



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Escola d'Enginyeria
Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental

**Aislamiento, identificación y caracterización
de nuevos probióticos con propiedades
funcionales para su aplicación en
alimentación.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

GLORIA CIFUENTES ORJUELA

Director: Dr. José Antonio Moreno

Tutor: Dr. Francesc Valero

Este trabajo ha sido realizado
en Laboratorios Ordesa 

Junio 2018

El Dr. **JOSE ANTONIO MORENO MUÑOZ** perteneciente al Departamento de Investigación básica de Laboratorios ORDESA S.L. en calidad de director de esta memoria de Tesis y el Dr. **FRANCESC VALERO BARRANCO**, director del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Animal, en calidad de tutor,

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada: "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS PROBIÓTICOS CON PROPIEDADES FUNCIONALES PARA SU APLICACIÓN EN ALIMENTACIÓN" que presenta Gloria Cifuentes Orjuela para optar el grado de Doctor en Biotecnología ha sido realizada en Laboratorios ORDESA S. L. y reúne los requisitos adecuados para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente documento,

Bellaterra (Cerdanyola de Vallès), 08 de junio de 2018

Fdo: José Antonio Moreno Muñoz

Fdo: Francesc Valero Barranco

"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas"

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas que a pesar de la distancia siempre me han brindado su confianza, comprensión, dedicación y amor, para no desfallecer en ver realizado uno más de mis objetivos de vida profesional.

A mi compañero de vida, amigo y esposo, Miguel Carrera, por su amor y apoyo incondicional, siempre haciéndome ver el lado positivo de las cosas y logrando sacar una sonrisa a los malos momentos que pasé. Gracias por creer en mí y hacerme sentir que nunca estuve sola en esto que decidí emprender un día. Gracias por seguir sujetando mi mano, porque con tu apoyo también has escrito parte de esta Tesis.

A mi hija Emma Carrera, que aunque ahora no seas capaz de leer estas líneas, quiero que sepas que pese a que en muchos momentos el tiempo dedicado hacia ti no fue el suficiente y que en muchos días necesitaste, te dedico todo el esfuerzo que puse para finalizar con éxito este trabajo. Quiero que aprendas a luchar por lo que quieres y no dejes que nadie te diga que no puedes alcanzar tus sueños; porque todo lo que tengo ahora, en un momento dado fue un sueño y ahora es la realidad más bonita que tengo.

A Laboratorios ORDESA por haberme dado la oportunidad de ingresar a la plantilla del Departamento de Investigación Básica de la empresa y posteriormente permitirme realizar el programa de Doctorado facilitando tanto las instalaciones, como el material necesario para el desarrollo de los diferentes experimentos que se han llevado a cabo.

Al Dr. José Antonio Moreno, director de esta tesis y jefe directo en el laboratorio, por su confianza para dejarme llevar a cabo este trabajo, por guiarme y siempre haber creído en mis capacidades y habilidades para sacar este trabajo adelante, también gracias por compartir sus conocimientos acerca de la microbiota intestinal, que me han permitido descubrir un nuevo e interesante campo de investigación.

Al Dr. Francisco Valero, tutor de esta tesis, por el tiempo dedicado a realizar el seguimiento de este trabajo y de esta manera estar al tanto de los avances y dudas que surgieron, durante el desarrollo del mismo.

A la Dra. Maria Rodríguez y a la Dra. Ma. Cristina de Almagro, por estar siempre dispuestas a resolver cualquier tipo de duda que podía surgir a medida que desarrollaba este trabajo y darme ánimos para no desfallecer, a pesar de las dificultades encontradas.

A los diferentes compañeros y becarios que han pasado por el laboratorio, por todos los momentos compartidos, ya que ellos también aportan valor a este trabajo.

También quiero dedicar unas líneas a las personas que me ayudaron al análisis y procesamiento de muestras y posteriormente al análisis de los datos, porque fueron indispensables y de gran ayuda para una buena y correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a la Universitat Autònoma de Barcelona, por darme la oportunidad de ingresar al programa de Doctorado, aceptar este trabajo de tesis y de esta manera poder compartir el conocimiento que he adquirido a medida que fui desarrollando este trabajo de investigación.

RESUMEN

La relación entre el hospedador y los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal (GIT) es importante y fundamental para mantener un buen estado de salud, ya que se ha observado que la baja diversidad microbiana intestinal está asociada con el riesgo de enfermedades. Debido a esto, se han empleado diferentes técnicas para identificar y caracterizar bacterias con propiedades probióticas que puedan usarse como ingredientes en alimentos funcionales y de esta manera permitir el restablecimiento de las comunidades microbianas del GIT (aumento de la diversidad) o simplemente para mantener su buen funcionamiento. El principal objetivo de este trabajo ha sido la creación y caracterización de una colección de cepas probióticas, pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, propiedad de Laboratorios Ordesa, a partir de muestras biológicas que incluyeron leche materna y heces de madre-bebé lactante. El uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo, incluida la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN y diferentes test bioquímicos (API 50CH y API ZYM) permitió identificar 288 cepas, donde *Bifidobacterium* fue el género predominante, representado por un 93.8% de todos los aislados, comparado con el género *Lactobacillus* (6,3%). Además de la identificación de las cepas aisladas, se realizaron análisis *in vitro* para evaluar diferentes propiedades funcionales, que incluyeron la capacidad de producción de ácidos conjugados a partir de ácido linoléico (LA) y ácido linolénico (LNA), la actividad antimicrobiana frente a tres patógenos relacionados con la mastitis en la lactancia y la producción de ácido gama-aminobutírico (GABA) a partir del Monoglutamato de Sodio (MGS). De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que una cepa de *Lactobacillus gasseri* (ORD0529) fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* CECT4013, microorganismo causante de la mastitis en la lactancia. En cuanto a la producción de CLA y CLNA, se encontraron 10 cepas buenas productoras de estos ácidos grasos conjugados, siendo mayoritariamente bacterias del género *Bifidobacterium* y diferentes especies como *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (ORD0084), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (ORD0105), *Bifidobacterium breve* (ORD0123, ORD0124, ORD0128, ORD 0134, ORD0138 y ORD0294) y *Bifidobacterium bifidum* (ORD0202); y del género *Lactobacillus* solo se obtuvo una cepa perteneciente a *Lactobacillus oris* (ORD0255). Todas estas cepas fueron patentadas y depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bajo el número WO 2014/096352 A2, excepto la ORD0084 y ORD0105. Respecto a la producción

de GABA, sólo se detectó la presencia de la enzima GAD en 7 cepas del género *Bifidobacterium*, concretamente en especies de *Bifidobacterium adolescentis* (ORD00106, ORD0119, ORD208, ORD0410, ORD0459 y ORD0465) y *Bifidobacterium angulatum* (ORD0026), sin embargo solo 6 de ellas fueron capaces de exportar el GABA. Los resultados obtenidos sugieren que estas cepas podrían ser tenidas en cuenta, para emplearse como ingredientes en productos alimentarios y/o complementos.

SUMMARY

The relationship between the human host and microorganisms that colonize the gut is important and fundamental to maintain a healthy balance and several research suggest that a gut microbiota with low diversity may have negative consequences for health. Because of that, different techniques have been employed to identify and characterize bacteria with probiotic properties that could be used as food ingredients. The aim of this work has been created an Ordesas's strain collection, belonging to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera, from human milk and feces of breast feeding babies and their mothers. A total of 288 lactic acid bacteria from these samples were identified through several molecular biology techniques including partial amplification of 16S rRNA gene and also biochemical tests (API 50CH and API ZYM). *Bifidobacterium* was the most prevalent genus, representing 93,8% of the isolates followed by *Lactobacillus* (6,3%). Functional properties were evaluated by *in vitro* assays, including production of conjugated fatty acid from linoleic acid (LA) and linolenic acid (LNA), antagonistic activity against three different pathogens related with lactational mastitis and production of gamma-aminobutyric acid (GABA) from Monosodium Glutamate (MGS). According to the results, a strain of *Lactobacillus oris* (ORD0529) was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* CECT4013, microorganism that cause lactational mastitis. Regarding the production of CLA and CLNA, 10 strains were the best producers of these conjugated fatty acids, being mostly of the *Bifidobacterium* genus and different species such as *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (ORD0084), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (ORD0105), *Bifidobacterium breve* (ORD0123, ORD0124, ORD0128, ORD 0134, ORD0138 and ORD0294) and *Bifidobacterium bifidum* (ORD0202); and only a strain belonging to *Lactobacillus oris* (ORD0255) was obtained from the genus *Lactobacillus*. All of these strains were patented and deposited in the Spanish Type Culture Collection (ATTC), except the ORD0084 and ORD0105. Regarding the production of GABA, only some bacteria of the *Bifidobacterium* genus had the GAD enzyme and were able to export GABA, including species of *Bifidobacterium adolescentis* (ORD0106, ORD0119, ORD0410, ORD0459 and ORD0465) and *Bifidobacterium angulatum* (ORD0026). The GABA production was strain-dependent. The results obtained in this work provide novel opportunities for the development of functional foods.

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. MICROBIOTA INTESTINAL.....	15
1.1.1. Adquisición y composición de la microbiota.....	19
1.1.2. Funciones de la microbiota intestinal.....	24
1.1.2.1. Metabolismo de nutrientes.....	25
1.1.2.2. Protección antimicrobiana.....	26
1.1.2.3. Inmunomodulación.....	27
1.1.3 Métodos de estudio de la composición de la microbiota intestinal.....	28
1.1.3.1. Métodos dependientes de cultivo.....	29
1.1.3.2. Métodos independientes de cultivo.....	29
1.1.3.2.1. Métodos de "next generation sequencing" (NGS).....	29
1.1.3.2.2. Métodos de huella dactilar ("fingerprinting").....	30
1.1.3.2.3. Sondas de hibridación.....	32
1.2. DISBIOSIS Y PATOGENIA.....	32
1.3. EJE INTESTINO-CEREBRO.....	44
1.4. ALIMENTOS FUNCIONALES.....	47
1.4.1. Probióticos.....	48
1.4.1.1. Mecanismos de acción de los probióticos.....	50
1.4.1.2. Efecto de los probióticos en la microbiota intestinal o en la salud humana.....	58
1.4.1.3. Géneros empleados como probióticos.....	60
1.4.1.3.1. Género <i>Lactobacillus</i>	61
1.4.1.3.2. Género <i>Bifidobacterium</i>	62
1.4.1.4. Pautas para la selección de las cepas probióticas.....	62
1.4.1.5. Propiedades industriales de los probióticos.....	67
1.4.1.5.1. Factores que afectan la supervivencia de los probióticos durante el procesado.....	69
1.4.1.5.2. Factores que pueden afectar la viabilidad durante el almacenamiento.	70
1.4.1.6. Seguridad de los probióticos.....	71
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	76
3.2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS.....	76
3.2.1. Identificación fenotípica de las colonias.....	78
3.2.1.1. Análisis macroscópico de las colonias.....	78
3.2.1.1.1. Almacenamiento y conservación de cepas.....	79
3.2.1.2. Características microscópicas.....	79
3.2.1.3. Prueba bioquímicas.....	80
3.2.1.3.1. Prueba de la catalasa.....	80
3.2.1.3.2. Prueba de la oxidasa.....	81
3.2.1.3.3. Prueba de la aminopeptidasa.....	82

3.2.1.3.4. Prueba de la detección de la enzima fructosa-6-fosfato-fosfoacetolasa (F6PPK).....	82
3.2.1.3.5. Prueba API 50CH® (Biomerieux).....	83
3.2.1.3.6. Prueba API ZYM® (Biomerieux).....	86
3.3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS. .	88
3.3.1. Obtención de extractos celulares y extracción de ADN cromosómico.	88
3.3.2. Amplificación parcial del gen 16S rARN y secuenciación.....	89
3.3.3. RAPD-PCR.....	91
3.4. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS AISLADAS.....	91
3.5. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES.	95
3.5.1. Evaluación de la producción in vitro de ácidos grasos conjugados: ácido linoléico (CLA) y ácido linolénico (CLNA).....	95
3.5.1.2. Crecimiento de las cepas en presencia de ácido linoléico (LA).....	95
3.5.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana in vitro de las diferentes cepas aisladas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Streptococcus mitis</i>	97
3.5.3. Producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA).....	99
3.5.3.1. Detección de presencia de la enzima Glutamato Decarboxilasa (GAD).....	99
3.5.3.2. Análisis y determinación de la producción de GABA.	101
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	102
4.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LAS MUESTRAS.....	103
4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS POSIBLES CEPAS PROBIÓTICAS AISLADAS.....	109
4.2.1. RAPD-PCR.....	115
4.2.2 Perfil de fermentación de carbohidratos y actividades enzimáticas.....	126
4.3. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS AISLADAS.....	134
4.4. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES.	140
4.4.1. Evaluación de la producción de ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido linolénico conjugado (CLNA).	140
4.4.1.1. Crecimiento de las cepas en presencia de ácido linoléico (LA).....	140
4.4.1.2. Determinación de producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA (ácido linolénico conjugado) de las cepas seleccionadas.	142
4.4.1.2.1. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80.....	142
4.4.1.2.2. Producción de CLNA (ácido linolénico conjugado) en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80.	149
4.4.1.2.3. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA (ácido linolénico conjugado) de las bacterias seleccionadas en leche desnatada reconstituida (RSM: Reconstituted Skim Milk) suplementado.	152
4.4.1.2.4. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA(ácido linolénico conjugado) de las bacterias seleccionadas en fórmula infantil Blemil Plus Forte-1.	155

4.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas.	159
4.4.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> CECT4013.	160
4.4.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT231.	166
4.4.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Streptococcus mitis</i> ATCC49456.	171
4.4.3. Determinación de la producción de GABA (ácido gamma-aminobutírico) de las cepas seleccionadas.	175
4.4.3.1. Detección de la presencia de la enzima GAD (Glutamato descarboxilasa).	175
4.4.3.2. Determinación de la producción de GABA (ácido gama-aminobutírico).	177
5. CONCLUSIONES	184
6. BIBLIOGRAFÍA	188

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AN: ácidos nucleicos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

SCFAs: ácidos grasos de cadena corta (siglas en inglés)

RAPD: amplificación aleatorizada de ADN polimórfico (siglas en inglés)

CLA: ácido linoléico conjugado (siglas en inglés)

CLNA: ácido linolénico desconjugado (siglas en inglés)

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GAD: glutamato descarboxilasa

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

BH: Agar cerebro-corazón

RCM: medio reforzado para clostridios

F6PPK: fructosa-6-fosfocetolasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (siglas en inglés)

MRS: Man, Rogosa & Sharpe

MRS_c: MRS con adición de cisteína 0.25%

MRS_m: MRS con adición de cisteína 0.05%

SNC: sistema nervioso central

MM: medio mínimo

UFC: unidades formadoras de colonias

GIT: tracto gastrointestinal (siglas en inglés)

WHO: Organización Mundial de la Salud (siglas en inglés)

DC: células dendríticas (siglas en inglés)

sIgA: inmunoglobulina A secretora

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (siglas en inglés)

IEC: células epiteliales intestinales (siglas en inglés)

DO: densidad óptica

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Microbiota intestinal.

El término **microbiota humana**, se refiere a la población de microorganismos que colonizan un lugar en particular del cuerpo humano, dicha población no solo incluye bacterias, sino también otros microorganismos tales como hongos, eucariotas de una sola célula, virus y protozoos (Sekirov *et al.*, 2010). Esta microbiota, se asocia con el **hospedador** de dos maneras: la primera, es de tipo **mutualista** produciéndose una relación **simbiótica**, donde el hospedador ofrece un medio rico en nutrientes obteniendo un beneficio; y la segunda, es de tipo **comensal** donde se establece una relación neutral (Romero Cabello, 2008) (de Almada *et al.*, 2015).

De esta manera, nos referimos a la **microbiota intestinal** como el conjunto de microorganismos que colonizan el **tracto gastrointestinal (GIT)** y que actualmente se considera un componente importante del organismo, ya que se le atribuyen funciones de gran interés interviniendo en procesos de digestión, respuesta inmune e incluso en procesos neurológicos. Diversos estudios realizados con animales **gnotobióticos**, han demostrado que la ausencia de esta microbiota intestinal tiene un gran impacto, ya que estos animales presentan defectos tanto en estructura como en la funcionalidad de los diferentes órganos. Por esto, el uso de dichos modelos animales, son una excelente herramienta de investigación, ya que han permitido dilucidar el mecanismo de acción que ejercen algunas comunidades microbianas que conforman la **microbiota humana** (Sekirov *et al.*, 2010).

Durante décadas el término empleado en la literatura médica para describir la microbiota intestinal ha sido "microflora intestinal" o "flora", pero actualmente el uso de esta alusión botánica es incorrecta, ya que los microorganismos que habitan el **GIT** no están relacionadas con las plantas y en términos taxonómicos, pertenecen a reinos totalmente diferentes entre sí (Isolauri *et al.*, 2004), si bien, entre la población sin formación microbiológica estos términos incorrectos aún son utilizados.

Un tema muy debatido ha sido si la microbiota intestinal es una entidad definida; pero diversas investigaciones indican que la microbiota comprende una mezcla **dinámica** de microorganismos, cuya composición cambia a lo largo del tiempo y del **GIT**, desde el lumen hasta la mucosa. Teniendo en cuenta que la microbiota de la mucosa está en

contacto cercano con el sistema inmunitario del hospedador, la composición y la actividad de esta microbiota, *a priori*, parece ser más relevante que la microbiota del lumen (Isolauri *et al.*, 2004).

Al observar las diversas regiones del **GIT** en detalle, se percibe una diferencia marcada en diversidad y número de bacterias (Jandhyala *et al.*, 2015). A lo largo del **GIT** existen diversas condiciones cambiantes, como la motilidad normal del intestino (peristalsis y la actividad motora propulsiva), los efectos antimicrobianos de los ácidos gástricos y biliares, y las secreciones pancreáticas e intestinales, que crean ambientes con **bajas concentraciones de bacterias** en ciertas zonas del **GIT**; es el caso del estómago y el duodeno, que a pesar de su bajo pH y de la presencia de enzimas digestivas, no son órganos estériles, albergando un número reducido de microorganismos que se adhieren a la superficie de la mucosa o están en tránsito (Guarner & Malagelada, 2003) (Quigley, 2013). De hecho, investigaciones realizadas por el grupo de Ryan y *col.* en 2008, han aislado del estómago humano, microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* con propiedades probióticas.

El número de microorganismos **aumenta progresivamente** a medida que nos acercamos al colon, desde alrededor de 10^4 UFC/g en el yeyuno hasta 10^7 UFC/g de contenido en el extremo ileal, donde existe un predominio de aerobios Gram negativos y algunos anaerobios obligados. *Streptococcus* parece ser el género dominante en el esófago distal, duodeno y yeyuno, mientras que *Helicobacter* es el género dominante en el estómago, determinando la composición de la microbiota gástrica, es decir, si *Helicobacter pylori* habita el estómago como microorganismo comensal, existe una amplia biodiversidad constituida por otros géneros dominantes, como *Streptococcus* (dominante), *Prevotella*, *Veillonella* y *Rothia*, pero esta biodiversidad cambia cuando *H. pylori* adquiere su fenotipo patogénico (Jandhyala *et al.*, 2015).

En el colon, el tránsito es lento y esto facilita la colonización de los microorganismos, ya que pueden fermentar los sustratos no digeribles, provenientes de la dieta o de la secreción endógena (Conlon & Bird, 2015). Por lo tanto, es en el colon donde se localizan aproximadamente el **70%** de todos los microorganismos encontrados en el cuerpo y los recuentos pueden llegar hasta 10^{12} UFC por gramo de contenido, compuestos básicamente por bacterias **anaerobias estrictas o facultativas**, como *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*, con un predominio de bacterias anaerobias sobre las aerobias con una relación que puede ir de 100 a 1000:1. Este predominio de anaerobios, se debe a la **baja concentración** de

oxígeno en el colon y que posiblemente la microbiota se adapta para habitar bajo estas condiciones (Quigley, 2013). En la **Fig. 1**, se muestra la distribución de poblaciones a lo largo del **GIT**.

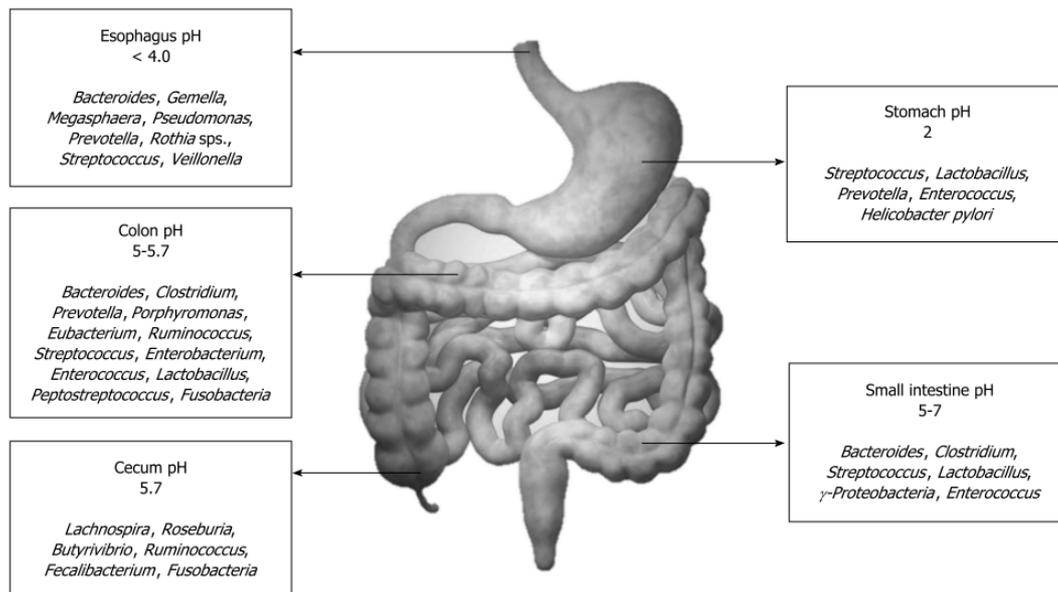


Figura 1. Distribución normal de la microbiota del tracto gastrointestinal (GTI) humano (Adaptado de Jandhyala *et al.*, 2015).

La región más estudiada del intestino es el **colon distal** y en adultos, se estima que las heces pueden contener de 10^{13} a 10^{14} microorganismos, con aproximadamente unas 1000 especies prevalentes y al menos 160 especies diferentes por individuo (Johansson *et al.*, 2011). Los resultados del **Proyecto Microbioma Humano**, muestran que miles de microorganismos diferentes pueden habitar colectivamente el intestino humano, confirmando que existe un **alto grado de variación** en la composición de estas poblaciones entre individuos (Conlon & Bird, 2015).

Se estima que la microbiota humana contiene **150** veces más genes que el genoma humano, sin embargo, sólo cerca de 50 especies pertenecientes exclusivamente a cinco o seis géneros y dos *phylum* representan el 99% de la biomasa, siendo *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* los géneros más importantes numéricamente, pudiendo representar **más del 60% de las bacterias cultivables** presentes en las heces humanas. Asimismo, otros géneros como *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcus* también son importantes, aunque son menos numerosos. De esta manera, casi todas las bacterias en el intestino humano (aproximadamente **el 90%**) se pueden asignar principalmente a dos *phylum*: *Firmicutes* y *Bacteroidetes*; aunque las proporciones

relativas de estos dos *phylum* dominantes varían y pueden estar influenciados por diversos factores (Conlon & Bird, 2015).

Aparte de los microorganismos pertenecientes a estos dos *phylum*, el colon humano también alberga algunos **patógenos primarios**, por ejemplo *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis*, los cuales se encuentran en una baja proporción (0,1% o menos, del total de la microbiota intestinal) (Huttenhower & Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Un alto predominio de géneros como *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus* y una baja concentración de microorganismos pertenecientes al *phylum Proteobacteria* sugiere una **microbiota saludable** (Jandhyala *et al.*, 2015). Aunque usualmente la **relación Firmicutes:Bacteroidetes** ha estado implicada en la predisposición de estados patológicos, diversos estudios han observado que existe una **variabilidad significativa**, tanto en individuos sanos como en los que padecen la patología, por lo que la relevancia de esta ratio aún sigue siendo discutible (Ley *et al.*, 2006).

Además de esta diferencia longitudinal en la composición y biodiversidad de la microbiota, también existe una diferencia **axial** desde el lumen hasta la superficie de la mucosa del intestino. Mientras que los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* son predominantes en la **microbiota luminal** (pueden ser identificados en heces), solo *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Akkermansia* son géneros que predominan en la **mucosa** y están asociados al moco (detectados tanto en la capa mucosa como en las criptas epiteliales del intestino delgado) (Jandhyala *et al.*, 2015).

Otra manera de clasificar la **microbiota intestinal**, fue propuesta por el Consorcio Europeo **MetaHit** y se basa en la propuesta de la existencia de tres **enterotipos** que difieren en su composición microbiana. Por lo tanto, la microbiota de la mayoría de los individuos puede ser categorizada dentro de **tres variantes o "enterotipos"**: "**enterotipo 1**", alta abundancia de *Bacteroides*; "**enterotipo 2**", alta abundancia de *Prevotella*; y "**enterotipo 3**", alta abundancia de *Ruminococcus*. Todos estos enterotipos son independientes de edad, sexo, nacionalidad e índice de masa corporal (IMC) (Quigley, 2013). El **enterotipo 1** (*Bacteroides*) obtiene energía de los carbohidratos y proteínas de la dieta ya que tienen un alto poder sacarolítico y se evidencia por la presencia de enzimas como proteasas, hexoaminidasas y galactosidasas; el **enterotipo 2** (*Prevotella*) actúa principalmente como degradador de las glicoproteínas de mucina que recubren la capa de la mucosa intestinal; y el **enterotipo 3** (*Ruminococcus*) está

asociado a la degradación de la mucina, además del transporte de azúcares a través de las membranas. Los "**enterotipos**" también tienen otras funciones metabólicas específicas, por ejemplo, la síntesis de biotina, riboflavina y ascorbato es más abundante en el enterotipo 1, mientras que la tiamina y síntesis de folatos son más predominantes en el enterotipo 2 (Jandhyala *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es importante tener en cuenta que la **microbiota intestinal** se va modificando a lo largo de la vida, por lo que cada individuo consta de una **microbiota única**, formada por una combinación de diferentes especies a las que se pueden encontrar en otro individuo (Claesson *et al.*, 2011).

1.1.1. Adquisición y composición de la microbiota.

Hasta hace poco, se pensaba que el bebé al nacer era estéril, su **primer contacto con los microorganismos se creía que se producía en el momento del nacimiento** y dependiendo del tipo de parto (natural o cesárea), podía adquirir un tipo de microbiota u otra (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). Pero diversos grupos de investigación, empleando técnicas dependientes de cultivo, han conseguido aislar microorganismos del líquido amniótico, entre los que se encuentran *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes* y *Streptococcus epidermidis* (Bearfield *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2005). Conjuntamente, el grupo de Wang *y col.* en 2013, empleando técnicas dependientes y no-dependientes de cultivo, consiguieron aislar e identificar microorganismos de líquido amniótico, cordón umbilical y sangre de recién nacido, tales como *E. coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Fusobacterium nucleatum* y *Ureaplasma*. Por otro lado, el grupo de Aagaard *y col.*, en 2014, empleando técnicas de secuenciación directa, determinaron que la placenta alberga una microbiota de baja abundancia pero metabólicamente rica, compuesta por microorganismos comensales no patogénicos, que incluyen los *phylum Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*, siendo muy similar a la microbiota encontrada en la cavidad oral (**Fig. 2.**).

