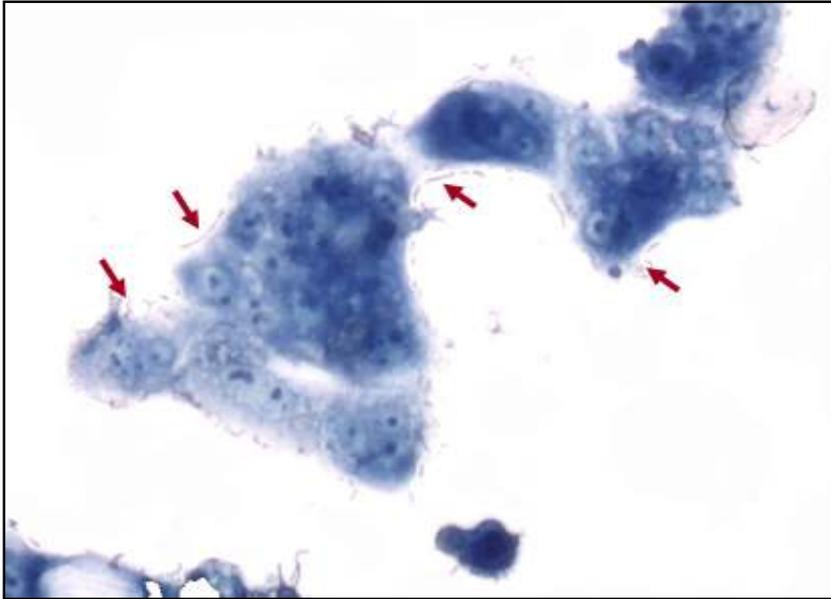
### 3.8.3. Adherence to epithelial cells

As mentioned in section 3.8.2, strains A2 and D3 were chosen for their adherence to Caco-2 cells assays. As a positive control, *Y. enterocolitica* strain IP383 was used, given that human origin strains have well-known adhesins (Leo and Skurnik, 2011). A *Bacillus subtilis* strain that lacks adhesins due to its environmental origin was used as a negative control. The assays were performed in triplicate and the results are shown in Figure 3.7. As depicted, both strains displayed adherence ability, being the adherence of strain D3 greater.



**Figure 3.7. Adherence capacity**

The next figure shows an image of the assay performed with strain D3, which is characteristic of these assays.



**Figure 3.8. Microphotograph (x 1000, blue methylene stain) of Caco-2 cells showing attached bacteria. The assay was performed with strain D3.**

#### **3.8.4. *In vitro* inhibition of enteropathogenic bacteria.**

For *in vitro* antibiosis assays, the strains that showed high resistance to acidic pH and to bile salts were chosen (Table 3.4). Seven strains that were able to grow in the presence of 0.05% bile salts were chosen as well, in spite of the fact that their viability decreased at least 2 logarithmic units in acidic pH, except for strain H22 (*L. salivarius*) which was excluded from the assay due to its high sensitivity to acidic pH.

Results of the *Y. enterocolitica* growth inhibition assay are shown in Table 3.6. All of them showed inhibitory activity to some extent, what is in accordance with the fact that, due to the high content of dextrose contained in MRS medium (20 g/L), lactobacilli are able to synthesize a large amount of acid that inhibits enteropathogenic bacteria growth, masking antibiosis due to other factors, such as the production of bacteriocins or antibiotics. An extensive discussion of these results is presented in the original publication required for the submission of the doctoral thesis (Bujalance et al., 2014).

**Table 3.6. *Y. enterocolitica* growth inhibition by lactobacilli strains**

STRAIN	INHIBITION HALO (mm)
A2	30
A4	50
B2	18
D3	54
B3	51
C6	59
D1	60
ALH1	64
ALH2	42

ALH4	38
C12	30

Later, the antibiosis study was extended including new test bacteria for strain D3, selected upon its optimal behavior in every assay performed, and for strain B16, obtained in the second screening phase. The latter showed a high resistance to acidic pH and bile salts and turned out to be easily cultured and to have technological robustness, features of particular interest for its future industrial application. Results of antibiosis assays are shown in Table 3.7.

Again, both strains showed inhibitory activity attributable to the production of acids in MRS agar. It is interesting to point out that in this assay, the inhibitory activity of strain D3 was remarkably higher than that of strain B16. However, given that the central inoculum of the inhibitory bacterium lacks standardization, this method does not allow for quantitative comparisons.

**Table 3.7. Antibiosis of strains D3 and B16 against some enteropathogens.**

STRAIN	TEST BACTERIUM	INHIBITION HALO (mm)
D3	<i>Y. enterocolitica</i>	54
	<i>S. enterica</i>	30
	<i>L. monocytogenes</i>	65
	<i>S. aureus</i>	55
B16	<i>Y. enterocolitica</i>	21
	<i>S. enterica</i>	15
	<i>L. monocytogenes</i>	13
	<i>S. aureus</i>	14

## **4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.**

### **4.1. Criterios de identificación molecular.**

Una de las aproximaciones más extendidas para estudiar las relaciones filogenéticas entre bacterias se basa en la secuenciación del DNA que codifica la molécula de RNA ribosomal (rRNA) 16S que forma parte de la subunidad menor (30S) del ribosoma de los procariotas. En los años 80, los rRNAs mostraron ser los "cronómetros moleculares" más útiles, capaces de medir las tasas de cambio en los linajes evolutivos, y en concreto las secuencias del rRNA 16S se tomaron como referencia para asentar la taxonomía de los microorganismos procariotas sobre bases moleculares (Woese, 1987). Pocos genes presentan un grado tan alto de conservación global de secuencias como el rRNA 16S, lo que le hace adecuado para diferenciar grandes taxones; pero en su secuencia, de alrededor de 1.550 bp, existen zonas "calientes" con un alto grado de polimorfismo, que permiten la diferenciación a nivel de especies e incluso de taxones intraespecíficos (Clarridge, 2004).

En el presente trabajo se planteó la conveniencia de confirmar, mediante análisis de secuencias del DNA que codifica el rRNA 16S, los resultados de la identificación

fenotípica de las cepas aisladas de mayor interés como posibles candidatos a probióticos.

#### **4.2. Secuenciación del DNA que codifica para rRNA 16S.**

La identificación a nivel de especie se realizó mediante técnicas moleculares, concretamente a través de la secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S, utilizándose los *primers* universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) los cuales fueron sintetizados por Sigma Genosis (UK).

Esta técnica se compone de cuatro fases fundamentales que se comentan más detalladamente a continuación:

- I. Extracción de DNA de cultivos
- II. Amplificación específica del fragmento del gen codificante del rRNA 16S
- III. Secuenciación del gen codificante del RNA 16S (regiones hipervariables)
- IV. Análisis de la secuencia de DNA y establecimiento de similitudes.

##### **4.2.1. Extracción del DNA.**

Para la extracción del DNA se parte de colonias bacterianas cultivadas durante 24 h en Agar MRS (Oxoid, U.K), que fueron lisadas mediante la adición de 20  $\mu$ l de una mezcla de

NaOH (0,05 M)-SDS (0,25%, p/v) y tratamiento térmico a 100°C durante 15 min.

Una vez obtenidos los lisados, se ajustaron a un volumen de 200 µl con agua bidestilada estéril y posteriormente se centrifugaron a 2500g durante 5 min en una centrífuga de sobremesa.

La confirmación de la correcta extracción de DNA se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa, posterior tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV. Se utilizaron marcadores al objeto de garantizar la calidad de la metodología de extracción de DNA.

#### **4.2.2. Amplificación específica del fragmento del gen codificante del RNAr 16S.**

La amplificación del fragmento del gen codificante del rRNA 16S se realizó mediante PCR. Para lo cual se adicionó a 4 µl de los lisados 1x PCR tampón Gold (Applied-Biosystems, Alemania), 1,5 mM MgCl (Applied-Biosystems, Alemania), 200 µM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Alemania), 20 pmol de cada *primer*, y 1U de Taq Polimerasa (Applied-Biosystems, Alemania). El volumen final en los tubos de reacción se ajustó a 50 µl. La reacción se realizó en un sistema de PCR Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Alemania). Los rangos de temperatura utilizados fueron los propuestos por Vinuesa *et al.* (1998), excepto el primer paso

de desnaturalización que fue de 7 minutos, tal y como requiere la polimerasa Ampli-Taq Gold.

Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas obtenidas se purificaron usando un kit Quiaex II (Quiagen, Alemania).

#### **4.2.3. Secuenciación del gen codificante del RNA 16S.**

El proceso de secuenciación de las bandas ya purificadas pertenecientes al del gen codificante de RNAr 16S, se realizó en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Granada, dedicado a la investigación biomédica, la de las cepas D3 y B16. La secuenciación de las cepas restantes (21) se realizó en el Instituto CRB de París.

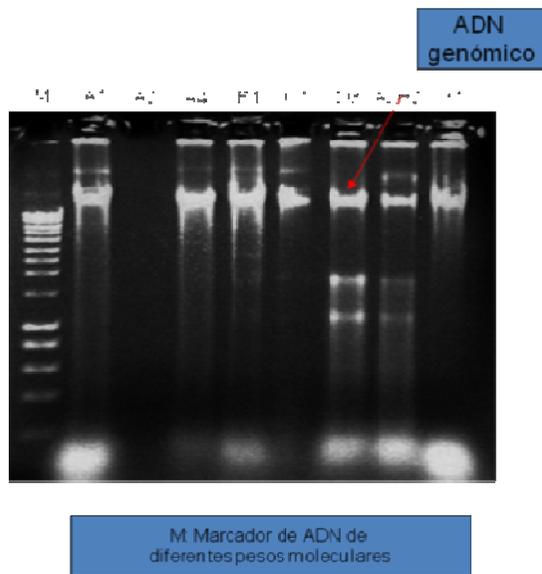
#### **4.2.4. Análisis de la secuencia de DNA y establecimiento de similitudes.**

Una vez obtenidas las secuencias, se compararon y buscaron similitudes en las bases de datos utilizando software BLAST, en el cual se realizó el alineamiento de la secuencia de la cepa a estudiar con otras depositadas y validadas anteriormente.

### 4.3. Resultados y discusión

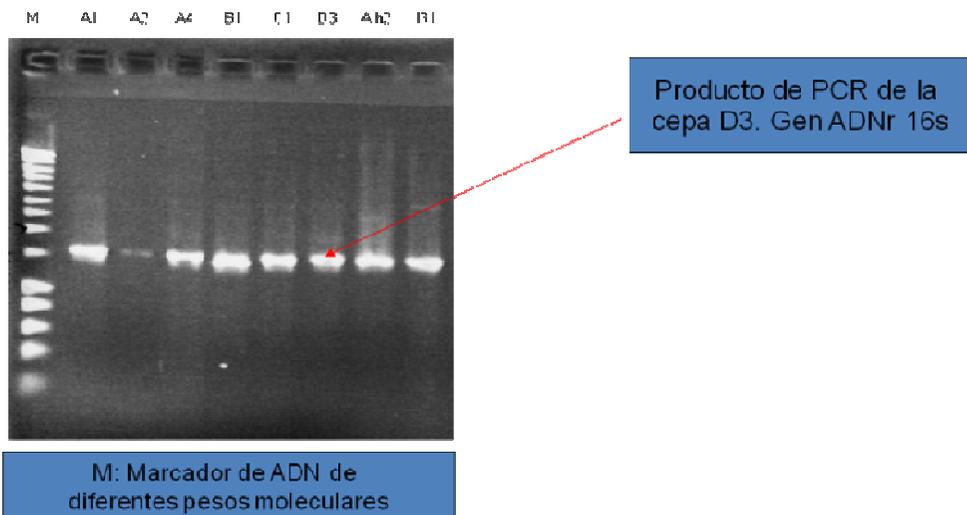
Se ha realizado la identificación molecular de un total de 24 cepas de todas las aisladas en cada una de las fases de muestreo.

Para dicha identificación se han seguido cada uno de los cuatro pasos explicados anteriormente. En la Figura 4.1, se muestra una fotografía de uno de los geles de agarosa correspondientes a la extracción de DNA de varias cepas, entre ellas la cepa D3.



**Figura 4.1. Fotografía de gel de agarosa tras electroforesis con fragmentos de DNA extraído.**

Tras la amplificación por PCR de los fragmentos de DNA, los productos se sometieron a una electroforesis. En la Figura 4.2, se pueden observar las bandas obtenidas en dicha electroforesis y que posteriormente se purificaron mediante un kit comercial.



**Figura 4.2. Fotografía de gel de agarosa con productos de PCR de distintas cepas**

Los resultados de secuenciación obtenidos para las cepas D3 y B16 se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2 respectivamente.

**Tabla 4.1. Secuencia de DNA obtenida de la cepa D3**

TACATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCACCTGA  
TTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACC  
TGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA  
ACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTG  
GATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCG  
ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACAC  
GGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCA  
AGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGC  
TCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGT  
ATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTT  
TTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAA  
CTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG  
AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTG  
CAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCT  
GGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT  
TCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAA  
GGTTGAACTCAAAGGAATGACGGGGCCGCACAGCGTGAGCATGTGATTAATC  
GAGCTACGCGAGACTTACAGTCTGACATCCTGCGCACCTAGAGATAGGGCGT  
TCTTCGACGCATGACGTGGTGCATGTTCGTCGTCAGCTCTGTCCTGGAAGTTG  
TTAATTTCCCACGAGCTACCTGTTCTAGTGCCGCTTACTTGGACCTATGGAC  
TGCCGGTCAACGGAATGAAAGTCAATACAG

**Tabla 4.2. Secuencia de DNA obtenida de la cepa B16**

CTAATACATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCGATTGATTGATGGTGCTTGCAC  
CTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGT  
AACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCAT  
AACAAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACT  
TCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA  
GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAG  
ACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGG  
CGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTA  
AAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGATTAAGTTCATACGTTGA  
CGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGC  
GGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCG  
GAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCG  
GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGG  
TCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCG  
CCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC  
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTG  
CGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTG  
CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGA  
GCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCC  
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAA  
CTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGC  
TGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC  
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGA  
GTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCC

Una vez analizadas y comparadas las secuencias con las bases de datos se puede afirmar que ambas cepas presentan un alto índice de identidad, la cepa D3 99% y la cepa B16 100%, con *Lactobacillus fermentum*.

Estos resultados genéticos confirman por demás los estudios taxonómicos preliminares realizados mediante pruebas bioquímicas realizadas a las cepas D3 y B16 durante el desarrollo de la primera fase de estudio.

Considerando la importancia de la cepa D3 con vistas a su posterior explotación industrial y protección, mediante la realización de una patente, se procedió a su depósito con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), como CECT 7472 donde se realizó una reclasificación taxonómica de la cepa como análisis de contraste de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en la CECT confirman la clasificación de la cepa en cuestión como *Lactobacillus fermentum*. En la Tabla 4.3, se muestra el alineamiento de secuencias obtenidas por nosotros y por la CECT realizado mediante el software CLUSTAL 2.0.10 donde se comprobó que ambas secuencias eran idénticas, con pequeñas discrepancias en las zonas terminales del gen, hecho este normal y atribuible al secuenciador utilizado en cada caso. En la Tabla 4.4, se presentan los resultados obtenidos en la identificación de

otras cepas aisladas como ya se comentó en el capítulo 3 apartado 3.8.1 de este trabajo.

**Tabla 4.3. Alineamiento de 2 secuencias usando el software CLUSTAL 2.0.10**

```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: D3CECT
# 2: D3_corregida
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 1151
# Identity:    1016/1151 (88.3%)
# Similarity: 1016/1151 (88.3%)
# Gaps:       127/1151 (11.0%)
# Score: 5833.5
#
#####
D3CECT          1 CTATCTGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCAACC
  ||..|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    1 TACATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCAACC

D3CECT          51 TGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    50 TGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG

D3CECT          101 TAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAACAGATGCTAATACCG
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    100 TAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAACAGATGCTAATACCG

D3CECT          151 CATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTA
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    150 CATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTA

D3CECT          201 TCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGC
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    200 TCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGC

D3CECT          251 CTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAAT
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    250 CTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAAT

D3CECT          301 GGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D3_corregida    300 GGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT

D3CECT          351 TCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGG
  
```

## Identificación molecular de las cepas seleccionadas

```

D3_corregida      350  |||||
TCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGG

D3CECT            401  GTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAA
|||||

D3_corregida      400  GTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAA
|||||

D3CECT            451  CTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTG
|||||

D3_corregida      450  CTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTG
|||||

D3CECT            501  CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGG
|||||

D3_corregida      500  CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGG
|||||

D3CECT            551  GCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
|||||

D3_corregida      550  GCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
|||||

D3CECT            601  CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGG
|||||

D3_corregida      600  CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGG
|||||

D3CECT            651  GTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
|||||

D3_corregida      650  GTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
|||||

D3CECT            701  ACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAA
|||||

D3_corregida      700  ACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAA
|||||

D3CECT            751  AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAC
|||||

D3_corregida      750  AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAC
|||||

D3CECT            801  GATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAAC
|||||

D3_corregida      800  GATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAAC
|||||

D3CECT            851  GCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
|||||

D3_corregida      850  GCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTG-AACTCAAAG
|||||

D3CECT            901  GAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
||| ||||| ||| ||||| ||| .||| ||||| .||| .||| |||
D3_corregida      899  GAA-TGACGGGG--CCGCAC-AGCG--TGAGCATGTGATT--AATCG-AG
|||||

D3CECT            951  CTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGA
||||| ||| ||||| .||| ||||| .||| ||||| .||| |||||
D3_corregida      940  CTACGCG-AGA--CTTAC--AGTC-TGACATCCTGCGC---ACCTAGAGA
|||||

D3CECT            1001 TAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGCTC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
D3_corregida      981  TAGGGCGTT--CTTCG---ACGC-ATGAC--GTGGTGCAT-GTCGTCGTC
|||||

D3CECT            1051 AGC
|||
D3_corregida      1022 AGCTCTGTCTGGAAGTGTTAATTCCCCACGAGCTACCTGTCTAGTGC
|||||

D3CECT            1054
D3_corregida      1072 CGCTTACTTGACCTATGGACTGCCGGTCAACGGAATGAAAGTCAATACA
#-----

```

**Tabla 4.4. Resultados de otras bacterias identificadas mediante secuenciación de 16S**

CEPA	IDENTIFICACIÓN (rRNA 16S)	FIABILIDAD (%)
B1	<i>L. plantarum</i>	100
B2	<i>L fermentum</i>	100
B4	<i>L fermentum</i>	99
B5	<i>L. plantarum</i>	99
B6	<i>L fermentum</i>	100
B7	<i>L. animalis</i>	99
B8	<i>L. reuteri</i>	99
B9	<i>L. reuteri</i>	99
B10	<i>L. salivarius</i>	99
B13	<i>L. salivarius</i>	99
B14	<i>L. salivarius</i>	99
B17	<i>L fermentum</i>	99
B21	<i>L fermentum</i>	100
B22	<i>L fermentum</i>	99
B25	<i>L fermentum</i>	99
B26	<i>L fermentum</i>	99
B27	<i>L fermentum</i>	100
B28	<i>L fermentum</i>	100
B32	<i>L fermentum</i>	100
B33	<i>L fermentum</i>	99
B34	<i>L fermentum</i>	99
B35	<i>L fermentum</i>	99

## **5. ENSAYOS TECNOLÓGICOS DE VIABILIDAD INDUSTRIAL**

### **5.1. Conservación de *L. fermentum* D3.**

Las cepas bacterianas que, por sus actividades metabólicas u otras propiedades, muestran posibles aplicaciones industriales, deben ser correctamente identificadas y conservadas de forma adecuada para preservar su viabilidad sin mutaciones que afecten negativamente a su potencial biotecnológico.

En el caso concreto de la cepa *L. fermentum* D3, resulta de especial importancia el conocimiento de las mejores condiciones de conservación. Ello es importante no solo desde un punto de vista biológico, al objeto de garantizar el mantenimiento de sus capacidades biotecnológicas, sino al mismo tiempo para la preservación de la viabilidad celular en condiciones de máxima estabilidad genética. Según se ha determinado en nuestro laboratorio, la cepa D3 posee un tiempo de generación próximo a 30 min bajo condiciones de cultivo óptimas. Ello determina una ronda de replicación de su cromosoma cada media hora y en definitiva una posibilidad de errores replicativos que pueden afectar a su genética. Por ello la evaluación de los sistemas y criterios de conservación y mantenimiento de la cepa D3, constituyen un reto de

investigación esencial al objeto de preservar la viabilidad y la estabilidad genética del microorganismo. Además, el desarrollo de este apartado garantiza la futura aplicación industrial de este organismo no solo como probiótico sino al mismo tiempo como starter fermentativo.

La correcta conservación se hace en base a las tres recomendaciones propuestas por García y Uruburu (2000): (1) evitar posibles contaminaciones durante el proceso de conservación; (2) durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan en números elevados; y (3) los microorganismos conservados deben de permanecer genéticamente estables.

El resguardo de las bacterias puede realizarse de tres formas generales: preservación a corto, mediano y largo plazo.

Es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada (García y Uruburu, 2000; Uruburu, 2003) y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica.

Para todo ello, con el desarrollo de nuestro trabajo de investigación proponemos avanzar en los criterios de conservación más adecuados para la cepa D3, realizándose para ello las siguientes actividades:

- Establecimiento de los criterios de conservación de la cepa D3 en medios de cultivo artificiales de laboratorio. Pautas de subcultivo, viabilidad celular y estabilidad morfológica.
- Criterios de crioconservación.
- Análisis de crioprotectores y estudio de viabilidad celular. Estudios de supervivencia.
  - Congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$
  - Ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Estudios de conservación mediante técnicas de liofilización. Análisis de supervivencia celular.
- Liofilización en sobres termo sellados y análisis de viabilidad.

**5.1.1. Establecimiento de los criterios de conservación de la cepa D3 en medios de cultivo artificiales de laboratorio. Pautas de subcultivo, viabilidad celular y estabilidad morfológica.**

En este apartado de investigación se han realizado paralelamente dos investigaciones sobre conservación bacteriana a corto plazo:

A. Subcultivo en medios sólidos.

B. Métodos de inmovilización celular

En el estudio de subcultivos en medio sólidos se incluyen ensayos con dos tipos de medio de cultivo; el MRS de carácter enriquecido para bacterias lácticas y un medio Rogosa más selectivo para este tipo de bacterias. La idea ha sido visualizar si la supervivencia se ve afectada por el medio de cultivo utilizado. Esta idea complementa la propuesta inicial y la enriquece. Si bien esto no se describe en la propuesta, durante el desarrollo del trabajo consideramos necesario ampliar el estudio, buscando siempre una interpretación más amplia de los resultados al objeto de no dejar dudas al respecto.

La inclusión de agentes inmovilizantes es una tecnología útil para la conservación de algunas bacterias lácticas, y por este motivo se incluyó en el estudio.

A. Subcultivo en medios sólidos.

Este estudio consiste en el análisis y establecimiento de las pautas de subcultivo para *Lactobacillus fermentum* D3. Los

cultivos bacterianos se pueden mantener en laboratorio mediante cultivos seriados en medios sólidos o líquidos. Los intervalos en que se hace la resiembra varían con el tipo de microorganismos. No obstante, se deben de considerar tres factores: el medio de cultivo apropiado, la temperatura de incubación para el crecimiento de los microorganismos, y el tiempo que se necesita para hacer las resiembras. En el caso de la cepa D3, su conservación y mantenimiento se ha realizado mediante resiembra en dos medios de cultivo sólidos específicos:

- Medio de cultivo Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe, Oxoid, U.K.); se trata de un medio de cultivo específico para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL).
- Medio de cultivo Agar Rogosa (Oxoid, U.K.); se trata de un medio de cultivo específico para el aislamiento y recuento de lactobacilos ya que debido a su composición inhibe el crecimiento de otras bacterias, incluso de otras bacterias consideradas ácido lácticas. Los subcultivos se han realizado a intervalos de tiempo de 15 días y un número de 3 réplicas en cada tipo de medio.

La metodología se resume a continuación:

En primer lugar, se prepararon los medios de cultivo deshidratados siguiendo las indicaciones del fabricante, vertiéndose en placas Petri y en tubos de rosca dejándose

solidificar, siempre en condiciones de esterilidad. Una vez preparadas las placas con el medio de cultivo y después de realizar los controles de esterilidad pertinentes, partiendo de un cultivo puro de la cepa D3, se procedió a la siembra por la técnica de agotamiento en las placas de Petri con los distintos medios de cultivo, utilizando asas de siembra estériles. Este proceso se realizó dentro de campanas de bioseguridad de flujo laminar Bio-II-A (Telstar, España) para evitar cualquier posible contaminación. Posteriormente, las placas de Petri sembradas con el microorganismo se incubaron en una estufa a 37°C durante 48 horas bajo condiciones de aerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación necesario, se comprobó el crecimiento y la pureza del cultivo, mediante el estudio de las características morfológicas de las colonias y observación de la morfología celular (tinción de Gram).

Una vez asegurada la pureza de los cultivos se procedió a la siembra de colonias en tubos de rosca conteniendo los mencionados medios de cultivo. Los mismos una vez inoculados se llevaron a incubación a 37 °C hasta la obtención de crecimiento masivo del microorganismo. Una vez verificado el crecimiento, se procedió a su mantenimiento. El mantenimiento de los cultivos bacterianos se realizó a 4°C, teniendo la precaución de sellar los tubos con papel de parafina (Parafilm®M, USA) para impedir la pérdida de humedad y evitar el deterioro de los medios de cultivo.

Transcurrido un periodo de conservación de 15 días, se inició nuevamente el proceso de análisis de viabilidad y pureza de los cultivos. Verificado el mismo, se vuelve a iniciar nuevamente el subcultivo de forma análoga a lo anteriormente indicado, repitiéndose el proceso de forma secuencial en el tiempo.

Basándonos en la metodología descrita se ha podido verificar que el subcultivo en medios artificiales de la cepa D3 permite el mantenimiento de la viabilidad celular en el laboratorio por períodos superiores a un año. Obviamente el método introduce la necesidad de un subcultivo continuo (cada 15 días) lo que representa una interrogante sobre la estabilidad genética de la cepa a largo plazo. No obstante, esta metodología puede ser utilizada de forma rutinaria a nivel de laboratorio para la conservación de cepas que estén en continuo proceso de manipulación industrial. En consecuencia la cepa D3 puede ser conservada a corto plazo con garantías siempre que se controle de forma específica la no contaminación de los cultivos.