Estos resultados indicarían que la **colonización microbiana del feto** ocurre desde el comienzo mismo del desarrollo, existiendo **interacciones** entre el feto y la microbiota presente en la placenta y el cordón umbilical. Sin embargo, los cambios relacionados en la microbiota, ocasionados por las fluctuaciones hormonales y físicas ocurridas durante la gestación, también pueden servir para inocular el **GIT** del bebé (Prince *et al.*, 2014)

(Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). El grupo de Chu y *col.* en 2017, a partir de los resultados obtenidos en sus investigaciones, han planteado la hipótesis de que el bebé va adquiriendo su microbiota semanas **antes del nacimiento** (a partir de la semana 32) y que parte de esta microbiota procede de la placenta, proceso que al parecer está modulado por la dieta materna durante el embarazo.

A medida que comenzamos a comprender los cambios que se producen en la microbiota durante el embarazo, un tema a tener en cuenta es el papel de esta microbiota en la **regulación del momento del parto**, y sobretudo del parto prematuro. Aunque actualmente se cree que el nacimiento prematuro es iniciado por una infección ascendente de la cavidad vaginal a la placenta, estudios recientes han demostrado que la entrada de patógenos de la cavidad oral pueden alcanzar la placenta y posteriormente propagarse a la circulación fetal, estimulando de esta manera una respuesta inmune/inflamatoria fetal que está caracterizada por la producción de anticuerpos IgM contra los patógenos y una secreción de niveles elevados de mediadores inflamatorios, lo que podría causar abortos o partos prematuros. Por lo tanto, no es sorprendente que la microbiota de la placenta se asemeje a la de la cavidad oral (Madianos *et al.*, 2013).

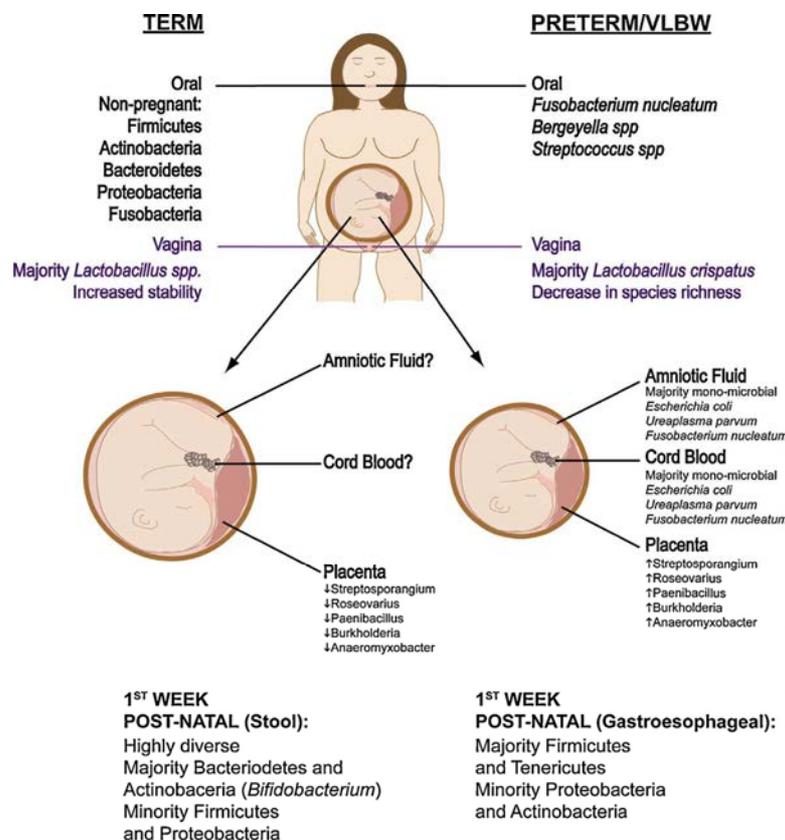


Figura 2. Comparación de la microbiota oral y vaginal presente en mujeres con parto a término vs. prematuro (Adaptado de Prince *et al.*, 2014).

Así como la placenta y el feto, el **meconio** (primeras heces del bebé), también era considerado estéril. Sin embargo, diversas investigaciones han mostrado mediante el uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo, la presencia de **poblaciones bacterianas**, incluyendo *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconosctoc*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Gosalbes *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2015; Jiménez *et al.*, 2008). Comparado con muestras de heces adultas, el meconio muestra una **baja diversidad** bacteriana, una alta variabilidad entre sujetos y un enriquecimiento de *Proteobacteria* a expensas de una reducción del número de *Bacteroidetes*, encontrando de esta manera una correlación entre la edad gestacional del recién nacido y la composición microbiana del meconio (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016).

Por lo tanto, se podría especular que **independientemente del tipo de parto**, no son bacterias ascendentes del tracto vaginal o contacto con bacterias del tracto vaginal durante el parto, los únicos o incluso los colonizadores mayoritarios del recién nacido (Prince *et al.*, 2014). El mecanismo por el cual los microorganismos entran en el compartimento fetal placentario y llegan a colonizar el feto, aún no es del todo claro. Pero se ha sugerido que las bacterias llegan a la placenta a través del torrente sanguíneo después de la **translocación** del epitelio intestinal y aunque la barrera epitelial intestinal, generalmente impide la entrada microbiana en el sistema circulatorio, las **células dendríticas (DCs)** pueden penetrar activamente en el epitelio intestinal, **absorber** las bacterias del lumen intestinal y transportarlas **vivas** en todo el cuerpo a medida que migran a los órganos linfoides (Rodríguez *et al.*, 2015).

Otro aspecto importante en la adquisición y desarrollo de la microbiota intestinal del niño, es el tipo de alimentación que recibe el bebé durante los primeros meses de vida. Tiempo atrás se consideraba que la **leche materna humana** era estéril, pero el uso de técnicas dependientes de cultivo han confirmado la presencia de microorganismos en este fluido. La mayoría de los microorganismos aislados de la leche materna pertenecen a los géneros bacterianos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Fernández *et al.*, 2012).

Aparte de la importancia de la microbiota de la leche materna, también lo es la abundancia de oligosacáridos complejos con actividad **prebiótica**, que al no ser asimilados por el bebé, pueden ser utilizados como fuente de energía por grupos específicos de bacterias, como es el caso de las **bifidobacterias**, dándoles una ventaja

competitiva sobre otras especies bacterianas (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que existe una **diferencia marcada**, referida a la composición de la microbiota del **GIT**, entre los niños que son alimentados con leche materna *vs.* los alimentados con leche de fórmula, por lo que cada tipo de alimentación durante este período repercute de manera diferente en el desarrollo de la microbiota intestinal del recién nacido (**Fig. 3**) (Guaraldi & Salvatori, 2012).

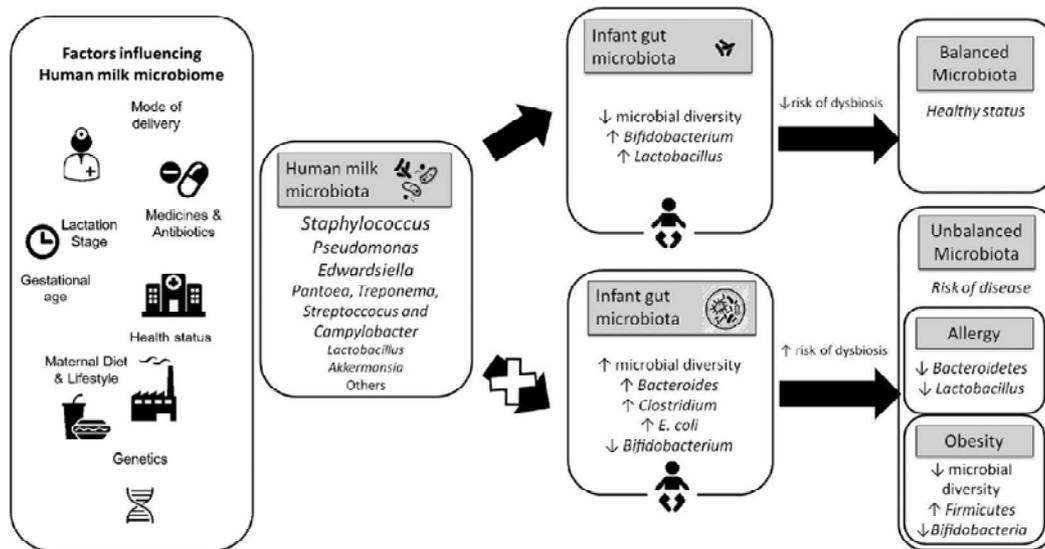


Figura 3. Composición de la leche humana y comparación entre la microbiota de bebés alimentados con leche materna *vs.* leche de fórmula. (Adaptado de Gomez-Gallego *et al.*, 2016).

El origen de las bacterias presentes en la **leche materna humana** ha llegado a ser un tema muy controvertido en los últimos años. Tradicionalmente, se creía que las bacterias que se encontraban en la leche materna humana eran el resultado de la contaminación con bacterias de la piel de la madre o de la cavidad oral del bebé (Fernández *et al.*, 2012). Y aunque algunos géneros presentes en la piel de la madre como *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionabacterium* también son comunes en la leche materna, algunas investigaciones han reportado que los lactobacilos y enterococos presentes en este fluido son **genotípicamente diferentes** de los aislados de la piel del adulto (Gao *et al.*, 2007). Adicionalmente, las bifidobacterias pertenecen a un género estrictamente anaeróbico y por lo tanto, la piel es una fuente poco probable para aislar este tipo de microorganismos (Gueimonde *et al.*, 2012). Así pues, varios trabajos de investigación han confirmado la existencia de una **ruta endógena (entero-mamaria)**, la cual también involucra a las DCs y los macrófagos (**Fig. 4**) (Jiménez *et al.*, 2008). Dichos procesos entero-mamarios implican el establecimiento de

interacciones específicas entre las células del epitelio intestinal, las bacterias intestinales y las células del sistema inmunitario del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) (Rodríguez *et al.*, 2008). Además, se sabe que durante el embarazo y el período de lactancia, existe una acumulación selectiva y masiva de células del sistema inmunitario de origen intestinal en la glándula mamaria, regulada por las hormonas lactogénicas (Fernández *et al.*, 2012).

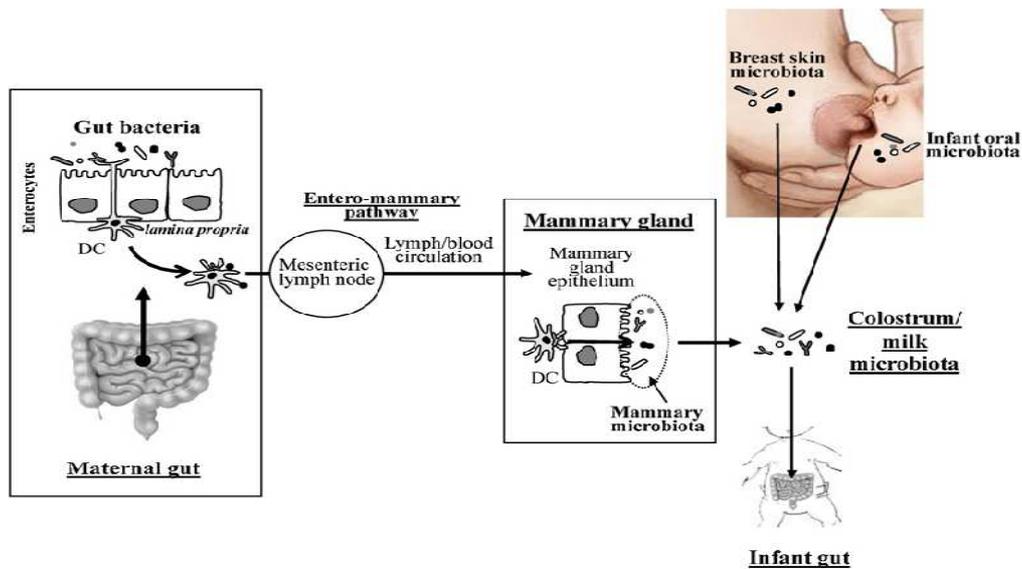


Figura 4. Ruta endógena mediante la cual, la microbiota del intestino de la madre, llega a la leche materna (Adaptado de Fernández *et al.*, 2012).

Después del destete, la diversidad de la microbiota intestinal se incrementa y la introducción de alimentos sólidos potencian una colonización del **GIT** por microorganismos productores de butirato, que incluyen especies de *Bacteroides* y ciertas especies de *Clostridium*. El **butirato** es la principal fuente de energía para los colonocitos y un compuesto relevante en la modulación de la función intestinal. Así pues, al final del primer año de vida, los bebés poseen un perfil microbiano individualmente distinto. De modo que desde los 2 a los 5 años de edad, la **microbiota intestinal** se asemeja a la de un adulto, en términos de composición y diversidad (Rodríguez *et al.*, 2015).

Hacia la **edad adulta**, la composición de esta microbiota es relativamente **estable** y es alterada exclusivamente por factores externos que incluyen la dieta, el medioambiente, la administración de medicamentos y el estilo de vida. Sin embargo, la estabilidad de esta microbiota se reduce al llegar a la vejez y la característica más notable en la microbiota de las personas mayores es una alteración en las proporciones relativas de

Firmicutes y *Bacteroidetes*. Se ha observado que en las heces de las personas mayores hay una alta proporción de *Bacteroidetes*, mientras que en adultos jóvenes hay una alta proporción de *Firmicutes* (Mariat *et al.*, 2009).

En la **figura 5**, se observa de manera resumida, la **adquisición de la microbiota** a lo largo de la vida y los principales géneros que se encuentran en cada etapa.

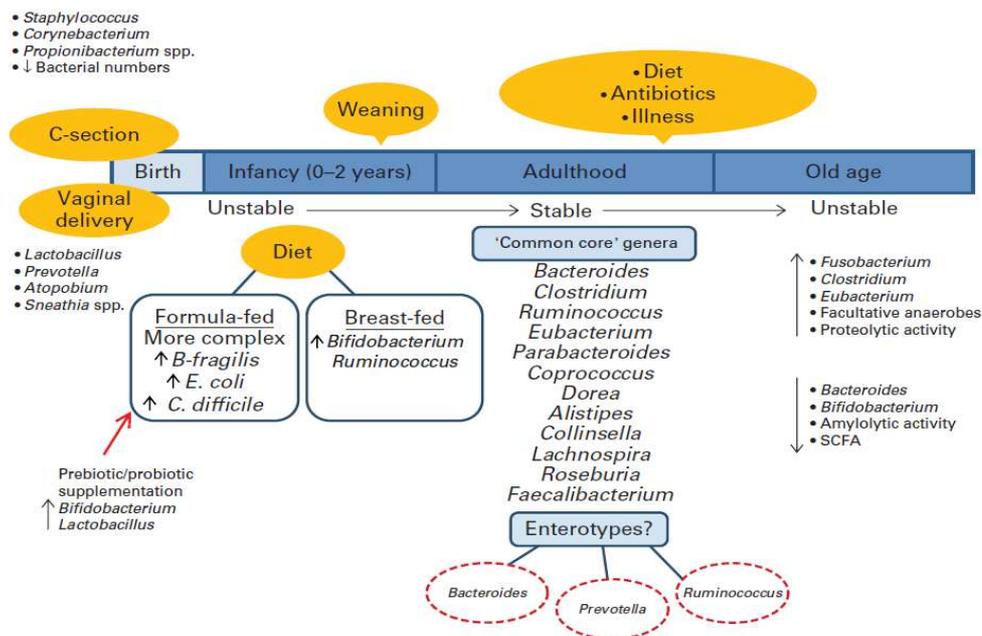


Figura 5. Principales géneros bacterianos que componen la microbiota a lo largo de la vida (**Adaptado de Power *et al.*, 2014**).

1.1.2. Funciones de la microbiota intestinal.

Las **bacterias del GIT** pueden ser: de tipo **transitorio**, que son aquellas que se establecen y colonizan sin producir ningún tipo de enfermedad, pero que tienden a ser excluidas por competencia o por factores inmunológicos; y de tipo **residente**, que son las que se encuentran presentes de manera invariable durante semanas o meses en un lugar particular. Las bacterias de tipo residente se pueden clasificar como **perjudiciales** o **promotoras de la salud**, estas últimas pertenecen mayoritariamente a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (**Fig. 6**) (Romero Cabello, 2008) (Isolauri *et al.*, 2004). Así pues, el equilibrio entre los grupos microbianos intestinales (microorganismos no patógenos vs. microorganismos patógenos) es esencial para el mantenimiento de la salud, pero una vez interrumpido este equilibrio, la relación entre el hospedador y los microorganismos puede llegar a una **condición patológica** (de Almada *et al.*, 2015).

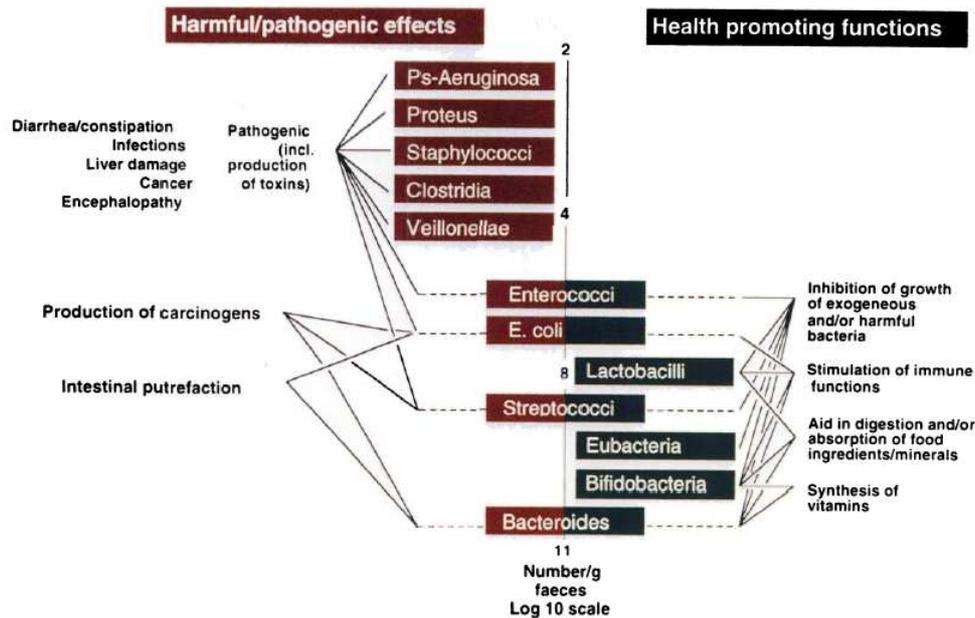


Figura 6. Esquema general de la composición y los efectos en la salud de la microbiota intestinal humana predominante (Adaptado de Gibson *et al.*, 1995).

De esta manera, el correcto equilibrio entre las poblaciones microbianas presentes en el **GIT**, permite el desempeño de importantes funciones metabólicas, inmunológicas y de protección intestinal en el individuo sano.

1.1.2.1. Metabolismo de nutrientes.

La dieta suministra nutrientes tanto para el **hospedador** como para las **bacterias del GIT**, pero muchas de las enzimas necesarias para romper la estructura de los carbohidratos de origen vegetal (almidón resistente, celulosa, hemicelulosa, inulina, azúcares y alcoholes no absorbidos), no están codificadas en el genoma de los mamíferos. La **microbiota intestinal** tiene una amplia colección de enzimas degradativas y exhiben un rango amplio de capacidades metabólicas (Flint *et al.*, 2012). La fermentación de estos carbohidratos no digeribles da como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta (**SCFAs**) como el butírico, propiónico y acético, los cuales son fuentes de energía tanto para las células epiteliales, como para los microorganismos. El **butírico** es, en su mayor parte, metabolizado por el epitelio intestinal, aportándole entre un 60 y 70% de toda la energía necesaria; el **propiónico** es transportado hasta el hígado y el **acético** pasa a la circulación periférica, llegando al músculo esquelético y cardíaco (Pryde *et al.*, 2002).

Los **SCFAs** que se producen, desempeñan funciones importantes tanto a nivel **local** (intestinal), como **sistémico**; y actualmente se considera que pueden contribuir a la función barrera o protectora del epitelio intestinal; modificar el metabolismo de los ácidos biliares y los lípidos (Sanz *et al.*, 2004).

- *Función barrera o protectora del epitelio intestinal.* La acidificación del medio debida a la fermentación de los carbohidratos no digeribles, inhibe el desarrollo y la colonización de patógenos, así como la producción de elementos tóxicos derivados de su metabolismo (amonio, compuestos fenólicos, aminas, etc.). Además, el ácido butírico constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, estimulando la proliferación celular y regulando la apoptosis y la composición del moco. De este modo, contribuyen globalmente a estabilizar la **función barrera** del intestino (Hooper *et al.*, 2002).

- *Modificación del metabolismo del nitrógeno.* La acidificación del medio también favorece la protonación del amoniaco a ion amonio, limitando su difusión a la sangre y aumentando su excreción fecal, disminuyendo de esta manera la uremia (Tungland *et al.*, 2002).

- *Absorción de minerales.* Los **SCFAs** favorecen la absorción de minerales (calcio, magnesio y hierro), que son clínicamente relevantes para el tratamiento y prevención de ciertas enfermedades, como la osteoporosis y la anemia. Los efectos se producen como consecuencia de la reducción del pH luminal, aumentando la solubilidad de los minerales y favoreciendo la absorción por difusión pasiva (Teitelbaum *et al.*, 2002).

- *Metabolismo de los lípidos y ácidos biliares.* El ácido propiónico disminuye la expresión de enzimas lipogénicas en el hígado, las cuales están implicadas en la síntesis *de novo* de triglicéridos y ácidos grasos, reduciendo así los niveles de colesterol (Sanz *et al.*, 2004). Por otro lado, la acidificación del medio intestinal inhibe la transformación de las sales biliares primarias en secundarias, que se consideran un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon (Tungland *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Protección antimicrobiana.

La estabilidad en la **microbiota intestinal** de un individuo en condiciones normales se debe al **equilibrio** que se mantiene entre las especies residentes y esta condición ejerce un fuerte efecto protector frente a la colonización por patógenos oportunistas. Uno de los mecanismos más simples de protección antimicrobiana en el **GIT** es la presencia de una **bicapa de moco**, constituido por glicoproteínas de mucina, las cuales mantienen los

microorganismos del lumen lejos del contacto epitelial (Jandhyala *et al.*, 2015). La capa interna es densa y no contiene ningún tipo de microorganismo, mientras que la capa externa es más dinámica y provee glicanos como fuente de nutrientes para los microorganismos (Johansson *et al.*, 2011).

La **microbiota intestinal** ejerce su función de protección contra patógenos compitiendo por nutrientes y receptores. La adherencia de las bacterias al epitelio intestinal y al moco es propia de cada cepa, por lo que algunas bacterias pueden unirse al epitelio intestinal, ya sea de forma **específica o inespecífica**, bloqueando de esta manera la unión de patógenos y potenciando el efecto barrera. Los mecanismos de adhesión **inespecíficos** están ligados a interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, por contra, los mecanismos **específicos** de adhesión, dependen de interacciones ligando-receptor mediante polisacáridos extracelulares, proteínas y/o ácidos teicoicos. (Natividad *et al.*, 2013).

1.1.2.3. Inmunomodulación.

Tanto el sistema inmune **innato** como el **adaptativo**, son dependientes de una óptima colonización temprana; de ahí la importancia que tienen tanto la alimentación que recibe el bebé al nacer, como la salud y la alimentación de la madre durante el embarazo, ya que son estos dos factores los que determinarán, de forma **muy importante**, la composición de la **microbiota inicial** del bebé (Natividad *et al.*, 2013).

La **mucosa intestinal** es la mayor interfaz entre el sistema inmunitario y el medio externo, lo que hace comprensible que la microbiota intestinal juegue un papel importante en el desarrollo y maduración del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (**GALT**, *Gut associated lymphoid tissue*). El **GALT** representa el mayor órgano del sistema inmune humano y contiene más del 80% de las células inmunocompetentes de un adulto sano (alrededor del 60% de las inmunoglobulinas producidas diariamente se secretan en el **GIT**). La respuesta inmunitaria característica de la mucosa intestinal es la producción de inmunoglobulinas A secretoras (**sIgA**), que son producidas por las células plasmáticas y posteriormente transportadas a través de la capa de células epiteliales hasta la luz intestinal. Una vez allí, reaccionan con antígenos específicos impidiendo la interacción física de los agentes nocivos con la superficie de la mucosa, previniendo de esta manera las reacciones inflamatorias que podrían dañar su integridad (**Fig. 7**). Por tanto, la **microbiota intestinal** determina el desarrollo del

sistema inmunitario actuando como regulador esencial de la respuesta inmune (Jandhyala *et al.*, 2015; Natividad *et al.*, 2013; Ruiz Álvarez *et al.*, 2010).

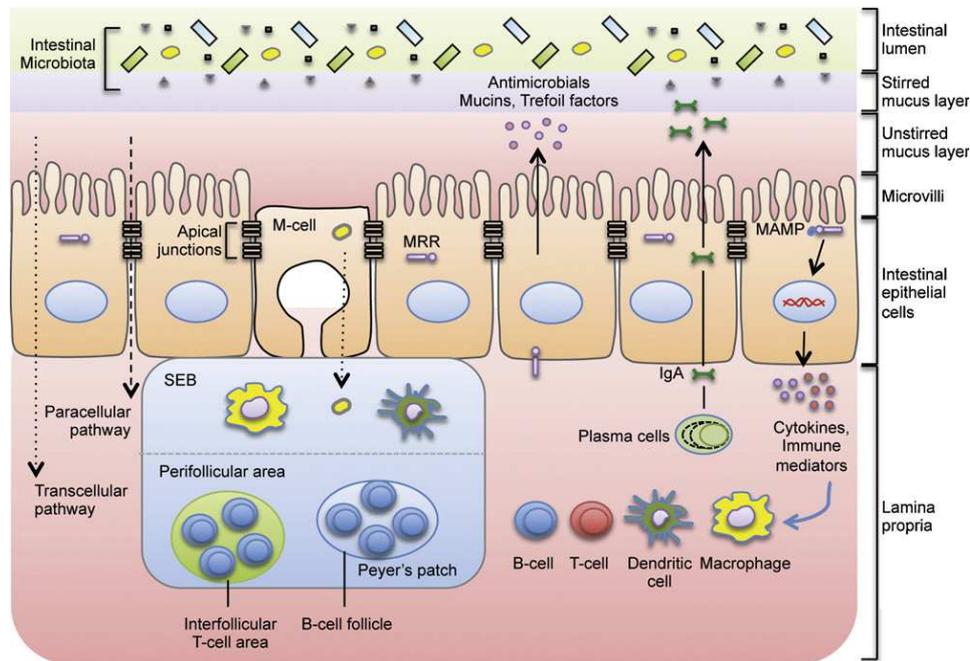


Figura 7. La barrera intestinal. La figura muestra los diferentes niveles de defensa con los que está equipada para evitar la translocación luminal de un antígeno (Adaptado de Natividad *et al.*, 2013).