## B. Métodos de inmovilización celular. Análisis de viabilidad.

### B.1. Técnicas de inmovilización.

La inmovilización celular representa un conjunto de técnicas que permiten incrementar la concentración de biomasa por unidad de volumen. Diversos estudios han

demostrado que la inmovilización celular puede ser aplicada en el mantenimiento y estabilización de bacterias lácticas de interés biotecnológico (Cruz *et al.*, 2003). En nuestro caso, a partir de cultivos puros de *L. fermentum* D3, se realizaron siembras en matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de medio de cultivo MRS caldo (Oxoid, U.K.). Los matraces una vez inoculados se incubaron en aerobiosis a la temperatura de 37°C durante 24 h y agitación continua (180 rpm) en un agitador orbital (Selecta ®, España). Transcurrido este periodo de crecimiento los cultivos de la cepa D3 se encontraron al final de su fase logarítmica, momento este especialmente interesante para los posteriores estudios de conservación.

La biomasa celular se recuperó de los medios de cultivo mediante centrifugación de alícuotas (50 ml) a 4000 rpm durante 10 minutos. La biomasa así obtenida se resuspendió nuevamente con solución salina estéril (NaCl 0,9%), repitiéndose el proceso en tres ocasiones al objeto de eliminar cualquier resto de medio de cultivo. La biomasa recuperada se inmovilizó por atrapamiento celular, utilizándose para ello tres técnicas de inmovilización, previamente descritas (Cruz *et al.*, 2003):

- 2% p/v de carragenina
- 2% p/v de carragenina y 10% de glicerina
- 2% p/v de carragenina y 10% de dimetilsulfóxido

Las carrageninas son hidrocoloides gelificantes extraídas de las paredes celulares de las algas rojas (Rhodophyta). Son utilizadas en diversas aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, gelificante, agente de suspensión y estabilizante, tanto en sistemas acuosos como en sistemas lácticos.

Cada inmovilizador junto con la biomasa atrapada en él, se conservó a tres temperaturas diferentes; 4°C, 18°C y -80°C, con la finalidad de estudiar al mismo tiempo, la influencia de la temperatura en este tipo de conservación y en cualquier caso cuál sería la temperatura más óptima.

## B.2. Estudios de viabilidad.

El estudio de viabilidad realizado ha consistido en comprobar el índice de supervivencia que presenta la bacteria tras el tratamiento con el inmovilizador, es decir el número de células viables recuperadas después de su conservación en las distintas condiciones.

Como se ha comentado anteriormente, la inmovilización celular es un método de conservación y mantenimiento a corto plazo. Teniendo en cuenta este aspecto se estimó que los períodos de estudio fueran: 7, 15, 30 y 60 días. Como control, para poder referenciar los resultados posteriores, se tomó la medida en el tiempo cero, es decir, en el momento en el que se preparan las muestras.

El estudio de viabilidad se llevó a cabo mediante recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterianas en medio de cultivo agar MRS. De los diferentes ensayos de inmovilización celular, se tomaron muestras que fueron resuspendidas en solución salina estéril, procediéndose inmediatamente a la realización de diluciones decimales en solución salina estéril. De cada una de las diluciones se procedió por triplicado a la siembra de placas de agar MRS, utilizando el método de recuento descrito por Miles y Misra (1938). Las placas se incubaron en estufas a 37°C durante 48 horas y condiciones de aerobiosis. Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias (UFC) en cada una de las diluciones y muestras, utilizándose para ello un contador de colonias (Labolan, España). Una vez obtenidos los datos a tiempo cero y en los periodos de conservación (7 a 60 días) se procede a la determinación de la curva de supervivencia de la cepa D3 ante cada agente inmovilizador. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4.

**Tabla 5.1. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>3</sup>) mediante inmovilización celular en medios de carragenina.**

	t <sub>0</sub>	7 días			15 días			30 días		
		4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C
Carragenina 2 %	ND	4000	ND	40	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	3000	ND	30	ND	ND	40	ND	ND	30
	ND	5000	ND	20	ND	190	10	ND	ND	9
	ND	3000	30000	24	70	140	4	ND	ND	3
	62	150	20000	7	30	3	2	220	ND	2
	30	90	1	4	1	2	2	100	ND	1
<b>Promedio</b>	15	2540	8330	21	17	56	10	53	ND	7,5
<b>Índice de supervivencia</b>	100%	16600%	54300%	136%	110%	364%	63%	348%	--	50%

ND. No se detecta crecimiento en los medios de recuento utilizados.

**Tabla 5.2. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>3</sup>) mediante inmovilización celular en medios de carragenina y glicerol.**

	t <sub>0</sub>	7 días			15 días			30 días		
		4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C
Carragenina 2 % + Glicerol 10%	3300	ND	900	70000	90	ND	400	ND	ND	1000
	7000	300	700	16000	80	ND	100	100	ND	800
	5000	120	600	15000	60	ND	70	40	ND	700
	4000	11	500	13000	50	4	40	12	ND	600
	3000	10	140	1300	8	3	20	8	ND	600
	600	6	90	800	5	2	15	2	ND	400
<b>Promedio</b>	3820	7,45	488	19400	49	1,5	108	27	ND	683
<b>Índice de supervivencia</b>	100%	1,95%	12,8%	507%	1,28%	0,04%	2,82%	70,7%	--	17,9%

ND. No se detecta crecimiento en los medios de recuento utilizados.

**Tabla 5.3. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>3</sup>) mediante inmovilización celular en medios de carragenina y dimetilsulfoxido.**

	t <sub>0</sub>	7 días			15 días			30 días		
		4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C
<b>Carragenina 2% + DMSO10%</b>	6000	500	2200	6000	300	300	7000	50	ND	7000
	2800	160	2000	6000	300	80	6000	40	ND	4000
	1900	70	1300	2000	200 90	60	6000	35	ND	400
	900	30	50	1500	130	60	4000	30	ND	300
	900	6	26	700	90	60	3000	20	ND	200
	13	6	18	200	20	20	1000	10	ND	200
<b>Promedio</b>	2090	129	959	2730	173	97	4500	31	ND	2020
<b>Índice de supervivencia</b>	100%	6,17%	46%	131%	8,31%	4,64%	216%	1,48%	--	96,7%

ND. No se detecta crecimiento en los medios de recuento utilizados.

**Tabla 5.4. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) en sistemas controles carentes de compuesto inmovilizador.**

	t <sub>0</sub>	7 días			15 días			30 días		
		4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C	4°C	18°C	-80°C
Solución salina	10000	15000	13000	8000	9000	1000	4000	9000	50	4000
	10000	9000	12000	7000	9000	400	4000	7000	7	3000
	9000	8000	11000	600	8000	300	800	6000	3	1000
	8000	7000	8000	500	7000	300	800	4000	3	700
	4000	4000	5000	400	6000	140	400	4000	2	300
Promedio	7500	7830	8500	2820	7330	378	1720	5500	11	1530
Índice de supervivencia	100%	104%	113%	37,6%	97,8%	5,04%	22,9%	73,3%	0,47%	20,4%

Como se puede observar, los resultados fueron muy dispares, siendo en cualquier caso evidente que la utilización de carragenina como inmovilizador determina unos bajos índices de viabilidad con independencia de la presencia de otros agentes conservadores o temperaturas de incubación. Ello queda patente al comparar los resultados de inmovilización (Tablas 5.1, 5.2 y 5.3) con los obtenidos en los sistemas controles carentes de cualquier tipo de agente inmovilizante (Tabla 5.4). Además de lo mencionado, se puede concluir que la introducción del agente inmovilizante dificulta de forma drástica la manipulación y recuento de los microorganismos. En este sentido las características físico-químicas de la carragenina hacen difícil y complicado la reproducibilidad de los experimentos y en consecuencia los análisis de supervivencia pueden carecer de significación estadística. Es por ello, que consideramos que la posible conservación a corto plazo de la cepa D3 mediante la utilización de este tipo de técnica de conservación resulta inadecuada.

Por todo ello, se desaconseja la conservación de la cepa D3 por inmovilización en carragenina o en cualquier otra matriz que contenga este compuesto en concentraciones similares a las utilizadas en este estudio.

### **5.1.2. Mantenimiento en crioteca: Análisis de crioprotectores y estudio de viabilidad.**

La presente investigación se ha desarrollado como una tecnología de conservación y mantenimiento de células bacterianas a medio y largo plazo. Por ello, hemos realizado la siguiente investigación:

A. Congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$

B. Ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El mantenimiento en crioteca es un método que requiere un laboratorio con una infraestructura de nivel medio-alto y el uso tanto de congeladores que alcancen temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  como de ultracongeladores que conservan las células a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A grandes rasgos, para preservar microorganismos por congelación, primero se cultiva al microorganismo en cuestión esta la fase estacionaria temprana. Las células del cultivo se lavan y después son adicionadas con un volumen equivalente de una solución que contiene una sustancia que deberá funcionar como protectora de las células a la congelación (Perry, 1995). Esa sustancia es conocida con el nombre de crioprotector. Los crioprotectores que se han ensayado son variados y desafortunadamente no existe un crioprotector universal. De hecho, algunas veces se fracasa en preservar un microorganismo por congelación debido a que las bacterias mueren si no se usa el protector adecuado.

Sin estos compuestos pueden formarse cristales de agua y también se genera un estrés osmótico debido a la baja disponibilidad de agua que ocurre durante el proceso de congelación (Perry, 1995).

Además de la infraestructura, el método por congelación, requiere de un gasto energético alto y constante para mantener las temperaturas tan bajas, no obstante, la ventaja más grande de este método es que es muy rápido y fácil de llevar a cabo (Muñoz-Rojas *et al.*, 2010).

La metodología seguida para realizar el estudio, siendo idéntica tanto para -20°C como a -80°C, se describe a continuación:

Se prepararon suspensiones bacterianas estandarizadas (Hernández *et al.*, 2003) a partir de cultivos de la cepa D3 en medio de MRS caldo. Para ello, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio con cultivos puros de la cepa D3. Posteriormente, los matraces se incubaron en agitación continua a 180 rpm en un agitador orbital (Selecta ®, España) a la temperatura de 37°C durante 24 h. Una vez alcanzada la fase estacionaria temprana, las células fueron separadas del cultivo mediante centrifugación a 4000 rpm/10 min y la biomasa obtenida se lavó con solución salina estéril mediante procesos de resuspensión y centrifugación (x 3).

En los ensayos de conservación mediante ultracongelación, se utilizaron distintos crioprotectores. Los mismos fueron seleccionados de acuerdo con experiencias previas (Morales-García *et al.*, 2010; Pannof *et al.*, 2000), procediéndose a su esterilización antes de su adición a las suspensiones bacterianas. Los crioprotectores y la concentración utilizada de los mismos se indican a continuación:

- Glicerol al 25 – 30%
- Dimetilsulfóxido al 2%
- Dimetilsulfóxido al 2% y sacarosa al 10%
- Sacarosa al 10%
- Lactosa al 10%
- Leche descremada al 20%
- Inositol al 5%

Al desarrollar el experimento, hemos ampliado el número de crioprotectores objeto de estudio de la propuesta inicial, para no dejar ningún resquicio de duda sobre la metodología, incorporando nuevos productos que recientemente han sido descritos en bibliografía.

Alícuotas de la biomasa bacteriana adicionadas de las distintas sustancias crioprotectoras, se ajustaron a una densidad celular de ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL). Posteriormente, las suspensiones celulares de la cepa D3 más el crioprotector se introdujeron en criotubos estériles para su conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

De acuerdo a indicaciones científicas previas (Morales-García *et al.*, 2010), la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  debe producirse lo más rápidamente posible para evitar la formación de cristales que podrían dañar las células. Es por ello que el volumen utilizado en los criotubos no supera nunca los 2 ml.

Al objeto de poder realizar los estudios de supervivencia, se prepararon un número total 100 criotubos por crioprotector ensayado, incluyéndose un control de conservación sin la adición de ningún tipo de crioprotector. Todos los análisis de viabilidad se realizaron en diferentes tiempos y en triplicado.

#### A. Estudio de viabilidad

Los estudios de supervivencia han consistido en comprobar el índice de viabilidad que presentan los cultivos tras la congelación/descongelación en las distintas sustancias crioprotectoras, es decir el número de células viables (UFC) recuperadas después de su conservación en las distintas condiciones.

La congelación en crioteca se considera un método de conservación y mantenimiento a medio plazo, por lo que se estimó que los períodos de estudio fueran: 7, 15, 30, 60, 90 y 180 días. Como control, para poder referenciar los resultados posteriores, se tomó la medida en el tiempo cero,

es decir, en el momento en el que se prepararon las muestras.

El estudio de viabilidad se llevó a cabo mediante recuento de colonias bacterianas (UFC/ml) en medio de cultivo agar MRS, a partir de cada una de las muestras de cada crioprotector.

En primer lugar, se realizó la descongelación rápida de las muestras a 37°C. De los diferentes ensayos de crioprotección se tomaron muestras que fueron resuspendidas en solución salina estéril, procediéndose inmediatamente a la realización de diluciones decimales en solución salina estéril. De cada una de las diluciones se procedió por triplicado a la siembra de placas de agar MRS, utilizando el método de recuento descrito por Miles y Misra (1938). Las placas se incubaron en estufas a 37°C durante 48 horas y condiciones de aerobiosis. Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias (UFC) en cada una de las diluciones y muestras, utilizándose para ello un contador de colonias (Labolan, España). Una vez obtenidos los datos a tiempo cero y en los períodos de conservación (7 a 180 días) se procede a la determinación de la curva de supervivencia de la cepa D3 ante cada agente crioprotector.

En las Tablas 5.5 a 5.11 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 5.5. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando inositol como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Inositol 5%</b>	10000	12000	18000	12000
	10000	8000	10000	12000
	5000	7000	3200	11000
	5000	7000	3100	2600
	5000	6000	2800	2100
	5000	5000	2500	2000
<b>Promedio</b>	6670	7330	6600	6950
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	110 %	99 %	104 %

**Tabla 5.6. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando sacarosa como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Sacarosa 10%</b>	16000	18000	15000	20000
	13000	14000	15000	19000
	12000	12000	14000	16000
	10000	11000	10000	15000
	9000	10000	8000	4000
	9000	10000	5000	1900
<b>Promedio</b>	11500	12500	11200	12700
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	109 %	97,1 %	110 %

**Tabla 5.7. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando lactosa como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Lactosa 10 %</b>	18000	15000	12000	11000
	15000	12000	10000	11000
	14000	9000	10000	9000
	13000	7000	5000	9000
	8000	6000	5000	8000
	5000	4000	4000	6000
<b>Promedio</b>	12200	88300	7670	9000
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	72,6 %	63,0 %	74,0 %

**Tabla 8.8. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando dimetilsulfoxido como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>DMSO 2%</b>	23000	27000	25000	26000
	21000	20000	24000	24000
	19000	20000	23000	22000
	19000	19000	18000	19000
	18000	19000	17000	18000
	17000	16000	15000	16000
<b>Promedio</b>	19500	20200	20300	20800
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	103 %	104 %	107 %

**Tabla 8.9. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando glicerol como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Glicerol 25%</b>	70000	80000	60000	60000
	60000	60000	50000	50000
	50000	40000	40000	30000
	34000	40000	30000	30000
	26000	9000	30000	22000
	20000	3000	10000	20000
<b>Promedio</b>	43300	38700	36700	35300
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	89,9 %	85,3 %	81,5 %

**Tabla 8.10. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/ mL x 10<sup>5</sup>) mediante criopreservación utilizando leche descremada como criopreservante.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Leche desc 20%</b>	20000	30000	30000	30000
	19000	26000	26000	22000
	18000	15000	14000	20000
	16000	14000	12000	15000
	16000	10000	9000	11000
	9000	10000	8000	9000
<b>Promedio</b>	16300	17500	16500	17800
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	107 %	101 %	109 %

**Tabla 8.11. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/mL x 10<sup>5</sup>) mediante crioconservación utilizando leche descremada como crioprotector.**

	t cero	7 días	15 días	30 días
<b>Sacarosa 10% + DMSO 2%</b>	16000	25000	25000	20000
	15000	20000	20000	19000
	11000	11000	10000	14000
	11000	9000	10000	11000
	11000	6000	8000	8000
	10000	6000	6000	8000
<b>Promedio</b>	12300	12800	13200	13300
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	104 %	107 %	108 %

De los resultados obtenidos de nuestro estudio se puede establecer que la criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  representa un excelente método de conservación a medio plazo para la cepa D3. No obstante, resulta evidente que la presencia de un determinado crioprotector durante el proceso influye de una manera directa sobre los índices de supervivencia de la cepa. Así se puede afirmar que de los crioprotectores ensayados el inositol, sacarosa, dimetilsulfóxido, leche descremada y la mezcla de dimetilsulfóxido-sacarosa determinaron índices de supervivencia ciertamente excelentes. En sentido contrario, la utilización de la lactosa como crioprotector determinó índices de viabilidad menores del 80%, lo que claramente indica su menor capacidad de protección durante el proceso de ultracongelación. Finalmente, la utilización de glicerol determinó índices de supervivencia aceptable (valores entre 80 y 90%) aunque inferiores a los obtenidos con otros protectores.

En conclusión podemos afirmar que la ultracongelación es una técnica adecuada para la conservación de la cepa D3, recomendándose que la misma se realice con crioprotectores del tipo inositol, sacarosa, dimetilsulfóxido y leche descremada, así como mezclas de dimetilsulfoxido-sacarosa. No obstante, considerando el fácil manejo y baja toxicidad ambiental de inositol, sacarosa y leche descremada, consideramos que estos crioprotectores son los más adecuados

y eficientes en la conservación de la cepa D3 mediante crioconservación.

### **5.1.3. Liofilización de cepa D3, fase de experimentación.**

A. Establecimiento de las condiciones óptimas de liofilización.

La liofilización es una tecnología ampliamente usada en la conservación de alimentos, proteínas y sustancias de interés farmacéutico (Ratti, 2001; Roy y Gupta, 2004; Tang y Pikal, 2004), con el objetivo de conseguir su estabilidad a temperatura ambiente. Además, esta metodología es muy efectiva para la preservación de la viabilidad de distintas células, de los dominios Eucaria (Crowe *et al.*, 2003; Ryan and Smith, 2007) y Bacteria (Leslie *et al.*, 1995; Perry, 1995; Redway y Lapage, 1974). No obstante, debe de tomarse en consideración que para incrementar la supervivencia de las células que se resguardan bajo condiciones de liofilización, se ha implementado el uso de sustancias que actúan como protectoras (lioprotectores) y se tiene que explorar la sustancia que protege a la bacteria que se desea resguardar (Morales-García *et al.*, 2006).

La liofilización consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas; que pasa directamente a un estado de

vapor debido a que no hay presión molecular que lo impida. En este método, las muestras que contienen la suspensión de microorganismos, son previamente congeladas e inmediatamente expuestas al vacío. El vapor de agua extraído es atrapado por un condensador de refrigeración. El vacío debe ser casi absoluto (menos de 10 mTorr; 10  $\mu\text{m}$  de Hg), lo que provoca la evaporación del hielo con la consiguiente pérdida de calor que se produce en el proceso. Por lo tanto, un liofilizador necesita una bomba de alto vacío, un condensador y complementos para el funcionamiento principal. No obstante, también se requiere de una bomba adicional y un accesorio de entradas múltiples si se desean elaborar ampollas al vacío que portarán las bacterias que se desean preservar. Después de la "deseccación" de las células bacterianas, los microorganismos se mantienen en viales individuales y bajo condiciones de vacío o se les aplica un gas inerte. Una vez que las bacterias se liofilizan, estas pueden permanecer en un lugar fresco a una temperatura que oscile entre los 15 a los 25°C, esto significa guardar a las muestras liofilizadas a temperatura ambiente, lo que reduce en gran medida los costos energéticos que se requieren para mantener las bajas temperaturas de un ultracongelador.

Así a largo plazo la liofilización resulta menos costosa que la ultracongelación. Además, la ventaja máxima que representa liofilizar una cepa bacteriana, es que es una manera de preservar a largo plazo; se dice que las muestras pueden conservarse por más de 25 años (Morales-García *et al.*, 2010).

El punto limitante del método de liofilización es que aún hay poco conocimiento en la forma adecuada para preservar a las bacterias por este método y de acuerdo con los datos con que se cuenta no existe un lio-protector universal para todas las cepas bacterianas y se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular (Morgan *et al.*, 2006). Sin embargo, se han encontrado algunas sustancias protectoras muy efectivas como la hidroxietilcelulosa (Manzanera *et al.*, 2002; Manzanera *et al.*, 2004) y los disacáridos trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa (Leslie *et al.*, 1995; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Palmfeldt *et al.*, 2003). Se propone que los disacáridos protegen a las células al sustituir a las moléculas de agua, durante el proceso de liofilización (Leslie *et al.*, 1995; Crowe *et al.*, 2003). De esta forma las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta (Leslie *et al.*, 1995), lo cual posibilita a que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y/o rehidratación.

Algunas bacterias que se han conservado eficientemente mediante liofilización se han preservado usando protectores de forma individual como algunos polialcoholes o azúcares y pocas veces usando mezclas de ellos. Quizás habrá que probar algunas mezclas complejas con los protectores más efectivos para obtener un lio-protector adecuado que sea capaz de proteger a cualquier célula bacteriana del proceso de liofilización. La combinación de lactosa y trehalosa ha resultado importante para la protección de bacterias probióticas (Pehkonen *et al.*, 2008). Además, la leche

desnatada al 20% es medianamente eficiente para preservar a algunas bacterias mediante liofilización (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006, Redway y Lapage, 1974, Morales-García *et al.*, 2010).

La metodología utilizada en nuestros estudios de liofilización se ha basado en la aplicación de técnicas estandarizadas y utilización de diversos lioprotectores, algunos de ellos aún poco experimentados en el ámbito de las bacterias lácticas. En definitiva el método utilizado se podría describir de la siguiente manera:

Se prepararon suspensiones bacterianas estandarizadas (Hernández *et al.* 2003) a partir de cultivos de la cepa D3 en medio de MRS caldo. Para ello, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio con cultivos puros de la cepa D3. Posteriormente, los matraces se incubaron en agitación continua a 180 rpm en un agitador orbital (Selecta ®, España) a la temperatura de 37°C durante 24 h. Una vez alcanzada la fase estacionaria temprana, las células fueron separadas del cultivo mediante centrifugación a 4000 rpm/10 min y la biomasa obtenida se lavó con solución salina estéril mediante procesos de resuspensión y centrifugación.

En los ensayos de conservación mediante liofilización se utilizaron distintos lioprotectores. Los mismos fueron seleccionados de acuerdo con experiencias previas (Leslie *et al.*, 1995; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Palmfeldt *et al.*, 2003), procediéndose a su esterilización antes de su adición a las suspensiones bacterianas. Los lioprotectores y la

concentración utilizada de los mismos se indican a continuación:

- Leche descremada al 20%; medio Skim Milk Powder (Oxoid, U.K.)
- Inositol al 5%
- Trehalosa al 5% + Sacarosa al 5%
- Lactosa al 5% + Trehalosa al 5%

Al desarrollar el experimento, se amplió el número de lioprotectores objeto de estudio, incorporando nuevos productos que recientemente han sido descritos en bibliografía.

Como se ha comentado anteriormente, los microorganismos liofilizados se mantienen en viales individuales sellados al vacío. Los viales son recipientes de cristal de un volumen no superior a 10 ml capaces de soportar temperaturas de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y presiones de vacío. Estos viales se esterilizaron en autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 min).

Una vez preparadas las suspensiones bacterianas con los distintos lioprotectores, se distribuyeron en los viales previamente esterilizados, con un volumen máximo de 2 ml por vial, ya que un volumen mayor dificultaría y ralentizaría en gran medida el proceso de liofilización. Seguidamente, se procedió con el ultracongelado de dichos viales a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante al menos 3 horas. Transcurrido el tiempo necesario para la congelación de las muestras, se comenzó con el

proceso de liofilización propiamente dicho, para lo cual se introdujeron los viales en las bandejas del liofilizador. Previamente, se revisan que todos los elementos del aparato estén en perfecto estado; niveles de aceite, engrasado de las juntas, válvulas cerradas, etc., y más importante aún, se programan los parámetros necesarios para que la liofilización tenga lugar según las condiciones de tiempo, temperatura, presión, etc., óptimas que se han establecido para el correcto transcurso de la liofilización de nuestros microorganismos.

El proceso de liofilización propiamente dicho tiene una duración aproximada de 35 horas. Una vez acabado el proceso, se procedió al sellado hermético de los viales con la ayuda de una pistola selladora. Los viales se mantuvieron en oscuridad a temperaturas de entre 18 – 25°C, hasta el momento de su reconstitución para realizar el correspondiente análisis de viabilidad.

## B. Análisis de viabilidad

El análisis de viabilidad consiste en comprobar el índice de supervivencia que presentan los cultivos tras el proceso de liofilización en las distintas sustancias lioprotectoras y posterior restitución, es decir el número de células viables recuperadas después de su conservación en las distintas condiciones. Como se ha comentado anteriormente, la liofilización es un método de conservación a largo plazo, por lo que se considera que el estudio de viabilidad debería

prolongarse en el tiempo hasta al menos dos años. Con lo cual, los períodos de estudio de viabilidad serían: 1, 15, 30, 90, 180, 360 y 720 días.

Como control, para poder referenciar los resultados posteriores, se toma la medida en el tiempo cero, es decir, en el momento en el que se preparan las muestras. Además, se incluyó un control de suspensión bacteriana sin la adición de ningún lioprotector.