1.1.3 Métodos de estudio de la composición de la microbiota intestinal.

Se ha descrito al **GIT** como un ecosistema complejo y dinámico, el cual contiene una **colección diversa** de microorganismos (Gerritsen *et al.*, 2011). Para poder determinar, caracterizar y analizar estas comunidades microbianas, existen diversos métodos que pueden ser divididos fundamentalmente en: **métodos dependientes** e **independientes** de cultivo. Un análisis de datos de estos métodos pueden proporcionar información sobre la **riqueza** (número de especies) y la **regularidad** (abundancia relativa de cada especie) de diferentes microorganismos en una muestra, representando de esta manera la **diversidad microbiana** (Gerritsen *et al.*, 2011). Estos cálculos de diversidad microbiana se pueden realizar tanto dentro de una única muestra (**alfa-diversidad**) determinando que y cuántos microorganismos hay en la muestra; como entre diferentes muestras (**beta-diversidad**), observando que tan diferentes son entre ellas. Asimismo, se han desarrollado métodos adicionales para evaluar los roles microbianos y funciones como lo son la metatranscriptómica, metabolómica y el uso de modelos gnotobióticos (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016).

1.1.3.1. Métodos dependientes de cultivo.

Tradicionalmente, la **composición** de la microbiota intestinal se ha analizado mediante el empleo de técnicas de cultivo, las cuales utilizan **medios diferenciales** para seleccionar poblaciones específicas de bacterias que se basan en los requerimientos metabólicos. Entre los medios de cultivo más empleados para el aislamiento de las principales poblaciones de la **microbiota intestinal** se encuentran: de Man Rogosa & Sharpe (MRS), agar Tomato y Rogosa para los lactobacilos; MRS modificado o Medio selectivo para *Bifidobacterium* (BSM), Agar clostridial reforzado para *Clostridium* y McConkey para enterobacterias (Montesi *et al.*, 2005; Palomar *et al.*, 2014). Aunque estos métodos son económicos y reproducibles, están limitados en su capacidad para distinguir entre diferentes grupos filogenéticos bacterianos y no se consigue recuperar la totalidad de los microorganismos presentes. Se estima que alrededor del **80%** de la microbiota intestinal **no puede ser cultivada** bajo condiciones de laboratorio, debido a sus exigentes requerimientos nutricionales (Eckburg *et al.*, 2005).

Así pues, la diversidad de la microbiota del **GIT** está influenciada **directamente** por el método que se emplea para estudiarla, por ejemplo, empleando tanto técnicas dependientes como independientes de cultivo, existe una mayor recuperación del *phylum Firmicutes*; por el contrario, el uso de métodos moleculares en comparación con los métodos que implican el aislamiento en medios de cultivo, permite una mayor recuperación del *phylum Bacteroidetes* (de Almada *et al.*, 2015).

1.1.3.2. Métodos independientes de cultivo.

Considerando las limitaciones de los métodos dependientes de cultivo, se han desarrollado **técnicas moleculares** que tienen la ventaja de proporcionar una visión más representativa de la microbiota intestinal y su diversidad (West *et al.*, 2015).

1.1.3.2.1. Métodos de "next generation sequencing" (NGS).

Los estudios filogenéticos basados en la secuenciación del gen 16s rARN, permiten estudiar la composición de la microbiota. Dicho gen, tiene como función la iniciación y extensión de la síntesis de proteínas. Los genes rARN están **altamente conservados** en las especies bacterianas, si bien contienen regiones lo suficientemente variables para producir una señal filogenética, útil para poder realizar una identificación bacteriana. De los tres genes bacterianos del rARN, el gen del **16S** es pequeño (tamaño de 1,5 Kb) y

altamente conservado. Posee 9 sitios **hipervariables**, suficientes para diferenciar especies bacterianas y que pueden ser relativamente fáciles de amplificar mediante **PCR** empleando los cebadores adecuados (Woese, 1987). Las regiones comunes para la identificación y clasificación bacteriana basados en el gen **16S rARN** son la V3, V4, V6 y V8 (Jandhyala *et al.*, 2015). El empleo de esta técnica facilita la caracterización y el seguimiento de gran variedad de grupos microbianos, incluso de **bacterias no cultivables**, pudiendo conocer en profundidad la población bacteriana (Fraher *et al.*, 2012).

En cuanto a biodiversidad bacteriana se refiere, para **muestras complejas** (por ejemplo, muestras de heces), actualmente se emplean técnicas de secuenciación basadas en **NGS**, que permiten obtener una mayor cantidad de información aunque de peor calidad, ya que el fragmento obtenido es más pequeño.

1.1.3.2.2. Métodos de huella dactilar ("fingerprinting").

Los métodos de **huella dactilar** generan un perfil de **ADN** de las comunidades microbianas en cada muestra y posteriormente permite una comparación entre las muestras, basada en las diferencias observadas entre sus "huellas" genéticas (Sekirov *et al.*, 2010).

-Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD): son fragmentos de ADN procedentes de la amplificación por PCR de segmentos aleatorios de ADN genómico mediante el uso de un **único cebador**, generalmente de 10-20pb. La amplificación se lleva a cabo mediante una PCR y los fragmentos amplificados son separados realizando una electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose de esta manera un patrón de bandas característico. Debido a su sensibilidad a las condiciones de reacción, la principal desventaja de esta técnica es su **baja reproducibilidad**, por lo que se requieren protocolos experimentales estandarizados. Los RAPD requieren generalmente ADN de alto peso molecular purificado y es necesario trabajar cuidadosamente, ya que al emplearse cebadores aleatorios cortos que son capaces de amplificar fragmentos de ADN en una gran variedad de organismos, se pueden contaminar las muestras (Kumari *et al.*, 2014).

- Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE): son una serie de herramientas que permiten comparar los fragmentos de ADN en una muestra. Básicamente son formas de

electroforesis, las cuales usan un gradiente de temperatura o químico (mezcla de urea y formamida) respectivamente, para desnaturalizar las muestras a medida que se mueven a través de un gel de agarosa o poliacrilamida, según la técnica empleada. Las muestras analizadas por estos métodos, corresponden a fragmentos de ADN previamente **extraídos directamente** de comunidades microbianas, sin necesidad de realizar pasos previos de pre-enriquecimiento y luego una amplificación por PCR. De acuerdo a su contenido en guanina y citosina (**GC**), los productos de PCR migran en el gel y se observan unos patrones de bandas diferenciados, que representan la diversidad microbiana en una muestra. Estas técnicas pueden ser usadas para analizar la comunidad total o específica de poblaciones y/o grupos dentro de una muestra, asimismo han sido usadas para el estudio de la complejidad y dinámica de la microbiota fecal humana. Sin embargo la **principal limitación** es la detección de moléculas heteroduplex, que pueden resultar en una sobre-estimación de la comunidad microbiana real y por tanto llegar a conclusiones imprecisas (de Almada *et al.*, 2015).

- **T-RFLP**: es una técnica basada en la **fragmentación** de los amplicones del gen **16S rARN** por el uso de endonucleasas de restricción, que originan un fragmento de longitud variable marcado con fluorescencia terminal. Se usa principalmente para determinar la diversidad de comunidades microbianas, para realizar comparativas y también para evaluar la variabilidad en la microbiota intestinal. Esta técnica es semicuantitativa, rápida y barata, pero su principal limitación es que no permite la identificación filogenética (Fraher *et al.*, 2012).

-**RISA**: es una técnica relativamente nueva, usada para el análisis de la microbiota (Roger *et al.*, 2010). El método implica la amplificación mediante PCR, de un **espacio intergénico** entre los genes del **16S** y **23S rARN**, usando un cebador marcado con fluorescencia en el extremo 5' que puede ser detectado por un secuenciador de capilar, produciendo una huella de los espacios intergénicos ribosomales (**RIS**) creados por el grado de heterogeneidad de longitud en la muestra (Sekirov *et al.*, 2010). Aparte de ser una técnica rápida y barata, tiene una buena resolución y límite de detección. Sin embargo, la aplicación del método puede estar limitada a la **ausencia** de una base de datos extensiva que comprenda la **taxonomía RIS** para microorganismos que habitan el **GIT** (de Almada *et al.*, 2015).

1.1.3.2.3. Sondas de hibridación.

Estas técnicas se basan en la **hibridación** de sondas específicas de oligonucleótidos, con secuencias diana sobre el ADN bacteriano, siendo complementarias a grupos y/o especies taxonómicas específicas. Incluyen técnicas como la FISH, qPCR y microarrays de ADN. Los **principales** usos de las sondas de hibridación son la identificación filogenética y la cuantificación de las especies presentes en la muestra (Fraher *et al.*, 2012).

-Microarrays de ADN: La tecnología del microarray de ADN es una poderosa herramienta con alto rendimiento y tiene el potencial de generar información acerca de la patogénesis de diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas. Muestra una buena relación coste-beneficio, buenos niveles de sensibilidad y selectividad, y requiere poco tiempo para el desarrollo del análisis. Pero uno de sus principales inconvenientes es el bajo límite de detección y la incapacidad para identificar nuevas especies y cepas (Sekirov *et al.*, 2010).

-FISH y qPCR (PCR cuantitativa): La técnica **FISH** usa sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia, diseñadas para hibridarse con secuencias únicas del gen **16S rARN** de los grupos bacterianos a estudiar. Dependiendo de las sondas diseñadas, la FISH puede ser usada para amplios grupos de bacterias (clasificación a nivel de *phylum*) o puede ser más específica (clasificación a nivel de género o especie). Otra técnica que se puede usar para detectar grupos específicos de bacterias en una mezcla compleja es la qPCR, donde las sondas de oligonucleótidos utilizadas también tienen un marcaje especial. Así como en la FISH, los cebadores empleados en la qPCR pueden ser diseñados para ser específicos o generales, según sea el caso. Sin embargo, en algunos casos los cebadores empleados para amplificar un grupo de bacterias, también amplifican para otros miembros relativamente cercanos. La **FISH** y la **qPCR** son técnicas que pueden usarse en combinación para confirmar los resultados obtenidos (Sekirov *et al.*, 2010)(de Almada *et al.*, 2015).

1.2. Disbiosis y patogenicia.

El **estado normal** de una microbiota intestinal se define como el **predominio** de los microorganismos beneficiosos sobre los potencialmente perjudiciales, lo que se denomina **normobiosis** (homeostasis) (Doré, 2010). Por el contrario, denominamos

disbiosis cuando ocurre un desequilibrio en la composición taxonómica de la microbiota intestinal. Esta pérdida del equilibrio se puede ver **influenciada** por varios factores, como lo son la administración frecuente de antibióticos, la dieta, la edad y factores tanto medioambientales como genéticos (de Almada *et al.*, 2015).

Diversas líneas de investigación sugieren que en adultos, una microbiota intestinal con una **baja diversidad** puede tener consecuencias negativas para la salud y asimismo estas alteraciones pueden jugar un papel importante en la **patogénesis** de un amplio rango de enfermedades (**Fig. 8**) (de Almada *et al.*, 2015). Asimismo, se ha demostrado que las bacterias comensales son capaces de ejercer acciones biológicamente cruciales en los tejidos del hospedador que comprenden desde regulaciones metabólicas hasta inmunomoduladoras. Cualquier **desequilibrio** entre el hospedador y las bacterias comensales conduciría al paso del contenido luminal a los tejidos subyacentes y por tanto al torrente sanguíneo. De esta manera, se estaría provocando una activación de la respuesta inmune y la posterior inflamación intestinal, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades que incluyen diarrea asociada a antibióticos (**AAD**), enterocolitis infecciosa (**NEC**), enfermedad inflamatoria intestinal (**IBD**), síndrome de intestino irritable (**IBS**), intolerancias alimentarias (**celiaquía**), manifestaciones atópicas (**alergias**), trastornos neurológicos (**autismo**), entre otros (Lin *et al.*, 2017).

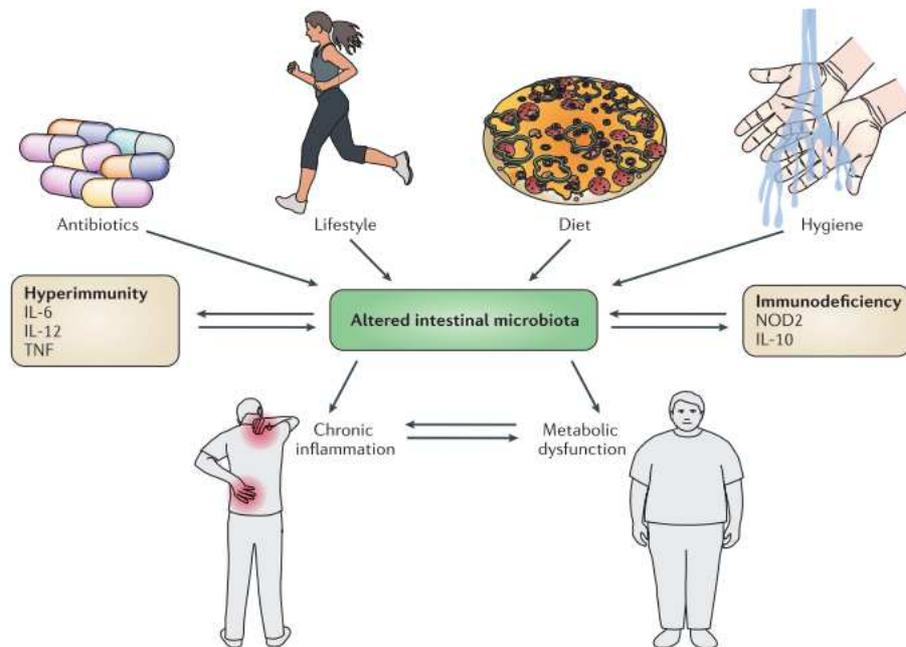


Figura 8. Factores que pueden generar una alteración en la composición de la microbiota intestinal (Sommer *et al.*, 2013).

- Diarrea asociada a antibióticos (AAD).

La **importancia del equilibrio** de la microbiota del **GIT** se observa rápidamente cuando se tienen en cuenta algunas de las secuelas perjudiciales que deja el tratamiento con antibióticos, siendo la diarrea asociada a antibióticos (**AAD**) una de las complicaciones más comunes por el uso de estos medicamentos. Las secuelas de la administración de antibióticos, a menudo, duran mucho tiempo después de la interrupción o finalización del tratamiento, lo que sugiere que se induce una **disfunción prolongada** en el balance de la microbiota intestinal del hospedador. Varios estudios, tanto en modelos animales como en humanos, han demostrado los **efectos adversos** que tiene la toma frecuente de antibióticos sobre la microbiota intestinal (Sekirov *et al.*, 2010). Se cree que los mecanismos por los cuales los antibióticos causan diarrea se deben a **efectos directos** sobre la mucosa intestinal y a la reducción de la concentración de microorganismos anaerobios que forman parte de la microbiota del **GIT**. Esta disminución de anaerobios genera una reducción del metabolismo de los carbohidratos, que a su vez provoca diarrea osmótica, disminución de la tasa de descomposición primaria de ácidos biliares y un crecimiento excesivo de microorganismos patógenos (Varughes *et al.*, 2013).

Existen **dos formas de AAD**. Una de ellas es la **diarrea asociada a *Clostridium difficile***, que constituye del 20 a 30% de los casos y es la que tiene una evolución y consecuencias con mayor trascendencia clínica. El segundo tipo es la **diarrea simple asociada a antibióticos**, en el que se han involucrado microorganismos como *Clostridium perfringens*, *Klebsiella oxytoca*, y algunas especies de *Candida* y *Salmonella* (Weitz *et al.*, 2013).

En el contexto clínico, todos los estudios señalan los **peligros inherentes** al uso excesivo de antibióticos, ya que la administración de estos medicamentos crea una **perturbación** en las comunidades microbianas intestinales, teniendo el potencial de afectar negativamente la función de múltiples sistemas y órganos del hospedador, durante un período prolongado. Este hecho ocasiona, que la comunidad microbiana tarde tiempo en regresar a su **status quo inicial**. Asimismo, la exposición de la microbiota intestinal a diversos antibióticos es probable que genere el desarrollo de **diversos patrones de resistencia**, lo que puede **impedir** el retorno del equilibrio después de la administración repetida del mismo tratamiento (Sekirov *et al.*, 2010) (Quigley, 2013).

La **coadministración de probióticos** a pacientes que reciben tratamiento con antibióticos, ha mostrado una reducción de la incidencia de diarrea asociada al tratamiento en niños y en adultos. Se han evaluado diferentes cepas, incluyendo *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y la levadura *Saccharomyces boulardii*. Asimismo, dos estudios de meta-análisis han concluido que los **probióticos** pueden ser usados para **prevenir la AAD** (Gill *et al.*, 2004).

- Enterocolitis infecciosa.

Se han reportado **diferencias en la microbiota intestinal** de los recién nacidos pretérmino diagnosticados de enterocolitis necrotizante (**NEC**), respecto a los que no la han padecido, tanto en el momento del diagnóstico como antes del desarrollo clínico. La microbiota comensal, los patógenos y los estímulos inflamatorios inducen una respuesta exagerada de **citoquinas proinflamatorias** en las células epiteliales intestinales comparadas con las del adulto, justificando de esta manera la susceptibilidad de los prematuros para esta complicación. En todos los bebés pretérmino se observa una **baja diversidad microbiana** y antes de desarrollar la NEC se comprueba un sobrecrecimiento del *phylum Proteobacteria*, comparado con los recién nacidos que no la padecen. Esta condición sugiere que la composición microbiana puede ser un **marcador** de esta enfermedad (Stewart *et al.*, 2012).

- Enfermedad inflamatoria intestinal.

En algunas situaciones, cuando se altera la **interacción entre la microbiota y el hospedador**, el cuerpo comienza a reconocer los constituyentes normales de la microbiota como **enemigos**, generando una respuesta inflamatoria inapropiada que en opinión de algunos, puede conducir a condiciones tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (**IBD**) (Quigley, 2013). Las IBD incluyen, la enfermedad de Crohn (**CD**) y la colitis ulcerosa (**UC**). La **CD** se caracteriza por una inflamación que puede afectar cualquier parte del **GIT**, causando una inflamación discontinua del revestimiento epitelial, con una formación de úlceras profundas; mientras que la **UC** es una afección inflamatoria crónica que sólo afecta al colon y el recto y se caracteriza por una inflamación mucosa continua y formación de úlceras superficiales (Gerritsen *et al.*, 2011)(de Almada *et al.*, 2015). Durante la última década, diversos estudios, mediante el uso de métodos independientes de cultivo, han comparado la microbiota intestinal entre

personas que padecen IBD e individuos sanos y se ha observado que la **disbiosis** en esta microbiota tiene un papel en la patogénesis de esta enfermedad (Gerritsen *et al.*, 2011). Hasta el momento, los cambios observados, a nivel de *phylum*, en pacientes con IBD no han sido del todo consistentes, pero en general se ha observado una **disminución de la diversidad microbiana** y la estabilidad de la microbiota intestinal (Power *et al.*, 2014). Se ha reportado una disminución de comunidades microbianas pertenecientes al *phylum Firmicutes*, la cual en algunos casos coincide con un incremento del *phylum Bacteroidetes* y el de anaerobios facultativos como *Enterobacteriaceae* (Hansen *et al.*, 2012). Además, Joossens *et al.* en 2011, identificaron un conjunto de cinco especies bacterianas que caracterizaron la disbiosis predominante en pacientes con **CD** comparado con los individuos sanos. Entre estas cinco especies, se encuentra en bajas proporciones a *Dialister invisus*, una especie no caracterizada del grupo XIVA de *Clostridium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* y por el contrario una alta proporción de *Ruminococcus gravus* (Joossens *et al.*, 2011). De estas especies, *F. prausnitzii* se ha relacionado por tener propiedades anti-inflamatorias y ser menos abundante en pacientes con **CD** que en individuos sanos (Sokol *et al.*, 2009). La microbiota intestinal de los pacientes con **IBD** produce cantidades reducidas de **SCFAs**, en particular butirato, mientras que se observa un aumento de las bacterias sulfato-reductoras (Gerritsen *et al.*, 2011). La importancia de las interacciones microbiota-hospedador en el **IBD**, también se apoya en los diferentes estudios genéticos que existen hasta el momento, los cuales han identificado una serie de cambios en los genes que codifican las moléculas implicadas en el reconocimiento bacteriano, la interacción hospedador-bacteria y la cascada inflamatoria resultante (van Limbergen *et al.*, 2011). Los cambios observados a nivel funcional y de composición en pacientes con **IBD**, sugieren que la microbiota intestinal juega un papel importante en la causa y patogénesis de esta enfermedad. Pero hasta la fecha, no está del todo claro si la disbiosis es una causa directa debida a la inflamación producida por la **IBD**, o simplemente es el resultado de un ambiente desequilibrado en el GIT (Gerritsen *et al.*, 2011).

- Síndrome de intestino irritable.

El **IBS** es un trastorno funcional del intestino que se caracteriza por dolor o molestia abdominal recurrente, movimientos intestinales irregulares y alteración en los patrones intestinales, tales como estreñimiento o diarrea (Gerritsen *et al.*, 2011). En muchos estudios, los pacientes con **IBS** han sido clasificados en diferentes subtipos, basados en

los criterios de Roma IV para el diagnóstico de este síndrome: IBS con diarrea predominante (**IBS-D**), IBS con estreñimiento predominante (**IBS-C**), IBS con patrones de intestinales alternados (**IBS-A**) o IBS donde los patrones no pueden ser clasificados dentro de ninguna de las categorías anteriores (**IBS-U**) (Domingo J., 2017); y en los diferentes grupos se han observado cambios en la composición de la microbiota comparado con individuos sanos (Gerritsen *et al.*, 2011). En particular, los pacientes con **IBS-D** han sido asociados con niveles significativamente altos de *Enterobacteriaceae* y niveles bajos de *F. prausnitzii* vs. individuos sanos, lo que sugiere un desequilibrio de bacterias intestinales oportunistas y potencialmente perjudiciales (Carroll *et al.*, 2012).

Este síndrome puede ser difícil de diagnosticar, debido a la falta de marcadores biológicos o patogénicos (Power *et al.*, 2014). Aunque se contempla que existen diversos factores implicados en el desarrollo del **IBS** que juegan un papel importante, que incluyen la mala fermentación de ingredientes que se encuentran en los alimentos, la composición de la microbiota intestinal, disfunción motora y sensorial intestinal, mecanismos inmunes, factores psicológicos y deterioro en la comunicación del eje intestino-cerebro (MGB) (Power *et al.*, 2014).

A pesar de que la fisiopatología del **IBS** no está del todo comprendida, lo que sí está claro es que existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre personas sanas vs. personas que padecen esta patología. Se ha observado un incremento en la relación *Firmicutes:Bacteroidetes*, existiendo una reducción de dos géneros específicos del *phylum Bacteroidetes* (*Bacteroides* y *Alistipes*) (Jeffery *et al.*, 2012). Sin embargo, así como ocurre con la **IBD**, no es posible decir con certeza si las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal observada en los pacientes con **IBS** son la causa de la enfermedad o simplemente el resultado de la disrupción de la motilidad del intestino u otra característica del **IBS** (Power *et al.*, 2014).

- Obesidad.

La **obesidad** es una enfermedad compleja caracterizada por el exceso de acumulación de grasa corporal y se ha propuesto que cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden ser una posible causa de esta enfermedad (Million *et al.*, 2013). Varios mecanismos se han propuesto para explicar la habilidad de la microbiota del **GIT** para influenciar esta enfermedad, los cuales incluyen:

(1) **alteraciones en la permeabilidad intestinal** con un aumento en la translocación de productos bacterianos como el lipopolisacárido (**LPS**), dando como resultado un nivel bajo de inflamación sistémica crónica (Mizock, 2015). La obesidad y su desorden metabólico asociado, **diabetes tipo 2**, se relacionan generalmente, con una inflamación crónica de grado bajo y el LPS bacteriano al ser un componente altamente inflamatorio, se considera como un posible iniciador de este deterioro metabólico. En estudios en animales y humanos que consumen una dieta alta en grasa, se han detectado niveles plasmáticos de LPS altos, por lo que se cree que, o bien el LPS se toma con las grasas de la dieta en forma de quilomicrones, o bien el LPS alcanza la circulación porque el intestino es más permeable, debido a la ruptura de las proteínas de unión (*tight junction*) (Power *et al.*, 2014).

(2) la capacidad de los SFCAs, como el acetato y propionato, para señalar a través de receptores epiteliales intestinales (Mizock, 2015). Se ha descrito que estos dos SFCAs son ligandos de los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs): Gpr41 y Gpr43, expresados fundamentalmente por las células enteroendocrinas del epitelio intestinal. Se ha encontrado que los GPCRs inhiben la expresión del péptido YY, un factor producido por las células enteroendocrinas y el sistema nervioso central y periférico que normalmente tiene efecto anorexígeno, acelera en tránsito intestinal y reduce la extracción de energía de la dieta (Revisi *et al.*, 2010).

(3) la recuperación calórica por algunos microorganismos de la microbiota del **GIT** que son más eficientes en la obtención de energía disponible de los alimentos (Mizock, 2015). La microbiota de personas obesas, proporciona al hospedador una mayor capacidad para recuperar energía a partir de la dieta, que la microbiota de los individuos no obesos. Por lo que una dieta rica en carbohidratos y reducida en proteínas y grasas produce una microbiota intestinal con **menos representación de Firmicutes**, lo contrario a lo que sucede en personas obesas (Million *et al.*, 2013; Power *et al.*, 2014).

Se ha descrito que ciertos *phylum* y clases de bacterias mejoran la **transferencia de calorías** de la dieta al hospedador, lo que conlleva cambios en el metabolismo del hospedador de las calorías que han sido absorbidas. Los microorganismos que se encuentran en el **GIT** fermentan los polisacáridos de la dieta a monosacáridos y SCFAs, esto permite la extracción de calorías de los polisacáridos no digeribles de la dieta. Uno de los mecanismos por el cual se puede afectar el metabolismo del hospedador es por la supresión del **fasting-induce adipocyte factor**, el cual es un inhibidor de la

lipoproteinlipasa, que contribuye a la acumulación de triglicéridos en adipocitos (Million *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Ley y *col.* en 2006 observaron que existe una abundancia relativa de *Firmicutes* y reducción de *Bacteroidetes*, tanto en estudios con animales como en humanos, pero investigaciones llevadas a cabo posteriormente, han obtenido resultados variables con respecto a los cambios de composición en la microbiota de personas obesas, no siendo posible confirmar los resultados obtenidos por este grupo. Esto sugiere que en lugar de cambios a nivel de *phylum*, existen cambios más sutiles en la composición de la microbiota intestinal asociados con el desarrollo de la obesidad. Asimismo es evidente que la ingesta (excesiva) de alimentos tiene una influencia sobre el peso del cuerpo (Gerritsen *et al.*, 2011).

Se han descrito altos niveles de algunas especies de *Lactobacillus* en pacientes obesos, específicamente un alto nivel de *L. reuteri* y bajos niveles de *L. casei/paracasei* y *L. plantarum* (Million *et al.*, 2013). De la misma forma, varios estudios han investigado la asociación entre especies bacterianas específicas y la obesidad, donde niveles de *F. prausnitzii* son significativamente más altos en dichos individuos. Este microorganismo, se ha identificado como uno de los miembros funcionales clave de la microbiota del **GIT** que más influyen en el metabolismo del huésped, responsable de una proporción significativa de fermentación de carbohidratos no absorbidos por el hospedador (Balamurugan *et al.*, 2010).

- Celiaquía.