En primer lugar, se realizó la reconstitución de los liófilos mediante adición a los mismos de 2 ml de MRS caldo. De los diferentes ensayos de lioprotección una vez reconstituidos se realizó la realización de diluciones decimales en solución salina estéril. De cada una de las diluciones se procedió por triplicado a la siembra de placas de agar MRS, utilizando el método de recuento descrito anteriormente (Miles y Misra, 1938). Las placas se incubaron en estufas a 37°C durante 48 horas y condiciones de aerobiosis. Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias (UFC) en cada una de las diluciones y muestras, utilizándose para ello un contador de colonias (Labolan, España). Una vez obtenidos los datos a tiempo cero y en los períodos de conservación, se procedió a la determinación de la curva de supervivencia de la cepa D3 ante cada agente lioprotector. Los resultados se muestran en las Tablas 5.12 a 5.15.

**Tabla 1.12. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/ mL x 10<sup>5</sup>) mediante liofilización utilizando inositol como lioprotector.**

	t cero	1 días	15 días	1 mes
<b>INOSITOL 5%</b>	66000	2200	90	120
	47000	630	90	110
	45000	560	70	85
	34000	390	70	70
	27000	150	70	40
	24000	120	30	40
<b>Promedio</b>	40500	675	70	77,5
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	1,66 %	0,17 %	0,11 %

**Tabla 1.13. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/ mL x 10<sup>5</sup>) mediante liofilización utilizando trehalosa +sacarosa como lioprotector.**

	t cero	1 días	15 días	1 mes
TREHALOSA 5% + SACAROSA 5%	42000	35000	30000	50000
	40000	31000	29000	50000
	39000	30500	28000	30000
	30000	30000	27500	24000
	25000	29000	25400	6000
	25000	26000	24800	2000
Promedio	33500	30250	27450	27000
Índice supervivencia	100 %	90,30 %	81,94 %	80,60 %

**Tabla 1.14. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/ mL x 10<sup>5</sup>) mediante liofilización utilizando trehalosa + lactosa como lioprotector.**

	t cero	1 días	15 días	1 mes
TREHALOSA 5% + LACTOSA 5%	76000	16000	25000	20000
	50000	12800	16000	20000
	49000	11000	14800	20000
	46800	10000	11000	18000
	43000	9000	10000	16000
	31000	9000	6000	8000
Promedio	49300	11300	13800	17000
Índice supervivencia	100 %	22,92%	28,20%	34,48%

**Tabla 1.15. Resultados de supervivencia bacteriana de la cepa D3 (expresada como ufc/ mL x 10<sup>5</sup>) mediante liofilización utilizando leche descremada como lioprotector.**

	t cero	1 días	15 días	1 mes
SKIM MILK	60000	22000	12600	40000
	17000	21000	11500	12000
	15000	20400	11000	8000
	13000	20000	10100	6000
	12000	19000	9500	160
	6000	18500	9000	27
<b>Promedio</b>	20500	20150	10616	11000
<b>Índice supervivencia</b>	100 %	98,29%	51,78%	53,66%

Los resultados del estudio de liofilización demuestran que esta técnica de conservación permite alcanzar niveles de supervivencia superiores a  $10^8$  células viables por mL tras 30 días de conservación a temperatura ambiente. No obstante, resulta evidente que en valores porcentuales los índices de supervivencia alcanzados con la mezcla de lioprotectores trehalosa+sacarosa determina los mejores índices de viabilidad celular. En consecuencia, se puede afirmar que el agente lioprotector también parece ejercer una cierta influencia en la viabilidad celular, siendo la mezcla trehalosa+sacarosa la más eficiente en relación a este parámetro.

En conclusión, se puede afirmar que la liofilización garantizaría la supervivencia de una elevada densidad celular en los viales lioprottegidos.

## **8.2. Curvas de crecimiento.**

La determinación de la curva de crecimiento de un microorganismo es necesaria para conocer su velocidad de crecimiento y el de generación.

Las fases son las siguientes:

Fase de adaptación (lag): El número celular no experimenta una subida notable.

Fase exponencial: En ella se observa un crecimiento exponencial del microorganismo con respecto al tiempo.

Fase estacionaria: No se observa crecimiento, se mantiene el número de células durante un tiempo.

Fase de muerte: El número de células vivas va disminuyendo a lo largo del tiempo.

El objetivo de los experimentos presentados en esta sección fue determinar la curva de crecimiento de la cepa D3 en cultivo líquido cerrado o discontinuo.

### **8.2.1. Metodología.**

#### Determinación del máximo de absorción

Para determinar el máximo pico de absorción al cual debe ser medido el microorganismo por espectrofotometría, se suspende masa del cultivo puro en un tubo, y cambiando la longitud de onda en el espectrofotómetro se determina a qué longitud se obtiene mayor valor en la medida.

#### Preparación del preinóculo

A partir de un cultivo puro en medio sólido (sembrado en pico de flauta) se realiza una siembra en placa con MRS sólido. Se

deja incubar a 37°C un tiempo necesario hasta que tengamos un crecimiento adecuado.

Desde la placa se realiza la siembra de una colonia en un tubo con 5 ml de medio líquido de MRS. Se incuba durante 24 horas a 37°C en agitación a 150 rpm (Agyei *et al.*, 2012).

### Siembra en matraz

Transcurrido ese tiempo se pasan 3 ml a un matraz con 150 ml de MRS líquido. El ml restante se utiliza para medir la densidad óptica y para realizar una siembra en placa de diferentes diluciones seriadas. Con ello nos aseguramos de la cantidad de microorganismos que inoculamos (UFC/ml). A partir del matraz se extraen alícuotas cada 30 minutos para determinar el crecimiento bacteriano. En cada una de las medidas, se determina la densidad óptica a la longitud de onda adecuada (determinada previamente), y se realiza siembra en placa para un conteo posterior del número de colonias. Se llevan a cabo diluciones seriadas para hacer siembras de cada una de ellas.

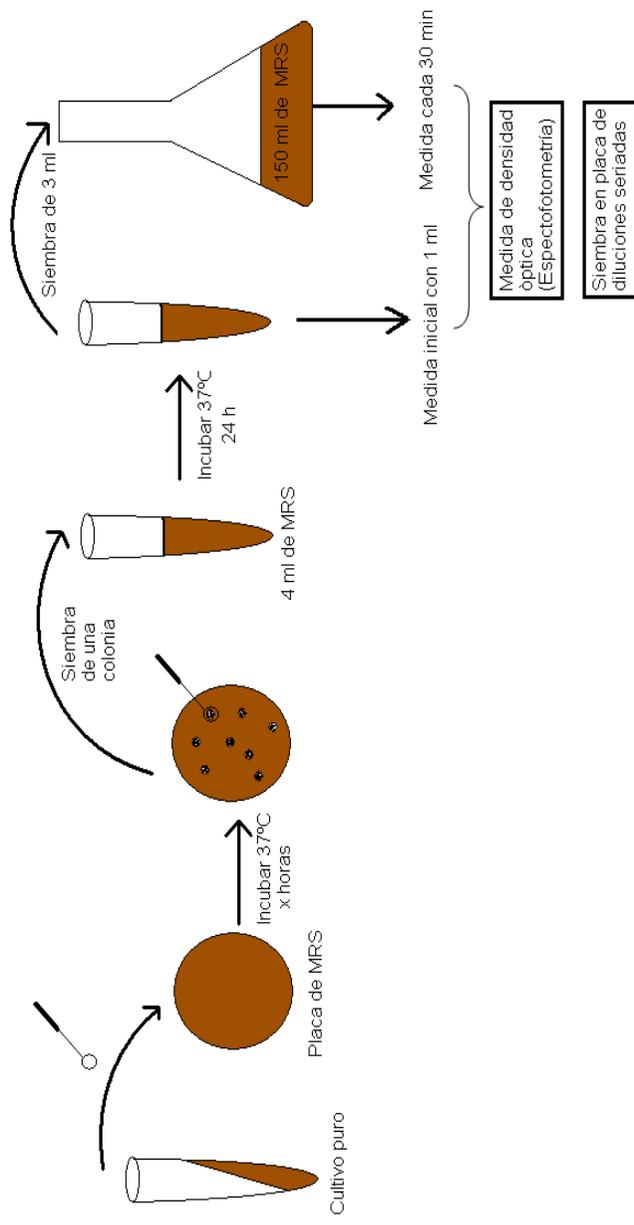
### Diluciones seriadas

Mediante una pipeta estéril, tomar una muestra del cultivo del matraz, y depositar 10 µl en un primer pocillo de un placa de 96 con 90 µl de solución salina (dilución  $10^{-1}$ ). Se debe conseguir una suspensión homogénea. Tomar otra pipeta estéril, y transferir de esta primera dilución 10 µl al siguiente pocillo con 90 µl de solución salina ( $10^{-2}$ ), y así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-6}$ . A partir de cada uno de

los pocillos, con una pipeta estéril, inocular una gota de 10  $\mu$ l en placa MRS. En cada una de las placas se colocarían 6 gotas correspondientes a las 6 diluciones. Se realizarán dos réplicas por cada dilución. Es decir, se sembrarían dos o tres placas cada vez (2 – 3 réplicas), cada una de ellas con las 6 gotas correspondientes a las diferentes diluciones. Este procedimiento tendría lugar cada 30 minutos durante unas 8 horas aproximadamente.

#### Conteo de colonias

Tras incubar 24 horas se podrán obtener colonias aisladas. El recuento de estas colonias permitirá conocer el número de células viables existentes en el cultivo original. El procedimiento se esquematiza en la Figura 5.1.



## 5.1. Continuación

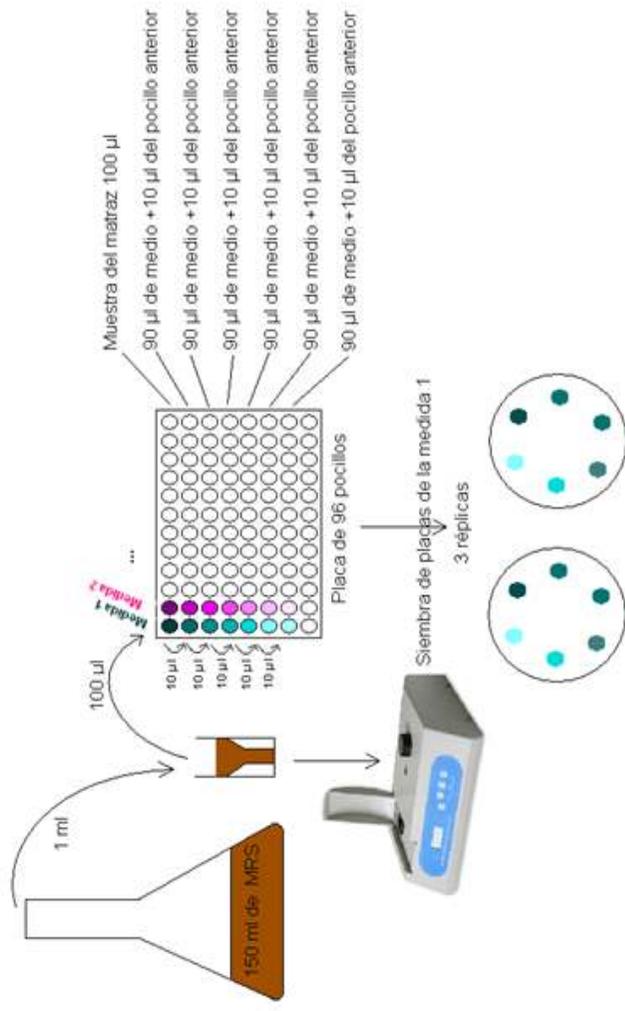


Figura 5.1. Esquema de las determinaciones de curvas de crecimiento.

### 5.2.2. Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos con la cepa D3 se muestran en la Tabla 5.16 y en la Figura 5.2.

**Tabla 5.16. Valores para la curva de crecimiento de D3.**

Tiempo (horas)	Abs(600nm)	UFC/ml
0	0,155	-
0,5	0,16	3,50E+07
1	0,183	1,00E+08
1,5	0,238	1,60E+08
2	0,314	9,00E+07
2,5	0,497	4,00E+08
3	0,65	1,80E+08
3,5	0,836	1,13E+08
4	1,01	9,00E+08
4,5	1,126	1,27E+08
5	1,271	8,00E+08
6	1,413	3,00E+08
6,5	1,457	6,90E+08
7	1,476	3,20E+08
7,5	1,52	9,90E+08
8	1,5	3,90E+08
8,5	1,54	6,80E+08
9	1,54	8,40E+08
<b>24(1 día)</b>	1,54	4,50E+08
<b>25</b>	1,532	1,00E+08
<b>26</b>	1,523	1,40E+09
<b>27</b>	1,527	4,50E+08
<b>32</b>	1,537	1,10E+09
<b>48 (2 días)</b>	1,546	2,45E+08
<b>72(3 días)</b>	1,525	3,10E+08
<b>75</b>	1,512	5,00E+08
<b>144 (6 días)</b>	1,6	2,10E+05

<b>147</b>	1,61	1,10E+05
<b>171(7 días)</b>	1,6	-
<b>195(8 días)</b>	1,6	-
<b>219(9 días)</b>	1,51	-
<b>285(12 días)</b>	1,6	-
<b>309 (13 días)</b>	1.6	-
<b>327(14 días)</b>	1.7	-

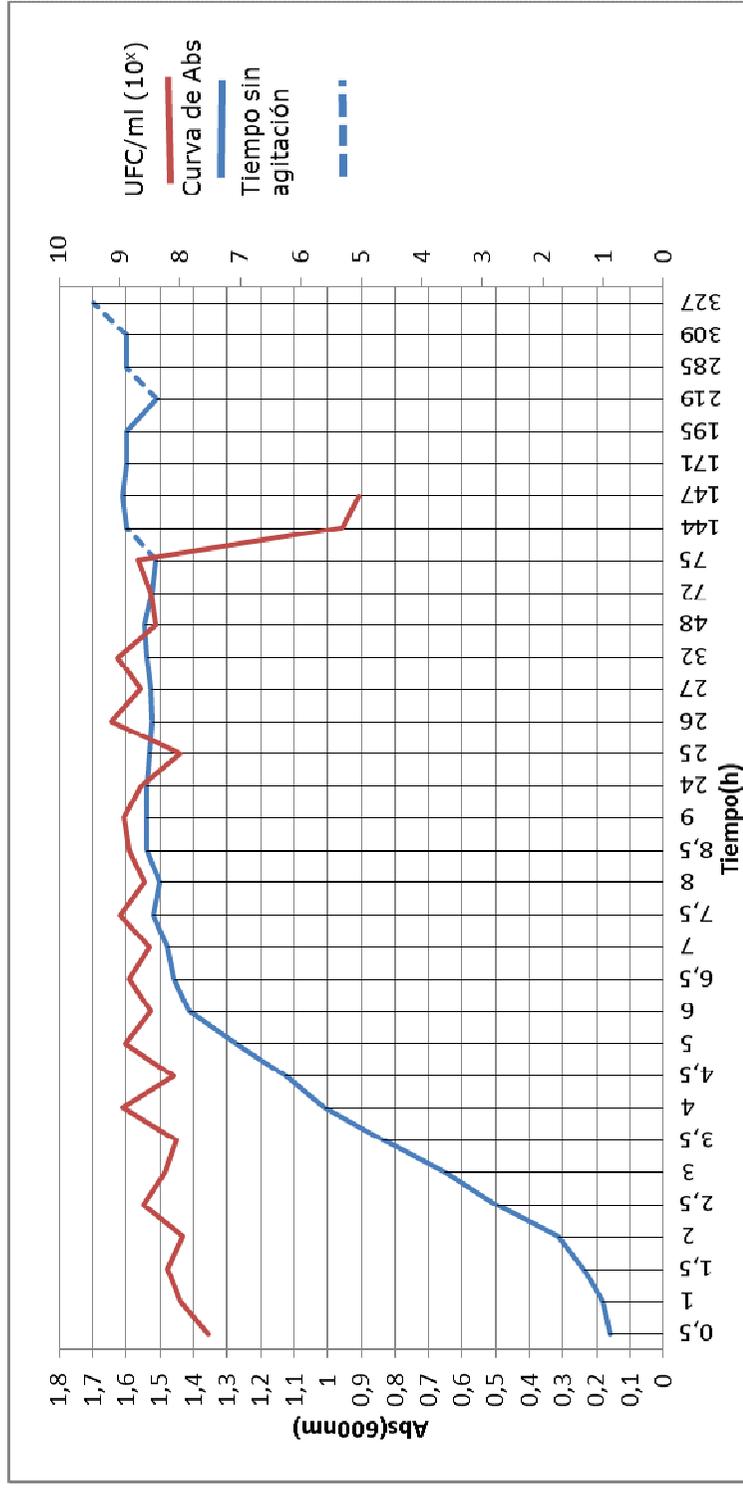


Figura 5.2. Curvas de crecimiento de D3 obtenidas por densidad óptica (masa bacteriana) y nº de bacterias viables.

Los datos obtenidos revelaron que el n<sup>o</sup> de bacterias viables, determinadas por recuento de UFC, ya era inicialmente muy elevado (más de 10<sup>7</sup> bacterias viables por ml) y alcanzó los máximos valores (alrededor de 10<sup>9</sup> por ml) entre las 4 y las 32 h, con un brusco descenso que se inicia a las 76 h hasta llegar a valores indetectables. Es un comportamiento típico de lactobacilos en medios ricos en dextrosa, donde la acumulación de ácidos producidos como consecuencia del metabolismo fermentativo llega a alcanzar niveles tóxicos para el propio microorganismo que los produjo (Leroy y De Vuyst, 2001). La curva de densidad óptica informa que durante la fase exponencial (primeras 4 h) y al principio de la fase estacionaria (primeras 7 h de dicha fase, con recuentos próximos a 10<sup>9</sup> bacterias viables/ml) las bacterias eran pequeñas, pero sus dimensiones fueron incrementándose progresivamente hasta mantener una turbidez constante. El abrupto descenso de viabilidad registrado a partir de las 75 h de cultivo no se reflejó en la turbidez: las bacterias mueren pero no se lisan.

### **8.3. Capacidad fermentadora**

#### **8.3.1. Fermentación de leche de cabra con cepa D3**

El objetivo de este estudio fue producir leche de cabra fermentada usando como microorganismo fermentador la cepa *L. fermentum* D3.

Al mismo tiempo se estudió también la cantidad de inóculo y el tiempo de fermentación hasta alcanzar el pH adecuado.

La metodología seguida se describe a continuación:

- Sembrar en una placa de MRS agar la cepa D3 procedente de un cultivo puro (cepario). Incubar 24h a 37°C.
- A partir de la placa, preparar una suspensión bacteriana en solución salina estéril (13ml) con una turbidez equivalente a escala de McFarland de 5.
- Dispensar 38 mL de MRS caldo en 6 tubos estériles.
- Inocular los tubos con 2 mL cada uno de la suspensión de D3 en incubar 24-48h a 37°C.
- Realizar un recuento de UFC de la suspensión bacteriana mediante recuento en placa de MRS. Para saber concentración de inóculo de partida.
- Centrifugar los 6 cultivos a 4000 rpm durante 15 min y desechar el sobrenadante. (Antes tomar una muestra del cultivo para realizar recuento de UFC tras incubación).
- Resuspender el pellet de cada tubo en 2-4 ml de leche pasteurizada.

- Inocular 2L de leche de cabra pasteurizada.
- Incubar a 40-42°C controlando el pH hasta alcanzar un pH < 5 y se estabilice pH. Para controlar el pH evitando posibles contaminaciones, apartar unos 100ml de leche inoculado a un vaso estéril e incubar con el resto. Las medidas de pH se realizaran en esa leche.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Partiendo de un inóculo de  $1,8 \times 10^8$  UFC/mL, los recuentos realizados durante el proceso de fermentación y el descenso del pH conforme progresa el proceso se presentan en la Tabla 5.17.

**Tabla 5.17. Parámetros durante el proceso de fermentación con D3.**

Horas	pH	Temperatura (°C)
13.10	6.44	34.7
14.10	6.41	38.2
17.10	6.23	41.3
18.25	6.16	39.9
20.45	4.90	41.0
8.05	4.23	41.5
10.30	4.22	40.3

Se ha formado un producto con aspecto de cuajada que se ha separado del suero: forma gas y huele a queso.

Se intenta separar el suero de la "cuajada" obtenida por gravedad mediante coladores de tela.

Se filtra durante más de 48 h y se obtiene una especie de queso untable. El rendimiento es de 33% aprox. La Figura 5.3 muestra fotografías del producto fermentado obtenido.



**Figura 5.3. Derivado lácteo fermentado producido utilizando D3 como único agente fermentador.**

### **8.3.2. Fermentación de leche de cabra con cepa B16.**

El objetivo de este estudio fue producir leche de cabra fermentada usando como microorganismo fermentador la cepa *L. fermentum* B16.

Al mismo tiempo se estudió también la cantidad de inóculo y el tiempo de fermentación hasta alcanzar el pH adecuado.

La metodología seguida se describe a continuación:

- Sembrar en una placa de MRS agar la cepa B16 procedente de un cultivo puro (cepario). Incubar 24h a 37°C.
- A partir de la placa, preparar una suspensión bacteriana en solución salina estéril (13ml) con una turbidez equivalente a escala de McFarland de 5.
- Dispensar 38 mL de MRS caldo en 6 tubos estériles.
- Inocular los tubos con 2 mL cada uno de la suspensión de B16 en incubar 24-48h a 37°C
- Realizar un recuento de UFC de la suspensión bacteriana mediante recuento en placa de MRS. Para saber concentración de inóculo de partida
- Centrifugar los 6 cultivos a 4000 rpm durante 15 min y desechar el sobrenadante. (Antes tomar una muestra del cultivo para realizar recuento de UFC tras incubación)
- Resuspender el pellet de cada tubo en 2-4 ml de leche pasteurizada
- Inocular 2L de leche de cabra pasteurizada

- Incubar a 40-42°C controlando el pH hasta alcanzar un pH < 5 y se estabilice pH. Para controlar el pH evitando posibles contaminaciones, apartar unos 100ml de leche inoculado a un vaso estéril e incubar con el resto. Las medidas de pH se realizaran en esa leche.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Partiendo de un inóculo de  $3,32 \times 10^7$  UFC/mL, los recuentos realizados durante el proceso de fermentación y el descenso del pH conforme progresa el proceso se presentan en la Tabla 5.18.

**Tabla 5.18. Parámetros durante el proceso de fermentación con B16.**

Hora	pH	Temperatura (°C)
13.10	6.52	14.4
14.10	6.43	35.2
17.10	6.33	40.2
18.25	6.29	40.1
20.45	5.44	40.2
8.05	4.20	42.0
10.30	4.90	41.0

Se ha formado un producto con aspecto de cuajada que se ha separado del suero, se forman dos fases.

Olor más o menos suave; no huele ni a queso ni a cabra.

Se intenta separar el suero de la "cuajada" obtenida por gravedad mediante coladores de tela. Se filtra durante más de 48h y se obtiene una especie de queso untable. El rendimiento es de 33% aprox. La Figura 8.4 muestra fotografías del producto fermentado obtenido.



**Figura 5.4. Derivado lácteo fermentado producido utilizando B16 como único agente fermentador.**

La fermentación de leche de cabra con ambas bacterias es prácticamente igual salvo en los tiempos de fermentación, que con la cepa D3 es un poco más rápida y las cualidades organolépticas del producto obtenido. El producto de D3 huele y sabe a queso de cabra mientras que el producto de B16 presenta la misma textura pero su olor y sabor son muy suaves no huele ni a queso ni a cabra, es prácticamente neutro.

## **6. INMUNOMODULACIÓN *EX VIVO***

### **6.1. Objetivo y diseño experimental.**

Entre los diversos efectos atribuidos a los probióticos, algunos como la protección frente a infecciones intestinales y extraintestinales por bacterias y virus, la mejoría de desórdenes intestinales como diarreas y enfermedades inflamatorias, y la prevención de trastornos alérgicos y en especial de urticarias causadas por alergias a alimentos (De Vrese y Schrezenmeir, 2008; Douglas y Sanders, 2008; Narayan *et al.*, 2010), sugieren la intervención de mecanismos inmunitarios. En efecto, son cada vez más numeroso los estudios que demuestran en microorganismos probióticos la capacidad para modificar los mecanismos defensivos, conocida como actividad inmunomoduladora (Leber *et al.*, 2008; Forsythe y Bienenstock, 2010). La interacción entre estructuras y/o metabolitos de bacterias probióticas y receptores de la inmunidad innata como los TLRs, presentes en macrófagos y células dendríticas, puede ser el acontecimiento inicial de la inmunomodulación por estas bacterias, que se traduce en la modulación de la producción de citoquinas, y finalmente implica la modificación de la actividad de fagocitos, células "natural killer" y linfocitos T y B (Leber *et al.*, 2008; Adams, 2010).

En el presente trabajo, se planteó evaluar el efecto inmunomodulador de la cepa *Lactobacillus fermentum* D3 mediante experimentos *ex vivo* en los que se midió la capacidad de proliferación y producción de citoquinas de esplenocitos murinos en presencia de mitógenos de células B (lipopolisacárido de bacterias gram-negativas o LPS) y T (concanavalina A o ConA). En los estudios *ex vivo*, se examina *in vitro* la capacidad de respuesta de células procedentes de animales sometidos al tratamiento problema, en comparación con células de animales no tratados; la diferencia con los estudios *in vivo* es que, en estos, las medidas se realizan directamente en los animales tratados o testigos, mientras que en los ensayos *in vitro* las células proceden siempre de animales no tratados y los tratamientos se realizan *in vitro*. En este trabajo, se compararon las respuestas de esplenocitos de ratones tratados con la cepa D3 con las de esplenocitos de ratones testigos que recibieron únicamente el vehículo de la suspensión bacteriana.

## **6.2 Animales.**

Se usaron ratones BALB/c hembras, de 20 g. de peso, suministrados por Janvier Labs (Saint Berthevin, France), que se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada. Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con las directrices de

la *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes* (Directiva 86/609 / CEE) y fueron autorizados y supervisados por el Comité de Bioética de la Universidad de Granada.

### **6.3. Administración de lactobacilos.**

El tratamiento consistió en la administración de una dosis de aproximadamente  $10^9$  lactobacilos viables en un volumen de 100  $\mu$ L de vehículo (leche descremada de vaca) por ratón durante 12 días consecutivos (el experimento se realizó por duplicado).

En cada experimento se dispusieron dos lotes de 5 animales cada uno (Figura. 3.1). Un grupo fue tratado con el probiótico y el otro solo con el vehículo lácteo.

La administración de los inóculos se realizó por vía intraesofágica, empleando una cánula de alimentación de acero inoxidable (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) conectada a una jeringa estéril de 1 ml.



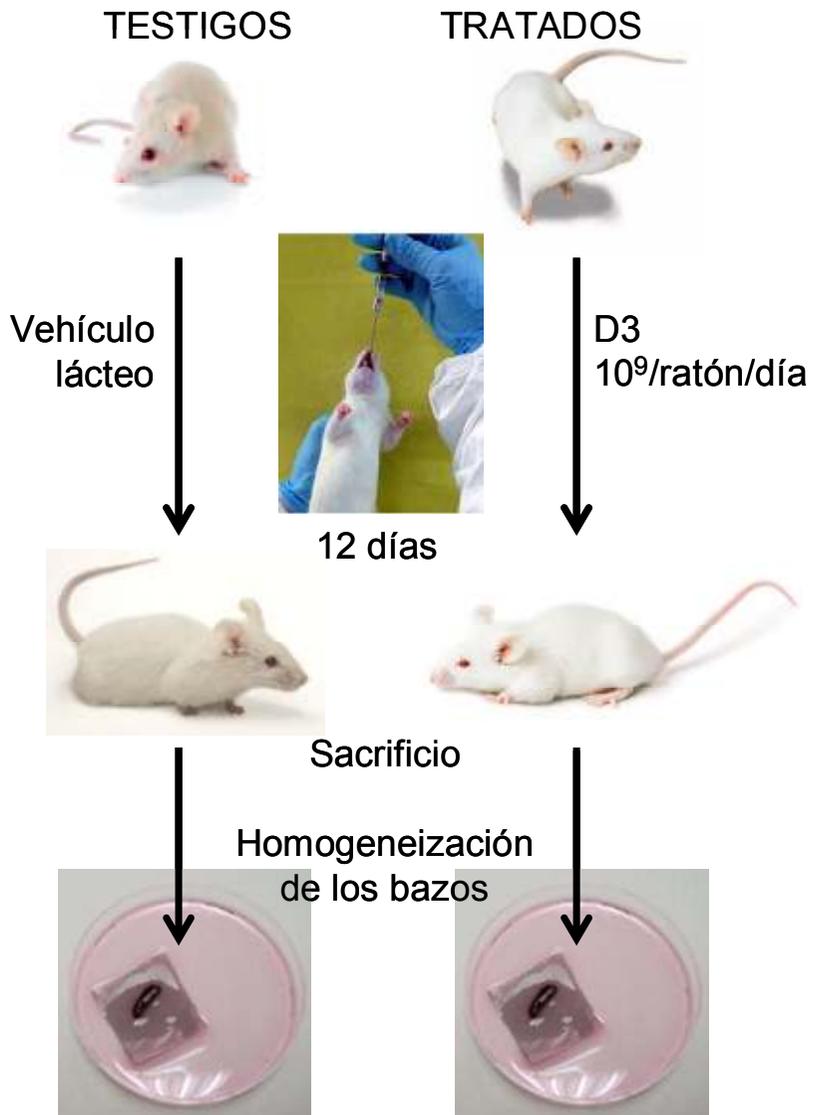
**Figura 6.1. Grupos experimentales de ratones BALB/c.**

Para la obtención del inóculo en leche descremada se partió de un cultivo de 24 h de la cepa probiótica en tubos inclinados de agar MRS, incubados a 37°C. A partir de este cultivo se sembraron 10 tubos con 5 mL de caldo MRS. Para que todos los tubos tuvieran una carga bacteriana similar el cultivo se realizó en unas condiciones fácilmente estandarizables y que consistían en tocar con el asa el cultivo original y a continuación descargarla en el medio líquido. Los tubos así preparados se incubaron a 37°C durante 24 h y transcurrido este tiempo se homogeneizaron por agitación transfiriéndose cuidadosamente su contenido a tubos de poliestireno de 50 mL. Estos tubos se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y a 5°C, se retiraron los sobrenadantes estérilmente y los sedimentos de los 10 tubos se recogieron juntos en un volumen total de 10 mL de leche

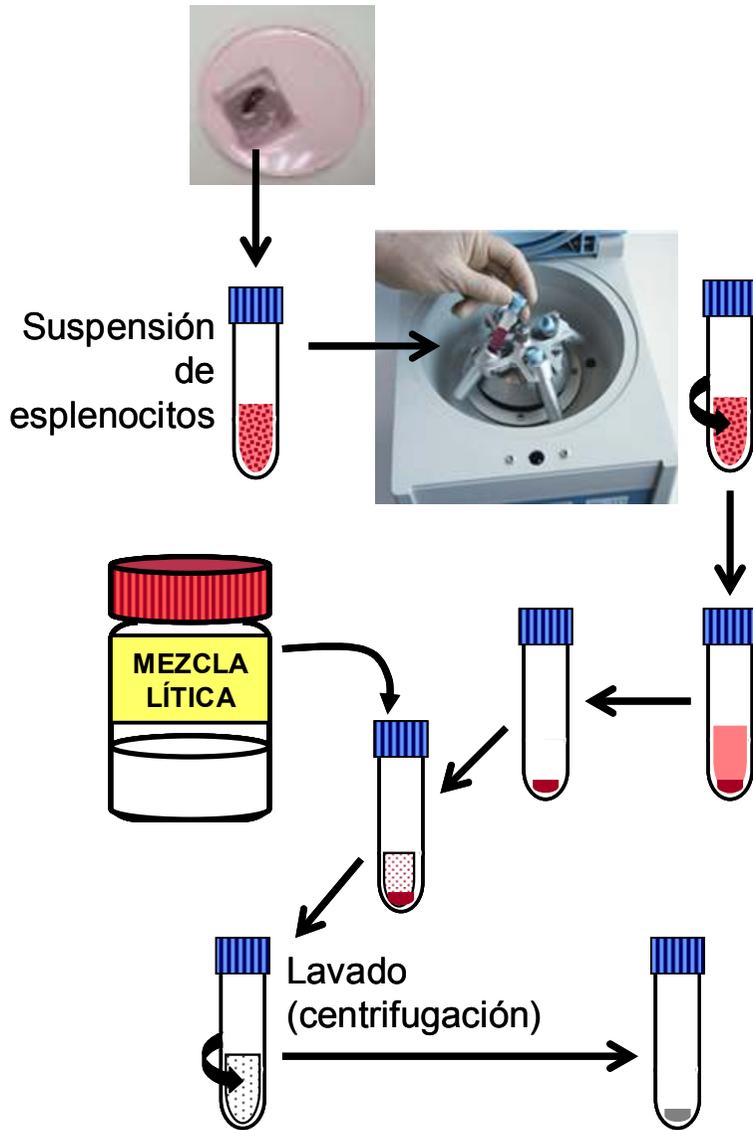
desnatada. Para conocer la concentración de lactobacilos viables en el inóculo, se realizaron diluciones decimales en solución salina estéril y se sembraron 10  $\mu$ L de cada dilución en placas de Agar MRS, que se incubaron 48 h a 37°C, tras lo cual se procedió al recuento de colonias. El inóculo así preparado se conservó en frío (4°C).

#### **6.4. Cultivo de esplenocitos.**

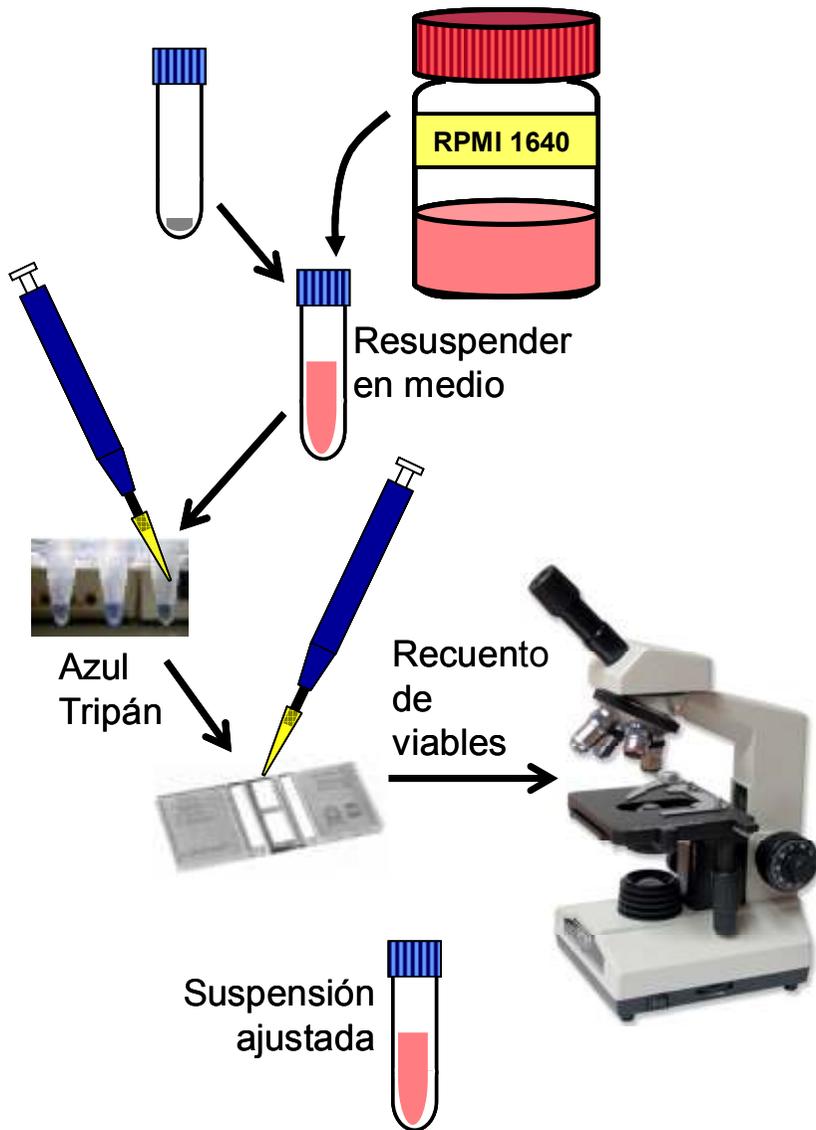
El procedimiento seguido, que se describe a continuación, ha sido optimizado en nuestro laboratorio, donde se utiliza de forma rutinaria (Ruiz-Bravo *et al.*, 2001). Un esquema del proceso se ofrece en la Figura 6.2.



**Figura 6.2. Cultivo de esplenocitos para medidas de proliferación y producción de citoquinas en respuesta a mitógenos**



**Figura 6.2 (Continuación)**



**Figura 6.2 (Continuación)**



**Figura 6.2 (Continuación)**

El medio empleado para el cultivo de células fue RPMI 1640 sin glutamina y con bicarbonato sódico (Sigma), suplementado con L-glutamina (extemporánea por ser fácilmente hidrolizable), piruvato, suero fetal bovino (fuente de nutrientes y de factores de crecimiento, se usó

descomplementado por calentamiento en baño de agua a 56°C durante 30 min), mercaptoetanol (para facilitar la proliferación de los linfocitos) y la mezcla antimicrobiana que previene contaminaciones. La suplementación se muestra en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1. Suplementación del medio RPMI 1640 para ensayos con esplenocitos.**

Componente	Concentración por litro	Volumen para 100mL de RPMI 1640
L- glutamina (Sigma) <sup>a</sup>	2mM <sup>d</sup>	1 mL
Piruvato sódico (Sigma) <sup>b</sup>	1mM <sup>d</sup>	1mL
2-mercaptoetanol (Merck)	50µM <sup>d</sup>	350µL <sup>e</sup>
Penicilina <sup>c</sup>	100000 U.I. <sup>d</sup>	1 mL
Estreptomicina <sup>c</sup>	100 mg <sup>d</sup>	
Anfotericina B <sup>c</sup>	250 µg <sup>d</sup>	
Suero bovino fetal (Sigma)	90.9 mL	10 mL

<sup>a</sup> Adquirida como una solución 200 mM.

<sup>b</sup> Adquirido como una solución 100 mM.

<sup>c</sup> Penicilina, estreptomicina y anfotericina B se adquirieron como una única solución que contiene respectivamente 10<sup>4</sup> U.I., 10 mg y 25 µg por mL.

<sup>d</sup> Concentraciones antes de añadir el suero bovino fetal.

<sup>e</sup> Volumen a tomar de una dilución 1:1000 en PBS del producto comercial.

El medio así preparado se esterilizó por filtración con presión positiva (suministrada por una bomba peristáltica) a través de membranas Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La esterilidad se comprobó manteniendo el medio a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se observaron el color, la transparencia y la ausencia de sedimentos, así como cualquier alteración indicativa de crecimiento de bacterias u hongos, en cuyo caso el medio debe desecharse. El medio se conservó en el frigorífico siendo utilizado en un plazo de tiempo inferior a 10 días, ya que la glutamina se hidroliza de forma espontánea por lo que sufre una pérdida gradual de concentración a lo largo del tiempo. Antes de su utilización, el medio se atemperó a temperatura ambiente.

#### **6.4.1. Obtención de suspensiones de esplenocitos.**

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Tras aseptizar la superficie corporal con etanol, se dispusieron sobre soportes previamente aseptizados en el interior de una cabina de flujo laminar. Utilizando material quirúrgico estéril, se practicaron sucesivas incisiones en la piel y en el peritoneo para extraer el bazo, que se dispuso sobre una rejilla metálica estéril depositada en el interior de una placa Petri estéril conteniendo 10 mL de medio de cultivo. Se procedió a homogeneizar el bazo presionando sobre la rejilla con el extremo ancho de una jeringa de 5 mL, estéril. Se dejaron

decantar los restos tisulares macroscópicos y se aspiró la suspensión celular con una pipeta desechable de 10 mL conectada a un dispositivo de pipeteo automático, para transferirla a un tubo de centrifuga de poliestireno de 15 mL. Las células se sedimentaron por centrifugación (10 minutos a 1000 r.p.m. y 5°C), desechando el sobrenadante. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis de hematíes (Sigma) estéril manteniendo la suspensión 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 5 mL de medio para proteger a las células nucleadas de daño hipotónico. A continuación se realizaron dos lavados por centrifugación en las condiciones ya descritas, resuspendiendo cada vez las células en medio de cultivo estéril.

#### **6.4.2. Recuento de células viables y ajuste de las suspensiones.**

De la suspensión de esplenocitos se tomaron 100  $\mu$ L que se llevaron a un tubo eppendorf conteniendo 500  $\mu$ L de azul Tripán (Sigma) diluído 1:10 en solución salina y 400  $\mu$ l de medio RPMI 1640. De esta dilución a 1:10, se tomó el volumen suficiente para llenar una cámara hemocitométrica de Neubauer y proceder al recuento de células viables (identificadas por su capacidad para excluir el colorante azul). La viabilidad de estas suspensiones, fue en todos los casos superior al 95% (las suspensiones con porcentajes inferiores

deben ser eliminadas). La suspensión original se centrifugó en las condiciones ya descritas, y el sedimento celular se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo para obtener una concentración de  $5 \times 10^6$  células viables por mL.

#### **6.4.3. Cultivo de esplenocitos.**

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar). Se distribuyeron 100  $\mu$ L de suspensión por pocillo, de modo que cada pocillo recibió  $5 \times 10^5$  células. Cada suspensión (procedente del bazo de un único ratón) se distribuyó en columnas de ocho pocillos. La primera columna sólo recibió células y se utilizó como blanco. El resto de las columnas recibieron células así como diferentes agentes mitogénicos a razón de 10  $\mu$ L por pocillo. Se probaron dos agentes distintos, lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhi* (mitógeno estándar de células B) y Concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de células T). Ambos mitógenos se obtuvieron de Sigma y se utilizaron a una concentración final en cultivo de 2.5  $\mu$ g/mL para el LPS y 1  $\mu$ g/ml para ConA, preparados a partir de soluciones madre esterilizadas por filtración. Cada pocillo de la placa de cultivo, recibió 10  $\mu$ L de estas soluciones para obtener las concentraciones finales deseadas. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de tensión de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación, durante 72 h, tras lo cual se procedió a las medidas de

proliferación o a la obtención de sobrenadantes que se guardaron congelados hasta su uso para medir niveles de citoquinas.

### **6.5. Medida de la proliferación celular.**

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann (1983). Concluidos los tres días de incubación, las placas se llevaron a la cabina de flujo laminar, donde se añadieron a cada pocillo 10  $\mu$ L de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio, compuesto designado con las siglas MTT (Sigma), al 0.5% en PBS. Se trata de un reactivo extemporáneo, que debe prepararse inmediatamente antes de su uso. La solución de MTT se esterilizó por filtración a través de membrana Millipore de 0.22  $\mu$ m y se mantuvo en frío, protegida de la luz. Las placas se reincubaron en las condiciones descritas anteriormente durante cuatro horas. Durante este tiempo, las células metabólicamente activas reducen el MTT a un derivado tetrazólico coloreado. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 200  $\mu$ L de isopropanol ácido (0.42 ml de HCl al 35% por cada 100 ml de isopropanol), con el fin de extraer de las células el colorante reducido. Se aspiró y expelió varias veces el contenido de cada pocillo, para solubilizar completamente los cristales del colorante reducido. La densidad óptica de los cultivos se determinó en un lector de microElisa (Behring EL 311), previamente programado

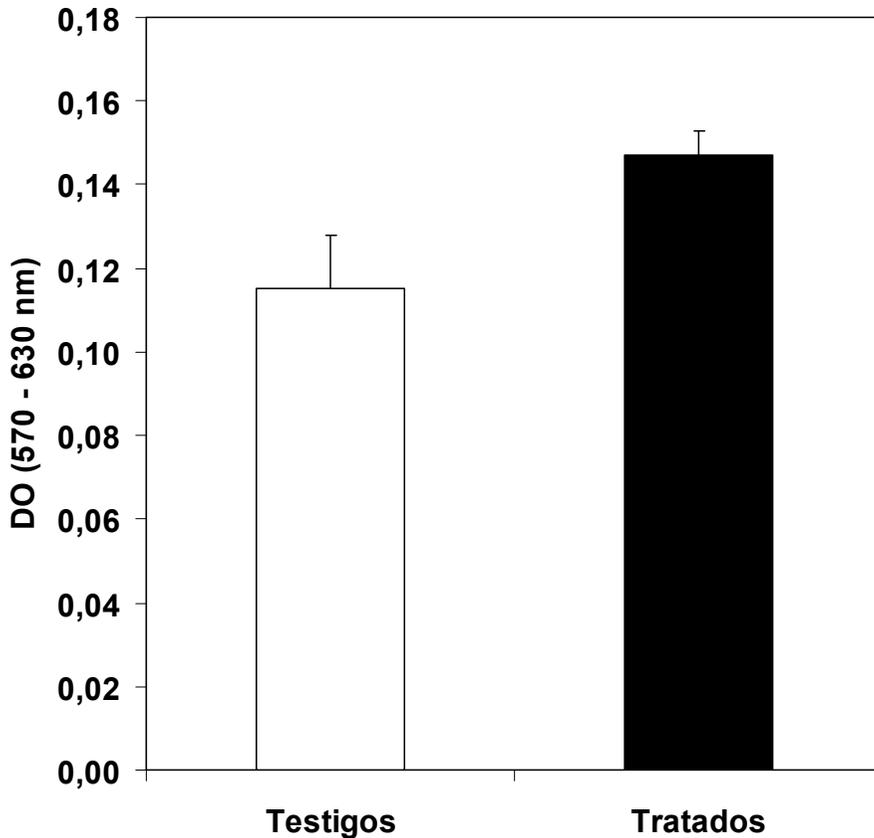
para leer absorbancias a 570 nm y 630 nm de referencia. Para los cultivos de cada bazo, se usaron como blanco los ocho pocillos de la columna reservada para ello, que no recibieron ningún estímulo mitogénico. Los resultados se expresaron como la media aritmética de las densidades ópticas de los ocho pocillos de cada columna destinada a un determinado agente mitogénico.

### **6.6. Cuantificación de citoquinas.**

Para la determinación de citoquinas se utilizaron kits de ELISA de la casa comercial Thermo Scintific (Rockford, USA), que utilizan anticuerpos monoclonales frente a citoquinas murinas. Las lecturas se realizaron por enzimoimmunoensayo a partir de los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de animales tratados con el probiótico. Como control se tomó un grupo de animales testigos que solo recibieron el vehículo (leche descremada estéril). Se midió la producción de interleukina 10 (IL-10), factor necrosante de tumores alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

### **6.7. Resultados y discusión.**

Los resultados de las medidas de proliferación de esplenocitos en respuesta al LPS, mitógeno de células B, se presentan en la Figura 6.3.

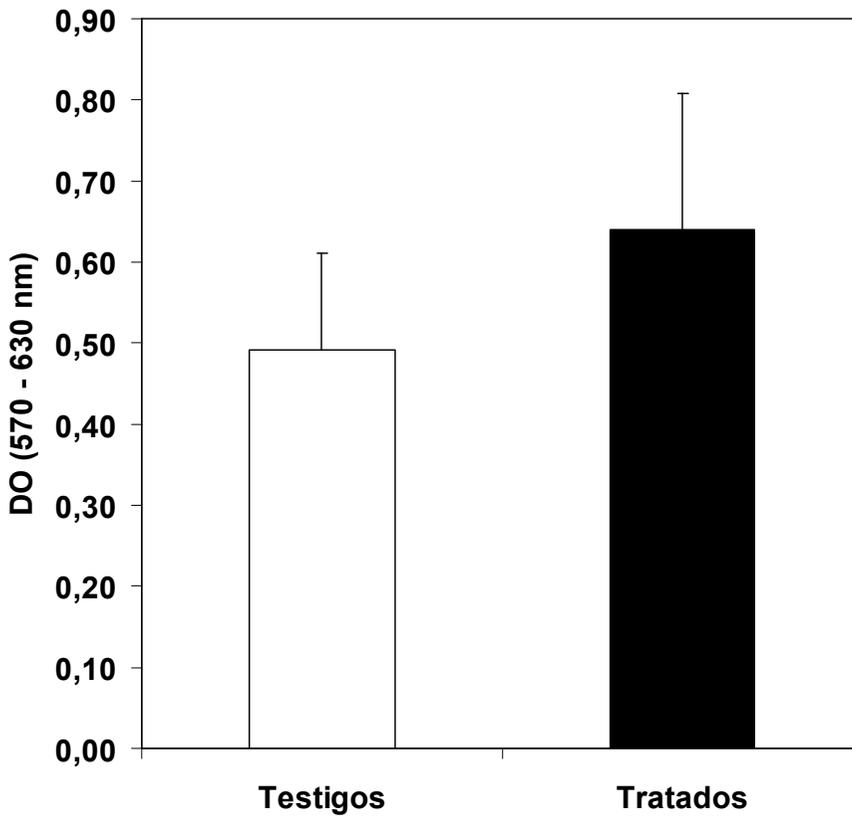


**Figura 6.3. Proliferación de esplenocitos en respuesta a LPS.**

Se observa que el tratamiento con D3 incrementó la capacidad de respuesta de los linfocitos B, que representó el 128% de la respuesta obtenida con células de animales testigos. Este incremento resultó estadísticamente significativo ( $P < 0,005$  según el test de Student).

En lo que se refiere a la proliferación en respuesta a ConA, mitógeno de células T, los resultados se muestran en la

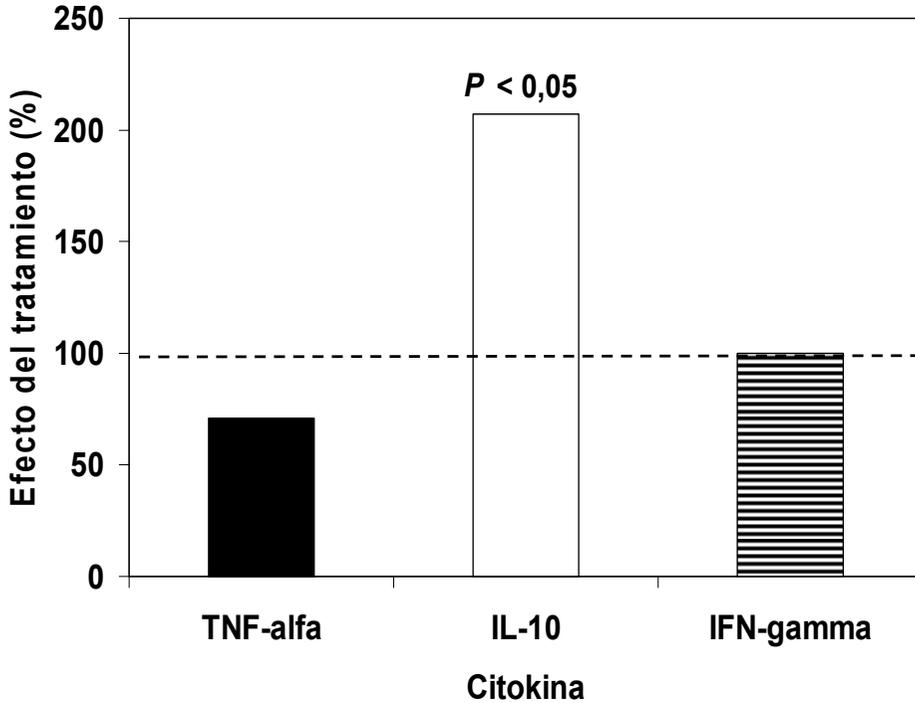
Figura 6.4. La respuesta de las células T de los animales tratados representó el 130%, pero no se alcanzó significación estadística ( $P = 0,112$ ), debido a la dispersión de los datos, que se tradujo en valores demasiado altos de las desviaciones estándar.