La **enfermedad celiaca (CD)** es un desorden inflamatorio intestinal desencadenado por el consumo del **gluten**. La fase activa de la enfermedad se caracteriza por una proinflamación intestinal resultante de una respuesta inmune exagerada debido al consumo de gluten, junto con una mayor permeabilidad intestinal que puede favorecer el paso de antígenos lumenales a la submucosa (De Palma *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no está del todo claro si la alteración de la permeabilidad intestinal es una causa primaria o una consecuencia de la CD y también si esta alteración es inducida por el gluten en sí, por alteraciones de la microbiota o por la combinación de ambas. Hasta la fecha, el único tratamiento para la CD es la **completa exclusión** de granos y cualquier alimento que pueda contener gluten (de Sousa Moraes *et al.*, 2014).

Esta enfermedad es común tanto en niños como en adultos, aunque el conocimiento acerca de la microbiota intestinal de los adultos con **CD** es escasa, ya que no es a partir

del año 2012 cuando empiezan a realizarse estudios que caracterizan la microbiota en adultos con esta enfermedad. Un estudio realizado tanto en niños como en adultos, obtuvo como resultado una ligera diferencia respecto a los porcentajes de los principales *phylum* entre los pacientes y también un perfil más diverso en cuanto a la composición de la microbiota bacteriana a nivel duodenal. El *phylum Firmicutes* fue más abundante en personas adultas con **CD**, mientras que el *phylum Proteobacteria* estaba presente en niños con **CD**. Un *phylum* que compartían tanto adultos como niños con **CD**, pertenecían a *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. En cuanto a géneros bacterianos, los adultos tenían un mayor número de *Mycobacterium sp.* y *Methylobacterium sp.*, mientras que *Neisseria sp.* y *Haemophilus sp.* fueron más abundantes en niños con **CD** (de Sousa Moraes *et al.*, 2014). Por otro lado, un estudio realizado en niños observó que la microbiota intestinal de los pacientes celíacos tenían una mayor diversidad que los sujetos control, con una alta proporción del grupo *Bacteroides-Prevotella* y una relación significativamente reducida de bacterias Gram-positivas:Gram-negativas en pacientes con **CD**. Asimismo *Bifidobacterium*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lituseburense* y *F. prausnitzii* fueron menos abundantes en pacientes celíacos (De Palma *et al.*, 2010). El hecho de que el paciente tratado con dieta sin gluten presente una microbiota diferente a la del sujeto sano abre la investigación sobre un biomarcador de la enfermedad, así como la posible actuación terapéutica (de Sousa Moraes *et al.*, 2014).

-Alergias.

Este tipo de enfermedades son causadas por una exagerada y desequilibrada respuesta inmunológica al ambiente y a antígenos inofensivos (**alérgenos**). Aunque los factores genéticos son importantes en la patogénesis de este tipo de enfermedades, no puede explicarse el rápido incremento que han tenido durante los últimos años (de Almada *et al.*, 2015). En particular, las alergias se han incrementado en países desarrollados con el paso de los años y han sido atribuidas a cambios en el estilo de vida como el aumento del estrés, exposición a contaminantes, consumo de medicamentos y cambio en la nutrición (Abrahamsson *et al.*, 2015). Asimismo, la exposición a una baja diversidad de bacterias en los primeros días de vida, puede retrasar la maduración del sistema inmune de la mucosa, incrementando el riesgo de una respuesta inmune irregular, pudiendo ocasionar alguna enfermedad alérgica (**Hipótesis del exceso de Higiene**) (Thomas *et al.*, 2014). Bajo esta hipótesis, el hecho que países en vía de desarrollo tengan menos tasas de alergias puede ser debido al tamaño de las familias, un gran porcentaje de la

población viviendo en ambientes rurales con escasas condiciones sanitarias y el bajo uso de antibióticos (Clemente *et al.*, 2012).

Se han descrito diferencias en la microbiota intestinal temprana entre los lactantes que más tarde desarrollan una enfermedad alérgica vs. los que no. Algunos estudios han encontrado asociaciones entre bajas tasas de bifidobacterias o colonización de lactobacilos durante la infancia y posterior desarrollo de la alergia (Rodríguez *et al.*, 2015). Otros estudios, usando métodos dependientes de cultivo han concluido que una reducción de ciertos grupos de microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal, están correlacionados con los síntomas de alergia en la edad temprana, donde los niños alérgicos tenían menos niveles de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* y una mayor cantidad de *S. aureus* y *C. difficile*. Estudios recientes han indicado que una **alta diversidad de la microbiota del GIT** es más importante que la prevalencia de un grupo específico de microorganismos (Abrahamsson *et al.*, 2014). Sin embargo, existen inconsistencias entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios y grandes diferencias en la técnicas microbiológicas que han sido empleadas (Rodríguez *et al.*, 2015).

Asimismo, es importante tener en cuenta que los análisis de las muestras de heces reflejan la microbiota luminal del colon y no necesariamente la colonización del intestino delgado, donde se encuentra la mayor parte del sistema inmune intestinal (Rodríguez *et al.*, 2015).

-Autismo.

El trastorno del espectro autista (**ASD**) es un desorden complejo del desarrollo neuronal. Los principales signos y síntomas afectan la comunicación, las interacciones sociales y las conductas repetitivas. Hasta el momento, se conoce muy poco sobre las causas del autismo y no están del todo claras; se sabe que hay un **componente hereditario** muy importante, pero los genes involucrados no han sido, aún, totalmente identificados. También se ha planteado la hipótesis de que la microbiota está involucrada en las formas de aparición tardía (o regresiva) en este tipo de trastornos, el cual se presenta habitualmente en niños mayores de **18 meses**. Estas formas de aparición tardía están asociadas con una combinación de manifestaciones conductuales y gastrointestinales que incluyen hinchazón, malestar abdominal y alteración en los patrones intestinales (Collins *et al.*, 2012). El vínculo entre la microbiota intestinal y el autismo se apoya en las siguientes observaciones: 1) el inicio de la enfermedad a menudo sigue a la terapia

con antibióticos; 2) las anomalías gastrointestinales están a menudo presentes en el inicio del autismo y con frecuencia persisten; y 3) los síntomas del autismo, algunas veces, se han reducido por el tratamiento oral con vancomicina, con una posterior recaída debida al cese del tratamiento. Estas observaciones han sido apoyadas usando técnicas dependientes de cultivo y qPCR para identificar los perfiles de la microbiota presente en estos pacientes, indicando que ciertos grupos de *Clostridium* spp. estaban presentes en un número **10 veces mayor** en muestras de heces de niños con autismo vs. niños sanos. Asimismo se planteaba que no era coincidencia que la exposición a los antibióticos trimetropim/sulfametoxazol precediera al diagnóstico de autismo, ya que estos antibióticos no son efectivos contra *Clostridium* spp., proponiendo de esta manera que dichos medicamentos podrían favorecer un sobrecrecimiento de estos microorganismos, contribuyendo de esta manera al desarrollo del autismo (Sekirov *et al.*, 2010). Igualmente, se observó que la administración oral de vancomicina, medicamento activo contra microorganismos Gram positivos, incluido *Clostridium* spp., producía una mejora tanto a nivel gastrointestinal como conductual en los pacientes que recibían el tratamiento, sin embargo al cesar el tratamiento se producía una recaída en los pacientes tratados. Por lo tanto, se planteó que las esporas de los clostridios que permanecían vivas, eran las responsables de esta recaída (Sekirov *et al.*, 2010). Asimismo, mediante el uso de técnicas moleculares, un estudio encontró que un amplio rango de microorganismos, incluyendo varios grupos de *Clostridium* spp. y *Desulfovibrio* spp. son más comunes en heces de niños que sufren autismo comparados con los sujetos control (Collins *et al.*, 2012). Los *Desulfovibrio* son microorganismos reductores de sulfato y en gran parte son responsables de la anomalía en el metabolismo del azufre y comúnmente los pacientes con autismo, tienen bajos niveles de azufre en la sangre y alta excreción urinaria (Finegold *et al.*, 2012). También se han encontrado bajos niveles de *Bifidobacterium* spp. y de *Akkermansia muciniphila* (especie que puede predisponer una translocación bacteriana y favorecer una disfunción en el GIT) (L. Wang *et al.*, 2011). Estudios metagenómicos han observado una reducción del *phylum Bacteroidetes* (dando como resultado un incremento en la relación *Firmicutes:Bacteroidetes*) así como un incremento en bacterias del género *Sutterella* comparado con individuos sanos. Estos perfiles microbianos se asocian con una mala adsorción de los carbohidratos, planteando varias posibilidades con respecto a la disbiosis y las manifestaciones gastrointestinales y de comportamiento del autismo de aparición tardía (Williams *et al.*, 2012).

Una situación de normobiosis acompaña al estado de salud, por el contrario, una estructura anormal de la microbiota o disbiosis está asociada con el riesgo de enfermedades caracterizadas por una **baja diversidad microbiana intestinal** y asimismo una situación de inflamación intestinal (**Tabla 1**). La administración de **probióticos**, puede corregir este desequilibrio en la microbiota y de este modo, contrarrestar la inestabilidad inmunológica, mejorando de esta manera el curso de la enfermedad o consiguiendo su prevención (Power *et al.*, 2014).

Patología	Disbiosis ^a	Referencia
Enterocolitis necrotizante (NEC)	↑ <i>Proteobacteria</i> previo al inicio de la enfermedad	(Mai <i>et al.</i> , 2011; Y. Wang <i>et al.</i> , 2009).
Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)	↓ α diversidad ↓ <i>Bacteroides</i> y <i>Firmicutes</i> ↑ Gammaproteobacteria ↓ <i>Faecalibacterium praustitzii</i> ↓ Clostridia, Rumminococcaceae, <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> Presencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Fusobacterium</i>	(Michail <i>et al.</i> , 2012) (Hansen <i>et al.</i> , 2012) (Kostic <i>et al.</i> , 2014)
Síndrome de intestino irritable (IBS)	↑ Relación <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i> y <i>Alistipes</i>	(Jeffery <i>et al.</i> , 2012)
Obesidad	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> ↓ Relación <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(Ley <i>et al.</i> , 2006) (Pflughoeft <i>et al.</i> , 2012) (Balamurugan <i>et al.</i> , 2010)
Celiquía (CD)	↓ Relación bacterias Gram-positivas:Gram-negativas ↓ Proporción del grupo <i>Bacteroides</i> : <i>Prevotella</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Clostridium histolyticum</i> ↓ <i>Clostridium lituseburense</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(De Palma <i>et al.</i> , 2010)

Patología	Disbiosis ^a	Referencia
Alergias	↓ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i>	(Sjögren <i>et al.</i> , 2009)
	↓ <i>Bacteroides</i>	(Watanabe <i>et al.</i> , 2003)
	↑ <i>Clostridium difficile</i> ↑ <i>Staphylococcus aureus</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 2002)
Autismo	↓ <i>Bifidobacterium spp.</i>	(L. Wang <i>et al.</i> , 2011)
	↓ <i>Akkermansia muciniphila</i>	(Williams <i>et al.</i> , 2012)
	↑ <i>Clostridium spp.</i> ↓ <i>Desulfovibrio spp.</i>	(Finegold <i>et al.</i> , 2012)
	↑ Relación <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i>	
	↑ <i>Sutterella</i>	

Tabla 1. Cambios en la microbiota intestinal asociada a diversas enfermedades. ^a Alteraciones respecto a individuos sanos.

1.3. Eje intestino-cerebro.

Durante los último años, se han llevado a cabo investigaciones que han demostrado la **comunicación que existe entre el cerebro y el intestino**; mostrando de esta manera, que la microbiota intestinal juega un papel esencial en esta comunicación, llegándose incluso a definir como "**psicobiótico**" a los microorganismos vivos que cuando son ingeridos en cantidades adecuadas, producen un beneficio saludable en pacientes que padecen trastornos psiquiátricos (Patterson *et al.*, 2014). Recientemente, a la definición se han incluido a los prebióticos, ya que estimulan el crecimiento de la microbiota comensal. Aunque actualmente existen gran cantidad de estudios pre-clínicos que respaldan este concepto, los datos de ensayos clínicos son escasos, sin embargo, poco a poco el número de estudios clínicos va aumentando (Dinan & Cryan, 2017).

Las primeras evidencias de la relación entre el intestino y el cerebro datan de finales del siglo XIX, cuando William James y Carl Lange en 1880, proponen una de las primeras hipótesis de la comunicación bidireccional entre estos dos órganos, sugiriendo que el estímulo fisiológico desencadenaba una respuesta emocional y que el cerebro estaba reaccionando a la información recibida del cuerpo. Esta teoría fue bastante criticada y en los años siguientes, mediante el uso de modelos **animales gnotobióticos**, se demostró el impacto que tenía la microbiota intestinal en el comportamiento mediante la activación del mecanismo **inmuno-neural**. Sin embargo, no ha sido hasta el siglo XXI, que mediante estudios meta-genómicos se ha evidenciado el papel clave de la microbiota intestinal en funciones del sistema nervioso central (SNC), dando lugar al

concepto conocido como eje Microbiota-Intestino-Cerebro (**MGB axis**) (Cryan, 2016). Es por esto que las alteraciones en la interacción bidireccional intestino-cerebro se han relacionado con desórdenes del **GIT** y recientemente se han implicado como un posible mecanismo en la patofisiología de diversos desórdenes mentales incluidos autismo, enfermedad de Parkinson y desórdenes en el estado de ánimo (Mayer *et al.*, 2015). Asimismo, teniendo en cuenta que el ambiente intrauterino no es estéril, se podría especular que los metabolitos de la microbiota intestinal de la madre, posiblemente ejercen algún tipo de influencia en el desarrollo cerebral del feto. Sin embargo, la posibilidad de que la microbiota de la etapa pre y post-natal pueda afectar el desarrollo del cerebro aún no está clara, ya que no existe hasta el momento ningún estudio en humanos que caracterice el efecto de la microbiota materna en el desarrollo cerebral del feto y algún tipo de secuela de dicha modulación (Mayer *et al.*, 2015).

Para estudiar el efecto modulador de la microbiota intestinal en las **interacciones intestino-cerebro**, se han usado diferentes enfoques experimentales, como la manipulación de la microbiota con antibióticos, trasplante de microorganismos fecales y modelos de animales gnotobióticos. En 2004, el grupo de Sudo *et al.*, observó que la ausencia de microbiota en animales gnotobióticos podía tener un efecto significativo en la respuesta ante el estrés y que dicha alteración podía ser invertida parcialmente, por la colonización del intestino. Sin embargo, el uso de este tipo de modelos animales tiene ciertas limitaciones y es importante no realizar extrapolaciones a humanos (Mayer *et al.*, 2015).

En situaciones de estrés, el cerebro reacciona y envía señales a diversas partes del cuerpo incluyendo el intestino, donde se encuentran localizadas tanto células nerviosas como el 60% de las células inmunes. La señal enviada puede hacerse mediante diversas vías **directas** o **indirectas**, que incluyen la vía endocrina (cortisol), inmune (citoquinas) y neuronal (sistema nervioso entérico y nervio vago) (**Fig. 9**). En sentido inverso, la **microbiota intestinal** puede alterar los niveles circulantes de citoquinas y esto puede tener un impacto en las funciones del cerebro. Tanto el nervio vago como la modulación de los niveles de triptófano sistémico, están fuertemente implicados en la transmisión de la influencia de la microbiota intestinal al cerebro. Además, los SCFAs pueden tener propiedades neuroactivas e influir en la modulación del cerebro y el comportamiento (Dinan & Cryan, 2017).

Se ha descrito que la microbiota intestinal produce diversidad de **neurotransmisores** y **neuromoduladores**, metabolitos bioactivos que tienen un impacto en la salud mental

del hospedador y aunque solo algunos de estos se han logrado demostrar en estudios *in vivo*, podrían ser usados para el tratamiento de desórdenes del SNC, tales como la ansiedad o la depresión (Patterson *et al.*, 2014). Asimismo, se ha demostrado que el nervio vago y la señalización inmunológica están implicados en la comunicación entre el eje **MGB** (Cryan & Dinan, 2015). El ácido gama-aminobutírico (**GABA**) es el mayor neurotransmisor inhibitor del SNC de los vertebrados y tiene varias funciones fisiológicas, por ejemplo, efectos diuréticos y tranquilizantes; es hipotensivo; mejora la síntesis de proteína en el cerebro y su disfunción ha sido implicada en trastornos neurológicos. Cuando la concentración de GABA disminuye por debajo de un determinado umbral en el cerebro, pueden ocurrir varios trastornos que incluyen epilepsia, convulsiones y enfermedad de Parkinson (Cho *et al.*, 2007). Es por esto, que el GABA se ha llegado a clasificar como componente **bioactivo** en alimentos y medicamentos (Dhakal *et al.*, 2012).

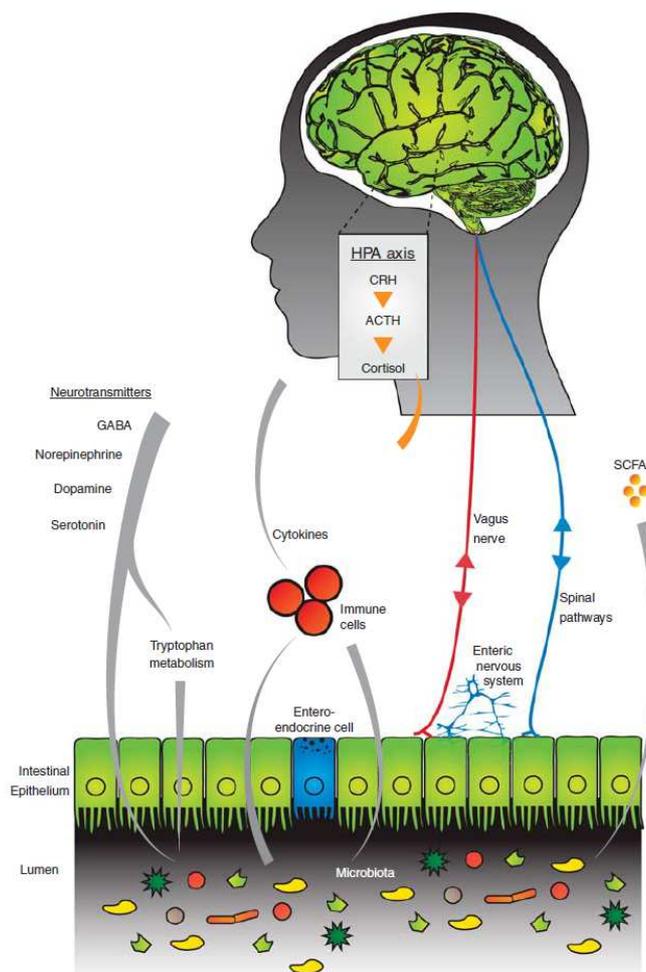


Figura 9. Mecanismos involucrados en la señalización entre el eje microbiota-intestino-cerebro (MGB) (Adpatado de Cryan & Dinan, 2015).

Un gran número de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, hongos e incluso algunas levaduras son capaces de producir GABA, pero el grupo con mayor interés son las bacterias ácido lácticas (**BAL**), ya que aparte de producir unos altos niveles de GABA, también pueden ser usadas como ingredientes **bioactivos** en complementos alimentarios. Diversos grupos de investigación han encontrado que ciertas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de producir y secretar GABA, usando la misma vía biosintética que la empleada por el tejido neuronal, involucrando la conversión del glutamato por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa (**GAD**) y el cofactor fosfato de piridoxal (PLP) o vitamina B₆. La **GAD** es una enzima intracelular y su inducción para la posterior síntesis de GABA parece ser debida a una respuesta ante el estrés al ácido al que se ven sometidas las **BAL** y el proceso de descarboxilación, provee energía a la bacteria (Li & Cao, 2010). La capacidad de producir **GABA** por lactobacilos y bifidobacterias de origen humano está muy poco estudiada. De hecho, solo unas pocas cepas de *Bifidobacterium dentium*, *B. infantis*, *B. adolescentis* y *L. brevis* han mostrado su capacidad para producir **GABA** (Barrett *et al.*, 2012).

1.4. Alimentos funcionales.

La **manipulación** de la composición de la microbiota intestinal a través de la dieta constituye una **alternativa ideal** para fomentar las propiedades funcionales derivadas de ésta en beneficio del hospedador (Sanz *et al.*, 2004). Por ello, ha surgido un nuevo concepto de alimentación que además de aportar nutrientes, promueven específicamente la salud, los llamados **alimentos funcionales (AF)**. Los **AF** se han definido como "alimentos similares en apariencia a los alimentos convencionales, que con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente una o varias funciones del organismo, proporcionando un mejor estado de salud y bienestar". Asimismo, estos alimentos también ejercen un papel preventivo, ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades (European Commission, 2010).

Las estrategias desarrolladas para el diseño de **alimentos funcionales** orientados a manipular la microbiota del consumidor, se basan principalmente en **tres estrategias** que son (Sanz *et al.*, 2004):

- Adición de cepas seleccionadas (**probióticos**).
- Adición de ingredientes alimentarios no digeribles (**prebióticos**), que favorezcan el desarrollo de una microbiota deseable.
- Combinación de probióticos y prebióticos (**simbióticos**).

1.4.1. Probióticos.

La palabra **probiótico** proviene del griego que significa "a favor (pro) de la vida (biótico)" (un antónimo de la palabra antibiótico) (Hamilton-Miller *et al.*, 2003). Elli Metchnikoff es considerado el padre del concepto probiótico y en su libro "La Prolongación de la vida" (1907), propuso que las bacterias presentes en el colon jugaban un papel **esencial** en la vejez y en la enfermedad en adultos ("la muerte comienza en el colon"); él, creía que el consumo de *Lactobacillus* producía un impacto favorable sobre el tracto gastrointestinal, además de prevenir la putrefacción de los alimentos y disminuir a su vez, la actividad tóxica microbiana. Por este motivo, fue el **primero** en recomendar el consumo de microorganismos como cultivos vivos, en los alimentos (Mercenier *et al.*, 2003).

Posteriormente, Kollath en 1953, empleó este término para describir la recuperación de los pacientes que padecían malnutrición, mediante el uso de diferentes suplementos orgánicos e inorgánicos. Un año después, en 1954, Vergin propuso que el desequilibrio microbiano en el cuerpo causado por el tratamiento con antibióticos, podría restablecerse por una dieta rica en probióticos. Sucesivamente, Lilly y Stillwell en 1965, describieron los probióticos como sustancias producidas por un microorganismo, que estimulaban el crecimiento de otros microorganismos. Similar a esta definición, Sperti en 1971 y Fuji y Cook en 1973, describieron los probióticos como compuestos que estimulaban tanto el crecimiento microbiano, como una mejora en la respuesta inmune del hospedador. En 1974, Parker los definió como organismos y sustancias que contribuían al balance de la **microbiota intestinal**, definición que se asemeja a la descripción más reciente de los probióticos. Sin embargo, esta definición fue discutida por muchos autores, ya que el empleo de la palabra sustancia, podría incluir a los antibióticos. Así pues, a finales de los 80 y principios de los 90, surge un aumento de las definiciones de probióticos (**Tabla 2**); y aunque todos los autores estaban de acuerdo en que los probióticos incluían **microorganismos vivos**, Salminen y *col.*, en 1999 dieron su punto de vista, incluyendo bacterias no vivas en la definición. Actualmente y de acuerdo con la *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, la

palabra **probiótico** se define como microorganismos **vivos**, que administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos beneficiosos en el individuo (Vasiljevic *et al.*, 2008).

Existen **dos motivos principales** para el consumo de probióticos; el **primero**, es el uso en individuos sanos para mantener un estado saludable y disminuir el riesgo de enfermedad; y el **segundo**, es el uso de probióticos como modalidad de tratamiento/terapéutico dirigido a una enfermedad en concreto (Power *et al.*, 2014). Debido a la creciente demanda del consumo de alimentos saludables existen muchos estudios enfocados a entender las **propiedades favorables** de los probióticos en la salud humana, lo que genera que cada vez los conocimientos sean más detallados y extensos (Saarela *et al.*, 2000).

Year	Description	Source
1953	Probiotics are common in vegetable food as vitamins, aromatic substances, enzymes and possibly other substances connected with vital processes	Kollath
1954	Probiotics are opposite of antibiotics	Vergin
1955	Deleterious effects of antibiotics can be prevented by probiotic therapy	Kolb
1965	A substance secreted by one microorganism which stimulates the growth of another	Lilly and Stillwell
1971	Tissue extracts which stimulate microbial growth	Sperti
1973	Compounds that build resistance to infection in the host but do not inhibit the growth of microorganisms in vitro	Fujii and Cook
1974	Organisms and substances that contribute to intestinal microbial balance	Parker
1992	Live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving microbial balance	Fuller
1992	Viable mono- or mixed culture of live microorganisms which, applied to animals or man, have a beneficial effect on the host by improving the properties of the indigenous microflora	Havenaar and Huis int'Veld
1996	Live microbial culture or cultured dairy product which beneficially influences the health and nutrition of the host	Salminen
1996	Living microorganisms which, upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition	Schaafsma
1999	Microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host	Salminen, Ouwehand, Benno and Lee
2001	A preparation of or a product containing viable, defined microorganisms in sufficient numbers, which alter the microflora (by implantation or colonization) in a compartment of the host and by that exert beneficial health effect in this host	Schrezenmeir and de Vrese
2002	Live microorganisms that when administered in adequate amount confer a health benefit on the host	FAO/WHO

Tabla 2. Compilado de algunas definiciones de la palabra probiótico, por diversos autores, a lo largo de los años (Adaptado de Vasiljevic *et al.*, 2008).

1.4.1.1. Mecanismos de acción de los probióticos.

Los **probióticos** ejercen sus beneficios en el hospedador a través de diferentes mecanismos de acción: **1)** interferencia con bacterias patógenas compitiendo con nutrientes y sitios de adhesión, **2)** mejora de la función barrera del revestimiento epitelial, **3)** inmunomodulación y **4)** influencia en otros órganos del cuerpo a través del sistema inmune y la producción de neurotransmisores (como el GABA o la serotonina), síntesis de ácidos grasos conjugados o aporte de vitaminas mediante biosíntesis o acumulación (**Fig. 10**) (Sánchez *et al.*, 2016). Sin embargo, es importante resaltar que el mecanismo de acción de los probióticos es **multifactorial** y **cepa dependiente** (Power *et al.*, 2014).

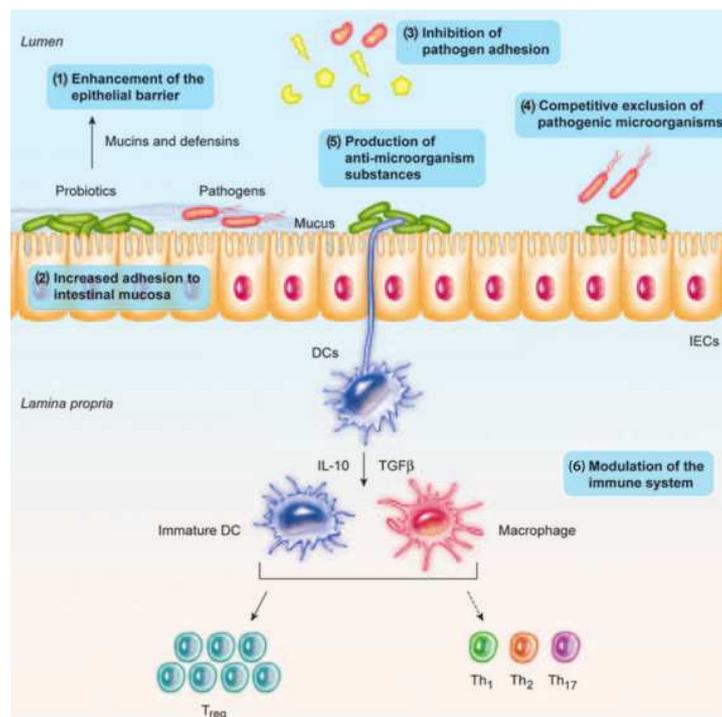


Figura 10. Esquema de los diferentes mecanismos por los cuales los probióticos pueden influir en la microbiota intestinal y/o inducir respuestas beneficiosas en el hospedador. (Adaptado de Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

- Incremento de adhesión a la mucosa intestinal e inhibición de adhesión de patógenos.

Una de las características más importantes cuando se define si un microorganismo es apto para ser empleado como probiótico es su **capacidad de adhesión**, ya que esta propiedad se relaciona con una mayor persistencia en el **GTI**, debido a la eliminación

por peristalsis o motilidad intestinal. De este modo, se incrementan las probabilidades de que el microorganismo tenga actividad inmunomoduladora o metabólica y que exista una mayor colonización por parte de la bacteria (Saarela *et al.*, 2000)(Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Las **BAL** presentan varias moléculas de superficie que están involucradas en su interacción con las células epiteliales intestinales (**IECs**) y el **moco**. Las **IECs** secretan **mucina**, una mezcla de glicoproteínas que es el principal componente del moco, evitando así la adhesión de bacterias patógenas (Collado *et al.*, 2005). Además, el bloqueo de los receptores de membrana por las proteínas de superficie (**S-layer**) de algunas bacterias probióticas genera que las bacterias patógenas no puedan adherirse, provocando de esta manera una **exclusión competitiva** (Van Tassell *et al.*, 2011). Se ha demostrado que varias proteínas de *Lactobacillus* promueven la adhesión a la mucosa y las bacterias presentan adherencias superficiales que median la fijación a la capa mucosa (Buck *et al.*, 2005). Este proceso está mediado principalmente por proteínas, aunque también pueden estar implicados restos de polisacáridos y ácidos lipoteicoicos. El ejemplo más estudiado de adhesinas bacterianas dirigidas al moco es **MUB** (proteína de unión al moco) producida por *Lactobacillus reuteri*. Las proteínas **MUB** contienen dominios funcionales repetidos, nombrados por diversos autores como dominios Mub, los cuales son responsables de las propiedades de adhesión de las proteínas. Los dominios Mub han sido considerados desde entonces, un miembro de la familia del dominio MucBP. Se han encontrado diversas proteínas con dominios homólogos a MUB y MucBP, exclusivamente en **BAL** y predominantemente en lactobacilos, que se encuentran de manera natural en el **GIT**. Esto sugiere, que proteínas que contienen dominios MucBP podrían jugar un papel importante en el establecimiento de interacciones **hospedador-probiótico** en el intestino (Van Tassell *et al.*, 2011).

El proceso de adhesión tanto de lactobacilos como bifidobacterias, incluyen fuerzas pasivas, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, ácidos lipoteicoicos y estructuras específicas, como anexos externos recubiertos por lectinas (Servin, 2004). Se han caracterizado diversidad de moléculas que son mediadoras de la adhesión de bacterias patogénicas. Sin embargo, la comprensión de los factores que median la adhesión para *Lactobacillus*, es limitada; por lo que hacen falta estudios adicionales para la identificación y análisis de la diferencia **funcional** de los componentes de las capas mucosas, así como las interacciones complejas de las capas mucosas, la

microbiota (incluidos los probióticos) y las células epiteliales (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

- Mejora de la barrera epitelial.

La **barrera intestinal** es el mayor mecanismo de defensa usado para mantener la integridad epitelial y proteger al **hospedador** (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Las defensas de la barrera intestinal consisten en la capa mucosa, péptidos antimicrobianos (defensinas), sIgA y las uniones fuertes intercelulares (Ohland *et al.*, 2010). Una vez se altera la función de la barrera, los **antígenos bacterianos** pueden alcanzar la submucosa e inducir una respuesta inflamatoria, lo que puede resultar en un desorden intestinal, como es el caso del **IBS** (de Almada *et al.*, 2015).

El consumo de **probióticos** puede contribuir a la función de la barrera intestinal y se han estudiado ampliamente por estar implicados en restablecer y mantener la integridad de dicha barrera. Investigaciones realizadas por el grupo de Zyrek *y col.* en 2007 indicaron que los probióticos pueden iniciar la **función barrera** después de haberse ocasionado una alteración, como es el caso de la *E. coli* Nissle 1917 (EcN1917), que no sólo previene la ruptura de la barrera mucosa por la *E. coli* enteropatogénica sino que también restaura la integridad de la mucosa en células T84 y CaCO-2, efecto mediado por un incremento en la expresión y redistribución de las proteínas de unión (occludinas) y la proteína quinasa C (PKC) (Zyrek *et al.*, 2007).

Por otro lado, los **probióticos** pueden aumentar la expresión de genes involucrados en la **señalización** de las uniones intracelulares y promover la secreción de moco mediante las **mucinas** (principales moléculas que forman parte de la capa de mucosa intestinal) para mejorar la función de la barrera intestinal y la exclusión de bacterias potencialmente patógenas (de Almada *et al.*, 2015). Muchas especies de *Lactobacillus* incrementan la expresión de mucinas en líneas celulares humanas; sin embargo, este efecto de protección es dependiente de la capacidad de adhesión a la monocapa celular (Van Limbergen *et al.*, 2011).

- Exclusión competitiva de microorganismos patógenos.

Se denomina "**exclusión competitiva**" al escenario en el que una especie bacteriana compite por los **sitios de unión** de la mucosa intestinal de forma más vigorosa que otra, evitando de esta manera su crecimiento a dicho nivel. Los mecanismos usados por un microorganismo para excluir o reducir el crecimiento de otra especie son variados y

pueden estar divididos en **cuatro** tipos: creación de un microclima hostil; eliminación de sitios receptores bacterianos disponibles; producción y secreción de sustancias antimicrobianas y metabolitos selectivos; y agotamiento competitivo de nutrientes esenciales (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Las propiedades de adhesión debidas a la interacción entre las proteínas de superficie y las mucinas pueden inhibir la colonización de bacterias patógenas y son el resultado de la actividad antagonista de algunas cepas probióticas contra la adhesión de patógenos gastrointestinales. Algunos lactobacilos y bifidobacterias han mostrado la **capacidad de inhibir un amplio rango de patógenos**, tanto de origen bacteriano como de origen vírico, incluidos *E. coli*, *Salmonella*, *H. pylori*, *Listeria monocytogenes* y *Rotavirus* (Sánchez *et al.*, 2016).

La exclusión competitiva se basa en la **interacción bacteria-bacteria** mediada por la competición de los nutrientes disponibles y por los sitios de adhesión de la mucosa. Para obtener una ventaja competitiva, las bacterias pueden modificar su ambiente para hacerlo **menos adecuado** a sus competidores. La producción de sustancias **antimicrobianas**, como el ácido láctico y acético son ejemplos de este tipo de modificación (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

- Producción de sustancias antimicrobianas.

Uno de los mecanismos involucrados en los beneficios saludables aportados por los probióticos, incluye la formación de compuestos de bajo peso molecular (<1000 Da), como ácidos, y la producción de sustancias antimicrobianas, denominadas **bacteriocinas** (> 1000 Da) (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Los microorganismos probióticos son capaces de producir determinados **ácidos orgánicos** como ácido acético y láctico, capaces de producir una disminución del pH local en la mucosa digestiva, ocasionando un efecto inhibitorio sobre el número de bacterias, especialmente frente a bacterias Gram negativas. Además algunos lactobacilos y bifidobacterias comparten **sitios de unión específicos** a carbohidratos y esto hace que las cepas compitan con patógenos específicos, por los receptores en las células del hospedador (Walker, 2008). Ciertas **BAL** producen péptidos antibacterianos, incluidos **bacteriocinas** y/o pequeñas proteínas antimicrobianas. Dentro del grupo de las bacteriocinas, existen las que tienen un espectro de actividad estrecho y actúan únicamente contra bacterias estrechamente relacionadas; mientras que otras bacteriocinas son activas frente a patógenos alimentarios. El mecanismo de acción de estas bacteriocinas se basa en la **lisis de la**

bacteria diana mediante la formación de un poro y/o la inhibición de la síntesis de la pared celular (Hassan *et al.*, 2012).

Algunos ejemplos de bacteriocinas son la **lactanina**, producida por *L. acidophilus*, la **plantaricina**, producida por *L. plantarum*, la **reuterina**, producida por *L. reuteri* y la **gassericina A**, producida por *L. gasseri*. También se han identificado proteínas de bajo peso molecular, como la producida por *B. longum* BL1928, denominada **BIF**, activa frente a bacterias Gram negativas (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

- Modulación del sistema inmune.

El sistema inmune está formado por el sistema **innato** y **adaptativo**. El sistema inmune **adaptativo** responde a antígenos específicos y consiste en linfocitos B y T, factores humorales e inmunoglobulinas. Por otro lado, el sistema inmune **innato** (primera línea de defensa) responde a estructuras comunes llamadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (**PAMPs**) compartidos con la gran mayoría de patógenos. La respuesta primaria a los patógenos es activada por los receptores de reconocimiento de patrones (**PPR**), que se unen a los **PAMPs** (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Asimismo, las bacterias probióticas tienen la habilidad de **interactuar** con las células epiteliales y dendríticas (DCs), con los monocitos/macrófagos y linfocitos (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

El sistema inmune innato y adaptativo trabajan en **colaboración** y su activación puede ocurrir debido a la competición de nutrientes, a los sitios de colonización, producción de sustancias antimicrobianas, cambios en el pH intestinal, entre otros (de Almada *et al.*, 2015).

- Síntesis de ácidos grasos conjugados (CFA).

Algunos microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal también pueden producir una amplia variedad de **ácidos grasos promotores de la salud**, como es el caso del ácido linoléico conjugado (**CLA**) y el ácido linolénico conjugado (**CLNA**). Diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*, han evidenciado los **efectos en la salud**, tanto locales como sistémicos, que tienen estos CFAs; incluyendo actividades anticancerígenas, antidiabéticas, antiadipogénicas y antiinflamatorias. Está bien descrito que la formación, tanto de CLA como de CLNA, ocurre durante la biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen, debido a la acción de las **isomerasas** de las bacterias. La primera bacteria que fue descrita por ser capaz de convertir LA a CLA fue *Butyrivibrio*

fibriosolvens, siendo la enzima linoleato isomerasa, la responsable de este proceso (Gorissen *et al.*, 2010). Es por esto, que la carne derivada de rumiantes y los productos lácteos, tradicionalmente han sido una **fuentes primaria** de consumo de CLA en la dieta para los seres humanos. Existen diversidad de isómeros del CLA, pero el *cis-9, trans-11* CLA es considerado, como uno de los principales isómeros **bioactivos**, ya que es el predominante en la dieta, constituyendo más del **90%** del contenido de CLA en la grasa de la leche. La cantidad de LA disponible para la producción de CLA en el intestino grueso varía dependiendo, tanto de la cantidad ingerida, como de la eficacia de la absorción en el intestino delgado. Sin embargo, se estima que los seres humanos excretan aproximadamente 20,0 mg de ácido linoléico de forma diaria (Whigham *et al.*, 2000; Belury, 2002a).

La absorción intestinal de ácidos grasos de cadena larga en el colon es mínima y es probable que el **CLA** y el **CLNA** microbiano formado en el colon, sirva de mediador, principalmente en efectos beneficiosos a nivel local. Sin embargo los aumentos sistémicos de estos ácidos grasos conjugados, también se han atribuido a la actividad de la isomerasa microbiana en el colon. De hecho, han estado implicados previamente en la **actividad inmunomoduladora** beneficiosa local y en los efectos anticancerígenos, así como efectos sistémicos, tales como la contribución al mantenimiento de la homeostasis metabólica. Por lo tanto, se podría sugerir que la producción microbiana de **CLA** y **CLNA** dentro del intestino puede ser un factor contribuyente a estos efectos (O'Shea *et al.*, 2012)(Gorissen *et al.*, 2010).

Se han observado variaciones considerables entre diferentes especies de bifidobacterias para las producciones tanto de CLA como de CLNA. Aunque *Bifidobacterium breve* ha sido identificado como uno de los productores más **eficientes**, entre las diferentes cepas que se han estudiado; *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium dentium*, también han demostrado buenos índices de conversión *in vitro*. Se ha comprobado que las cepas de bifidobacterias productoras de CLA y CLNA que se han testado, son **metabólicamente activas** en el GTI de ratones y cerdos. Además, la administración de *B. breve* NCIMB 702258 en combinación con LA, dio como resultado modulación de la composición de ácidos grasos de tejido, aumentando significativamente los niveles de *cis-9, trans-11* CLA en el hígado tanto de ratones como de cerdos (Patterson *et al.*, 2014).

Por otro lado las bacterias probióticas son capaces de producir los llamados **ácidos biliares desconjugados**, los cuales son derivados de las sales biliares. Los ácidos biliares desconjugados, muestran una fuerte **actividad antimicrobiana** comparada con

la síntesis de sales biliares por los organismos. Este mecanismo de desconjugación podría explicar cómo los probióticos se protegen de las sales biliares, que afectan la estabilidad de la membrana celular, e incluso de sus propios metabolitos bactericidas (W. Allan Walker, 2008).

- Aporte de vitaminas mediante biosíntesis o acumulación.

Algunas de las **BAL** que se emplean como **probióticos**, son capaces de producir/liberar y/o incrementar compuestos específicos beneficiosos en los alimentos. Estos ingredientes funcionales son descritos, muchas veces, como **nutracéuticos**. Este término fue utilizado por primera vez por Stephen DeFelice en 1989, para describir “un alimento (o parte de un alimento) que aporta beneficios médicos o saludables, que incluyen la prevención y/o tratamiento de una enfermedad”. Estos ingredientes pueden ser macronutrientes, micronutrientes (como las vitaminas) o compuestos no nutritivos, pudiendo estar presentes de manera natural en ciertos alimentos o ser añadidos durante el proceso (LeBlanc *et al.*, 2011).

Las vitaminas son **micronutrientes esenciales** para el metabolismo de todos los organismos vivos. Se encuentran como precursores de coenzimas intracelulares, que son necesarias para regular reacciones bioquímicas vitales en la célula; pero los humanos somos **incapaces de sintetizar** la mayoría de las vitaminas, siendo necesario obtenerlas de manera exógena (LeBlanc *et al.*, 2013).

Dentro de las **vitaminas del grupo B** se encuentran: la biotina, cobalamina (Vitamina B₁₂), ácido fólico (Vitamina B₉), piridoxina (Vitamina B₆), riboflavina y tiamina. Cada una de estas vitaminas es químicamente diferente y actúan en **sinergia** para mantener la homeostasis del cuerpo, jugando roles importantes en procesos metabólicos como la producción de energía y la formación de glóbulos rojos. Normalmente están presentes en muchos alimentos, pero se eliminan fácilmente o destruyen durante la cocción y el procesamiento de los alimentos, por lo que es común que en muchas sociedades exista una **ingesta insuficiente**. Por esta razón, muchos países han implantado leyes para hacer cumplir la fortificación de ciertos alimentos con vitaminas y minerales específicos. Sin embargo, en otros países no se han adoptado programas de implementación, por posibles efectos secundarios no deseados (LeBlanc *et al.*, 2011). Asimismo, algunos microorganismos comensales de la microbiota intestinal humana,

entre los que se encuentran **bifidobacterias** y **lactobacilos**, tienen la habilidad de sintetizar ciertas vitaminas del grupo B (Deguchi *et al.*, 1985).

El **ácido fólico** (Vitamina B₉) está involucrado en **funciones esenciales** del metabolismo celular como la replicación celular, reparación y metilación, y síntesis de nucleótidos. Las propiedades de los folatos biosintéticos producidos por las bifidobacterias han sido verificados y además la biosíntesis parece ser restrictiva a ciertas especies/cepas, donde se clasifican según su nivel de producción; *B. bifidum* y *B. longum* subsp. *infantis*, son cepas que tienen un alto nivel de producción de esta vitamina, mientras que *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* y *B. adolescentis* son cepas que tienen un bajo nivel de producción (Pompei *et al.*, 2007). Estos resultados han sido confirmados mediante estudios *in vivo*, donde la administración de cepas **altamente productoras** de folato, causaron un incremento de los niveles de folato fecal, tanto en ratas como en humanos. Por otro lado, algunas **BAL** importantes a nivel industrial como *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* tienen la **habilidad** de sintetizar folato. Esto explica, porque algunos productos lácteos fermentados como el yogurt, contienen altas cantidades de folato, comparados con leches no fermentadas (LeBlanc *et al.*, 2013). La **vía biosintética** del ácido fólico en **BAL** incluye **siete pasos** consecutivos, en la cual se necesitan diferentes precursores, como la 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfato (DHPPP) y el ácido p-aminobenzoico (pABA). Actualmente, existe información acerca de ciertos parámetros como el pH externo, la tasa de dilución y la concentración de pABA, que **influyen** en la producción de **folato** tanto en **BAL**, como en cultivos iniciadores utilizados en la producción de yogurt, productos lácteos probióticos y quesos (Pompei *et al.*, 2007).

La **cobalamina** (vitamina B₁₂) es la más grande y compleja de todas las vitaminas, siendo **esencial** para el funcionamiento normal del cerebro, del sistema nervioso y para la formación de varias proteínas. Normalmente está implicada en el metabolismo del cuerpo humano, especialmente en la **síntesis y regulación del ADN**; también en el metabolismo de los aminoácidos, de los ácidos grasos y de los glúcidos; por lo que su deficiencia, está asociada a problemas neurológicos, desórdenes hematológicos y otras condiciones relacionadas a la salud, incluyendo desarrollo cognitivo pobre y enfermedad de Alzheimer (Capozzi *et al.*, 2012). Animales, plantas y hongos son **incapaces** de producir esta vitamina que es **exclusivamente** sintetizada por microorganismos, particularmente **anaerobios**. Sin embargo, los humanos tienen que

absorber la coenzima de fuentes naturales como carne animal, pescado y huevos; aunque tienen un proceso complejo para la absorción gastrointestinal de la cobalamina y su biodisponibilidad depende significativamente de la salud de la absorción del sistema gastrointestinal (Capozzi *et al.*, 2012). La biosíntesis de la cobalamina fue identificada primero en *Propionibacterium freudenreichii*, que actualmente se usa para la producción comercial de dicha vitamina. Pero más adelante, *Lactobacillus reuteri* CRL1098 fue la **primera BAL**, capaz de producir compuestos parecidos a la cobalamina, con un espectro de absorción similar a la cobalamina estándar (LeBlanc *et al.*, 2013). Se han identificado una serie de **30 genes** que están involucrados en la biosíntesis de esta vitamina, los cuales pueden estar presentes en diferentes especies de **BAL**; lo que sugiere, la posibilidad de encontrar diversas cepas y especies de BAL productoras de cobalamina (Capozzi *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de **microorganismos productores de vitaminas** pueden ser una alternativa viable, económica y más natural, que la fortificación con pseudo-vitaminas químicamente sintetizadas, permitiendo de esta manera la producción de alimentos con **elevadas** concentraciones de vitaminas con menor propensión a causar efectos secundarios no deseados (LeBlanc *et al.*, 2011).

1.4.1.2. Efecto de los probióticos en la microbiota intestinal o en la salud humana.

Desde la era de Metchnikoff, se han atribuido a los productos que contienen microorganismos **probióticos**, una serie de beneficios para la salud. Algunos de estos efectos han sido bien documentados y establecidos por ensayos *in vitro* e *in vivo* y hasta el momento existen diversos estudios clínicos que respaldan algunos de estos efectos producidos (Tripathi & Giri, 2014).

La evidencia a favor de los **efectos beneficiosos** ejercidos por los probióticos, incluyen el aumento de la respuesta inmune, la prevención y el tratamiento de trastornos del GIT tales como la AAD, gastroenteritis, el IBS, las IBD, la NEC, la infección por *H. pylori*, así como alergias, intolerancia a la lactosa, reducción de los niveles de colesterol y disminución de la presión arterial (**Fig. 11**) (Mahajan & Singh, 2014).

Estas propiedades son **cepa-específica** por lo que es importante resaltar que **no todas las BAL** ejercen un efecto probiótico. La variabilidad fenotípica y genotípica que se observa entre los diferentes aislamientos pertenecientes a una misma especie, hace

imposible generalizar la eficacia probiótica (Mercenier *et al.*, 2003). En la actualidad, las cepas *L. rhamnosus* GG (Valio), *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii (Biocodex), *L. casei* Shirota (Yakult) y *B. animalis* Bb-12 (Chr. Hansen), son los **cultivos probióticos** con más datos de eficacia, en salud humana. Los efectos beneficiosos que producen los lactobacilos son una combinación de **varios factores**, como la acidificación del medio, coagregación con bacterias patógenas, exclusión competitiva, producción de peróxido de hidrógeno, bacteriocinas o biosurfactantes (Felis *et al.*, 2007).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (**EFSA**) reconoció los beneficios saludables de diferentes probióticos como componentes de alimentación animal, mientras que para humanos (la población en general), el **único beneficio** reconocido hasta el momento es la digestión de la lactosa, por parte de los microorganismos del yogurt. Sin embargo, se está acumulando evidencia científica que muestra que cepas probióticas específicas o la combinación de ellas, pueden ser beneficiosas para tratar diferentes enfermedades. Los efectos pueden ser, **directos** de la propia bacteria probiótica o **indirectos** a través de la interacción con la microbiota comensal (Scott *et al.*, 2015).

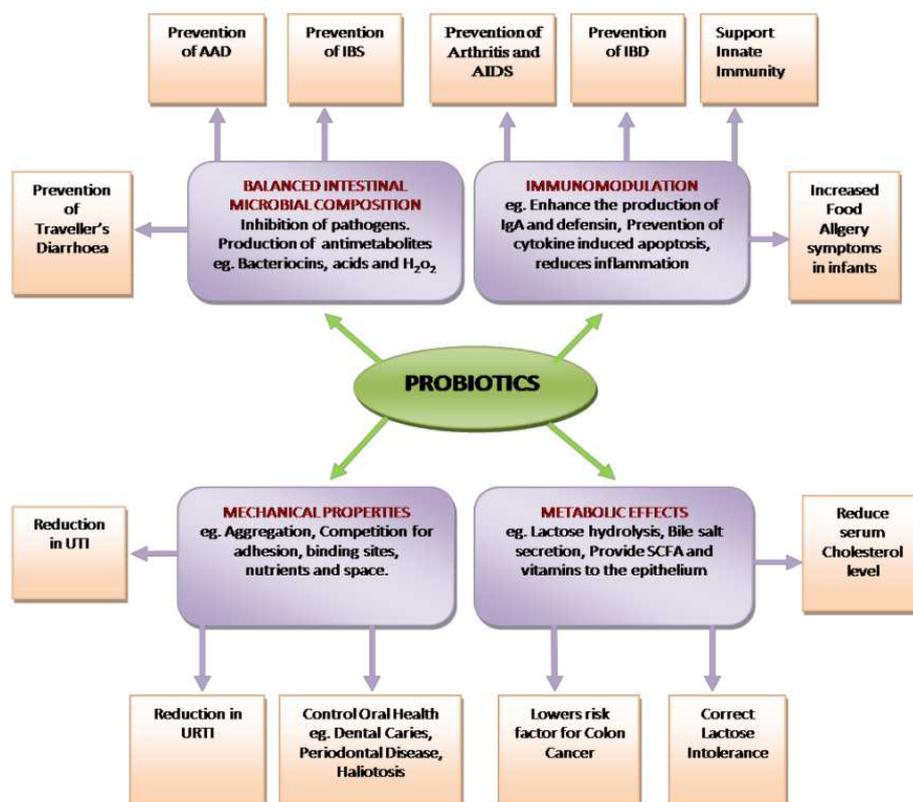


Figura 11. Efectos beneficiosos de los probióticos y posibles mecanismos empleados (Adaptado de Mahajan and Singh, 2014).

1.4.1.3. Géneros empleados como probióticos.

Teniendo en cuenta la definición de probióticos, el número de especies microbianas que pueden tener efectos probióticos es considerable. Algunas de las especies más representativas se muestran en la **tabla 3** (Kechagia *et al.*, 2013).

Los microorganismos probióticos pertenecen **principalmente** al grupo de las **BAL**, que forman parte de la microbiota intestinal. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los dos géneros bacterianos que actualmente cuentan con un mayor número de cepas probióticas en el mercado y aunque *Bifidobacterium* formalmente no es una BAL, tradicionalmente se le ha incluido en este grupo. Un gran número de cepas pertenecientes a estas dos especies, se consideran no perjudiciales para la salud, ya que según su histórico de consumo no generan ningún riesgo para la persona a la que se le administra, contando con el *status* "Generally Regarded As Safe" (**GRAS**) de la Food and Drug Administration (**FDA**) o el "Qualified Presumption of Safety" (**QPS**) de la **EFSA**. Aunque el listado de los organismos GRAS o QPS es revisado regularmente, es posible que una nueva cepa quiera ser añadida a este listado, por lo que es necesario realizar la solicitud al organismo correspondiente (FDA o EFSA), aportando evidencias científicas que respalden la consideración de este *status*. Las **BAL** participan principalmente en fermentaciones de carbohidratos, dando lugar a la formación de ácido láctico y en el caso del género *Bifidobacterium*, usan una vía diferente para la fermentación de estos (Felis & Dellaglio, 2007)(Tripathi *et al.*, 2012).

Microorganisms considered as probiotics	
<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species
<i>L. acidophilus</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. gallinarum</i> ¹	<i>B. bifidum</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i> ²
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	
Other lactic acid bacteria	Nonlactic acid bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	
<i>E. faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> ¹
<i>Lactococcus lactis</i> ³	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i> ³	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹	<i>S. boulardii</i>
<i>Streptococcus thermoophilus</i> ³	

Tabla 3. Microorganismos considerados como probióticos. Aplicación principal en alimentación animal¹. Recientemente reclasificado como *B. animalis subsp.lactis*². Poco conocimiento acerca de las propiedades probióticas³ (**Adaptado de Holzapfel *et al.*, 2001**).