**Figura 6.4. Proliferación de esplenocitos en respuesta a Concanavalina A.**

La modulación de la proliferación de linfocitos esplénicos en respuesta a mitógenos es un efecto utilizado comúnmente para evaluar tratamientos inmunopotenciadores o inmunosupresores y se utiliza clásicamente en el estudio de las interacciones entre microorganismos probióticos y el sistema inmune del hospedador. En el presente estudio, el tratamiento con D3 causó un incremento general en la capacidad de respuesta de los linfocitos esplénicos, aunque el efecto solo fue significativo sobre linfocitos B. Se ha descrito que algunos probióticos causan incrementos en la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos de células B y T, lo que se considera un componente de un efecto general de inmunopotenciación beneficioso para la salud (Gill *et al.*, 2000); ciertamente, una inmunopotenciación sistémica podría traducirse en un incremento de la resistencia a infecciones o de la eficacia de inmunizaciones vacunales. Efectos contrarios, como los reportados por Kirjavainen *et al.* (1999) en ratones tratados con cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus rhamnosus*, han sido interpretados como favorables por sugerir efectos supresores de reacciones de hipersensibilidad; sin embargo, en nuestra opinión una afirmación así, sin aportar evidencias concretas que demuestren inhibición de las respuestas de IgE, es totalmente especulativa y, en realidad, lo único que en tales casos se demuestra es un efecto inmunosupresor potencialmente peligroso.

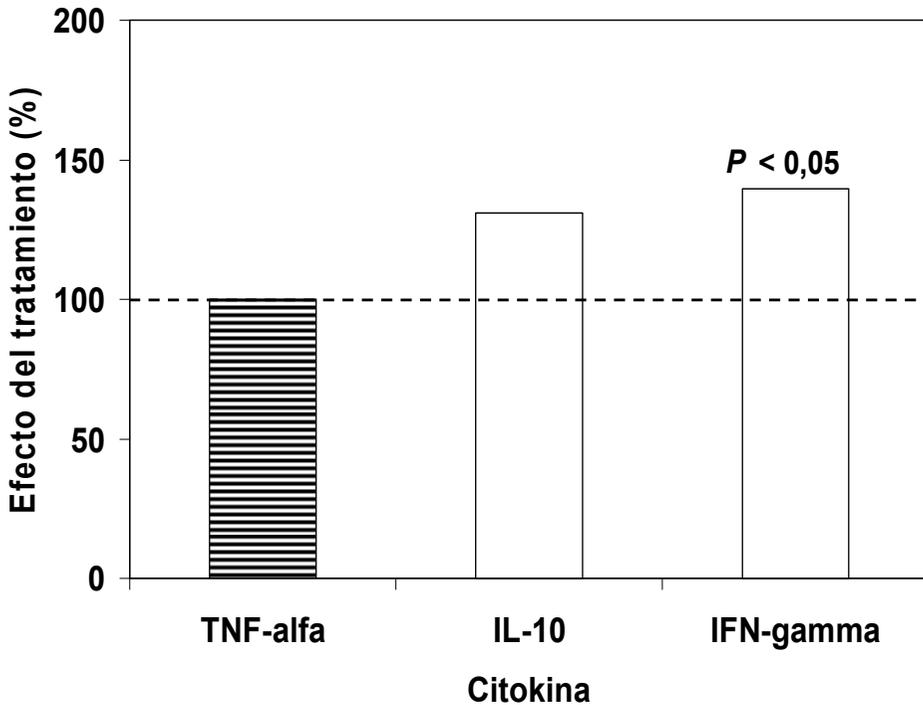
Para tener una idea más precisa de las repercusiones de la inmunopotenciación sobre la salud, es preciso conocer si existe un efecto modulador, que potencie selectivamente alguna de las ramas de la respuesta inmune, dependientes de las células Th1 o Th2, y para ello es de utilidad la información sobre los niveles de citoquinas producidas por los esplenocitos estimulados por mitógenos. Las Figuras 6.5 y 6.6 presentan los resultados de las medidas de citoquinas en cultivos de esplenocitos estimulados con LPS y ConA, respectivamente. Los datos de la Figura 6.5 revelan que en los cultivos estimulados con LPS hubo un incremento significativo de la producción de IL-10. Esta interleukina inmunorreguladora tiene actividad antiinflamatoria (Mege *et al.*, 2006). Los linfocitos B no producen IL-10, por lo que el incremento observado debe atribuirse a otras células presentes en el cultivo, que podrían ser los macrófagos esplénicos, susceptibles a la estimulación por el LPS (Meisel *et al.*, 1996) y/o a linfocitos Th2, estimulados a su vez por los macrófagos. La información de la Figura 6.6 es esclarecedora en el sentido de que el incremento de IL-10 atribuible células T no es significativo. Si lo es, en cambio, aunque modesto, el incremento de la citoquina IFN- $\gamma$ , conocida por ser un mediador crucial de la inmunidad celular y la principal citoquina activadora de macrófagos.



**Figura 6.5. Efecto de D3 en la producción de citoquinas por esplenocitos estimulados con LPS. Los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de animales testigos se han igualado a 100 (en blanco, niveles superiores, y en negro, niveles inferiores a los de sobrenadantes de testigos). La significación estadística se obtuvo con el test de Student.**

No es fácil interpretar en términos celulares estos efectos sistémicos del tratamiento con D3, que parece tener dos componentes: (1) estímulo de las células Th1, productoras de IFN- $\gamma$ ; (2) estímulo de la actividad antiinflamatoria de macrófagos. Independientemente de los mecanismos

celulares, los datos obtenidos evidencian en su conjunto un panorama muy interesante: potenciación sistémica de la capacidad de respuesta de los linfocitos, estímulo de la inmunidad celular y acción antiinflamatoria.



**Figura 6.6. Efecto de D3 en la producción de citoquinas por esplenocitos estimulados con ConA. Los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de animales testigos se han igualado a 100 (en blanco, niveles superiores a los de sobrenadantes de testigos). La significación estadística se obtuvo con el test de Student.**

Este panorama se podría traducir en incremento de la resistencia frente a infecciones, tanto por patógenos extracelulares (potenciación de los linfocitos B, productores de anticuerpos) como por patógenos intracelulares (potenciación de la producción de IFN- $\gamma$ , que asegura la activación de macrófagos), y limitación de los daños causados por las reacciones inflamatorias que acompañan a la presencia de microorganismos patógenos en los tejidos. A priori, este espectro de acción parece preferible al mostrado por otros probióticos como *Escherichia coli* M-17 que al reducir la producción de todas las citoquinas proinflamatorias inhiben también la producción de IFN- $\gamma$  (Fitzpatrick *et al.*, 2008), con lo que deprimen las defensas frente a patógenos intracelulares; o al perfil contrario, mostrado por *Lactobacillus rhamnosus* LA68, que al estimular a las células Th1 favorece la producción de IFN- $\gamma$  pero inhibe a la citokina antiinflamatoria IL-10 (Dimitrijevic *et al.*, 2014); y se aproxima a una situación ideal como la descrita para *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium lactis* HN019, que incrementan las defensas sin tener efectos colaterales indeseables debidos a estimulación de respuestas inmunopatológicas (Zhou y Gill, 2005).

## **7. PROTECCIÓN FRENTE A INFECCIONES EXPERIMENTALES**

### **7.1. Objetivo y diseño experimental**

Uno de los efectos más interesantes de los microorganismos probióticos es la capacidad para incrementar la resistencia del hospedador a infecciones intestinales (Ng *et al.*, 2009) y extraintestinales (Fraga *et al.*, 2005; Lehtoranta *et al.*, 2014). En el caso de la protección frente a infecciones intestinales, que es el que ha sido investigado con mayor asiduidad, se han postulado varios posibles mecanismos: la producción de sustancias inhibitoras, el bloqueo de sitios de adhesión en la superficie intestinal, la competencia por los nutrientes, y la estimulación de la mucosa y la inmunidad sistémica (Servin, 2004; Ng *et al.*, 2009; Ohland y Macnaughton, 2010). Sin embargo, el incremento de resistencia frente infecciones extraintestinales no puede explicarse por mecanismos que supongan competencia o proximidad entre el probiótico y el patógeno, y deben atribuirse a mecanismos inmunomoduladores (Park *et al.*, 2013). El interés de la aplicación de probióticos en la prevención y tratamiento de infecciones alcanza incluso al concepto, tan actual, de “salud global”, ya que los probióticos se presentan como una alternativa al uso de antibióticos tradicionales como promotores de crecimiento en ganadería; es sabido que el

uso profiláctico imprudente de antibióticos conlleva un alto riesgo de selección de bacterias resistentes a múltiples fármacos útiles en clínica, pero ingesta de probióticos es un enfoque seguro y no farmacológico para combatir los microbios patógenos, principalmente a través de la modulación del sistema inmune (Cross, 2002).

En el presente trabajo, se planteó el objetivo de examinar si *L. fermentum* D3 es capaz de incrementar la resistencia frente infecciones intestinales en modelos experimentales en ratón. Se eligieron dos bacterias patógenas entéricas: *Yersinia enterocolitica* O9 y *Listeria monocytogenes*. Las cepas virulentas (portadoras del plásmido pYV) del serotipo O9 de *Y. enterocolitica* pertenecen al biotipo 2, de patogenicidad moderada (Fábrega y Vila, 2012); son patógenos extracelulares que causan una enteritis aguda que se autolimita sin manifestaciones extraintestinales, excepto en enfermos inmunocomprometidos o con sobrecarga plasmática de hierro. En el ratón, la infección con *Y. enterocolitica* O9 por vía oral produce una infección intestinal similar a la humana, que cursa sin sintomatología aparente, pero que puede persistir durante más de dos meses, como revela la excreción de yersinias en heces (Ruiz-Bravo *et al.*, 1999). En este modelo experimental, la evolución de la infección se monitoriza mediante coprocultivo en medios selectivos para yersinias. En cuanto a *L. monocytogenes*, es un patógeno intracelular (Stavru *et al.*, 2011), que tras la infección por vía oral atraviesa la mucosa intestinal y pasa a

sangre; las listerias pueden cuantificarse mediante siembras de homogeneizados de hígado o bazo, órganos donde son retenidas por los macrófagos fijos que las retiran de la circulación.

## **7.2. Ensayos de protección frente a *Yersinia enterocolitica* O9.**

### **7.2.1. Pretratamiento con *Lactobacillus fermentum* D3.**

Se dispusieron dos lotes de ratones BALB/c (ver el apartado 6.2), uno de los cuales recibió solo el vehículo de leche descremada, mientras que el otro fue tratado con una *L. fermentum* D3 en leche descremada ( $10^9$  CFU por ratón y día). Los inóculos fueron de 100  $\mu$ L por ratón, administrados por cánula intragástrica como se describió en la sección 6.3, donde se describe también la preparación de los inóculos. El tratamiento se inició 12 días antes del desafío con *Y. enterocolitica*.

### **7.2.2. Desafío.**

Terminado el tratamiento previo con D3, todos los animales fueron inoculados por vía intragástrica con la cepa IP383 de *Y. enterocolitica*.

La cepa IP383, de origen humano, pertenece al serotipo O9, biotipo 2, y es portadora del plásmido de virulencia pYV (Mazigh *et al.*, 1983). Los inóculos se obtuvieron recogiendo en PBS las bacterias crecidas en TSA a 25°C durante 24 h (a temperaturas superiores a 29°C, el pYV es inestable y termina perdiéndose). Cada animal recibió  $10^8$  bacterias viables en un volumen de 100  $\mu$ l mediante cánula intraesofágica.

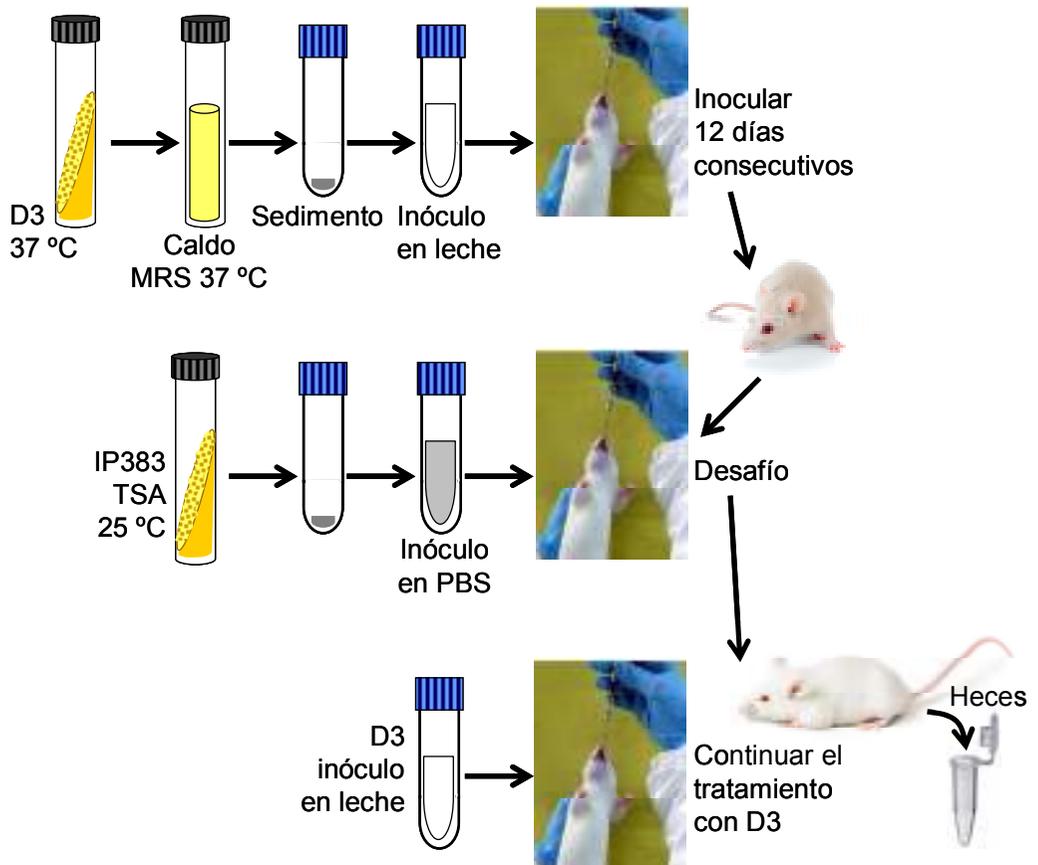
### **7.2.3. Continuación del tratamiento con D3.**

Una vez infectados, los animales continuaron recibiendo sus tratamientos diarios (D3 y vehículo lácteo) hasta el final del ensayo.

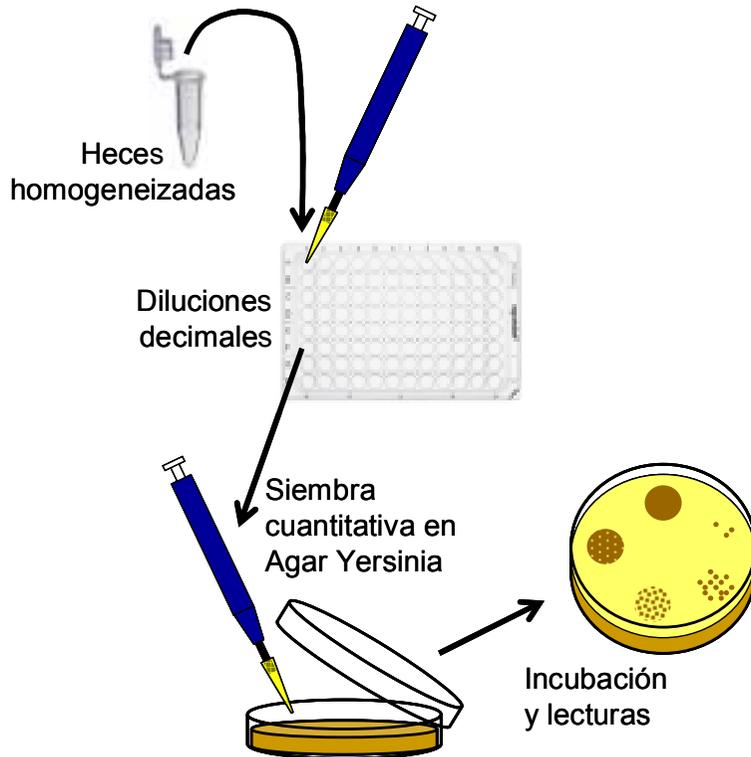
### **7.2.4. Monitorización de la infección.**

La evolución de la infección se monitorizó por coprocultivo en medio selectivo. Las heces de los ratones infectados se obtuvieron directamente sobre placas Petri estériles y se procesaron en un máximo de 15 minutos después de la recogida. Las heces se pesaron y se homogeneizaron en 10 ml de PBS estéril y se sembraron diluciones adecuadas de los homogeneizados en placas de Agar Yersinia (CIN Agar), suplementado con cefsulodina, irgasan y novobiocina (Oxoid, Hampshire, UK), para el recuento de CFU correspondientes al

contenido en bacterias viables. Los resultados se expresaron como número de yersinias viables por gramo de heces. Un esquema del procedimiento completo se presenta en la Figura 7.1.



**Figura 7.1. Ensayo de protección frente a la infección experimental con *Y. enterocolitica* IP383.**



**Figura 7.1 (Continuación)**

### **7.3. Ensayos de protección frente a *Listeria monocytogenes*.**

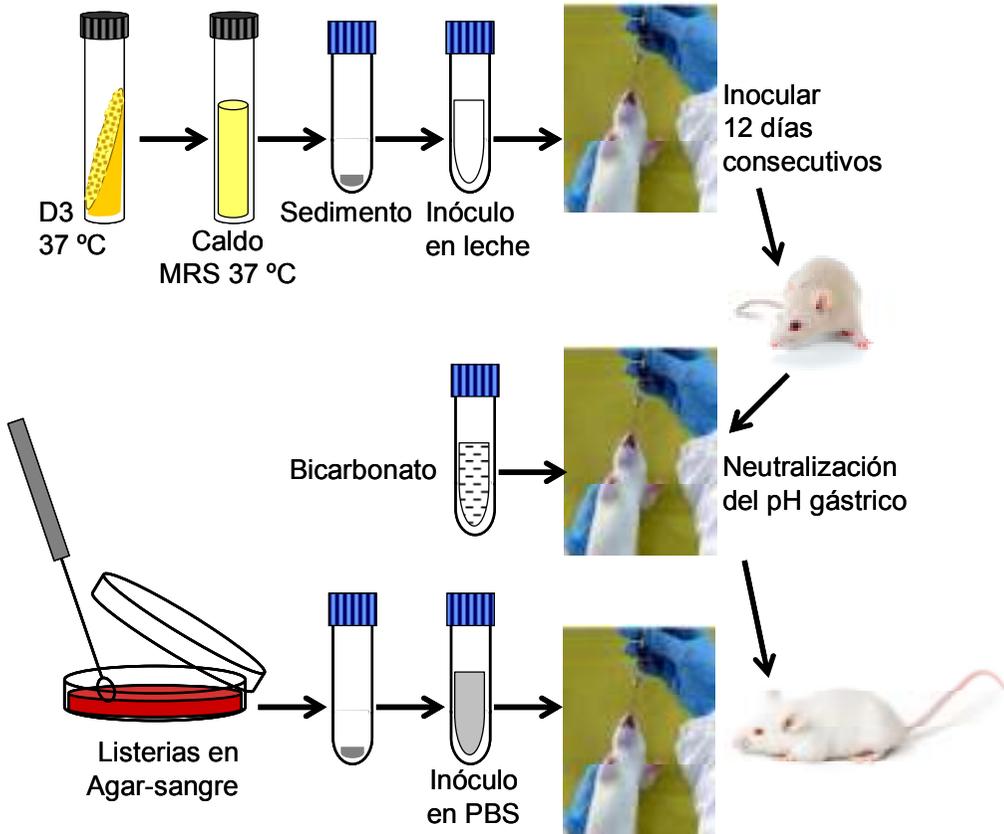
#### **7.3.1. Pretratamiento y desafío.**

El tratamiento previo con D3 se realizó como se ha descrito en la sección 7.2.1. La infección se llevó a cabo con una cepa de *L. monocytogenes* cedida por el Dr. Sampedro del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada), aislada de una herida, y cuya virulencia en modelos de infección experimental en ratón ha sido previamente establecida en nuestro laboratorio (Ruiz-Bravo *et al.*, 2001). Las bacterias se cultivaron en agar sangre a 37°C durante 24 h, se recogieron en PBS estéril, se lavaron dos veces por centrifugación y se prepararon inóculos en PBS, que se ajustaron por densidad óptica para que cada ratón recibiese, por vía intragástrica,  $10^8$  bacterias viables en un volumen de 100  $\mu$ l. Diez minutos antes de la inoculación, cada ratón recibió, por la misma vía, 100 ml de una solución de bicarbonato sódico al 10 %, con el objeto de neutralizar el pH gástrico y favorecer la supervivencia del patógeno, ya que en condiciones normales se estima que más de un 90 % de las listerias ingeridas son inactivadas por el pH gástrico (Sleator *et al.*, 2009).

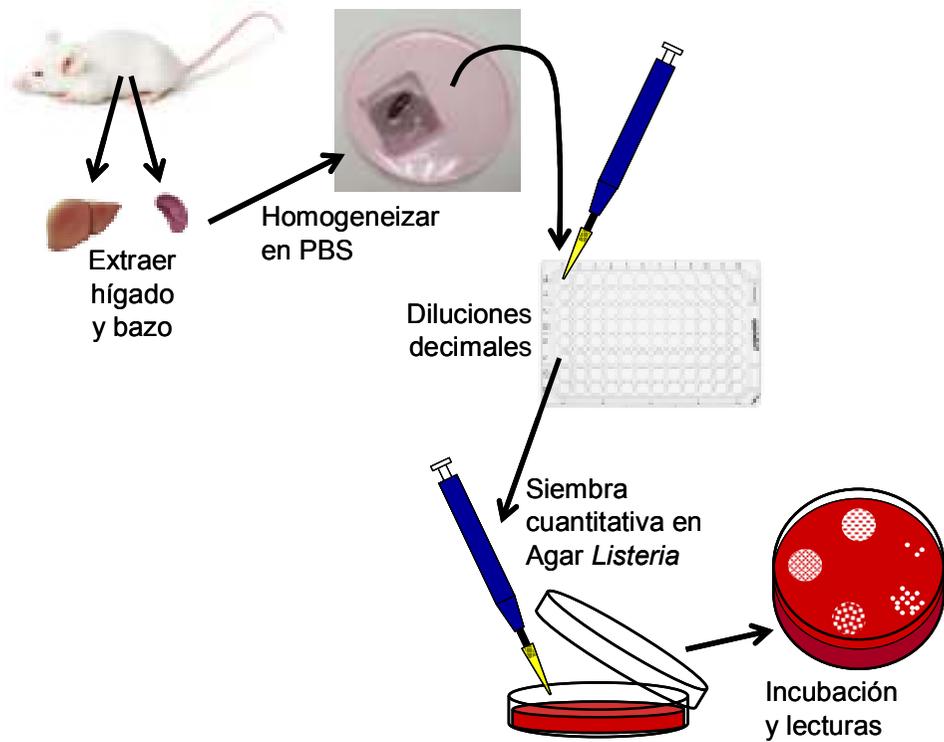
### **7.3.2. Monitorización de la infección.**

Una vez establecida la infección, en los ratones BALB/c, muy sensibles a esta bacteria, las listerias atraviesan la mucosa y se diseminan por vía hemática, por lo que pueden ser cuantificadas en diversos tejidos (Bou Ghanem *et al.*, 2013), especialmente en bazo e hígado, por su condición de órganos muy irrigados y ricos en macrófagos fijos que desempeñan un papel crucial en la depuración de partículas extrañas de la sangre.

Al tercer y sexto día tras la infección, se sacrificaron la mitad de los animales de cada lote, se extrajeron bazos e hígados, que se homogenizaron en PBS y se practicaron diluciones seriadas para realizar cultivos cuantitativos cultivados en medio selectivo para *Listeria* (PALCAM Agar de Oxoid, Hampshire, UK). Los resultados obtenidos se expresaron como nº de bacterias viables por órgano. Un esquema del procedimiento completo se presenta en la Figura 7.2.



**Figura 7.2. Ensayo de protección frente a la infección experimental con *L. monocytogenes*.**

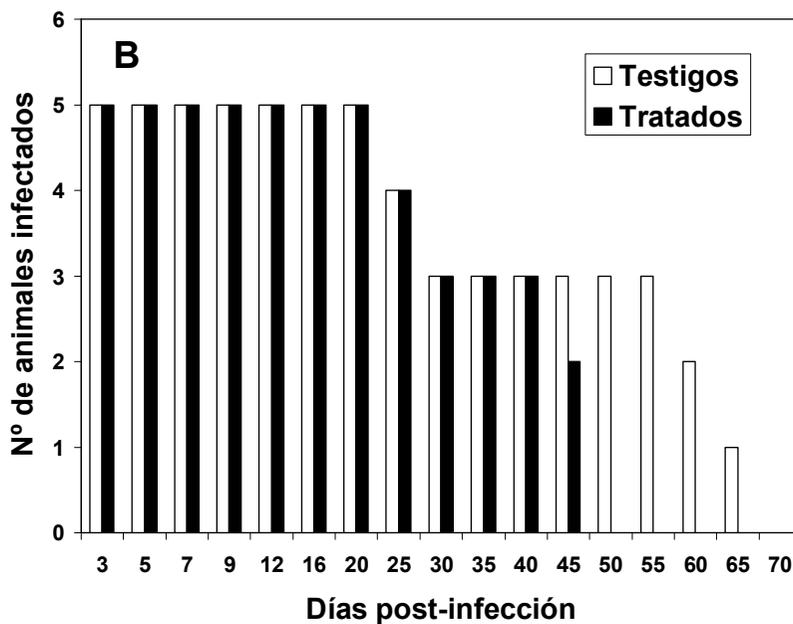
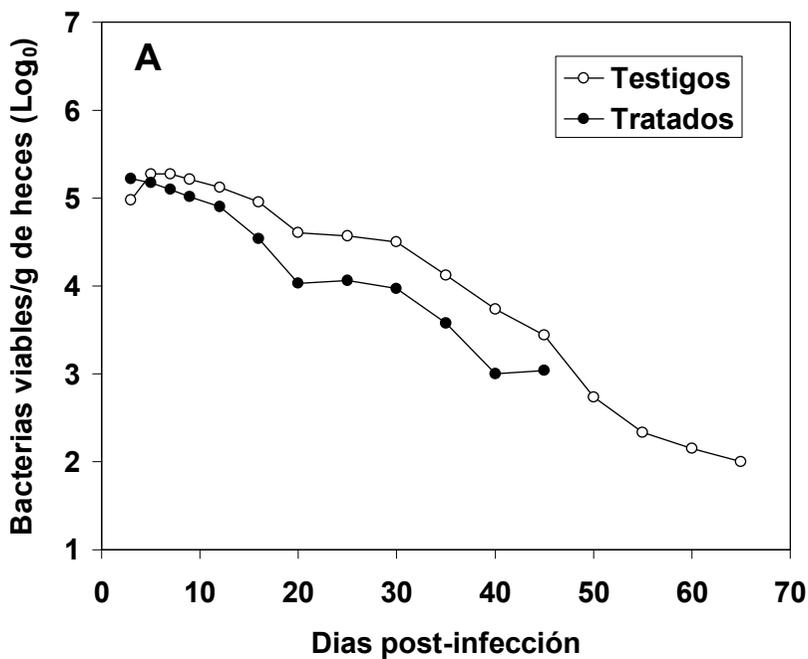


**Figura 7.2 (Continuación)**

## **7.4. Resultados y discusión**

### **7.4.1. Infección con *Y. enterocolitica* O9.**

Los resultados, mostrados en la Figura 7.3, evidenciaron que todos los animales de ambos lotes, testigos y tratados, se infectaron, con un registro del 100 % de excreción de yersinias en heces desde que se iniciaron los coprocultivos tres días después del desafío. Durante el primer mes postinfección no se observaron diferencias apreciables en los coprocultivos de ambos lotes. Sin embargo, ya a los 35 días los recuentos de yersinias de los animales tratados con D3 fueron inferiores a los de los testigos, y a partir del día 50, todos los animales tratados tuvieron coprocultivos negativos, mientras que la negativización total del grupo testigo se alcanzó en el día 70. Aunque el test no paramétrico de Mann-Whitney no alcanzó significación estadística, debido a que en ambos grupos las negativizaciones empezaron de forma simultánea, resulta evidente que en el grupo no tratado el 60 % de los animales persistía infectado en el día 50, cuando ningún animal tratado excretaba yersinias en niveles detectables en heces.