1.4.1.3.1. Género *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son miembros pertenecientes al grupo de las **BAL** con forma de bacilo y pared celular de tipo Gram-positivo; catalasa y oxidasa negativos (Bergey, 2009). Se caracterizan por la formación de **ácido láctico** como producto **principal** de la fermentación, haciendo que el pH del medio disminuya, evitando el crecimiento de microorganismos patógenos (Holzapfel *et al.*, 2001). Representan el género **más amplio** dentro de las **BAL**, con más de **100** especies caracterizadas hasta el momento. Se caracterizan por ser un género muy heterogéneo donde se engloban especies con diferencias sustanciales entre sí, ya sea a nivel fenotípico, bioquímico, fisiológico o genotípico. Comúnmente se encuentran en la naturaleza en medios ricos en carbohidratos o proteínas, aparte de ser miembros habituales de la microbiota del **GIT** y **vaginal**. Presentan un contenido en Guanina-Citosina (GC) comprendido entre el 32-54% y muestran requerimientos nutricionales altos. Se dividen en función del tipo de fermentación que realizan, que puede ser homofermentativa obligada, heterofermentativa obligada y heterofermentativa facultativa (Felis *et al.*, 2007). Los lactobacilos **homofermentativos obligados**, (comúnmente denominados grupo metabólico A), fermentan las hexosas a ácido láctico mediante la vía de Emben-Meyerohof-Parnas (EMP) o glucólisis, mientras que las pentosas y el gluconato no pueden ser fermentadas por falta de enzimas fosfoetolasas en estos lactobacilos. Las especies **heterofermentativas facultativas** (grupo metabólico B) fermentan las hexosas a ácido láctico a través de la vía EMP y son capaces de degradar las pentosas y gluconato, mediante la vía pentosa-fosfato (PP) al tener una fosfoetolasa inducible, produciendo de esta manera ácido acético, etanol y ácido fórmico. Y por último, los lactobacilos **heterofermentativos obligados** (grupo metabólico C) poseen aldolasas, pero no fosfoetolasas, que metabolizan las pentosas y hexosas mediante la vía fosfogluconato (correspondiente a la primera parte de la vía PP), produciendo ácido láctico, etanol (o ácido acético) y CO₂ (Felis & Dellaglio, 2007; Salvetti *et al.*, 2012). La utilización de *Lactobacillus* es común por parte de la industria alimentaria para la elaboración de alimentos fermentados como vegetales, soja, pan y gran variedad de productos derivados de la leche, ya que se caracterizan por ser microorganismos **GRAS** o **QPS** (Vasiljevic & Shah, 2008).

1.4.1.3.2. Género *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium*, pertenece al grupo de las bacterias de tipo Gram-positivo, no formador de esporas y anaerobios estrictos. Su nombre hace alusión a su morfología en forma de "Y" o bacteria bífida, sin embargo se pueden encontrar en formas de bastón, en V, en estrellas, con los extremos espatulados o formando redes; estas morfologías se generan cuando las condiciones de crecimiento no son óptimas y la bacteria esta bajo estrés. Tradicionalmente, este género ha sido incluido dentro del grupo de las **BAL**, aunque filogenéticamente no son muy cercanos con los demás grupos que se incluyen y taxonómicamente se encuentran en la subdivisión *Actinomycetes* debido a su contenido en **GC** (55-67% mol) (Vasiljevic & Shah, 2008) (Schell *et al.*, 2002).

Las bifidobacterias presentan un mecanismo de degradación de las hexosas que difiere del resto, llamado "*bifid shunt*" correspondiente a la ruta fructosa-6-fosfato, mediante la enzima fructosa-6-fosfoacetolasa (**F6PPK**). Esta vía de fermentación permite a las bifidobacterias producir ácido acético, aparte del ácido láctico, en una proporción molar de 3:2 (Vasiljevic & Shah, 2008). Son bacterias no móviles y no filamentosas, catalasa y oxidasa negativas. Para crecer en condiciones óptimas, requieren una temperatura dentro del rango de 37-41°C, existiendo un crecimiento nulo por debajo de los 20°C y por encima de los 46°C. El género *Bifidobacterium* es considerado ácido-tolerante, aunque el pH óptimo se encuentra entre 6.5-7.0, presentando un crecimiento nulo por debajo de 4.5 y por encima de 8.5 (Felis *et al.*, 2007).

1.4.1.4. Pautas para la selección de las cepas probióticas

El 1 de Julio de 2007 entró en vigor el **Reglamento (CE) n° 1924/2006** del Parlamento Europeo sobre las declaraciones de **propiedades saludables y nutricionales** de los alimentos. Los principales objetivos de este Reglamento han consistido en garantizar un alto nivel de protección a los consumidores, un funcionamiento eficaz del mercado, la competencia leal dentro de la industria alimentaria y la protección de las innovaciones (van Loveren *et al.*, 2012).

En el Reglamento, los términos utilizados en las declaraciones de propiedades saludables se clasifican en tres categorías diferentes: en **la primera categoría**, la llamada declaración saludable del artículo 13.1, o también denominada "**declaración funcional**", que se refiere a **(1)** el papel de un nutriente u otra sustancia en el

crecimiento, desarrollo y las funciones del organismo, (2) funciones psicológicas y/o conductuales y (3) reducción o control de peso referente al aumento de la saciedad o reducción de la energía disponible de la dieta; la **segunda categoría**, formada por las declaraciones del Artículo 13.5, que incluye declaraciones establecidas en áreas nuevas y no implantadas hasta el momento, es decir, las afirmaciones son nuevas y se basan posiblemente en productos patentados, métodos o procesos; y la **tercera categoría**, incluye las siguientes áreas para las propiedades saludables del Artículo 14: (i) declaración sobre riesgo de enfermedad y (ii) declaraciones referentes al desarrollo y salud de los niños (Ferreira *et al.*, 2010).

En el caso de los probióticos, el principal beneficio para la salud se basa en el equilibrio de la barrera intestinal, la integridad de la mucosa y la exclusión competitiva de patógenos y virus. Ciertos probióticos también pueden estar asociados con otros beneficios para la salud que incluyen la modulación de la intolerancia a la lactosa, la prevención de la diarrea y el alivio de los síntomas, la respuesta inmune y alérgica, la absorción de minerales y la inhibición de la activación de enzimas procarcinogénicas (van Loveren *et al.*, 2012).

Respecto a las declaraciones de propiedades probióticas y saludables de una cepa que potencialmente quiere ser usada como probiótico, existen tres áreas importantes que requieren evaluarse:

(1) Caracterización de la cepa probiótica: una identificación y nomenclatura apropiada de los microorganismos constituye el punto de partida de dicha evaluación. Una correcta identificación mediante el uso de métodos adecuados, permite confirmar la identidad de la cepa para su uso comercial, lo que también es necesario para el adecuado etiquetado de los productos que los contienen (Felis *et al.*, 2007). Esta identificación permite la vinculación del microorganismo con la información que ya se conoce, respecto al grupo microbiano al que corresponde y la predicción de algunas de sus propiedades. Durante los último años, se han desarrollado técnicas para reemplazar o complementar los métodos fenotípicos tradicionales. Sin embargo, los análisis de las secuencias del gen 16s rARN, son los que se usan comúnmente para la identificación de especies bacterianas. En general, los microorganismos que comparten una homología del gen 16s rARN superior al 97%, se consideran miembros de la misma especie (Ferreira *et al.*, 2010). A pesar de la disponibilidad de diversas técnicas de identificación, la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) y la hibridación ADN-

ADN siguen siendo consideradas las mejores para diferenciar cepas, sin olvidar que la presencia de plásmidos y otros elementos extracromosómicos puede estar asociada a propiedades que las diferencie frente a otras de la misma especie. La secuenciación del genoma completo (incluyendo dichos elementos extracromosómicos) es la mejor información posible para la identificación de una especie/cepa, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico (utilización preferente de sustrato, resistencia a condiciones ambientales, presencia de fagos, entre otras) (Rodríguez J.M., 2015).

Un proyecto financiado recientemente por la EU (**Prosafe**) ha concluido que los test bioquímicos no deberían ser usados como **método único** para la identificación de cultivos probióticos y recomiendan el análisis de las secuencias del gen 16s rARN como la **mejor herramienta** para la identificación rutinaria de microorganismos, debido a su alta reproducibilidad e intercambio de datos. Sin embargo, en algunos casos la resolución de la secuencia del gen 16s rARN es limitada y puede ser insuficiente para discriminar especies estrechamente relacionadas (Felis *et al.*, 2007).

Es importante señalar, que cuando se compara una secuencia de este gen con las que se encuentran en las bases de datos, la calidad de las secuencias depositadas tienen un alto impacto para una identificación precisa. En este aspecto, el proyecto Prosafe señaló que en las bases de datos existen secuencias **incompletas o poco fiables**, por lo que es necesario realizar una lista de secuencias del gen 16s rARN válidas para una correcta identificación. Por lo tanto, establecer la identidad correcta de un microorganismo es el primer paso para la evaluación de su seguridad y eficacia, ya que existen diversas investigaciones que han reportado que la identidad de los microorganismos aislados de productos que contienen probióticos, frecuentemente no corresponden a la información en la etiqueta del producto. Respecto a esto, el *status* QPS establecido por la EFSA, considera la identificación de los microorganismos como el **primer pilar** en la evaluación de la seguridad y asimismo indican que se debe tener en cuenta que los efectos probióticos son específicos de cada cepa, siendo necesaria una identificación a **nivel de cepa** (van Loveren *et al.*, 2012).

La EFSA recomienda que las cepas deben ser depositadas en una **colección de cultivos** reconocida internacionalmente. Esto es importante ya que permite a las autoridades el acceso a la cepa, su seguimiento y a la información relacionada, cuando sea necesario (Ferreira *et al.*, 2010).

(2) **Seguridad de uso de la cepa probiótica:** los microorganismos propuestos como probióticos, tienen un largo historial de uso seguro en productos de alimentación. Los probióticos, principalmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, no han mostrado ninguna característica de patogenicidad; y con la excepción de *Enterococcus*, los lactobacilos y bifidobacterias han sido raramente involucradas en infecciones. La mayoría de cepas pertenecientes a estos géneros están incluidas en la lista de microorganismos que tienen el *status* QPS para su uso en alimentación y por esta razón, la valoración de seguridad no es un aspecto en la evaluación de las declaraciones de propiedades saludables (Panel *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la importancia de este aspecto, se requiere una evaluación rigurosa de seguridad de los nuevos probióticos, en particular los probióticos que no tienen antecedentes de uso seguro y aquellos pertenecientes a especies, las cuales no se puede hacer una suposición general de seguridad (**Fig. 12**) (Ferreira *et al.*, 2010).

(3) **Efectos sobre la salud humana:** a diferencia de Japón, donde las declaraciones de propiedades saludables se basan en la evidencia de la **experimentación animal**; en Europa, son necesarios los **ensayos clínicos** para respaldar estas declaraciones, razón por la cual las opiniones sobre probióticos publicadas hasta el momento por la EFSA, no han sido favorables. Antes de realizar un ensayo clínico, es importante obtener información acerca de la identidad de la cepa y de sus propiedades pre-clínicas (van Loveren *et al.*, 2012).

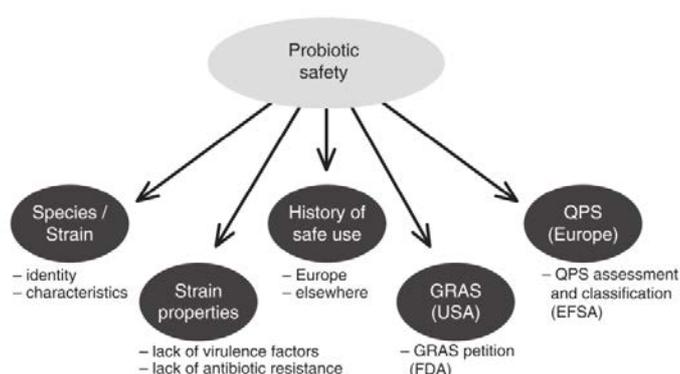


Figura 12. Principales aspectos para la evaluación de seguridad de nuevos probióticos (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

Los ensayos clínicos se deben realizar en la población a la cual irá dirigido el probiótico, empleando el mismo nivel de dosis que se usará en el producto final y haciendo especial énfasis en el caso de las declaraciones relacionadas con la reducción

del riesgo de enfermedad o las destinadas a la salud en niños. Estos ensayos se deben llevar a cabo siguiendo las directrices internacionales y deben proporcionar información de marcadores o factores importantes o marcadores intermedios asociados con puntos finales claros de la enfermedad o del área de salud del que se quiere declarar el efecto (**Fig. 13**) (Ferreira *et al.*, 2010).

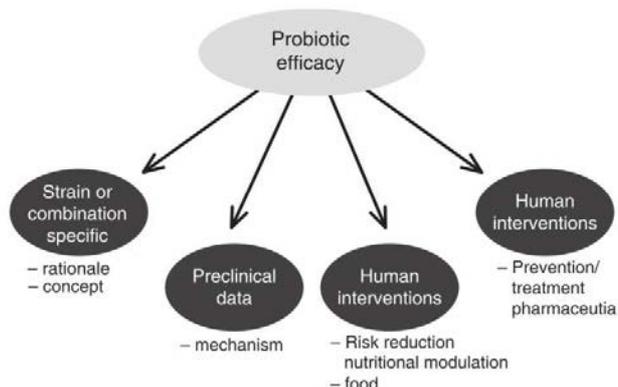


Figura 13. Principales factores que respaldan las declaraciones saludables de un probiótico específico (Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

La **especificidad** de la cepa se extiende más allá de su aspecto funcional, ya que la elección de la cepa a emplear también depende de varias condiciones tecnológicas, por ejemplo las relacionadas al proceso de fabricación industrial y la posibilidad de garantizar una vida media óptima bajo condiciones de almacenamiento, medianamente fáciles (Foligné *et al.*, 2013).

Aunque una cepa cumpla con los requisitos de seguridad y criterios funcionales, los aspectos relacionados con la **producción** del probiótico y su **procesado** también son importantes (Tripathi *et al.*, 2014). Entre los aspectos que tienen que ser considerados para la selección de la cepa, se incluyen (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002):

- (1) Buenas propiedades sensoriales,
- (2) Resistencia a fagos,
- (3) Viabilidad durante el proceso,
- (4) Estabilidad en producto y durante el almacenamiento.

En cuanto al producto final, la **dosis de probiótico** debe basarse en las concentraciones que fueron eficaces en los ensayos clínicos que se realizaron previamente, por lo que las UFCs /g o ml es un parámetro importante a tener en cuenta. Aunque la información de la concentración mínima efectiva es aún insuficiente, está generalmente aceptado que

los probióticos en producto deben tener una **concentración mínima** de 10^6 UFC/g o ml y que un total de 10^8 a 10^9 UFC deben ser consumidos diariamente para que el efecto probiótico pueda ser conseguido en el consumidor (Kechagia *et al.*, 2013), aunque esto debería de cambiar en función de la evidencia obtenida en los ensayos clínicos realizados, para cada cepa en concreto.

1.4.1.5. Propiedades industriales de los probióticos.

Más de **500** productos alimentarios se han introducido al mercado global durante las últimas dos décadas y la lista está en continua expansión (Markets & Markets, 2015). Los alimentos que contienen probióticos están hechos a base de la **fermentación** de cereales, frutas, vegetales y productos cárnicos; así como en el área de productos derivados de la leche como los yogurts y quesos, que fueron con los que se comenzó su uso. Para el desarrollo de estos alimentos, los probióticos se añaden artificialmente dentro del alimento. La mayoría de los cultivos están disponibles comercialmente en formas **altamente concentradas** y muchas de ellas están diseñadas para su aplicación directa (Direct Vat Set (**DVS**)), ya sea como cultivos congelados altamente concentrados o en forma liofilizada (Tripathi *et al.*, 2014). Asimismo, los cultivos deben ser envasados bajo atmósfera controlada y en envases que lo protejan de la luz y la humedad. Usualmente los cultivos congelados contienen más de 10^{10} UFC/g, mientras que los liofilizados contienen generalmente 10^{11} UFC/g. La concentración de microorganismo por gramo o ml de producto, varía con el cultivo y con el tipo de microorganismo usado (Saarela *et al.*, 2000).

La **viabilidad** es por definición un **pre-requisito** para la funcionalidad de los probióticos y de esta manera potenciar sus mecanismos de acción, entre los cuales están la adherencia, reducción de la permeabilidad intestinal y la inmunomodulación, por lo que esto constituye un reto industrial. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la viabilidad no es necesaria para todos los efectos de los probióticos, porque en algunos probióticos, los componentes de la pared celular o el ADN de la bacteria pueden tener efectos saludables (Kechagia *et al.*, 2013).

Se han realizado diversos intentos para mejorar la viabilidad de los probióticos en diferentes productos alimentarios durante su producción y hasta el momento de su consumo. Así pues, la aplicación de probióticos en matrices alimentarias dependen de una serie de factores que pueden influir en la viabilidad del microorganismo probiótico (**Fig. 14**), entre los que se encuentran: **parámetros alimentarios** (pH, acidez valorable,

oxígeno molecular, actividad de agua, presencia de sales, azúcar y químicos como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), bacteriocinas, sabores artificiales y agentes colorantes); **parámetros de procesamiento** (tratamiento de calentamiento, temperatura de incubación, tasa de enfriamiento del producto, materiales de envase, métodos de almacenamiento y escala de producción); y **parámetros microbiológicos** (cepas probióticas, tasa de crecimiento y concentración de inóculo (Foligné *et al.*, 2013).

En productos que contienen probióticos, como las fórmulas infantiles, es importante que las condiciones de formulación mantengan la actividad y viabilidad del probiótico por largos períodos de tiempo. Teniendo en cuenta que los probióticos se usan como ingredientes para esta clase de productos, usualmente no se multiplican, por lo tanto es importante asegurar que la concentración de bacterias se mantiene a lo largo del tiempo. El almacenamiento a temperatura ambiente, común en este tipo de productos, representan un gran reto industrial. Sin embargo, actualmente este problema ha sido solventado, mediante el uso de la microencapsulación, tratamiento que mejora la viabilidad y estabilidad de las cepas probióticas en producto (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). La **microencapsulación** es una técnica, que consiste en recubrir la célula con una sustancia adecuada, de manera que resulte en la liberación apropiada de las células en el medio intestinal. Este proceso aparte de ayudar a mantener la célula **metabólicamente activa** durante su almacenamiento, también hace que el probiótico pueda resistir a las condiciones gástricas y por tanto mejorar su habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal (Mizock, 2015).

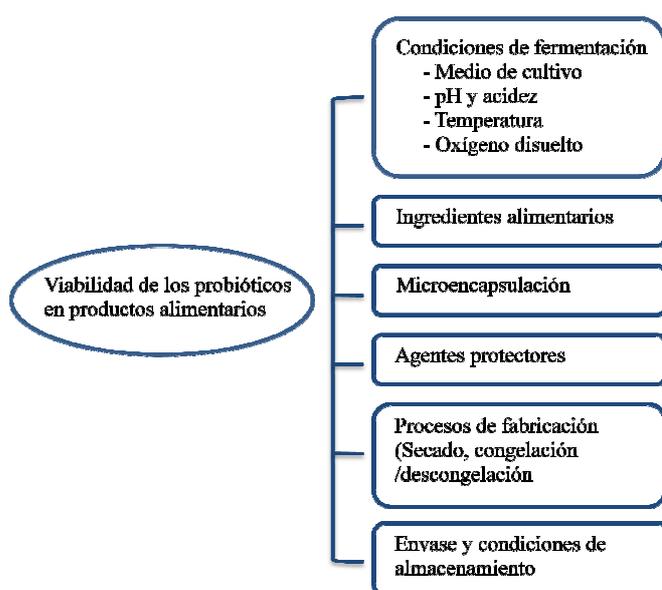


Figura 14. Principales factores que afectan la viabilidad de los probióticos (Adaptado de Tripathi *et al.*, 2014).

1.4.1.5.1. Factores que afectan la supervivencia de los probióticos durante el procesado.

- **Condiciones de fermentación**: la temperatura de la fermentación es uno de los factores importantes que afectan la viabilidad del probiótico y otros parámetros cualitativos de los productos de la fermentación probiótica. El rango de temperatura de crecimiento de la mayoría de probióticos se encuentra entre 37-43°C, ya que temperaturas más altas pueden afectar de manera negativa al microorganismo. Cuando se trata de probióticos anaerobios estrictos, el oxígeno presente en la fermentación también puede afectar la viabilidad de la bacteria; para bajar los niveles del contenido de oxígeno, uno de los mejores métodos que se emplean es fermentación bajo atmósfera modificada o de nitrógeno. Por otro lado, la resistencia de las bacterias probióticas al estrés por calor, puede ser aumentado realizando un tratamiento térmico leve antes de su uso. La aplicación de un choque térmico no letal, permite que las bacterias toleren un segundo estrés térmico de mayor intensidad (McDougall, 2011).

- **Operaciones de congelación y descongelación**: los probióticos tienen una duración prolongada en productos congelados. Sin embargo, las membranas celulares de los probióticos pueden dañarse durante el proceso de congelación, debido a los cristales de hielo que se forman en el medio externo o en el interior de la célula, lo cual causaría la reducción o interrupción de su actividad metabólica. La descongelación también tiene efectos nocivos en la célula, debido a que la célula es expuesta a efectos osmóticos así como a altas concentraciones de factores perjudiciales, como iones de hidrógeno y ácidos orgánicos, entre otros (Tripathi *et al.*, 2014).

- **Secado**: algunos probióticos empleados en los alimentos, son secados con el fin de incrementar su vida media útil y así reducir el coste de mantenerlos en congelación; su fácil almacenamiento, manejo, transporte y subsecuente uso en la aplicación de los alimentos funcionales, hacen que esta técnica sea una buena opción. Existen diferentes técnicas de secado, aunque la **liofilización** es dentro de todos los métodos que existen, la que mejor mantiene la viabilidad del probiótico a pesar de su alto coste. La tasa de supervivencia del probiótico durante el proceso de secado, también depende de la composición del medio de cultivo y la presencia de carbohidratos, los cuales juegan un papel importante en este aspecto. Una estrategia para ayudar a la protección de la viabilidad de la célula es la adición de protectores celulares, que son sustancias que se

añaden al medio antes de realizar el proceso de secado, como la leche descremada en polvo, glicerol, proteína de suero, betaina, adonitol, lactosa y polímeros como los dextranos y el polientilenglicol (Hubálek, 2003).

- **Rehidratación de los alimentos funcionales deshidratados**: los productos que contienen probióticos, en algunos casos, son necesarios reconstituirlos, con lo cual la tasa de recuperación de los probióticos se ve influenciada por las condiciones de rehidratación (temperatura, volumen del medio de rehidratación y el tiempo de rehidratación), propiedades físicas del material a ser rehidratado, así como las propiedades de osmolaridad, pH y energía nutricional de la solución rehidratante (Poirier *et al.*, 1999).

1.4.1.5.2. Factores que pueden afectar la viabilidad durante el almacenamiento.

La composición del alimento, el material de envase y las condiciones de almacenamiento (temperatura, contenido de humedad, contenido de polvo, humedad relativa, contenido de oxígeno y exposición de luz, entre otros) tiene una influencia significativa en la supervivencia de los probióticos (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

- **Ingredientes alimentarios y aditivos**: los ingredientes en los alimentos pueden ser, protectores, neutrales o perjudiciales, por lo que la compatibilidad de los ingredientes del producto con los probióticos juega un papel muy importante. Los aditivos, que generalmente se usan en la industria alimentaria, incluyen tipos de azúcares, edulcorantes, sales, compuestos aromáticos, sabores naturales o artificiales, agentes colorantes, entre otros. Se han encontrado ciertos derivados de proteínas, como proteína de suero concentrada e hidrolizados de caseína y triptona, que promueven el crecimiento de los probióticos, ya que le proveen nutrientes a la célula, reducen el potencial redox del medio e incrementan la capacidad tamponadora del medio, que en algunos casos resulta en pequeños descensos de pH (Mortazavian *et al.*, 2010).

- **Contenido de oxígeno y potencial redox**: el oxígeno puede afectar de tres maneras a los probióticos: toxicidad directa para algunas células, producción de peroxidasas tóxicas en presencia de oxígeno y producción de radicales libres de la oxidación de algunos componentes del producto, por ejemplo grasas del producto en el que se encuentran (Tripathi *et al.*, 2014). El grado de sensibilidad al oxígeno varía considerablemente entre diferentes especies y/o cepas probióticas, siendo más afectadas

las anaerobias estrictas como es el caso, del género *Bifidobacterium* spp. Existen diferentes métodos que se han empleado para reducir el contenido de oxígeno durante el envasado y almacenamiento de los alimentos funcionales. Estos incluyen, envasado al vacío, adición de antioxidantes y control del proceso de producción para que la exposición y entrada de oxígeno, sea mínima (Mani-López *et al.*, 2014).

- **pH**: valores de pH bajos, incrementan la concentración de ácidos orgánicos disociados en productos fermentados, aumentando el efecto bactericida de estos ácidos. Bebidas como zumos de frutas con pH bajo (zumo de naranja) representan un desafío importante para los probióticos (Tripathi *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, la selección de la cepa es **esencial** en el desarrollo de los alimentos funcionales y aquellas cepas que pueden permanecer viables con una vida media aceptable, son las que deben usarse para garantizar beneficios reales al consumidor (Tripathi *et al.*, 2014).

1.4.1.6. Seguridad de los probióticos

La mayoría de los probióticos se comercializan como ingredientes en alimentos, suplementos o medicamentos, por lo que la **seguridad de los probióticos** es de vital importancia. Los probióticos que actualmente son comercializados tienen un historial de seguridad amplio. Sin embargo, puede haber un riesgo mínimo que en ciertas situaciones se relaciona con la calidad del producto, en lugar de con el probiótico *per se* (Mizock, 2015).

En la práctica, se han reportado casos de sepsis con probióticos que contienen lactobacilos y bifidobacterias, pero son muy raros. La administración de probióticos a personas inmunosuprimidas (por ejemplo, VIH, prematuros, ancianos y enfermedad inflamatoria del intestino) ha sido un tema de preocupación, pero incluso en este contexto, la incidencia de sepsis es bastante baja (Mizock, 2015). Por otro lado, se han documentado varios casos de fungemia asociados al probiótico *S. cerevisiae* (*S. boulardii*), los cuales fueron preparados en la habitación donde se encontraba el paciente. La investigación de estos casos, indicó que la infección fue debida a la contaminación de los catéteres, por lo que se recomendó que los probióticos en polvo, como *S. cerevisiae*, deben prepararse en condiciones higiénicas para evitar contaminaciones de este tipo (Borriello *et al.*, 2003).

El uso indiscriminado de antibióticos en humanos, ha generado que la resistencia a los antibióticos sea una característica cada vez más común en los microorganismos, causando de esta manera serios problemas al momento de tratar enfermedades infecciosas. Por esta razón, el perfil de resistencia a antibióticos de la cepa probiótica es un factor importante en el proceso de selección. Esta prueba debe incluir una amplia variedad de antibióticos comunes y posteriormente debe confirmarse que no se transfieren ni los genes de resistencia al antibiótico, así como los plásmidos de virulencia. Lo ideal es que el probiótico no sea capaz de transmitir resistencia a antibióticos a otras bacterias (Del Piano *et al.*, 2006). La resistencia a antibióticos en bacterias puede ser, intrínseca o adquirida. La **intrínseca**, es una característica propia de la cepa, mientras que la **adquirida**, se deriva de mutaciones o adquisición de ADN extraño de otras bacterias. Respecto a esto, los lactobacilos muestran un amplio rango de resistencias naturales a antibióticos, pero en la mayoría de los casos, no son transmisibles (Saarela *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los objetivos generales de este trabajo son:

1. Aislar, identificar y caracterizar **bacterias con propiedades probióticas** a partir de muestras de origen humano, que permitan la futura aplicación de las mismas en la elaboración de productos alimentarios y/o complementos con propiedades funcionales.

Los objetivos específicos planteados para este objetivo son:

- i) Establecer una metodología adecuada de aislamiento y caracterización, que permita la recuperación de bacterias probióticas de las muestras analizadas, principalmente bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
- ii) Construcción del cepario de bacterias probióticas, propiedad de Laboratorios Ordesa.
- iii) Identificar y caracterizar genótipicamente y fenotípicamente las diferentes cepas probióticas aisladas, mediante el uso de técnicas moleculares y test bioquímicos.
- iv) Análisis de la biodiversidad de las bacterias probióticas identificadas, para realizar su clasificación parcial y realizar una comparativa respecto a las existentes en las bases de datos, mediante análisis filogenéticos utilizando un software bioinformático adecuado.