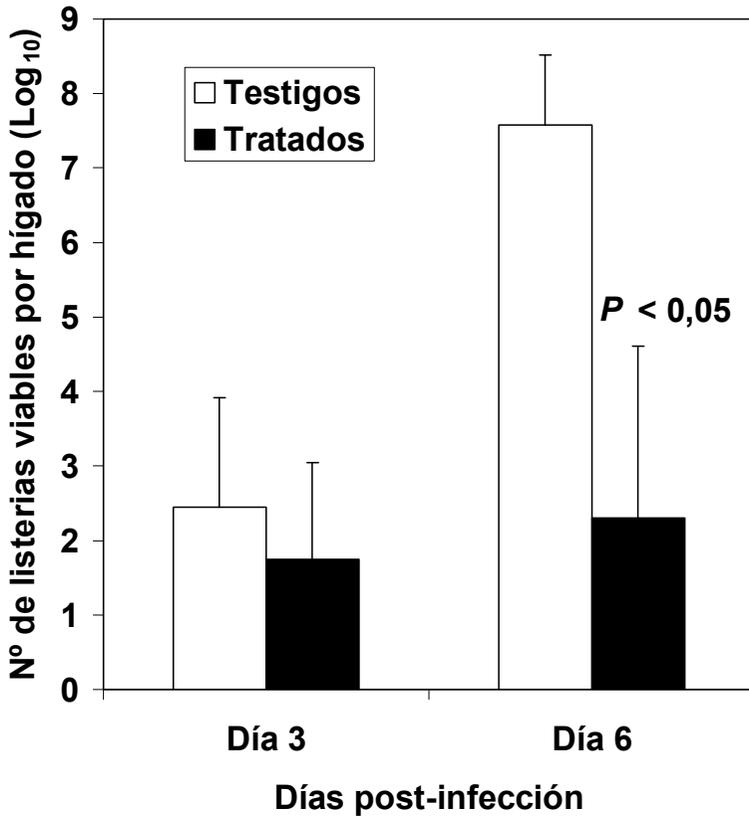
**(En la página anterior) Figura 7.3. Efecto de D3 sobre la infección experimental con *Y. enterocolitica* O9. (A), niveles de excreción fecal de yersinias en los animales con coprocultivo positivo. (B), número de animales con coprocultivo positivo (n = 5 para cada grupo).**

*Y. enterocolitica* O9 es un patógeno muy bien adaptado al ambiente intestinal, como se evidencia por su capacidad para colonizar el intestino, tanto en seres humanos como en el modelo experimental murino, durante largos periodos de tiempo sin manifestar una sintomatología significativa. El hecho de que el tratamiento con D3 consiguiese acortar el periodo de infección, monitorizado por la excreción fecal de yersinias, es una manifestación notable del efecto potenciador de la resistencia frente a la infección intestinal, que no se ha conseguido con otras cepas probióticas con capacidad para estimular la inmunidad mucosal (De Montijo *et al.*, 2015). El mismo hecho de que el efecto protector se manifieste a largo plazo, sugiere que se debe a un mecanismo de inmunomodulación, ya que las posibles interacciones físicas entre ambas bacterias (antibiosis, competencia por receptores en la mucosa, competencia por nutrientes) hubieran debido manifestarse desde el inicio de la infección. Dado el efecto potenciador de D3 sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos B (sección 6.7), responsables de las respuestas de anticuerpos, y el hecho de que la respuesta de anticuerpos de clase IgA, presentes en las secreciones

mucosales, es importante en la eliminación de las yersinias de la mucosa intestinal (Sugiura *et al.*, 2013), es razonable proponer que sea este un mecanismo responsable del acortamiento de la infección en los animales tratados con D3. Esta hipótesis debiera contrastarse mediante experimentos en los que se mida la inmunidad mucosal específica frente a *Y. enterocolitica* en animales testigos y tratados con D3.

#### **7.4.2. Infección con *L. monocytogenes*.**

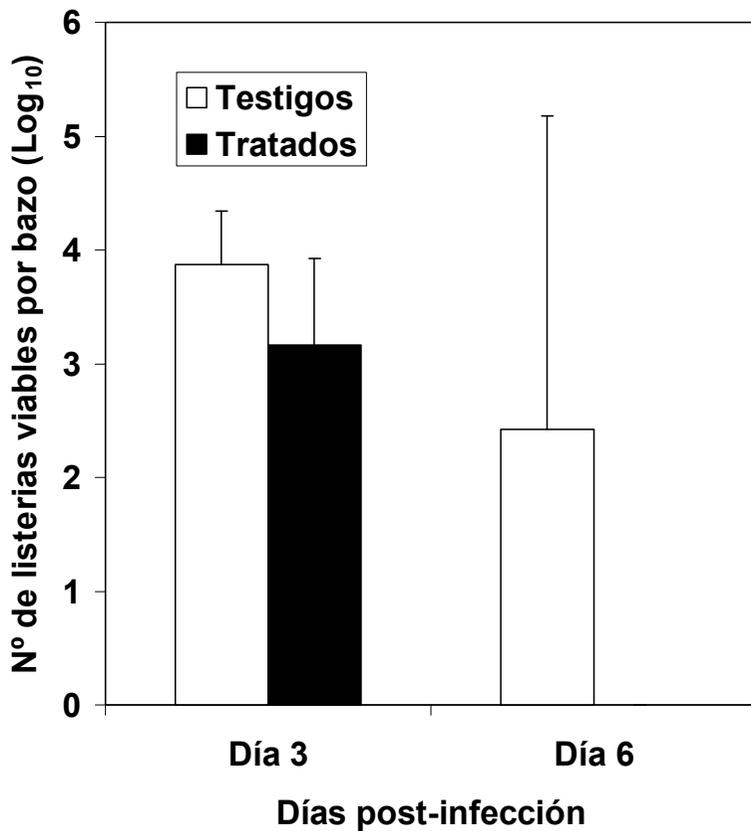
Los resultados mostrados en la Figura 7.4 revelan que los niveles de listerias en los hígados de los animales testigos se incrementaron significativamente (más de 5 unidades logarítmicas) entre los días 3 y 6 después de la infección, como cabría esperar de una bacteria de alta patogenicidad capaz de proliferar en el hígado. Sin embargo, el pretratamiento con D3 frenó espectacularmente esta proliferación; las diferencias entre los recuentos de listerias entre animales testigos y tratados, en el día 6, fueron significativas.



**Figura 7.4. Efecto del tratamiento con D3 sobre los recuentos de listerias en hígado. La significación ( $P < 0,05$ ) se obtuvo mediante el test de Student.**

La Figura 7.5 presenta los resultados de los recuentos de listerias en bazo. En este caso, la tendencia fue de reducción a lo largo del tiempo, aunque sin alcanzar la significación estadística en los animales testigos pese a que en la mitad de ellos los recuentos fueron indetectables a los 6 días (lo que

explica el alto valor de la desviación estándar). El pretratamiento con D3 consiguió que en la totalidad de los animales los recuentos a los 6 días fueran indetectables.



**Figura 7.5. Efecto del tratamiento con D3 sobre los recuentos de listerias en bazo.**

La rapidez del proceso de depuración sugiere que se debe a mecanismos de la inmunidad innata, ya que la respuesta de células Th1 y células T citotóxicas específicas, que es importante en la inmunidad adquirida frente a esta bacteria (Williams *et al.*, 2012), tardaría más tiempo en aparecer. Los macrófagos fijos de bazo e hígado son capaces de depurar eficazmente a las listerias (Portnoy *et al.*, 2002), y la producción de IFN- $\gamma$ , potenciada por D3, puede coadyuvar muy eficazmente a este proceso, mediante la activación de macrófagos. En este caso, la producción de IFN- $\gamma$  podría atribuirse a células de la inmunidad innata, como las células NK, más que a linfocitos T. Estos posibles mecanismos debieran ser confirmados en ensayos ulteriores.

## **8. BIOSEGURIDAD.**

### **8.1. Criterios de bioseguridad.**

El concepto de probiótico establece de forma explícita que tales microorganismos se administran vivos, y ello plantea de inmediato la necesidad de garantizar la ausencia de riesgos para el consumidor. El precedente de consumo, desde tiempos casi inmemoriales, de microorganismos vivos en productos fermentados, especialmente derivados lácteos como yogures, kéfir, koumis, filmjöl, crema agria, etc., les ha adjudicado la consideración de microorganismos seguros, sin embargo, la introducción de nuevas cepas como agentes probióticos destinados al consumo humano exige verificar que la consideración de seguridad puede extenderse a ellas. Los criterios de bioseguridad se refieren en principio a la ausencia de patogenicidad en las bacterias y de toxicidad en sus productos metabólicos, pero la preocupación por el creciente problema de la adquisición de resistencias frente a los agentes antimicrobianos de uso clínico llevó pronto a incluir también entre los requisitos de bioseguridad la ausencia de genes de resistencia transmisibles (Donohue y Salminen, 1995). El informe conjunto de expertos FAO/WHO de 2001 partía de la aceptación inicial de que larga historia de consumo de lactobacilos, bifidobacterias y lactococos sin riesgo establecido para los seres humanos, unida a la

ausencia de patogenicidad, era la mejor prueba de su seguridad, pero reconocía también la existencia de algunos raros casos de bacteriemia asociados a lactobacilos y, especialmente, insistía en la importancia de comprobar que las cepas usadas como probióticos careciesen de genes transmisibles responsables de resistencias a antimicrobianos (Joint FAO/WHO Expert, 2001). Un año después, los expertos FAO/WHO insistieron en que estos grupos de bacterias son tradicionalmente seguros, recogiendo el concepto de microorganismos "Generally Recognized as Safe" (GRAS), pero recomendaron una serie de pruebas a realizar con las cepas utilizadas como probióticos: (1) determinación de los patrones de resistencia a antimicrobianos; (2) evaluación de ciertas actividades metabólicas (por ejemplo, la producción de D-lactato y la desconjugación de sales biliares); (3) evaluación de los efectos secundarios en estudios en humanos; (4) vigilancia epidemiológica post-mercado de incidentes adversos en los consumidores; (5) en cepas pertenecientes a una especie toxicogénica, ensayos de producción de toxina; (6) si la cepa pertenece a una especie con potencial hemolítico conocido, determinación de la actividad hemolítica; adicionalmente, recomendaban evaluar la ausencia de infectividad en animales inmunocomprometidos (Joint FAO/WHO Working Group, 2002).

Buscando introducir en el ámbito europeo un sistema similar a la definición de "Generally Recognised As Safe" (GRAS)

utilizada en USA, la European Food Safety Authority (EFSA) introdujo el concepto de "Qualified Presumption of Safety (QPS)" para referirse a taxones (géneros o grupos de especies) de microorganismos para los que es asumible que son seguros en base a una evidencia razonable, y que por lo mismo estarían exentos de la necesidad de una evaluación específica de la seguridad; lo cual conlleva que, para los microorganismos que no se incluyan en el *status* QPS, sería necesaria una evaluación completa de la seguridad antes de aceptarlos como componentes de alimentos destinados al consumo humano (Barlow *et al.*, 2007). El *status* QPS se adjudica a microorganismos que "tienen un largo historial de uso aparentemente seguro", en contraposición a otros que "son menos conocidos y pueden representar un riesgo para los consumidores" (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013). En el primer listado elaborado en 2007 figuraban 33 especies de *Lactobacillus*, entre ellas *L. fermentum*, cuya inclusión ha sido ratificada en los posteriores listados (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013). El *status* QPS ha sido introducido en la legislación de la Unión Europea con la publicación de la "Commission Implementing Regulation (EU) No 562/2012". El EFSA Panel on Biological Hazards (2013) reconoce que se han producido varios informes de infecciones por lactobacilos en hospedadores inmunocomprometidos, en especial atribuidos a *L. rhamnosus*, que se considera la especie de mayor prevalencia en infecciones humanas asociadas a lactobacilos. En la mencionada publicación se recogen varios reportes de infecciones en inmunocomprometidos atribuidas a

lactobacilos, ninguna de las cuales implica a *L. fermentum*. El Panel de EFSA concluye que no hay necesidad de cambiar la recomendación QPS de las especies de *Lactobacillus* recomendadas anteriormente, pero insiste en que deben vigilarse estrechamente las infecciones clínicas asociadas a especies de lactobacilos, especialmente *L. rhamnosus* (EFSA Panel on Biological Hazards, 2013).

Para acogerse al *status* QPS, es crucial la correcta identificación de las cepas. PROSAFE, una organización profesional sin fines de lucro cuyo objetivo principal es mejorar la seguridad de los usuarios de productos y servicios en Europa, ha prestado atención a esta exigencia, recomendando que los métodos bioquímicos convencionales se complementen con métodos moleculares realizados en un centro cualificado (Vankerckhoven *et al.*, 2008). El Proyecto PROSAFE se ha centrado en definir los criterios, las normas y directrices que se requieren establecer la bioseguridad de estas cepas. PROSAFE ha dedicado especial atención al riesgo de transmisión de resistencias a antimicrobianos desde cepas probióticas a microorganismos potencialmente patógenos. En consecuencia, se han propuesto nuevos medios y procedimientos para investigar la sensibilidad de bacterias lácticas y se han realizado algunas recomendaciones al respecto: por ejemplo, evitar aquellas cepas cuyo espectro de sensibilidad a antimicrobianos difiera del característico de su taxón, cabe interpretar que por la sospecha razonable de que las resistencias inusuales se hayan adquirido por

transferencia lateral de genes y por tanto conserven su capacidad de movilidad. Paralelamente, se recomendó evitar el uso de cepas que alberguen genes de virulencia conocidos y confirmados. Para la evaluación *in vivo* de la seguridad mediante la investigación de patogenicidad de la cepa en modelos animales, se ha propuesto el modelo de endocarditis como el modelo más fiable probado en el proyecto PROSAFE. Además, se llegó a un consenso para la aprobación de la necesidad de un estudio de la colonización humana en un diseño aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo; sin embargo, se necesitan más discusiones sobre los detalles del estudio (Vankerckhoven *et al.*, 2008).

Diversos autores se han ocupado de discutir criterios de bioseguridad para probióticos, y, en general, hay coincidencia en todos ellos, aunque algunos parecen excesivos: así, Saarela *et al.* (2000) se refieren al origen de las cepas, que según ellos debe ser el tracto gastrointestinal humano sano, lo que excluiría cepas de otros orígenes (por ejemplo, leche de ganado, vegetales, etc.) que pueden reunir propiedades perfectamente asumibles para probióticos destinados al consumo humano. Para asegurar la exclusión de cepas portadoras de genes indeseables, ya sea por codificar factores de virulencia o resistencias trasmisibles, se ha propuesto la obtención de secuencias completas del genoma de las bacterias candidatas (Wassenaar y Klein, 2008; Wei *et al.*, 2012); en la mayoría de los casos, este recurso parece desproporcionado, ya que los estudios basados en técnicas

convencionales pueden contrastar la bioseguridad de forma razonablemente fiable.

En esta Tesis se ha abordado el estudio de la bioseguridad de las nuevas cepas aisladas como candidatas a probióticos, en tres tipos de ensayos: (1) la ausencia de enzimas indeseables, relacionados con la producción de carcinógenos; (2) la ausencia de resistencias transmisibles frente a agentes antimicrobianos de relevancia en clínica humana; y (3) la ausencia de patogenicidad en modelos experimentales de animales inmunocomprometidos.

## **8.2. Detección de enzimas indeseables.**

Se ha demostrado que algunos microorganismos definidos como probióticos producen actividades enzimáticas que pueden ser perjudiciales para el organismo. Ciertos autores (Parodi, 1999) apuntan a algunas enzimas como la  $\alpha$ -quimiotripsina, la  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa implicadas en la aparición de determinados cánceres de colon.

La capacidad de producción de enzimas indeseables se ha determinado utilizando el kit comercial API<sup>®</sup> ZYM de la casa comercial BioMérieux, Francia. El kit API<sup>®</sup> ZYM es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas aplicable a diferentes tipos de muestra, que

permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas (Tabla 8.1) a partir de pequeñas cantidades de muestra. La galería consta de 20 microtubos cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene un substrato enzimático con su tampón. Este soporte está destinado a favorecer el contacto entre el enzima y el substrato generalmente insoluble. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas en los distintos microtubos.

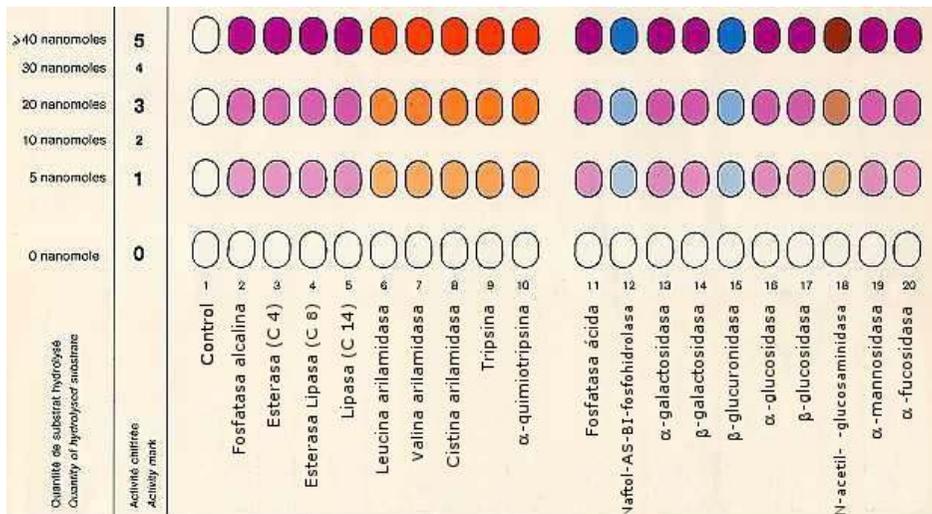
**Tabla 8.1. Actividades enzimáticas ensayadas en el Kit API® ZYM.**

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	
1. Control	11. Fosfatasa ácida
2. Fosfatasa alcalina	12. Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa
3. Esterasa (C4)	13. $\alpha$ -galactosidasa
4. Esterasa Lipasa (C8)	14. $\beta$ -galactosidasa
5. Lipasa (14)	15. $\beta$ -glucoronidasa
6. Leucina arilamidasa	16. $\alpha$ -glucosidasa
7. Valina arilamidasa	17. $\beta$ -glucosidasa
8. Cisteinaarilamidasa	18. N-acetil-glucosaminidasa
9. Tripsina	19. $\alpha$ -mannosidasa
10. $\alpha$ -quimiotripsina	20. $\alpha$ -fucosidasa

Cada uno de los microtubos del sistema se inocula con una suspensión bacteriana con una concentración de  $10^8$  UFC/mL, procedente de un cultivo puro de la bacteria estudiada. Posteriormente se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4h aproximadamente.

Tras finalizar el período de incubación y el posterior revelado con el uso de reactivos específicos (ZYM A y ZYM B), se desarrolla en cada microtubo una coloración característica que pone de manifiesto los resultados.

La lectura de los resultados se realiza mediante comparación colorimétrica con una tabla de lectura (Figura 8.1).



**Figura 8.1. Tabla de lectura de resultados del sistema API<sup>®</sup> ZYM.**

### **8.3. Prueba de sensibilidad a antimicrobianos.**

Existen estudios de bioseguridad que pueden permitir un mejor entendimiento del proceso de transferencia horizontal de resistencia a antibióticos de microorganismos iniciadores de productos lácteos a otros microorganismos. Así, la forma de transmitir los genes de resistencia a antibióticos es mediante plásmidos conjugativos y transposones. Se han descrito (Shalini *et al.*, 2005) como mínimo 25 especies de *Lactobacillus* que contienen plásmidos nativos y a menudo en múltiples copias (entre 1 y 6) en una cepa única. Así, se han encontrado plásmidos de resistencia (R-plásmidos) a tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol y macrólidos en *Lactobacillus fermentum* aislados de carne y heces. La posible transferencia de plásmidos o transposones desde microorganismos del ácido láctico a microorganismos patógenos ha sido descrita en varias ocasiones (Shalini *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2007). En este contexto, se ha demostrado que un plásmido aislado en *L. fermentum* con resistencia a eritromicina (erm gen) presenta un 98,2% de similitud con un transposón de una cepa de *Enterococcus*. Además se ha detectado que el gen que codifica la resistencia a tetraciclina en diversas cepas de *Lactobacillus*, se encuentra en un plásmido-R también detectado en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis*. Todos estos resultados, pueden sugerir la posible capacidad de transferencia de plásmidos de bacteria BAL a otras bacterias, incluidas algunas patógenas.

Se procedido al estudio del perfil de sensibilidad de la cepa D3 a diversos antimicrobianos. Como microorganismos controles, hemos incluido a cepa de *L. fermentum* 4007 obtenida de la Colección Española de cultivos tipo (CECT) y una cepa de *Bacillus subtilis*. Esta última se ha utilizado como control positivo de la prueba de sensibilidad por ser una bacteria muy sensible a la mayoría de los antibióticos.

Estos ensayos se realizaron mediante tres técnicas:

1. Antibiograma.
2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

### **8.3.1. Antibiograma.**

Para la realización de esta técnica se utilizó el método conocido como de Kirby-Bauer, basada en la difusión en agar a partir de discos comerciales estándar con concentraciones prefijadas de los antimicrobianos a ensayar (Crespo, 2005).

Se sembraron las cepas D3 y CECT4007 en caldo MRS sin agitación a 30°C durante 24 horas y la cepa de *Bacillus subtilis* en caldo TSB (Oxoid, U.K). Pasado el tiempo de incubación, se sembraron en superficie una alícuota del cultivo de cada una de las cepas a ensayar sobre placas de

Petri conteniendo agar Mueller Hinton (Hi Media, Scharlau, España). Los antibióticos se presentan en discos comerciales (Biorad, España) de 0,6 mm de diámetro, colocándose con ayuda de pinzas estériles sobre la superficie de las placas inoculadas. Seguidamente, las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 48 horas, midiéndose también a las 24 horas, el diámetro de la zona de inhibición.

Los resultados mostraron que este método no fue efectivo para estudiar la sensibilidad de las cepas de *L. fermentum* D3 y *CECT 400*, debido a que no se produjo un correcto crecimiento de los microorganismos en el medio Mueller Hinton, posiblemente debido a los requerimientos especiales de estas bacterias lácticas.

El método de Kirby-Bauer está estandarizado para clínica (microorganismos patógenos) y al no dar buenos resultados, fue necesario desarrollar un método alternativo. Así, se modificó el método de KIRBY-BAUER, utilizando placas de Petri con medio MRS agar para las cepas de lactobacilos y agar TSA para la cepa de *B. subtilis*. El procedimiento seguido fue el mismo que el descrito anteriormente, con la única salvedad de los medios de cultivo utilizados.

### **8.3.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).**

Se realizaron las determinaciones de la mínima concentración inhibitoria (CMI) y la mínima concentración bactericida (CMB) para eritromicina, tetraciclina y vancomicina, elegidos por haberse descrito resistencias trasmisibles para ellos.

La CMI de un agente antimicrobiano es la mínima concentración que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada tras un período de incubación, mientras que la CMB se define como la mínima concentración de agente antimicrobiano que mata a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación.

Para la realización de la determinación de la CMI y la CMB se ha seguido la técnica de microdilución en caldo nutritivo (Crespo, 2005), que se describe a continuación:

Se partió de un cultivo puro de 18-24 h de la cepa D3 y de *L. fermentum* CECT 4007, tiempo necesario para que se haya alcanzado la fase exponencial de crecimiento.

La experiencia se realizó en placas microtiter donde se disponen los antibióticos (eritromicina, tetraciclina y vancomicina) a distintas concentraciones y medios de cultivo adecuado (MRS caldo), de forma que se consigue preparar una batería de diluciones decreciente de antibióticos.

Posteriormente, se añadió un inóculo de volumen conocido de cultivo puro en cada uno de los pocillos correspondientes, de acuerdo a las indicaciones descritas por Crespo (2005).

Una vez preparada las placas microtiter se sellaron con papel de parafina (Parafilm®M) y se incubaron durante 24 h a 30°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de absorbancia con la ayuda de un lector multipocillo (ELISA) a una longitud de onda de 620 nm.