2. Realizar cribados de **actividad funcional** en las cepas probióticas aisladas y caracterizadas.

Los objetivos específicos planteados para este objetivo son:

- i) Evaluación de la capacidad de las diferentes cepas probióticas aisladas, de producir *in vitro* ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido linolénico conjugado (CLNA).
- ii) Evaluación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de las diferentes cepas aisladas frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mitis*.
- iii) Evaluación de la capacidad de producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) *in vitro* de las cepas probióticas aisladas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y procesamiento de muestras.

Las muestras empleadas para el desarrollo del trabajo eran de origen humano, concretamente, leche materna y heces de madres lactantes y sus respectivos bebés. Para la obtención de las muestras se contó con la participación voluntaria de madres que habían dado a luz recientemente, o bien, estaban en las últimas semanas de gestación e interesadas en participar en el estudio cuando dieran a luz.

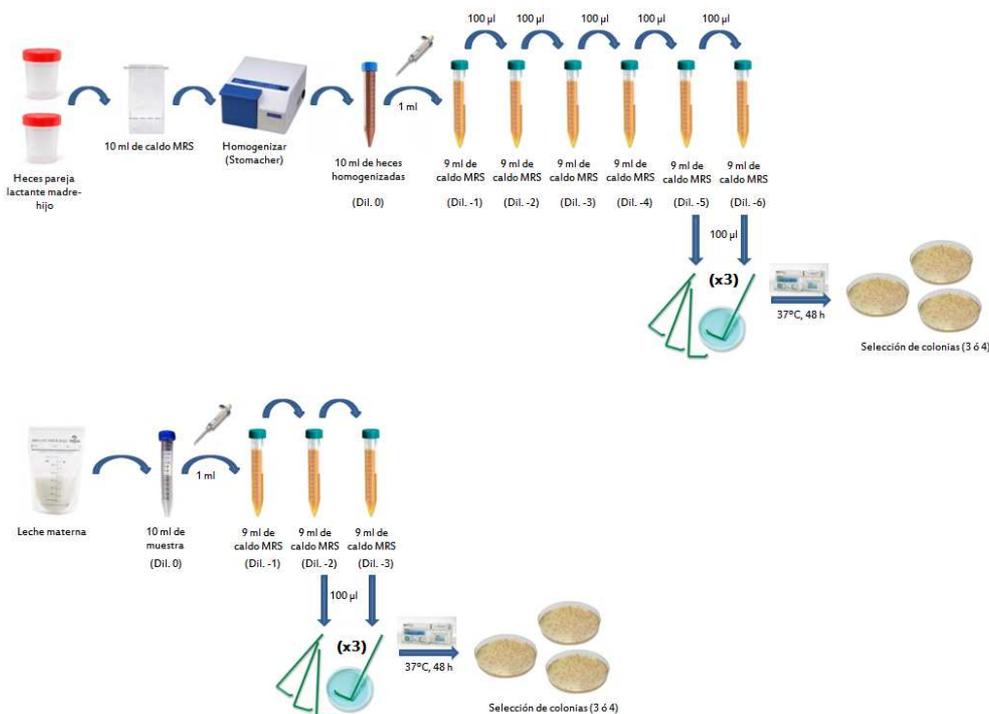
Antes de la toma de cada una de las muestras, se procedió a explicar a cada una de las madres participantes, el objetivo del estudio y el procedimiento que debía seguir para la recolección de cada una de las muestras, obteniendo en todos los casos el correspondiente formulario de consentimiento informado firmado. Teniendo en cuenta los diferentes factores que pueden afectar la microbiota intestinal, en el momento de obtener las muestras cada voluntaria detallaba mediante el cumplimiento de un formulario, la dieta que seguía diariamente. Como requisito fundamental para participar en el estudio, la alimentación del bebé tenía que ser exclusivamente leche materna, la madre no debía consumir ningún tipo de alimento o suplemento que tuviera probióticos, ni recibir tratamiento con antibióticos, con el fin de evitar que estos factores pudieran repercutir en la composición de la microbiota natural de cada una de las madres y de sus bebés. El cuestionario y el material para la recolección les fue entregado a las madres el día en que accedieron a participar en el estudio.

Tras la recolección de las muestras en los botes estériles, se pusieron en jarras de cultivo anaeróbico con sobres de Anaerocult® (Merck) y en refrigeración, para así generar un ambiente anaeróbico y conservar la mayor cantidad de microbiota bacteriana anaeróbica presente en las muestras, mientras estas llegaban al laboratorio. Las muestras fueron procesadas tan pronto llegaron al laboratorio y el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta su procesamiento no superó los 30 minutos, de esta forma se evitaba en la medida de lo posible, el crecimiento de bacterias aeróbicas no deseadas y la disminución de bacterias anaeróbicas en las muestras.

3.2. Aislamiento de microorganismos de las muestras obtenidas.

Las diferentes muestras fueron manipuladas bajo condiciones de esterilidad con el fin de no alterar la carga microbiana presente y de esta manera proceder a realizar el aislamiento de los microorganismos presentes (**Esquema 1**).

Las muestras de heces, tanto maternas como de bebé, fueron homogenizadas para su análisis en el Stomacher® 80 Biomaster (Seward). Para esto, se introdujeron en bolsas de plástico estériles (Stomacher® 80 Biomaster Bags) y se añadieron 10 ml de caldo MRS (Merck) estéril a cada una. El uso de este equipo, permitió que las muestras se disgregaran perfectamente, permitiendo una mayor recuperación de los microorganismos que pudieran estar presentes en estas muestras; se llevó a homogenizar durante 60 segundos o hasta observar que la muestra estaba totalmente homogénea y mezclada con el caldo MRS. Una vez terminado este proceso, se realizaron diluciones decimales seriadas en caldo MRS para cada una de las muestras, considerando la dilución 0 la muestra homogenizada que se encontraba en la bolsa estéril. De las últimas dos diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , se tomaron 100 μ l y se sembraron en superficie por triplicado, con ayuda de un Asa “Digralsky” desechable, en placas de agar. Para las muestras de leche materna, el procedimiento de análisis fue un poco diferente, en este caso no se hizo uso del Stomacher 80, ya que al ser una muestra líquida no fue necesario realizar una homogenización previa. Por lo tanto, la dilución 0 fue la muestra de leche materna y se realizaron diluciones decimales seriadas en caldo MRS hasta 10^{-3} , sembrando tres réplicas de cada una de las diluciones en los diferentes medios de cultivo. Las diluciones sembradas, garantizaban la obtención de placas con colonias aisladas comprendidas entre 30-300 colonias/placa.



Esquema 1. Procesamiento de las muestras empleadas para el aislamiento de las bacterias probióticas.

Para la recuperación de los microorganismos presentes en las muestras, se emplearon seis medios de cultivo diferentes, algunos de ellos selectivos para el tipo de bacterias que queríamos buscar en este trabajo; pero también óptimos para recuperar otro tipo de bacterias que pudieran ser de interés, en otros estudios futuros. Los diferentes medios empleados, los géneros aislados en cada uno y las condiciones de incubación se detallan en la **tabla 4**. A todos los medios empleados en estos aislamientos, se les ajustó el pH mediante adición de NaOH o HCl, de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante.

MEDIOS DE CULTIVO	GÉNEROS AISLADOS	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
Agar MRSc (Merck)	<i>Lactobacillus/Bifidobacterium</i>	Anaerobiosis, 37°C, 24 h
Agar Tomato (BD)	<i>Lactobacillus</i>	Anaerobiosis, 37°C, 24 h
Agar RCM (Merck)	<i>Clostridium</i>	Anaerobiosis, 37°C, 48 h
Agar BHI (Merck)	Microorganismos exigentes	Anaerobiosis, 37°C, 48 h
Agar Rogosa (Merck)	<i>Lactobacillus</i>	Anaerobiosis, 37°C, 24 h
Agar BFM (Nebra <i>et al.</i> , 1999)	<i>Bifidobacterium</i>	Anaerobiosis, 37°C, 48 h

Tabla 4. Medios empleados para el aislamiento de los diferentes microorganismos, géneros aislados y condiciones de incubación. MRSc: Medio MRS con adición de 0.25% de L-Cys HCl. * La condición de anaerobiosis se generó mediante el uso de cabina de anaerobiosis MAC 500 Workstation (Don Whitley Scientific), con una mezcla de gases N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%.

3.2.1. Identificación fenotípica de las colonias.

Transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvieron diferentes tipos de colonias y se procedió a seleccionar las que presuntamente, podrían pertenecer a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.

3.2.1.1. Análisis macroscópico de las colonias.

Las características macroscópicas que se evaluaron para todas las colonias obtenidas fueron las siguientes:

- Forma: circular, irregular o filamentosa.
- Borde: ondulado, en sierra, dentado o liso.
- Superficie de la colonia: plana, convexa, umbilicada.

- Color: crema, blanca o pigmentada (en algunos casos, el medio contiene algún compuesto que ocasiona que el microorganismo al crecer adopte algún tipo de pigmentación específica).
- Comportamiento frente a la luz: brillante u opaca.
- Consistencia: mucosa, lisa o rugosa.
- Grosor de la colonia

De cada uno de los medios, se seleccionaron 3 ó 4 tipos de colonias que tuvieran diferencias macroscópicas marcadas y propias de los géneros que buscábamos, se aislaron por el método de agotamiento en estría en placas de agar MRSc (Medio MRS con adición de 0.25% de L-Cys HCl) y se llevaron a incubar bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C, durante 48 horas. Posterior al crecimiento, se seleccionó una colonia aislada de cada placa sembrada en estría y se realizó un cultivo líquido de cada una de ellas en caldo MRSc incubándose bajo las mismas condiciones, explicadas anteriormente.

3.2.1.1.1. Almacenamiento y conservación de cepas.

Las cepas fueron conservadas en forma de glicerizados de 1 mL, preparados a partir de 0,5 mL de disolución glicerol (Prolabo)-agua destilada al 60-40% y 0,5 mL de cultivo *overnight*, quedando la bacteria en una disolución de glicerol al 30%. Se realizaron 6 réplicas de cada cepa, conservando 3 replicas a -24°C y las otras a -80°C. Las cepas se identificaron mediante el prefijo ORD seguido de cuatro dígitos, comenzando por el 0001.

Para una manipulación más segura de las cepas durante el trabajo experimental y evitar un excesivo número de pases en los viales base, se construyó un cepario de trabajo donde cada una de las cepas se encontraba por cuadruplicado.

3.2.1.2. Características microscópicas.

La tinción de Gram permite la clasificación de las bacterias, en Gram positivas o Gram negativas según la presencia o no de peptidoglicano en su pared y asimismo, se puede determinar la morfología celular de las bacterias.

Para realizar esta tinción, se empleó el kit de tinción Gram-color modificado (exento de fenol) para la tinción de Gram (Merck). La preparación del frotis se llevó a cabo mediante el uso de un asa de Kolle de plástico desechable, extendiendo una gota de

cultivo líquido sobre un portaobjetos, dejándola secar al aire y posteriormente fue fijada a la llama mediante el uso de un mechero Bunsen. Luego se dejó enfriar y se tiñó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Portaobjetos con frotis fijado		
REACTIVO	PROCEDIMIENTO	TIEMPO DE ACTUACIÓN
Solución de cristal violeta	Cubrir completamente y dejar actuar	1:30 minutos
Agua destilada	Enjuagar con cuidado	5 segundos
Solución de yodo estabilizado	Cubrir completamente y dejar actuar	3 minutos
Agua destilada	Enjuagar con cuidado	5 segundos
Solución decolorante	Cubrir completamente	10 segundos
Agua destilada	Enjuagar con cuidado	5 segundos
Fucsina en solución	Cubrir completamente y dejar actuar	1 minuto
Agua destilada	Enjuagar con cuidado	5 segundos
Dejar secar completamente el portaobjetos al aire.		

Finalizado este procedimiento, el portaobjetos se cubrió con una laminilla cubreobjetos y se observó en el microscopio mediante el uso de aceite de inmersión (Merck) bajo el objetivo de 100X. Los microorganismos Gram positivos presentaron un color violeta oscuro, mientras que los Gram negativos presentaron un color rosa intenso.

3.2.1.3. Prueba bioquímicas.

3.2.1.3.1. Prueba de la catalasa.

Mediante el uso del test Bactident[®] catalasa (Merck), se determinó la presencia o ausencia de esta enzima, que al ser una propiedad taxonómica puede ser usada para la diferenciación e identificación de los microorganismos. Para ello, se tomó una colonia aislada mediante el uso de un asa de Kolle, se llevó a un portaobjetos y posteriormente se aplicó una gota del reactivo sobre la colonia. La producción o no de burbujas indicaba la presencia o no de la enzima (**Fig. 15**).

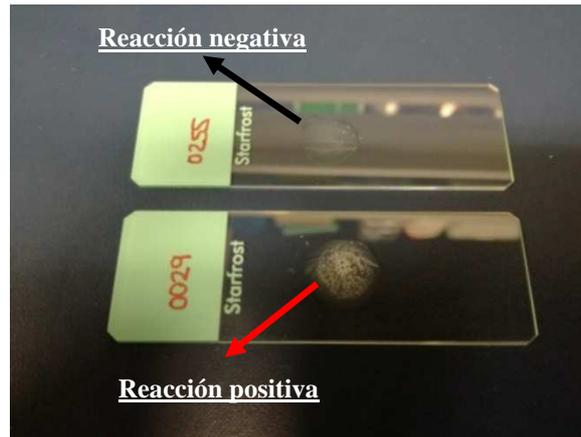


Figura 15. Interpretación visual de la prueba bioquímica de la catalasa.

3.2.1.3.2. Prueba de la oxidasa.

Es otro tipo de prueba que se utiliza para identificación de cepas bacterianas, determinando si la bacteria produce citocromo oxidasa (y por lo tanto utiliza oxígeno en la cadena de transporte de electrones). Para realizar esta prueba se usó el test Bactident[®] oxidasa (Merck) que consistía en el uso de tiras reactivas colorimétricas. De un cultivo líquido fresco de cada una de las cepas, se tomaron 200 μ l y se llevaron a un eppendorf estéril. Este tubo se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 200 μ l de agua MiliQ estéril y posteriormente se introdujo una de las tiras reactivas en el eppendorf, de tal manera que la zona de reacción quedara completamente sumergida en la suspensión. Pasados 60 segundos, la tira se comparó con la tabla colorimétrica incluida en el test y un color en la zona de reacción de azul o azul-violeta, indicó la presencia de esta enzima (**Fig. 16**).

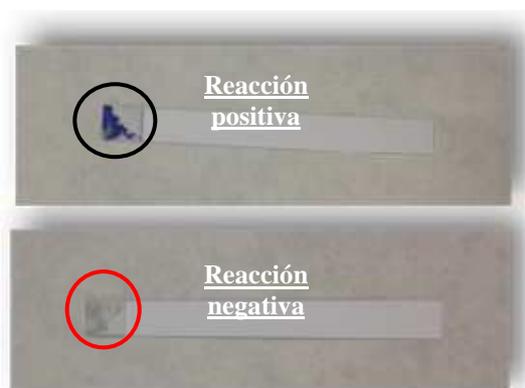


Figura 16. Interpretación visual de la prueba bioquímica de la oxidasa (Adaptado de <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/oxidasa>).

3.2.1.3.3. Prueba de la aminopeptidasa.

Para esta prueba se emplearon las tiras reactivas del test Bactident® Aminopeptidasa (Merck) y se realizó como prueba complementaria para la Tinción de Gram. Esta prueba consistía en la detección de la enzima L-alanino aminopeptidasa, la cual está localizada, exclusivamente, en la pared celular de las bacterias Gram-negativas. De un cultivo líquido fresco de cada una de las cepas, se tomaron 200 µl de dicho cultivo y se llevaron a un eppendorf estéril. Este tubo se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 200 µl de agua MiliQ estéril y posteriormente se introdujo una de las tiras reactivas en el eppendorf, de tal manera que la zona de reacción quedara sumergida completamente en la suspensión. Posteriormente, este tubo se llevó a incubar a 37°C durante 10 minutos (máximo 30 minutos) y la tira reactiva se comparó con la escala colorimétrica incluida en el test. Una coloración amarilla de la suspensión bacteriana, indicó cepas aminopeptidasa positiva (Gram negativas) (**Fig. 17**).

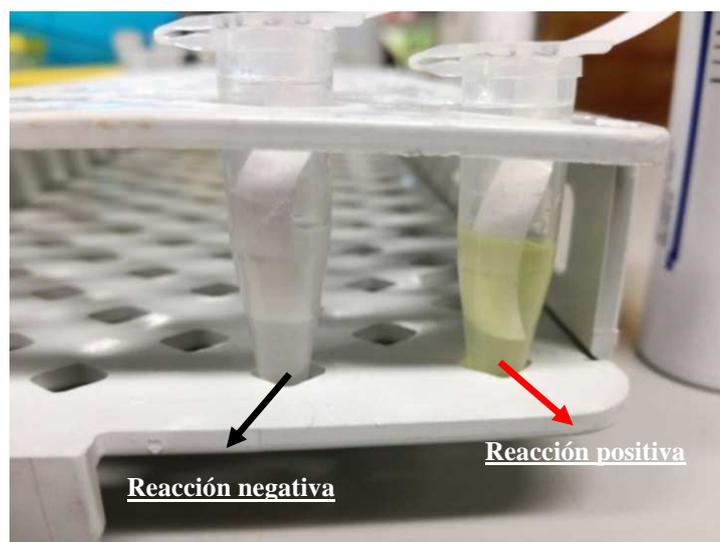


Figura 17. Interpretación visual de la prueba bioquímica de la aminopeptidasa.

3.2.1.3.4. Prueba de la detección de la enzima fructosa-6-fosfato-fosfoetolasa (F6PPK).

Para identificar las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*, se realizó la prueba de la fructosa-6-fosfoetolasa (F6PPK), enzima propia de este género al tener una ruta especial para la fermentación de hexosas, conocida como “bifid shunt”.

Para la realización de este protocolo, se emplearon los siguientes reactivos:

Reactivo 1: KH_2PO_4 0.05M + L-Cisteína 0.05% p/v (pH 6.5)

Reactivo 2: KH_2PO_4 0.05M + L-Cisteína 0.05% p/v + Triton X-100 0.25% v/v (pH 6.5)

Reactivo 3: Fluoruro de Sodio (6 mg/ml) + Iodoacetato de Sodio (10 mg/ml)

Reactivo 4: Fructosa-6-fosfato (80mg/ml)

Reactivo 5: Hidroxilamina clorhidrato (13.9 g/ml), pH 6.5

Reactivo 6: Ácido Tricloroacético 15 % p/v

Reactivo 7: HCl 4M

Reactivo 8: Cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5 % p/v en ácido clorhídrico 0.1M

A partir de un cultivo fresco de 10 ml, se pasó 1 ml de este cultivo a un eppendorf estéril y después de centrifugarlo a 3990 rpm durante 4 minutos, el pellet se lavó dos veces con 1 ml de reactivo 1. Se descartó el sobrenadante y resuspendió en 200 μl de reactivo 2 durante 2 min y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 50 μl de reactivo 3 y 50 μl de reactivo 4 y se llevó a incubar a 37°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 μl de reactivo 5 y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Inmediatamente, se añadieron 200 μl de reactivo 6, 200 μl de reactivo 7 y 200 μl de reactivo 8. Una coloración rojo-violeta de la mezcla, se interpretó como resultado positivo e indicaba la presencia de la enzima F6PPK (**Fig.18**).

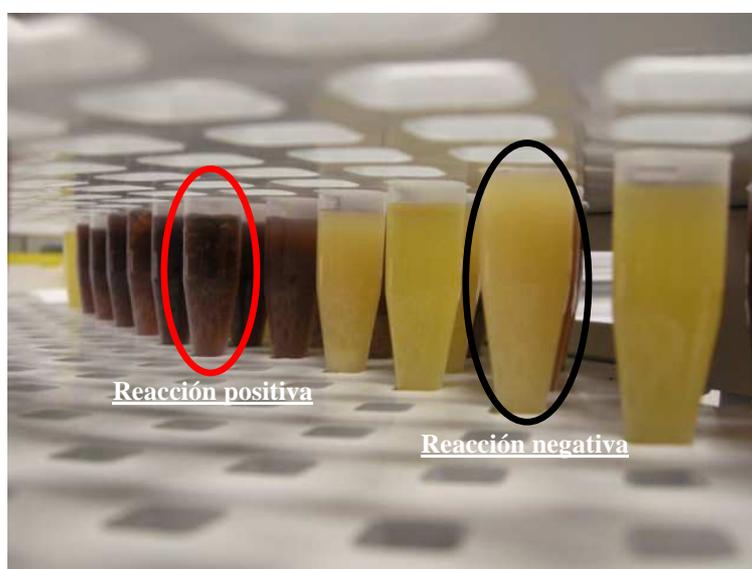


Figura 18. Interpretación visual de la prueba bioquímica de la detección de la F6PPK.

3.2.1.3.5. Prueba API 50CH[®] (Biomérieux).

Esta prueba es un sistema estandarizado que consiste en 50 pocillos, los cuales contienen diferentes hidratos de carbono y derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos

urónicos) (**Tabla 5**) permitiendo estudiar la fermentación de estos sustratos, por parte de los diferentes tipos de microorganismos. Para cada cepa probiótica aislada, se inoculó una galería API 50CH[®] en combinación con el medio API 50 CHL, para la caracterización del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos.

Pocillo	Carbohidrato (sustrato)	Pocillo	Carbohidrato (sustrato)
0	Control	25	ESculina citrato férrico
1	GLIcerol	26	SALicina
2	ERITritol	27	D-CELObiosa
3	D-ARAbinosa	28	D-MALtosa
4	L-ARAbinosa	29	D-LACtosa (origen bovino)
5	D-RIBosa	30	D-MELibiosa
6	D-XILOsa	31	D-SACarosa
7	L-XILOsa	32	D-TREhalosa
8	D-ADONitol	33	INULina
9	Metil-βD-Xilapiranososa	34	D-MeLeZitosa
10	D-GALactosa	35	D-RAFinosa
11	D-GLUcosa	36	AlMiDón
12	D-FRUctosa	37	GLIcoGéno
13	D-MamNosA	38	XiLiTol
14	L-SorBosA	39	GENtiobiosa
15	L-RHAMnosa	40	D-TURanosa
16	DULcitol	41	D-LIXosa
17	INOsitol	42	D-TAGatosa
18	D-MANitol	43	D-FUCosa
19	D-SORbitol	44	L-FUCosa
20	Metil-αD-Manopiranososa	45	D-ARabinoL
21	Metil-αD-Glucopiranososa	46	L-ARabitoL
22	N-AcetilGlucosamina	47	GlucNaTo potásico
23	AMIGdalina	48	2-CetoGluconato potásico
24	ARButina	49	5-CetoGluconato potásico

Tabla 5. Sustratos presentes en cada uno de los pocillos de la galería API 50CH[®].

Para el desarrollo de esta prueba se siguió el siguiente protocolo:

- Preparación de la galería: cada galería estaba constituida por 5 filas, conteniendo cada una 10 pocillos numerados y que posteriormente se puso dentro de una cámara de incubación. La preparación de esta cámara, se realizó antes de inocular la galería, repartiendo aproximadamente unos 10 ml de agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos, ni susceptibles a liberar gases), en los alveolos del fondo de la cámara para crear una atmósfera húmeda.

- Preparación del inóculo: Se realizó un cultivo líquido de cada microorganismo en 10 ml de caldo MRSc, pasado el tiempo de incubación, cada tubo se centrifugó a 3990 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4 ml de medio 50 CHL para realizar un lavado de las células y retirar el medio de cultivo remanente. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones empleadas

anteriormente y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió añadiendo 10 ml de medio 50 CHL y se utilizó de inmediato para inocular los diferentes pocillos de la galería.

- Inoculación de las galerías: de la suspensión bacteriana, se inocularon unos 120 μ l aproximadamente en cada uno de los pocillos de la galería, evitando la formación de burbujas y que la muestra no rebasara el límite superior del mismo con el fin de evitar derrames de la misma y que pudiera mezclarse con la muestra del siguiente pocillo. Como control negativo, en el pocillo 0, se inoculó medio 50 CHL sin microorganismo. Posteriormente cada galería se introdujo en las cámaras de incubación preparadas anteriormente y se llevó a incubar a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis durante 48 horas.

-Lectura e interpretación: transcurrido el tiempo de incubación, la fermentación en cada pocillo se interpretó en un cambio de violeta a amarillo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio elegido. Mientras que los azúcares que no fueron fermentados mantuvieron su color violeta después de la incubación (**Fig. 19**).

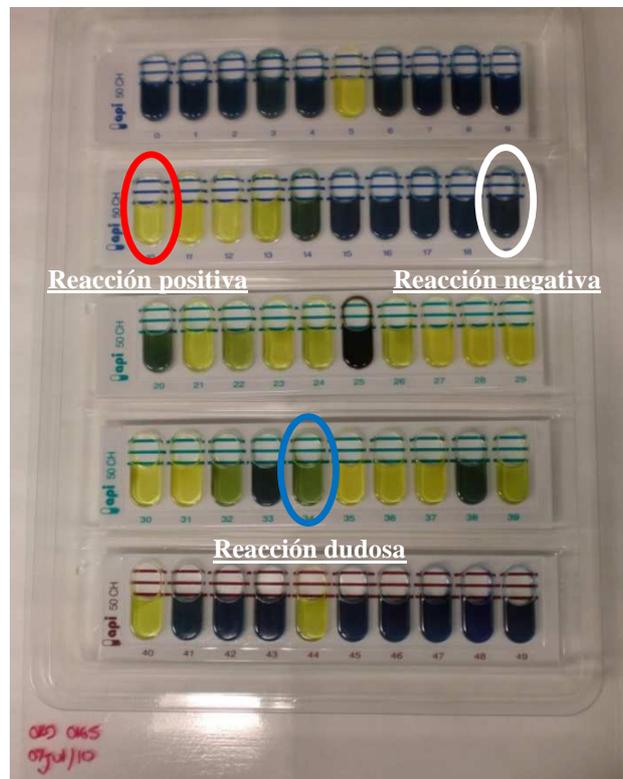


Figura 19. Interpretación visual de los resultados de la prueba API50CH®

3.2.1.3.6. Prueba API ZYM[®] (Biomerieux).

Esta prueba, es un método semicuantitativo que consiste en 20 pocillos, los cuales contienen diferentes sustratos (**Tabla 6**), permitiendo evaluar simultáneamente la presencia de diferentes actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra.

Pocillo	Enzima estudiada	Sustrato
1	Control	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato
3	Esterasa (C 4)	2-naftil butirato
4	Esterasa Lipasa (C 8)	2-naftil caprilato
5	Lipasa (C 14)	2-naftil miristato
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamina
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamina
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato
13	α -galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido
14	β -galactosidasa	2-naftil- β D-galactopiranosido
15	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI-glucuronido
16	α -glucosidasa	2-naftil- α D-glucopiranosido
17	β -glucosidasa	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosido
18	N-acetil- β -glucosamina	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminido
19	α -manosidasa	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosido
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido

Tabla 6. Sustratos y enzimas estudiadas en cada pocillo de la galería API ZYM[®].