#### **8. 4. Ensayo de inocuidad en un modelo experimental de inmunosupresión con ciclofosfamida.**

Para comprobar la ausencia de patogenicidad de la cepa D3, se utilizaron 20 ratones BALB/c hembras de alrededor de 20 g de peso (ver la sección 6.2), de los cuales la mitad se mantuvieron inmunológicamente intactos, y la otra mitad se sometió a un régimen de inmunosupresión con ciclofosfamida descrito por Sanati *et al.* (1997), establecido en nuestro laboratorio (Jiménez-Valera *et al.*, 2003) y aplicado al estudio de la actividad inmunorrestauradora de una bacteria probiótica (Bujalance *et al.*, 2007). Cada animal recibió por vía intraperitoneal dos dosis de ciclofosfamida (Genoxal) de 150 y 100 mg/Kg, con un intervalo de tres días entre ambas. Este tratamiento asegura una leucopenia durante al menos cinco días tras la última inyección, junto con una reducción

del bazo, que a partir de unos siete días evoluciona hacia una acusada esplenomegalia.

Los animales se inocularon por inyección en el plexo venoso retroorbital con un volumen de 100 µl por ratón, de una suspensión en PBS estéril conteniendo aproximadamente  $10^8$  lactobacilos viables por ml. Los animales se sacrificaron, a tiempos determinados (día 1, 2 y 3) por dislocamiento cervical. Se procedió a la extracción del bazo en condiciones de esterilidad y a su homogenización en PBS estéril. De esta suspensión se realizaron diluciones decimales y se sembraron en MRS. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24°C. Tras la incubación se realizó el recuento de colonias, expresado como bacterias viables por órgano.

## **8.5. Resultados y discusión.**

### **8.5.1. Detección de enzimas indeseables.**

Los resultados obtenidos con *L. fermentum* D3, en relación a su capacidad de producción de enzimas indeseables, se muestran en la Figura 8.2



**Figura.8.2. Fotografía de los resultados de la galería API®  
ZYM de la cepa *L. fermentum* D3.**

Como se puede observar la cepa D3 presenta resultados negativos ante la presencia de enzimas indeseables:  $\alpha$ -quimiotripsina (microtubo nº 10),  $\beta$ -glucoronidasa (microtubo nº 15),  $\beta$ -glucosidasa (microtubo nº 17), y N-acetil-  $\beta$ -glucosaminidasa (microtubo nº 18). Por ello se puede concluir que el *L. fermentum* D3 es un microorganismo bioseguro con respecto a la producción de actividad enzimática perjudicial.

La cepa B16 también mostró resultados negativos en los ensayos de presencia de las enzimas indeseables  $\alpha$ -quimiotripsina (microtubo nº 10),  $\beta$ -glucoronidasa (microtubo nº 15),  $\beta$ -glucosidasa (microtubo nº 17), y N-acetil-  $\beta$ -glucosaminidasa (microtubo nº 18). Por lo que se puede concluir que el *L. fermentum* B16 es un microorganismo bioseguro con respecto a la presencia de actividad enzimática perjudicial.

### **8.5.2. Sensibilidad a antimicrobianos.**

La Tabla 8.2 presenta los resultados numéricos de un antibiograma representativo de los realizados a la cepa D3, junto con las cepas control. La cepa D3 fue resistente a algunas cefalosporinas, a todas las fluoroquinolonas ensayadas y a algunos aminoglicósidos. Como no existen valores estandarizados para la interpretación de la susceptibilidad de lactobacilos, se interpretaron de acuerdo a los estándares de diámetros de inhibición de *Enterococcus* spp., dada su relación filogenética con los lactobacilos y se clasificaron como sensible, resistente o intermedio de acuerdo a las tablas publicadas por el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards) según la edición de Enero de 2013. Con esta información, se clasificó el efecto del antibiótico en Resistente (R), Intermedio (I) y Sensible (S).

De todos los antibióticos ensayados la eritromicina y la tetraciclina son los que más interés tienen en este estudio ya que son los que se han demostrado por otros autores que se presentan en plásmidos que pueden ser transferidos a *Enterococcus*. Nuestros resultados demuestran que la cepa D3 fue sensible a estos antibióticos, con lo que se puede sugerir que es un excelente candidato para ser utilizado como microorganismo probiótico en productos destinados al consumo humano.

**Tabla 8.2. Resultado del ensayo del antibiograma para la cepas D3 y cepas control *L. fermentum* CECT4007 y *B. subtilis*.**

Agente	Concen- tración (µg)	<i>L. fermentum</i> D3		<i>L. fermentum</i> 4007		<i>B. subtilis</i>	
		Diámetro halo (mm)	Interpre- tación	Diámetro halo (mm)	Interpre- tación	Diámetro halo (mm)	Interpre- tación
<b>CEFALOSPORINAS</b>							
CEFEPINA (FEP)	30	0	Resistente	0	Resistente	25	
CEFIXIMA (CFM)	5	0	Resistente	0	Resistente	0	Resistente
CEFOPERAZONA (CFP)	75	26	Sensible	33	Sensible	35	Sensible
CEFPIROMA (CPO)	30	19		25		37	
CEFTAZIDIMA (CAZ)	30	14	Resistente	17	Resistente	15	Resistente
<b>FLUORQUINOLONAS</b>							
AC. NALIDÍXICO (NA)	30	0	Resistente	0	Resistente	21	Sensible
AC. PIPEMIDICO (PI)	20	0	Resistente	0	Resistente	20	Sensible
CIPROFLOXACINA (CIP)	5	0	Resistente	0	Resistente	28	Sensible
NORFLOXACINA (NOR)	10	0	Resistente	0	Resistente	26	Sensible
ESPARFLOXACINA (SPX)	5	19		16		25	
<b>MACRÓLIDOS</b>							
AZITROMICINA (AZM)	15	22	Sensible	25	Sensible	20	Sensible

ERITROMICINA (E)	15	27	Sensible	27	Sensible	25	Sensible
ESPIRAMICINA (SP)	100	24		29		20	
CLARITROMICINA (CLR)	15	28	Sensible	31	Sensible	27	Sensible
<b>AMINOGLICÓSIDOS</b>							
ESTREPTOMICINA (STR)	300	14		13		20	
AMIKACINA (AN)	30	0	Resistente	0	Resistente	24	
GENTAMICINA (GEN)	120	17		15		31	
TOBRAMICINA (TM)	10	0	Resistente	0	Resistente	20	
<b>TETRACICLINAS</b>							
MINOCICLINA (MNO)	30	30	Sensible	32	Sensible	26	Sensible
TETRACICLINA (TE)	30	22	Sensible	27	Sensible	17	Resistente

Los resultados de CMI y CMB mediante la lectura del ELISA se muestran a continuación en la Tabla 8.3.

**Tabla 8.3. Valores de CMI y CMB de las cepas *L. fermentum* D3 y CECT 4007 para eritromicina, tetraciclina y vancomicina.**

Antibiótico	Concentración (µg/ml)	Cepa D3	Cepa CECT 4007
Eritromicina	CMI	0,78	1,56
	CMB	1,5	12,5
Tetraciclina	CMI	15,68	31,25
	CMB	125	250
Vancomicina	CMI	>1000	>1000
	CMB	>1000	>1000

Con los resultados de la CMI y CMB se corroboraron los resultados del antibiograma, en el sentido de que la cepa control *L. fermentum* CECT 4007 presenta mayor resistencia a los antibióticos eritromicina y tetraciclina que la cepa D3.

Si comparamos nuestros resultados con investigaciones realizadas por otros autores (Chin *et al.*, 2005) con diferentes cepas de *L. fermentum*, los valores de CMI y la CMB de la cepa D3 fueron sensiblemente más bajos que otras cepas, es

decir, la cepa D3 es más sensible a los antibióticos eritromicina y tetraciclina que otras cepas de la misma especie.

Los resultados de la realización de antibiogramas con la cepa B16 se recogen en la Tabla 8.4. Se mantuvo la sensibilidad a eritromicina y tetraciclina.

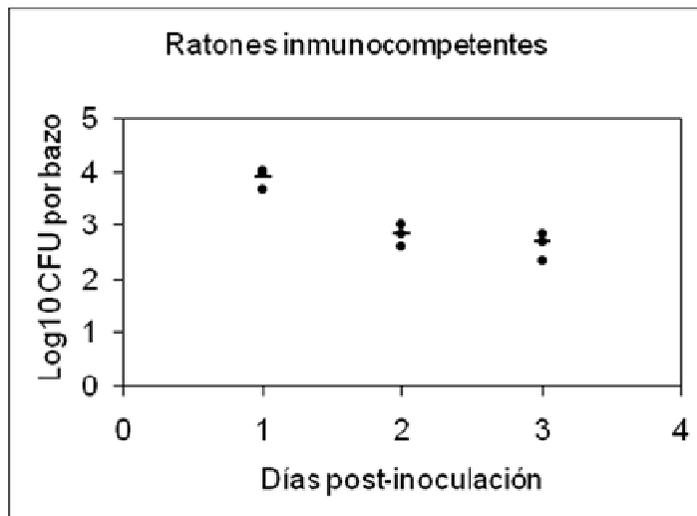
**Tabla 8.4. Resultado del antibiograma para la cepa B16.**

Antibiótico	Concentración (µg)	Cepa B16	
		Diámetro de halo (mm)	Interpretación
AMOXICILINA-ÁC.CLAVULÁNICO (AMC)	20/10	42	Sensible
AMOXICILINA (AML)	25	29	Sensible
CIPROFLOXACINO (CIP)	5	10	Resistente
CEFUROXIMA (CXM)	30	30	Sensible
AZITROMICINA (AZM)	15	22	Sensible
CLARITROMICINA (CLR)	15	29	Sensible
LEVOFLOXACINO ( LEV)	5	12	Resistente
MOXIFLOXACINO (MXF)	5	17	Resistente
NORFLOXACINO (NOR)	10	0	Resistente
CEFEPIME (FEP)	30	38	Sensible
AMPICILINA (AMP)	10	29	Sensible
CEFAZOLINA (KZ)	30	29	Sensible
ERITROMICINA (E)	15	27	Sensible
FOSFOMICINA (FOF)	200	0	Resistente
GENTAMICINA (CN)	10	7	Resistente
METRONIDAZOL (MTZ)	50	0	Resistente
TOBRAMICINA (TOB)	15/10	0	Resistente
VANCOMICINA (VA)	30	0	Resistente

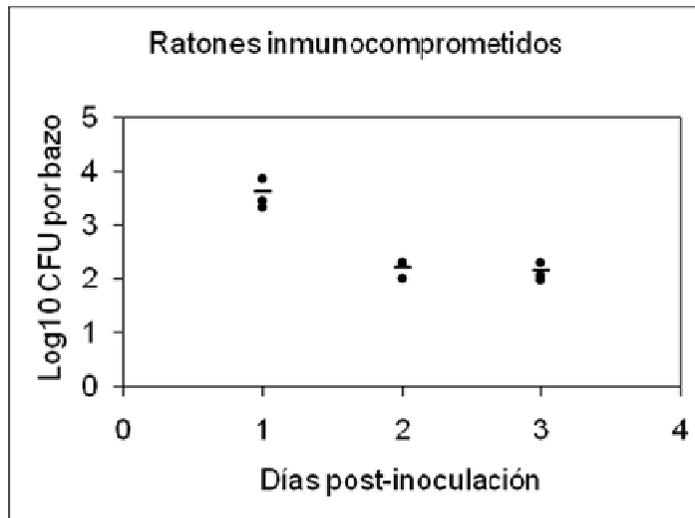
CEFTAZIDIMA (CAZ)	30	28	Sensible
ÁCIDO PIPEMIDICO (PIP)	20	0	Resistente
CEFIXIMA (CFM)	5	20	Sensible
ESTREPTOMICINA (S)	10	16	Intermedio
AMIKACINA (AK)	30	10	Resistente
MINOCICLINA (MH)	30	32	Sensible
TETRACICLINA (TE)	30	20	Sensible

### 8.5.3. Ensayo de patogenicidad en ratón.

Los resultados de los recuentos de lactobacilos en el bazo de los animales inoculados por vía intravenosa se recogen en la Figuras 8.3. y Figura 8.4.



**Figura 8.3. Infectividad de la bacteria en ratones BALB/c inmunocompetentes.**



**Figura 8.4. Infectividad de la bacteria en ratones BALB/c inmunocomprometidos.**

A la vista de los resultados podemos afirmar que la depuración de lactobacilos en el bazo no se vió afectada por la inmunosupresión con ciclofosfamida, una de cuyas consecuencias es la neutropenia severa: los ratones inmunocomprometidos no tuvieron dificultades en eliminar la bacteria de forma similar a los inmunocompetentes, siendo en ambos casos indetectables en bazo a los 4 días post-infección. Hay que considerar que se trata de un modelo exigente, ya que se introdujo directamente en sangre un

número considerable de bacterias. Se concluye que la cepa D3 podría administrarse sin riesgo a individuos con defensas deterioradas por la edad o por tratamientos inmunosupresores.

## 9. CONCLUSIONES.

**Primera:** La aplicación de criterios de selección ha permitido caracterizar, a partir de 57 aislados de lactobacilos procedentes de diversas muestras, dos cepas de *Lactobacillus fermentum*, designadas como D3 y B16, que poseen las características básicas para considerarlas candidatas a microorganismos probióticos.

**Segunda:** Los estudios de antibiosis, comúnmente incluidos entre las pruebas de cribado de nuevas cepas probióticas, tienen un valor limitado, ya que, cuando la bacteria candidata crece en medios con alto contenido en dextrosa, la inhibición de bacterias de prueba ocurre por efecto del descenso de pH causado por la producción de ácidos, que es poco probable que opere *in vivo* y puede enmascarar otros mecanismos de antibiosis.

**Tercera:** La administración continuada de la cepa D3 a ratones por vía intragástrica incrementa la capacidad de respuesta de los linfocitos esplénicos y modula la producción de citoquinas, potenciando la producción de la citoquina antiinflamatoria interleukina 10 y del interferón gamma, mediador crucial de la inmunidad celular efectiva frente a patógenos intracelulares.

**Cuarta:** La administración continuada de la cepa D3 a ratones por vía intragástrica incrementa la resistencia a la infección experimental por el patógeno intestinal extracelular *Yersinia enterocolitica* y por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes*.

**Quinta:** Las cepas D3 y B16 mostraron buenos perfiles de bioseguridad, ya que ninguna de las dos expresó enzimas indeseables ni resistencias documentadas como transmisibles dentro del género *Lactobacillus*. Adicionalmente, D3, inoculada a ratones inmunocomprometidos, fue depurada con la misma cinética que en ratones inmunocompetentes.

## 9. CONCLUSIONS.

**First:** The application of selection criteria on 57 lactobacilli isolated in a variety of samples, allowed for the characterization of two *Lactobacillus fermentum* strains, designated D3 and B16 that possess the basic characteristics to be considered candidates to probiotic microorganisms.

**Second:** Antibiosis assays, usually included in the screening of new probiotic strains, have a limited value given that the growth of the candidate bacteria in high dextrose concentration media leads to the inhibition of test bacteria due to the pH decrease occurred as a consequence of the acid production that would unlikely happen *in vivo*, masking other antibiosis mechanisms.

**Third:** Continuous administration of strain D3 through intragastric route on mice increases the response ability in splenic lymphocytes and modulates cytokines production, enhancing the production of the anti-inflammatory interleukin 10 and gamma interferon, a crucial mediator of the cellular immune response that is effective against intracellular pathogens.

**Fourth:** The continuous administration of strain D3 through intragastric route on mice increases resistance to the

experimental infection with the extracellular enteropathogen *Yersinia enterocolitica* and with the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*.

**Fifth:** Strains D3 and B16 showed good biosafety profiles, since none of them expressed undesirable enzymes or resistances reported as transferable among genus *Lactobacillus*. Furthermore, strain D3 inoculated in immunocompromised mice was cleared with the same kinetics as in immunocompetent mice.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Adams, C. A. 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23:37-46.

Adlerberth, I., Cerquetti, M., Poilane, I., Wold, A. y Collignon, A. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12(Suppl 2):223-239.

Alfaleh K., Anabrees J., Bassler D., Al-Kharfi T. 2011. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* (3): D005496

Agyei, D., Potumarthi, R. y Danquah, M.K. 2012. Optimisation of batch culture conditions for cell-envelope-associated proteinase production from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC® 7830™. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168(5):1035-1050.

Alam, M.Z., Alam, Q., Kamal, M.A., Abuzenadah, A.M. y Haque, A. 2014. A possible link of gut microbiota alteration in type 2 diabetes and Alzheimer's disease pathogenicity: an update. *CNS. Neurol. Disord. Drug. Targets.* 13(3):383-90.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-

BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

Amara, A.A, Shibl, A. 2015. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and Saudi Pharmaceutical Journal. 23: 107–114.

Amores, R., A. Calvo, J. R. Maestre y D. Martínez-Hernández. 2004. Probiotics. *Rev. Esp. Quimioter.* 17:131-139.

Ando A., Ogawa J., Kishino S., Shimizu S. 2003. CLA production from L. plantarum ricinoleic acid by lactic acid bacteria. *J Am Oil Chem Soc.* 80:889-94.

Andreasen A.S., Larsen N., Pedersen-Skovsgaard T., Berg RM, Møller K., Svendsen K.D., Jakobsen M., Pedersen B.K. .2010. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr.* 104:1831-8.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium,

Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., Van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., Van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo-Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. y Bork, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473(7346):174-80.

Asahara, T., K. Nomoto, K. Shimizu, M. Watanuki y R. Tanaka. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection by synbiotic administration of *Bifidobacteria* and transgalactosylated oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91:985-996.

Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A. y Gordon, J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307(5717):1915-1920.

Barlow, S., Chesson, A., Collins, J.D., Dybing, E., Flynn, A., Fruijtjer-Pöllöth, C., Hardy, A., Knaap, A., Kuiper, H., Le Neindre, P., Schans, J., Schlatter, J., Silano, V., Skerfving, S. y Vannier, P. 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific

Committee (Question No EFSA-Q-2005-293). EFSA J. 587:1-16.

Baumgart, D.C. y Carding, S.R. 2007. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet. 369(9573):1627-1640.

Boroni-Moreira, A.P., Fiche-Salles-Teixeira, T., do C Gouveia-Peluzio, M. y de Cássia-Gonçalves-Alfenas, R. 2012. Gut microbiota and the development of obesity. Nutr. Hosp. 27(5):1408-14.

Borthakur A., Gill R.K., Tyagi S., Koutsouris A., Alrefai WA, Hecht G.A., Ramaswamy K., Dudeja P.K. 2008. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* stimulates chloride/hydroxyl exchange activity in human intestinal epithelial cells. J Nutr. 138:1355-9

Bou-Ghanem, E.N., Myers-Morales, T., Jones, G.S. y D'Orazio, S.E. 2013. Oral transmission of *Listeria monocytogenes* in mice via ingestion of contaminated food. J. Vis. Exp. (75): 50381.

Brady, L. J., D. D. Gallaher y F. F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130(Suppl.2):410-414.

Brandt, L.J. 2015. Fecal Microbiota Transplant: Respite, Adspice, Prospice. J. Clin. Gastroenterol. 49(1):S65-68.

Brook I. 1999. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol.* 25:155-172.

Breider T, Rousset E, Hunot S, Hartmann A, Michel P. 2003. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 991: 214-228

Brüssow H. 2013 Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environmental Microbiology.* 15(8), 2154–2161.

Bujalance-Martínez-Cañavate, M.C. 2006. Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos de animales inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España.

Bujalance, C., Moreno, E., Jimenez-Valera, M. y Ruiz-Bravo, A. 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int. J. Food Microbiol.* 113:28-34.

Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., Ruiz-López, M.D., Lasserrot, A. y Ruiz-Bravo, A. 2014. Lack of correlation between in vitro antibiosis and in vivo protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. *Res. Microbiol.* 165:14-20.

Cai, Y., Pang, H., Kitahara, M., Ohkuma, M. 2012. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt5):1140-4.

Caldini G., Trotta F., Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Cenci G. 2005. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. *Int J Food Microbiol.* 102:37-47.

Cani, P.D. y Delzenne, N.M. 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.* 15(13):1546-58.

Chen, J., Li, Y., Tian, Y., Huang, C., Li, D., Zhong, Q. y Ma, X. 2015. Interaction between microbes and host intestinal health: Modulation by dietary nutrients and Gut-Brain-Endocrine-Immune Axis. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 16(7):592-603.

Chin, S.C., Abdullah, N., Siang, T.W, y Wan, H.Y. 2005. Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. *The Journal of Microbiology* 225-256.

Clarridge III, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:840-862.

CODIS; Servicio de Información comunitario sobre la Investigación y Desarrollo. (2011). Descubren que el intestino humano puede ser de tres tipos posibles. [En línea]. Comisión europea. Recuperado el día 8 de noviembre de 2015, desde [http://cordis.europa.eu/news/rcn/33339\\_es.html](http://cordis.europa.eu/news/rcn/33339_es.html).

Colgan, S.P., Pitman, R.S., Nagaishi, T., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mayer, L.F., Shao, L., Sartor, R.B., Subjeck, J.R. y Blumberg, R.S. 2003. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 112(5):745-754.

Collado, M.C., Gueimonde, M. y Salminen, S. 2010. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action, pp. 353–370. En R.R. Watson y V.R. Preedy (Eds), *Bioactive Foods in Promoting Health. Probiotics and prebiotics*. Academic Press, London.

Commane D., Hughes R., Shortt C., Rowland I. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res.* 591:276-89

Corthier, G. y Doré, J. 2010. A new era in gut research concerning interactions between microbiota and human health. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34(1):S1-6.

Christensen H.R., Frøkiaer H., Pestka J.J. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and

maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 168:171-8; PMID:11751960.

Craft S. 2005. Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. *Neurobiol. Aging* 26: 65-69.

Crespo, M. P. 2005. La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla? Asociación Colombiana de Infectología. [En línea]. Recuperado 10 de marzo 2011, desde [http://www.infectio.org/upload/Vol 9:1;2005.pdf](http://www.infectio.org/upload/Vol%209:1;2005.pdf).

Cross, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 45–253.

Crowe, J.H., Tablin, F., Wolkers, W.F., Gousset, K., Tsvetkova, N.M. y Ricker, J. 2003. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chem. Phys. Lipids.* 122(1-2):41-52.

Cruchet, S., Furnes, R., Aldo Maruy, A., Hebel, E., Palacios J., Medina F., Ramirez N., Orsi, M., Rondon, L., Sdepanian, V., Xóchihua, L., Ybarra, M., Zablah R.A. 2015. The Use of Probiotics in Pediatric Gastroenterology: A Review of the Literature and Recommendations by Latin-American Experts *Paediatr Drugs*.

Cruz-Pacheco, K., Martínez-Zambrano, A., Brito-Arias, M.A. y Durán-Páramo, E. 2003. Mantenimiento de *Lactobacillus casei* var. *Shirota* por liofilización e inmovilización celular. [En línea].SBBM. Recuperado el día 3 de Febrero de 2015, desde [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA\\_VI/CARTEL/CVI-33.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/CARTEL/CVI-33.pdf)

Cryan, J.F. y Dinan, T.G. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13(10):701-712.

Dang Y., Reinhardt J.D., Zhou X., Zhang G. 2014. The Effect of Probiotics Supplementation on Helicobacter pylori Eradication Rates and Side Effects during Eradication Therapy: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 3;9.

Day, C.P. y James, O.F. 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 114(4):842-5.

De Boever P., Wouters R., Verschaeve L., Berckmans P., Schoeters G., Verstraete W. 2000. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity *Appl Microbiol Biotechnol.* 53:709-14.

Delzenne, N.M., Neyrinck, A.M. y Cani, P.D. 2011. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb. Cell. Fact.* 10(1):S10.

De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 23:130-135.

De Montijo-Prieto, S., Moreno, E., Bergillos-Meca, T., Lasserrot, A., Ruiz-López, M.D., Ruiz-Bravo, A. y Jiménez-Valera, M. 2015. A *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kefir protects against intestinal infection with *Yersinia enterocolitica* O9 and modulates immunity in mice. *Res. Microbiol.* 166:626-632.

De Moreno de Le Blanc, A. y G. Perdigón. 2004. Yogurt feeding inhibits promotion and progresión of experimental colorectal cancer. *Med. Sci. Monit.* 10:96-104.

De Smet I., De Boever P., Verstraete W. 1998. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr.* 79:185-94.

De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J. 2001. Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 73:421S-9S.

De Vrese, M. y Schrezenmeir, J. 2008. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111:1-66.

De Vrese M., Laue, C., Offick, B., Soeth, E., Repenning, F., Thoß, A., Schrezenmeir, J.. 2015. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A

randomized, controlled, double-blind cross-over trial. *Clinical Nutrition* 34. 394e399.

Diaz Martin J.J., Gonzalez Jimenez D. 2015. Aplicaciones en Gastroenterología. *Nutr Hosp* 31(Supl. 1):21-25

Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdollahi, M., *World J.* 2015. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis *Gastroenterol.* 21(10): 3072–3084.

Dimitrijevic, R., Ivanovic, N., Mathiesen, G., Petrusic, V., Zivkovic, I., Djordjevic, B. y Dimitrijevic, L. 2014. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* LA68 on the immune system of C57BL/6 mice upon oral administration. *J. Dairy Res.* 81(2):202-207.

Donohue, D.C. y Salminen, S. 1995. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 2:25-28.

Dotan, I. y Mayer, L. 2003. Intestinal Immunity, pp. 43-59. En G. Hecht (ed), *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell* (1ª edición). ASM Press, Washington, DC.

Douglas, L.C. y Sanders, M.E. 2008. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J. Amer. Dietet. Assoc.* 108:510-521.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B.C., O'Sullivan, G., Shanahan, F. y Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386S-392S.

Dumas, M.E., Barton, R.H., Toye, A., Cloarec, O., Blancher, C., Rothwell, A., Fearnside, J., Tatoud, R., Blanc, V., Lindon, J.C., Mitchell, S.C., Holmes, E., McCarthy, M.I., Scott, J., Gauguier, D. y Nicholson, J.K. 2006. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(33):12511-12516.

Duseja, A. y Chawla, Y.K. 2014. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clin. Liver. Dis.* 18(1):59-71.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. y Relman, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308(5728):1635-1638.

EFSA, Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC). No 1924/2006.EFSA J.8:1763.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2013. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA J. 11:3449, 106 pp.

Ejtahed H.S., Mohtadi-Nia J., Homayouni-Rad A., Niafar M., Asghari-Jafarabadi M., Mofid V., Akbarian-Moghari A. 2011 Effect of probiotic yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. J Dairy Sci. 94:3288–3294.

Fàbrega, A. y Vila, J. 2012. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 30:24-32.

Fernández, M.F., Boris, S. y Barbes, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 94:449-455.

Fitzpatrick, L.R., Small, J., Hoerr, R.A., Bostwick, E.F., Maines, L. y Koltun, W.A. 2008. *In vitro* and *in vivo* effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. Br. J. Nutr. 100(3):530-541.

Ford A.C., Quigley E.M., Lacy B.E., Lembo A.J., Saito Y.A., Schiller L.R. 2014. Efficacy of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic

Constipation: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol.*109:1547-1561.

Forsythe, P. y Bienenstock, J. 2010. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol. Invest.* 39:429-448.

Fraga, M., Scavone, P. y Zunino, P. 2005. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 88:25-34.

Franzosa, E.A., Huang, K., Meadow, J.F., Gevers, D., Lemon, K.P., Bohannan, B.J. y Huttenhower, C. 2015. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (22):E2930-2938.

Freitas, M. y Cayuela, C. 2000. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microb. Ecol. Healyh. Dis. Suppl.* 2:165-178.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.

García-López, M.D. y Uruburu-Fernández, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. [En línea]. Colección Española de Cultivos Tipo: Universitat de València. SEM. 30: 12-16. Recuperado el 17 de Septiembre de 2014, desde

[https://www.google.es/search?q=Garc%C3%ADa+MD+%26+Uruburu+F+\(2000\).+La+conservaci%C3%B3n+de+cepas+microbianas.+SEM&oq=Garc%C3%ADa+MD+%26+Uruburu+F+\(2000\).+La+conservaci%C3%B3n+de+cepas+microbianas.+SEM&aqs=chrome..69i57j69i59.810j0j9&sourceid=chrome&es\\_sm=122&ie=UTF-8](https://www.google.es/search?q=Garc%C3%ADa+MD+%26+Uruburu+F+(2000).+La+conservaci%C3%B3n+de+cepas+microbianas.+SEM&oq=Garc%C3%ADa+MD+%26+Uruburu+F+(2000).+La+conservaci%C3%B3n+de+cepas+microbianas.+SEM&aqs=chrome..69i57j69i59.810j0j9&sourceid=chrome&es_sm=122&ie=UTF-8)

Gibson, G. R., A. L. McCartney y R. A. Rastall. 2005. Probiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.* 93(Suppl.1):S531-S534.

Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J. y Gopal, P.K. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* 83(2):167-76.

Gorissen L, Raes K, Weckx S, Dannenberger D, Leroy F, De Vuyst L, De Smet S. 2010. Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:2257-66.

Guo, Z., Liu, X.M., Zhang, Q.X., Shen, Z., Tian, F.W., Zhang, H., Sun, Z.H., Zhang, H.P., Chen, W. 2011. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21:844-850.

Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., Andrew D. 2013. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *FoeyNutrients*. 5(6): 1869–1912.

Hattori, M. y Taylor, T.D. 2009. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res*. 16(1):1-12.

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Shulman, G.I., Gordon, J.I., Hoffman, H.M. y Flavell, R.A. 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 482(7384):179-85.

Hernández-Peñaranda. A. 2003. La preparación de medios de cultivo, pp. 25-30. En A. Hernández-Peñaranda, I. Alfaro y A. Ronal (Eds), *Microbiología Industrial*. EUNED. Costa Rica.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 11:506–514

Hold, G.L., Smith, M., Grange, C., Watt, E.R., El-Omar, E.M. y Mukhopadhyaya, I. 2014. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World. J. Gastroenterol.* 20(5):1192–1210.

Holubar S.D., Cima R.R., Sandborn W.J., Pardi D.S. 2010. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.*(6):CD001176.

Human Microbiome Project Consortium. 2012 a. A framework for human microbiome research. *Nature.* 486(7402):215-21.

Human Microbiome Project Consortium. 2012 b. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 486(7402):207-14.

Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium, Nelson, K.E., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., Worley, K.C., Creasy, H.H., Wortman, J.R., Rusch, D.B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A.T., Feldgarden, M., Gevers, D., Haas, B.J., Madupu, R., Ward, D.V., Birren, B.W., Gibbs, R.A., Methe, B., Petrosino, J.F., Strausberg, R.L., Sutton, G.G., White, O.R., Wilson, R.K., Durkin, S., Giglio, M.G., Gujja, S., Howarth, C., Kodira, C.D., Kyrpides, N., Mehta, T., Muzny, D.M., Pearson, M., Pepin, K., Pati, A., Qin, X., Yandava, C., Zeng, Q., Zhang, L., Berlin, A.M., Chen, L., Hepburn, T.A.,

Johnson, J., McCorrison, J., Miller, J., Minx, P., Nusbaum, C., Russ, C., Sykes, S.M., Tomlinson, C.M., Young, S., Warren, W.C., Badger, J., Crabtree, J., Markowitz, V.M., Orvis, J., Cree, A., Ferriera, S., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Gillis, M., Hemphill, L.D., Joshi, V., Kovar, C., Torralba, M., Wetterstrand, K.A., Abouelleil, A., Wollam, A.M., Buhay, C.J., Ding, Y., Dugan, S., FitzGerald, M.G., Holder, M., Hostetler, J., Clifton, S.W., Allen-Vercoe, E., Earl, A.M., Farmer, C.N., Liolios, K., Surette, M.G., Xu, Q., Pohl, C., Wilczek-Boney, K. y Zhu, D. 2010. A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science*. 328(5981):994-999.

Hungin AP, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, Lionis C, Mendive J, Philippart de Foy JM, Rubin G, Winchester C, de Wit N. 2013. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice – an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther*. 38(8): 864–886.

Icaza-Chávez, M.E. 2013. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev. Gastroenterol. Mex*. 78(4):240-248.

Issa, I., Moucari World R. 2014. Probiotics for antibiotic-associated diarrhea: Do we have a verdict? *J Gastroenterol*. 20(47): 17788–17795.

Ivarsson, A., Persson, L.A., Nyström, L., Ascher, H., Cavell, B., Danielsson, L., Dannaeus, A., Lindberg, T., Lindquist, B.,

Stenhammar, L. y Hernell, O. 2000. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 89(2):165-71.

Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* 59: 171-200.

Jägerstad M, Skog K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res.* 574:156-72

Jimenez-Valera, M., Moreno, E., Amat, M.A. y Ruiz-Bravo, A. 2003. Modification of mitogen-driven lymphoproliferation by ceftriaxone in normal and immunocompromised mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22:607-612.

Jin-Ju Jeong, Kyung-Ah Kim , Young-Tae Ahn , Jae-Hun Sim , Jae-Yeon Woo , Chul-Sung Huh , and Dong-Hyun Kim. 2015. Probiotic Mixture KF Attenuates Age-Dependent Memory Deficit and Lipidemia in Fischer 344 Rats. *Microbiol. Biotechnol.* (2015), 25(9), 1532–1536).

Johnston B, Goldenberg J, Vandvik P, Sun X, Guyatt G. Probióticos para la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en niños. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011 Issue 11. Art. No.: CD004827.

Joint FAO/WHO Expert. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization.

Joint FAO/WHO Working Group. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization.

Jonkers D., Penders J., Masclee A., Pierik M. 2012. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs*. 72:803-823

Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P. y Vermeire, S. 2011. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*. 60(5):631-7.

Jorgensen y R.H. Yolken (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (8ª edición). ASM Press, Washington.

Jumpertz, R., Le, D.S., Turnbaugh, P.J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J.I. y Krakoff, J. 2011. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 94(1):58-65.

Kabeerdoss J., Devi R.S., Mary R.R., Prabhavathi D., Vidya R., Mechenro J., 2011. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory

immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutr J.* 2011;10:138.

Kabeerdoss, J., Sankaran, V., Pugazhendhi, S. y Ramakrishna, B.S. 2013. *Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India. *BMC Gastroenterol.* 13:20.

Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M., Tsuchida T. 2010. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 64:636-43.

Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkivuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J. y Palva, A. 2007. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology.* 133(1):24-33.

Keshav, S. 2004. Paneth cells in innate immunity and intestinal inflammation, p. 171-196. En S.H.E. Kaufmann, R. Medzhitov y S. Gordon (Eds.), *The innate immune response to infection.* ASM Press, Washington.

Kirjavainen, P.V., El-Nezami, H.S., Salminen, S.J., Ahokas, J.T. y Wright, P.F. 1999. The effect of orally administered

viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26(2):131-135.

Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte y G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103-125.

Kligler, B. y Cohrsen, A. 2008 Probiotics. *Am. Fam. Physician.* 78:1073-1078.

Kumura, H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka y K. Shimazaki. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J. Dairy. Sci.* 87:4050-4056.

Leber, S., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:728-764.

Lehtoranta, L., Pitkäranta, A. y Korpela, R. 2014. Probiotics in respiratory virus infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:1289-1302.

Leroy, F. y De Vuyst, L. 2001. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4407-4413.

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. y Crowe, L.M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10):3592-3597.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. y Gordon, J.I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 444(7122):1022-1023.

Liévin-Le Moal, V, y Servin, A.L. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2):315-37.

Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L.M., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J.K., Li, L. y Zhao, L. 2008. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(6):2117-2122.

Lilly, D. M. y R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science.* 147:747-748.

Lorca, G. L., T. Wadström, G. Font de Valdez y A. Ljungh. 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. *Curr. Microbiol.* 42:39-44.

Macfarlane, S., Hopkins, M.J. y Macfarlane, G.T. 2000. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 12(2): 64-72.

Makino S., Ikegami S., Kume A., Horiuchi H., Sasaki H., Orii N. 2010. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br J Nutr.*104:998-1006

Manco, M., Putignani, L. y Bottazzo, G.F. 2010. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr. Rev.* 31(6):817-44.

Manzanera, M., García de Castro, A., Tondervik, A., Rayner-Brandes, M., Strøm, A.R. y Tunnacliffe, A. 2002. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (9):4328-4333.

Manzanera, M., Vilchez, S. y Tunnacliffe, A. 2004. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS. Microbiol. Lett.* 233(2):347-352.

Mattar, A. F., D. H. Teitelbaum, R. A. Drongowski. F. Yongyi, C. M. Harmon y A. G. Coran. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell culture model. *Pediatr. Durg. Int.* 18:586-590

Mazigh, D., Alonso, J.M. y Mollaret, H.H. 1983. Simple method for demonstration of differential colony morphology of plasmid-associated virulent clones of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. 17(3):555-7.

Meddings JB. 1997. Review article: intestinal permeability in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 11: 47-56,

Mege, J.L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C. y Raoult, D. 2006. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. Lancet. Infect. Dis. 6(9):557-569.

Meisel, C., Vogt K., Platzer, C., Randow, F., Liebenthal, C. y Volk, H.D. 1996. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. Eur. J. Immunol. 26(7):1580-1586.

MetaHit. 2012. Metagenomic of the Human Intestinal Tract. [En línea]. Recuperado el 7 de noviembre de 2015, desde <http://www.metahit.eu>

Medzhitov, R. y Janeway, C.Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev. 173:89-97.

Miles, A.A. y Misra, S.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. J. Hyg. (Lond). 38(6):732-749.

Moayyedi P., Ford A.C., Talley N.J., Cremonini F., Foxx-Orenstein A.E., Brandt L.J., Quigley E.M. 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. 59:325-32.

Mohammed SALIM Ammor, Ana Belén Flórez, Baltasar Mayo 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology 24, 559-570.

Moncla, B.J. y Hillier, S.L. 2003. Peptostreptococcus, Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non-spore-forming anaerobic Gram-positive bacteria, pp. 857-879. En P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, J.H. Tenover, R. Tenover. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington, DC: ASM Press. 857-879.

Morelli L. 2014. Yogurt, living cultures, and gut health. American Journal Clinical Nutrition.99 (suppl):1248S-50S.

Morales-García, Y.E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J. Martínez-Contreras, R.D., Pérez-Y-Terrón, R. y Muñoz-Rojas, J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. S.M.B.B. 14 (2):11-29.

Moreau, M.C. y Gaboriau-Routhiau, V. 2000. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue, pp. 69-114. En: R. Fuller y G. Perdigon (Eds), Probiotics 3: 69-114.

Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Kluwer Academic Publishers, Doordrecht.

Morelli, L. 2000. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in intestinal microbiology* 1:59-67.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. y Vesey, G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods.* 66(2):183-193.

Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. 2006. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr.* 96: 570-577.

Mosmann, T. 1993. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65(1-2):55-63.

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A. y Ramos, J.L. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 472-477.

Muccioli, G.G., Naslain, D., Bäckhed, F., Reigstad, C.S., Lambert, D.M., Delzenne, N.M. y Cani, P.D. 2010. The

endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 6:392.

Mullard, A. 2008. Microbiology: the inside story. *Nature.* 453(7195):578-80.

Narayan, S.S., Jalgaonkar, S., Shahani, S. y Kulkarni, V.N. 2010. Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Med. J.* 16:213-218.

National Institutes of Health. 2007. Human Microbiome Project. [En línea]. Recuperado el 7 de noviembre de 2015, desde <http://nihroadmap.nih.gov>.

NCBI. 2015. *Lactobacillus*. [En línea]. Recuperado el 8 de noviembre de 2015, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1578>.

Neis, E.P., Dejong, C.H. y Rensen, S.S. 2015. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients.* 7(4):2930-46.

Neu, J. 2014. The developing intestinal microbiome: probiotics and prebiotics. *World. Rev. Nutr. Diet.* 110:167-76.

Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J. y Knight, S.C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm. Bowel. Dis.* 15:300-310.

O'Hara A.M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7:688–693.)

Ohland, C.L. y Macnaughton, W.K. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298:G807-G819.

Orel R., Kamhi Trop T. 2014. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 7;20:11505-24.

Ortega R.M., Requejo A.M., López A.M., Navia B. Repercusión del consumo de probióticos en el estado nutricional. En: Ortega RM, Marcos A, Aranceta J, Mateos JA, Requejo AM, Serra L (eds). 2002. *Alimentos Funcionales. Probióticos.* Editorial Médica Panamericana. pp 77-87.

Ouwehand, A. C., S. Salminen y E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82:279-289.

Palmfeldt, J., Radström, P. y Hahn-Hägerdal, B. 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology.* 47(1):21-29.

Panoff, J.M., Thammavongs, B. y Guéguen, M. 2000. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw

stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*. 40(3):264-269.

Park, M.K., Ngo, V., Kwon, Y.M., Lee, Y.T., Yoo, S., Cho, Y.H., Hong, S.M., Hwang, H.S., Ko, E.J., Jung, Y.J., Moon, D.W., Jeong, E.J., Kim, M.C., Lee, Y.N., Jang, J.H., Oh, J.S., Kim, C.H. y Kang, S.M. 2013. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a probiotic confers protection against influenza virus by modulating innate immunity. *PLOS One* 8(10):e75368.

Park, Y.H., Kim, J.G., Shin, Y.W., Kim, H.S., Kim, Y.J., Chun, T., Kim, S.H., Whang, K.Y. 2008. Effects of *Lactobacillus acidophilus* 43121 and a mixture of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesterolemia-induced pigs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72:595–600.

Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*. 29:4-8.

Parodi, P.W. 1999. The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *The Australian Jn. Dairy Tech*. 54, 103-121.

Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang y H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol*. 100:1171-1185.

Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P. y Stanton, C. 2008. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GC. J. Appl. Microbiol. 104(6):1732-1743.

Perry, S.F. 1995. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria, pp. 21-30. En J.G. Day y M.W. Pennington (Eds.), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (1ª edición). Methods in Molecular Biology. Human Press. New Jersey.

Peterson, C.T., Sharma, V., Elmén, L. y Peterson, S.N. 2015. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. Clin. Exp. Immunol. 179(3):363-77.

Podolsky, S. 1998. Cultural divergence: Elie Metchnikoff's *Bacillus bulgaricus* therapy and his underlying concept of health. Bull. Hist. Med. 72:1-27.

Portnoy, D.A., Auerbuch, V. y Glomski, I.J. 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. J. Cell Biol. 158(3):409-14.

Prescott, L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2005. Microbiology (6th ed.). McGraw-Hill, Boston.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D. y Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464(7285):59-65.

Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S. y De Vos, W.M. 2001. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 141(5):1792-801.

Raman M, Ambalam P, Kondepudi KK, Pithva S, Kothari C, Patel AT, Purama RK, Dave JM, Vyas BR.2013.Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer Vyas. *Gut Microbes* 4:3, 181–192.

Ratti, C. 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J. Food. Eng.* 49(4): 311-319.

Redway, K.F. y Lapage, S.P. 1974. Effect of carbohydrates and related compounds on the long-term preservation of freeze dried bacteria. *Cryobiology*. 11(1): 73-79.

Reid, G., J. Jass, M. T. Sebulsky y J. K. McCornick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 658-672.

Rerksuppaphol S., Rerksuppaphol L., 2015. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol-9(3): KC01-KC04.

Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and sucesion. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2:43-53.

Robles-Alonso, V. y Guarner, F. 2013. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr. Hosp.* 28(3):553-557

Raoult, D. 2008. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27:631-4.

Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamailard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.F., Ardid, D., Desreumaux P. 2007. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature Medicine* 13:35–37.

Roy, I. y Gupta, M.N. 2004. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39(2):165-177.

Ryan, M.J. y Smith, D. 2007. Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. En J.G. Day y Stacey, G.N. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols (2ª edición). Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Ruiz-Bravo, A y Jimenez-Valera, M. 2005. Sistema inmune y mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, pp. 1191-1227. En A. Gil y F. Sánchez de Medina (Eds.), *Tratado de Nutrición. Acción Médica*, Madrid.

Ruiz-Bravo, A., Moreno, E. y Jimenez-Valera, M. 2001. Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology.* 147:3165-3169.

Ruiz-Bravo, A., Moreno, E., Sampedro, A. y Jimenez-Valera, M. 1999. Experimental infection of mice with *Yersinia enterocolitica* serotype O9 by oral and parenteral routes: spreading and enterotropism of virulent yersiniae. *Curr. Microbiol.* 38:257-263.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84:197-215.

Sakata, S., C. S. Ryu, M. Kitachara, M. Sakamoto, H. Hayashi, M. Fukuyama e Y. Benno. 2006. Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. *Microbiol. Immunol.* 50:1-10.

Salminen, S. J., M. Gueimonde y E. Isolauri. 2005. Probiotics that modify disease risk. *J. Nutr.* 135: 1294-1298.

Sanati, H., Ramos, C.F., Bayer, A.S.y Ghannoum, M.A. 1997. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1345-1348.

Sánchez M.T., Ruiz M.A., Morales M.E. 2015. Microorganismos probióticos y Salud. *Ars Pharm.* 56(1):45-59

Sánchez-Calvo, J.M. 2012. Análisis metagenómico de la microbiota intestinal en pacientes con colitis ulcerosa. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.

Sanders, M. E. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61:91-99.

Sanders M.E. 2015. Probiotics in 2015: Their Scope and Use. *J Clin Gastroenterol.* 49 Suppl 1:S2-6.

Sankpal U.T., Pius H., Khan M., Shukoor M.I., Maliakal P., Lee C.M. Abdelrahim, M., Connelly, S.F., and Basha. 2012. Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumour Biol.* 33:1265-74

Schaafsma, G. 1996. State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. News Lett.* 5:23-24.

Shanahan, F., Quigley, EM. 2014. Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies. *Gastroenterology.* 146:1554–1563

Sell, S. 2001. *Immunology, immunopathology and immunity.* ASM Press, Washington.

SEPYP. 2014. Consenso Prebióticos. [En línea]. Recuperado el 11 de marzo de 2015, desde <http://www.sepyp.es>

Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405-440.

Shalini Mathur, Rameshwar Shing. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281-295.

Simpson, S. y Wetzler, L. 2004. Mucosal Immunity, pp. 399-423. En G. Pier, J. Lyczak y L. Wetzler (Eds), Immunology, Infection, and Immunity (1ª edición). ASM Press, Washington.

Sjöberg, V., Sandström, O., Hedberg, M., Hammarström, S., Hernell, O. y Hammarström, M.L. 2013. Intestinal T-cell responses in celiac disease - impact of celiac disease associated bacteria. PLoS One. 8(1):e53414.

Sleator, R.D., Watson, D., Hill, C. y Gahan, C.G. 2009. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. Microbiology. 155:2463–2475

Songisepp, E., J. Kaals, T. Kullisaar, R. Mädar, P. Hütt, M. Zilmer, and M. Mikelsaar. 2005. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. Nutr. J. 4:22.

Sreekumar O., Hosono A. 1998. Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. J Dairy Sci. 81:1508-16

Stavru, F., Archambaud, C. y Cossart, P. 2011. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. Immunol. Rev. 240(1):160-84.

Sugiura, Y., Kamdar, K., Khakpour, S., Young, G., Karpus, W.J. y DePaolo, R.W. 2013. TLR1-induced chemokine production is critical for mucosal immunity against *Yersinia enterocolitica*. *Mucosal Immunol.* 6(6):1101-9.

Surawicz C.M., McFarland L.V., Greenberg R.N., Rubin M., Fekety R., Mulligan M.E., Garcia R.J., Brandmarker S., Bowen K., Borjal D., Elmer G.W. 2000. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis.*31:1012-7.

Tang, X. y Pikal, M.J. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* 21(2):191-200.

Tannock, G. W. 2004. A special fondness for *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3189-3194.

Timmerman, H.M., Niers, L.E.M., Ridwan, B.U., Koning, C.J.M., Mulder, L., Akkermans, L.M.A., Rombouts, F.M. y Rijkers, G.T. 2007. Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clin. Nutr.* 26:450-459.

Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology* 60:359-361.

Tlaskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Zádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovská, D., Reháková, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. y Kokesová, A. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93(2-3):97-108.

Tuohy, K. M., H. M. Probert, C. W. Smejkal y G. R. Gibson. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Therap. Focus* 15:692-700.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R. y Gordon, J.I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 457(7228):480-4.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R. y Gordon, J.I. 2007. The human microbiome project. *Nature*. 449(7164):804-810.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. y Gordon, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444(7122):1027-31.

Uruburu, F. 2003. History and services of culture collections. Int. Microbiol. 6: 101- 103.

Valeur, N., P. Engel, N. Carbajal, E. Connolly y K. Ladefoged. 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 70:1176-1181.

Vandenplas Y, Huys G, Daube G. 2015. Probiotics: an update. J Pediatr (Rio J).91:6–21.

Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vael, C., Klare, I., Romond, M.B., Entenza, J.M., Moreillon, P., Wind, R.D., Knol, J., Wiertz, E., Pot, B., Vaughan, E.E., Kahlmeter, G. y Goossens, H. 2008. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE Project. Trends Food Sci. Technol. 19:102-114.

Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J. y Werner, D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S–23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 64:2096–2104

Vrieze, A., Van-Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R.S., Bartelsman, J.F., Dallinga-Thie, G.M., Ackermans, M.T.,

Serlie, M.J., Oozer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van-Hylckama-Vlieg, J.E., Bloks, V.W., Groen, A.K., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Stroes, E.S., de Vos, W.M., Hoekstra, J.B. y Nieuwdorp, M. 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 143(4):913-916.e7.

Walker, R. y Buckley, M. 2006. Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press, Washington.

Wang Z.H., Gao Q.Y., Fang J.Y. 2013. Meta-analysis of the efficacy and safety of Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containing probiotic compound preparation in Helicobacter pylori eradication therapy. *J Clin Gastroenterol*. 47: 25-32.

Wassenaar, T.M. y Klein, G. 2008. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. *J. Food Prot*. 71:1734-1741.

Wei, Y.X., Zhang, Z.Y., Liu, C., Malakar, P.K. y Guo, X.K. 2012. Safety assessment of Bifidobacterium longum JDM301 based on complete genome sequences. *World J. Gastroenterol*. 18:479-488.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*. 173(2):697-703.

Welsh FK.S, Ramsden C.W., MacLennan K., Sheridan M.B., Barclay G.R., Guillou P.J., Reynolds J.V. 1998. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann Surg.* 227: 205.

Werner, T., Haller, D. 2007. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research* 1:42-57.

WGO. Probióticos y prebióticos. (Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Octubre 2011. [www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html](http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html).

Wijtzes, T., M. R. Bruggeman, M. J. R. Nout y M. H. Zwietering, 1997. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 39:65-70.

Williams, M.A., Schmidt, R.L. y Lenz, L.L. 2012. Early events regulating immunity and pathogenesis during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Immunol.* 33(10):488-95.

Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 73(Suppl):451S-5S

Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. 2001. Human DNA repair genes. *Science*.291:1284- 9.

Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R. y Gordon, J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 486(7402):222-227.

Yeung, P. S. M., C. L. Kitts, R. Cano, P. S. Tong y M. E. Sanders. 2004. Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotic strain identity and relatedness. *J. Appl. Microbiol.* 97:1095-1104.

Yvan Vandenplasa, Geert Huysb, Georges Daubec. 2015. Probiotics: an update.*J Pediatr (Rio J)*. 91(1):6-21

Zhang, M., Qian, W., Qin, Y.Y., He, J., Yu-Hao, Z. 2015. Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: A systematic review and meta-analysis. *ZhouWorld J Gastroenterol*. 21(14): 4345–4357.

Zhou, J.S. y Gill, H.S. 2005. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse

model of experimental autoimmune thyroiditis. *Int. J. Food. Microbiol.* 103(1):97-104.

Zimbro, M.J., Power, D.A., Miller, S.M., Wilson, G.E. y Johnson, J.A. (Eds.) 2009. *Difco y BBL, Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Becton, Dickinson and Company, Sparks, pp. 289-290.

Zhu, L., W. Li y X. Dong. 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1619-1623.