Para el desarrollo de esta prueba se siguió el siguiente protocolo:

- Preparación de la galería: cada galería estaba constituida por 1 fila que contenía 20 pocillos y posteriormente se puso dentro de una cámara de incubación. La preparación de esta cámara se realizó antes de inocular la galería, repartiendo aproximadamente unos 5 ml de agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos, ni susceptibles a liberar gases) en los alveolos del fondo de la cámara para crear una atmósfera húmeda.
- Preparación del inóculo: Se realizó un cultivo líquido de cada microorganismo en 10 ml de caldo MRSc, pasado el tiempo de incubación, cada tubo se centrifugó a 3990 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4 ml de agua destilada estéril para realizar un lavado de las células y retirar el medio de cultivo remanente. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones empleadas anteriormente y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió nuevamente en 4 ml de agua destilada estéril y se utilizó de inmediato para inocular los diferentes pocillos de la galería.

- Inoculación de las galerías: de la suspensión bacteriana, se inocularon unos 65 µl aproximadamente en cada uno de los pocillos de la galería. Como control negativo, en el pocillo 0, no había ningún tipo de sustrato. Posteriormente cada galería se introdujo en las cámaras de incubación preparadas anteriormente y se llevó a incubar a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis durante 4 a 4:30 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó una gota del reactivo ZYM A y 1 gota del reactivo B en cada pocillo. Se dejó actuar durante 5 minutos como mínimo. Después, cada galería se expuso durante 10 segundos bajo la radiación de una lámpara de 1000W a una distancia de 10 cm. Este procedimiento tenía por objeto, eliminar el fondo amarillo debido al exceso de Fast Blue BB que no había reaccionado y pudiera dar reacciones negativas incoloras.

-Lectura e interpretación: las reacciones producidas durante el período de incubación se tradujeron en cambios de color que se revelaron mediante la adición de los reactivos para cada pocillo. Esta lectura, se realizó con la ayuda de la Tabla de Lectura (**Tabla 7**) que venía adjunta a la prueba (**Fig. 20**).

Pocillo	Reacción	
	Positiva	Negativa
1	Incolora o color de la muestra según importancia de la coloración	
2	Violeta	Incolora o amarillo muy pálido*
3	Violeta	
4	Violeta	
5	Violeta	
6	Naranja	
7	Naranja	
8	Naranja	
9	Naranja	
10	Naranja	
11	Violeta	
12	Azul	
13	Violeta	
14	Violeta	
15	Azul	
16	Violeta	
17	Violeta	
18	Marrón	
19	Violeta	
20	Violeta	

Tabla 7. Tabla de lectura de cada una de las reacciones de la galería API ZYM®.



Figura 20. Interpretación visual de los resultados de la prueba APIZYM®

3.3. Identificación genotípica y caracterización de las cepas seleccionadas.

Las pruebas bioquímicas primarias (bacterias catalasa negativa, oxidasa negativa, aminopeptidasa negativa y formas bacilares o bacilos pleomórficos Gram positivos) junto a la presencia/ausencia de la F6PPK fueron resultados clave para determinar que cepas serían seleccionadas para su posterior identificación y caracterización genotípica y fenotípica.

3.3.1. Obtención de extractos celulares y extracción de ADN cromosómico.

Para obtener los extractos bacterianos, las cepas seleccionadas se crecieron en cabina de anaerobiosis durante 48 horas en caldo MRSc. Posteriormente, una alícuota de 1 ml se llevó a un eppendorf, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad y se retiró el sobrenadante a cada uno de los tubos. El pellet obtenido, se lavó con agua grado biología molecular o Mili-Q, para retirar cualquier tipo de resto de caldo de cultivo que pudiera quedar remanente, se centrifugó bajo las mismas condiciones empleadas anteriormente y se descartó el sobrenadante. Para la extracción de ADN cromosómico se empleó el kit MAgMAX™ Total Nucleic Acid Isolation (Applied Biosystem). Este kit emplea una disrupción mecánica de las muestras, mediante el uso de bolitas de zirconia las cuales se encuentran en una solución de tiocianato de guanidinio, dicha mezcla libera rápidamente los ácidos nucleicos (AN), mientras que simultáneamente inactiva nucleasas que pueden estar presentes en la muestra. Posteriormente la muestra es diluida añadiendo isopropanol y la adición de unas bolitas paramagnéticas con superficie de unión a los AN. La mezcla bolitas + AN son inmovilizadas mediante el uso de unos imanes y lavadas para remover proteínas y otros contaminantes. Finalmente

los AN se eluyen usando una pequeña cantidad de buffer con baja concentración de sal y las muestras resultantes se conservaron a - 24°C hasta su uso. Para observar la pureza de las extracciones de ADN, todas las muestras de las diferentes cepas, se cargaron en geles de agarosa (BIO-RAD) al 0.4% en buffer TAE 1X (BIO-RAD), para esto se emplearon cubetas de electroforesis (BIO-RAD) y se corrieron las muestras a 90V durante una hora y media, aproximadamente. Para teñir el gel se empleo el colorante SYBR Safe (Invitrogen), añadiendo 1 µl por cada 10 ml de gel. Las muestras se cargaron en paralelo con dos marcadores de peso molecular (100 y 1000pb).

3.3.2. Amplificación parcial del gen 16S rARN y secuenciación.

La solución de ADN cromosómico obtenida para cada una de la cepas aisladas, fue empleada para amplificar por PCR un fragmento del gen que codifica el gen del 16S rARN mediante dos pares diferentes de cebadores. La identificación de bifidobacterias se realizó mediante un resultado positivo de la prueba de la F6PPK y para realizar una identificación a nivel de especie, se emplearon los cebadores Y1 (5'-TGG CTC AGG ACG AAC GCT GGC GGC-3') e Y2 (5'-CCT ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (Young *et al.*, 1991). La región que se amplifica es de unas 348pb, se encuentra comprendida desde la base 50 a la 400 según la numeración de *E. coli*, y contiene las regiones variables V1 y V2 del gen 16s rARN. Para la identificación de lactobacilos, se emplearon los cebadores 16s1a (5'- AAT ACA TGC AAG TCG AAC GA -3') y 16s1b (5'- TTA ACC CAA CAT CTC ACG AC -3') (Marshall *et al.*, 1999). El tamaño de la banda amplificada era de 1004 pb. Como control positivo de PCR se usó la cepa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT7210, junto a un control negativo el cual no contenía muestra de ADN.

La PCR se realizó en un termociclador "MyCycler" (BIO-RAD). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, dicha mezcla contenía 10X de Buffer KOD Hot Start, 25mM MgSO₄, 2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10µM de cada uno de los cebadores, 1U de la *Taq*DNA Polymerase (Novagen, Merck) y se completó el volumen a 50 µl añadiendo agua grado biología molecular.

Las condiciones de la PCR para los cebadores Y1 e Y2 fueron las siguientes:

1 ciclo	Desnaturalización	95°C	3 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	95°C	2:30 minutos
	Anillamiento	68°C	30 segundos
	Extensión	70°C	45 segundos
1 ciclo	Extensión	70°C	7 minutos

Y para los cebadores 16s1a y 16s1b fueron las siguientes:

1 ciclo	Desnaturalización	95°C	2 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 minuto
	Anillamiento	62°C	30 segundos
	Extensión	72°C	1:30 minutos
1 ciclo	Extensión	72°C	10 minutos

Los fragmentos amplificados fueron examinados mediante electroforesis en geles de agarosa (BIO-RAD) al 2% en buffer TAE 1 X (BIO-RAD) usando las mismas condiciones que la electroforesis del ADN cromosómico.

Los productos de PCR fueron purificados, siguiendo el protocolo descrito para el Kit PCR Cleanup (QIAGEN) y para verificar el producto purificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, empleando las mismas condiciones que las descritas previamente. A continuación se enviaron a secuenciar a Secugen S.L. (www.secugen.es); la mezcla de cada muestra contenía 10 µl de agua grado biología molecular, 0.75 µl de cada primer y 5 µl de la muestra del producto de PCR purificado.

Para la identificación de cada una de las cepas, se realizó un alineamiento de la secuencia obtenida con los diferentes cebadores usando el programa EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html) y de esta manera obtener la secuencia consenso depurada para el fragmento conseguido en cada caso. El uso de una secuencia consenso de doble cadena, permite mejorar la calidad de la misma

ya que se tiene comprobaba tanto en sentido forward como en reverse y asimismo se pueden resolver indeterminaciones que se tengan en algunas de ellas. Con el fin de determinar a qué microorganismo pertenecía dicha secuencia consenso, se realizó una comparación con las presentes en las bases de datos públicas (“BLAST”: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> o Ribosomal Database Project: <https://rdp.cme.msu.edu/>).

3.3.3. RAPD-PCR.

La técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) se empleó para obtener un patrón de bandas de las diferentes cepas identificadas y a partir de este patrón poder establecer diferencias, entre cepas de la misma especie. A partir de las extracciones de ADN obtenidas previamente, se realizaron PCRs independientes empleando el cebador RapdBif (5´- AGT CAG CCA C -3´) (Tynkkynen *et al.*, 1999).

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl, dicha mezcla contenía 10X de Buffer KOD Hot Start, 25mM MgSO₄, 2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10µM del primer, 1U de la *Taq*DNA Polymerase (Novagen, Merck); y se completó el volumen a 50 µl añadiendo agua grado biología molecular.

Las condiciones de la RAPD-PCR fueron las siguientes:

1ciclo	Desnaturalización	95°C	5 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Anillamiento	32°C	2 minutos
	Extensión	72°C	2 minutos
1 ciclo	Extensión	72°C	10 minutos

3.4. Análisis de la biodiversidad de las cepas probióticas aisladas.

Previo a realizar los diferentes árboles filogenéticos, se realizó un BLAST entre las secuencias consenso de las diferentes cepas aisladas y se identificó que cepas, pertenecientes a la misma especie y misma muestra, mostraban un porcentaje de identidad entre el 97 al 100%, para de esta manera identificar que cepas eran iguales entre sí.

A partir de esta información, se construyeron los diferentes árboles filogenéticos mediante el uso del software Geneious 10.1, creando una base de datos propia con las secuencias consenso del gen 16S rARN de las cepas previamente seleccionadas y las secuencias de algunas cepas comerciales o que pertenecieran a colecciones de cultivos tipo (ATCC, CECT o JCM). Las cepas de referencia empleadas para la creación de los árboles se detallan en la **Tabla 8**.

CEPA	ACCESION NUMBER (GenBank)
<i>B. pseudocatenulatum</i> JCM5820	AB116329.1
<i>B. pseudocatenulatum</i> JCM7041	AB507135.1
<i>B. catenulatum</i> JCM7130	AB116295.1
<i>B. catenulatum</i> ATCC27539	M84784.1
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7060	AB116320.1
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7054	AB507114.1
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> CECT7210	HM118564.1
<i>B. longum</i> JCM11660	AB507124.1
<i>B. breve</i> ATCC15700	AB006658.1
<i>B. breve</i> JCM1192	AB116288.1
<i>B. bifidum</i> JCM1209	AB507076.1
<i>B. bifidum</i> DSM20456	NR_117764.1
<i>B. animalis lactis</i> Bb12	FJ169944.1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> JCM7117	AB507072.1
<i>B. angulatum</i> JCM1252	AB507068.1
<i>B. angulatum</i> ATCC27535	M84775.1
<i>B. adolescentis</i> JCM1251	AB116268.1
<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	NR_074802.1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	AF458075
<i>L. gasseri</i> DSM20243	AB008209
<i>L. acidophilus</i> LA5	JQ580993
<i>L. acidophilus</i> DSMZ20079	KM096595
<i>L. rhamnosus</i> HN001	ABWJ01000068
<i>L. rhamnosus</i> GG	GU550100
<i>L. oris</i> JCM11028	LC097079
<i>L. casei</i> Lc-10	AFYT01000013
<i>L. casei</i> strain:Shirota	AB531131
<i>L. paracasei</i> LAB13	JN039359
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14893	AJ310098

Tabla 8. Cepas de referencia usadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

Para observar la distancia filogenética que existía entre las secuencias se realizó un alineamiento múltiple, usando el algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). A partir de este alineamiento, se realizó un árbol filogenético empleando el método de *Neighbor-joining*, que determina la pareja de secuencias más cercanas entre sí, uniéndolas mediante un nodo y este proceso se repite con el resto de secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos que minimizan la longitud de cada una de las ramas internas. Para validar la robustez de cada uno de los árboles, se empleo el método de *Bootstrap*, realizando los replicados 1000 veces y posteriormente se obtuvo el consenso de cada árbol filogenético.

En el **diagrama 1**, se resume la metodología empleada para el procesamiento y análisis de las muestras empleadas en el estudio y las diferentes actividades funcionales realizadas para las diferentes cepas aisladas:

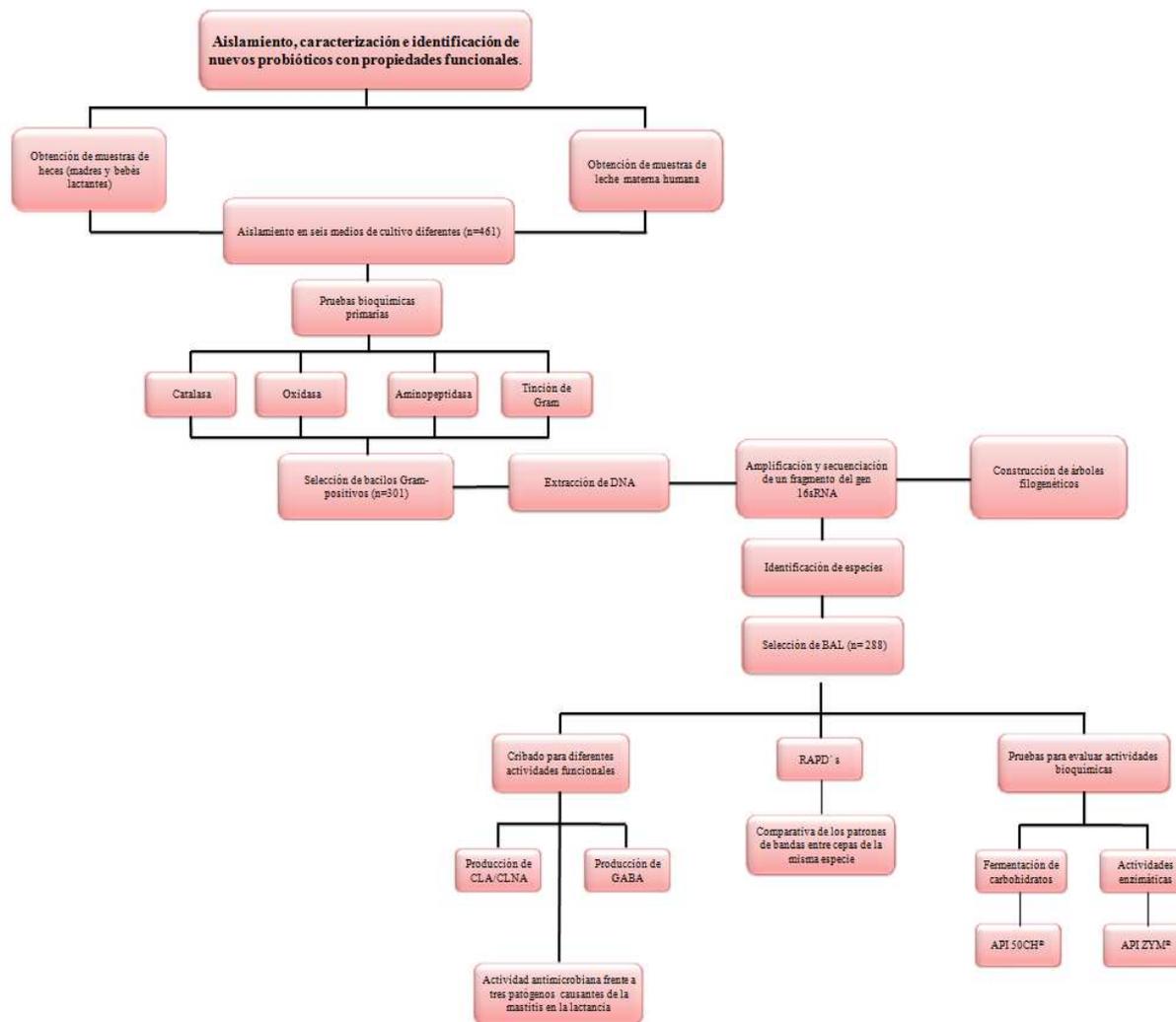


Diagrama1. Descripción del procedimiento general realizado para el desarrollo de este trabajo.

3.5. Evaluación de propiedades funcionales.

3.5.1. Evaluación de la producción *in vitro* de ácidos grasos conjugados: ácido linoléico (CLA) y ácido linolénico (CLNA).

3.5.1.2. Crecimiento de las cepas en presencia de ácido linoléico (LA).

Las diferentes cepas probióticas aisladas se cultivaron en 10 ml de caldo MRS + L-cisteína-HCl (Prolabo) 0.05% (MRSm) + Tween 80 (Prolabo) al 0.2% para realizar una activación de la cepa. Estos cultivos se llevaron a incubar a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, cada tubo se dividió en dos alícuotas de 5 ml para realizar dos ensayos en paralelo. Con la primera alícuota se realizó un subcultivo al 2% en 10 ml del mismo medio con y sin adición de LA (Sigma-Aldrich) (0.5g/l). Se llevó a incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas.

La segunda alícuota se centrifugó durante 15 minutos a 3990 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó dos veces con solución Ringer. Luego el pellet fue resuspendido en 10 ml de Medio Mínimo de Norris (MM). Se llevó a incubar a 37°C durante 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis y transcurrido este tiempo, se realizó un subcultivo al 2% en MM con y sin adición de LA (0.5g/l). Todos los tubos que contenían este medio fueron incubados recubiertos con papel aluminio, ya que este medio al contener riboflavina, es fotosensible.

Al transcurrir el tiempo de incubación, a las dos alícuotas se les midió la densidad óptica (DO) mediante un espectrofotómetro (SmartSpec Plus- BioRad), a una longitud de onda de 600 nm para el MRSm y a 530 nm para el MM.

Para calcular el crecimiento en presencia de LA expresado en porcentaje, se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{(DO_f - DO_i)}{DO_i} \times 100$$

Siendo, DO_i , la absorbancia obtenida del crecimiento de la cepa en medio MRSm o MM; y la DO_f la absorbancia obtenida del crecimiento de la cepa en los medios con adición de LA.

La composición del MM y las cantidades de cada componente, se describen en la **tabla 9**. Este medio fue esterilizado durante 10 min a 121°C 15psi, finalizado este proceso se mantuvo en agitación hasta su enfriamiento. Posteriormente, la botella que contenía el medio se protegió de la luz, mediante el uso de papel de plata.

Componente	Cantidad por litro
Adenina (Prolabo)	17,4 mg
Alanina (Prolabo)	200 mg
Ácido p-aminobenzoico (pABA) (Sigma-Aldrich)	10 mg
Ácido ascórbico (Prolabo) ^a	1 g
Asparragina (Prolabo)	100 mg
Biotina (Prolabo)	5 µg
Pantotenato de calcio (Prolabo)	200 µg
Cisteína-HCl (Prolabo)	200 mg
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O) (Prolabo)	10 mg
Ácido fólico (Prolabo)	10 µg
Guanina(Prolabo)	12,4 mg
Lactosa (Prolabo)	35 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O) (Prolabo)	200 mg
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ ·7H ₂ O) (Prolabo)	6,7 mg
Ácido nicotínico (Prolabo)	600 µg
N-Z-Case [®] (Sigma-Aldrich)	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄) (Prolabo)	2,5 g
Piridoxina hidrocloreuro (Prolabo)	1,2 mg
Riboflavina (Prolabo)	200 µg
Acetato de sodio anhidro (Prolabo)	25 g
Cloruro de sodio (Prolabo)	10 mg
Tween 80 (Prolabo)	0,5 ml
Tiamina hidrocloreuro (Sigma-Aldrich)	200 µg
Triptófano (Sigma-Aldrich)	200 mg
Uracilo (Sigma-Aldrich)	10 mg
Xantina (Sigma-Aldrich)	10 mg

Tabla 9. Composición del Medio Mínimo de Norris (pH ajustado a 6,8). ^a El ácido ascórbico al ser termolábil, fue esterilizado mediante filtración y añadido al medio luego de autoclararlo (121°, 15 min, 15psi).

La solución de LA empleada, se preparó tomando 30mg/ml al 2% de Tween 80 en agua destilada y se esterilizó mediante filtración de 0.22 micras (Sartorius). Se realizaron alícuotas de 1.5 ml y se mantuvieron en nevera hasta su uso, envueltas en papel de plata.

3.5.1.3. Determinación de la producción de ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido linolénico conjugado (CLNA).

Una vez seleccionadas las cepas capaces de crecer en presencia de CLA. El análisis de la producción de CLA y CLNA fue llevado a cabo en el Departamento de bioactividad y análisis de alimentos, por el grupo de biomarcadores Lipídicos en alimentación y salud del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), siguiendo el

protocolo que se describe a continuación. Se realizó un cultivo de las diferentes cepas bacterianas seleccionadas, en 10 ml de caldo MRS + L-cisteína-HCl 0.05% (MRSm) + Tween 80 al 0.2% para realizar una activación de la cepa, posteriormente estos cultivos se llevaron a incubar a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis durante 24 horas. A continuación, se realizó un subcultivo al 2% en 10 ml de caldo MRS + L-cisteína-HCl 0.05% (MRSm) + Tween 80 al 0.2% con y sin adición de 0.5mg/ml de LA o 0,5mg/ml de LNA y se incubaron a 37°C, durante 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis. Para determinar el CLA y CLNA producido por las diferentes cepas, se empleó un método de transesferificación directa (Castro-Gómez *et al.*, 2014) y a las muestras se les adicionó ácido heptadecanoico (C17:0; Sigma-Aldrich), como estándar interno. Los esteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se disolvieron en n-hexano y se cuantificaron por cromatografía de gases (GLC) en un Clarus[®] 500 (Pelkin Elmer, Beaconsfield) equipado con una columna VF-23 de 30m de largo (30m x 0,25mm, x 0,25µm, Varian, Middelburg). Las condiciones de la cromatografía de gases fueron las siguientes: la temperatura inicial fue de 80°C. Luego la temperatura se incrementó 30°/min hasta 170°C, se mantuvo durante 3 minutos y posteriormente se incrementó 30°C/min hasta 230°C y mantenida durante 7 minutos. El gas portador fue Helio a una presión de 15 psi y una relación de separación 1:50. El volumen de inyección fue 0,5µl y el tiempo de análisis 15 minutos.

Los picos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención del Tonalin[®] usado como estándar para el CLA. La identificación de los isómeros del CLNA fueron analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) y los resultados de la producción de CLA y CLNA se expresaron en µg/ml usando los estándares internos. Para la evaluación de producción de CLA y CLNA en leche desnatada y leche de fórmula Blemil Plus Forte-1, los medios fueron suplementados con L-cisteína-HCl 0.05% y casaminoácidos 0.8% (p/v). Las condiciones de crecimiento e incubación fueron las mismas que en el experimento previo y la determinación de CLA y CLNA se analizó posterior a la fermentación bacteriana.

3.5.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de las diferentes cepas aisladas frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mitis*.

A partir del glicerinado de cada una de las cepas probióticas a evaluar, se realizó un cultivo líquido al 1% en caldo MRS y se llevó a incubar en condiciones de aerobiosis a

37°C durante 24h. Posteriormente, los cultivos de las cepas se centrifugaron a 3990 rpm durante 15 minutos, el pellet descartado y los sobrenadantes se neutralizaron a pH 7,0 ± 0,2 con NaOH 1M. Luego los sobrenadantes se filtraron usando filtros de 0,2 micras para esterilizarlos y se almacenaron a -24°C hasta su uso. En el caso de los patógenos, se realizó un cultivo líquido ON al 1% en 10 ml de caldo CASO que llevó a incubar en condiciones de aerobiosis con una agitación de 220 rpm durante 24 h, el día previo a realizar el ensayo.

Las pruebas de inhibición se llevaron a cabo en tubos con 34 ml de caldo CASO y 6 ml de sobrenadante neutralizado (correspondiente a un 15%) procedente de las diferentes cepas probióticas seleccionadas. El control negativo de la prueba correspondió a un tubo con 34 ml de caldo CASO y 6 ml de caldo MRS; mientras que el control positivo se le añadió un 15% de sobrenadante del *Lactobacillus salivarius* CECT5713 o *Lactobacillus fermentum* CECT5716. Posteriormente, cada uno de estos tubos se inoculó con 400 µl (1%) del cultivo ON de cada patógeno y se incubaron en condiciones de aerobiosis a 220 rpm, 37°C. La curva de inhibición de crecimiento se realizó mediante la evaluación de dos parámetros: medición de la DO a 600 nm y recuento de UFC/ml. Cada una de estas medidas se realizó a los tiempos 0 (correspondiente al momento en que se realizó el inóculo), 3, 6, 8 y 24 h. Las diluciones para determinar las UFC/ml se realizaron en solución Ringer, sembrando cuatro placas por dilución. Se incubaron en aerobiosis, 37°C durante 24 h. Las diluciones sembradas fueron las apropiadas para obtener colonias entre 30-300 UFC/ placa. Para el cálculo de las UFC, se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{Número de colonias} * \text{factor de dilución} * 10$$

Donde el factor de dilución corresponde a la dilución sembrada y el número 10, un factor de corrección que se debe aplicar a las muestras que se siembran en superficie, ya que la cantidad sembrada corresponde a la décima parte de un mililitro.

La actividad antimicrobiana se realizó frente a tres patógenos diferentes: *S. aureus* CECT4013, *S. epidermidis* CECT231 y *S. mitis* ATCC49456, microorganismos involucrados en causar la mastitis en la lactancia.

Las cepas probióticas que se evaluaron fueron la ORD0529, ORD0713 y ORD0714, todas ellas pertenecientes a *L. gasseri*, ya que esta especie ha sido descrita en la

bibliografía por tener un efecto inhibitorio frente a estos patógenos. Como control positivo se usó *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716, cepas disponibles comercialmente que tienen actividad antimicrobiana demostrada frente a diversos patógenos, entre ellos algunas cepas de *Staphylococcus* spp. causantes de la mastitis durante la lactancia (Jiménez *et al.*, 2008; Olivares *et al.*, 2006).

Previo a la utilización de los controles positivos, se realizó una identificación de cada uno de ellos para de esta manera, asegurar que se estaba trabajando con un cultivo puro del microorganismo. La identificación se llevó a cabo mediante PCR, usando los cebadores 16s1a y 16s1b y posteriormente realizando el BLAST de la secuencia consenso obtenida del gen ribosomal 16S rARN, mediante el uso de un software adecuado.

Para las unidades formadoras de colonias (UFC) y la densidad óptica (DO₆₀₀) en el experimento con *S. aureus* CECT4013 se ha ajustado un modelo de análisis de varianza con medidas repetidas con variable dependiente al logaritmo natural de UFC y DO. Se ha realizado análisis gráfico del Ln(UFC) y del Ln(DO₆₀₀) frente a tipo de sobrenadante. Todos los datos se han gestionado y analizado con SAS 9.4 y SAS Enterprise Guide 7.1 (2002-2010) by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). En el caso de *S. epidermidis* CECT231 y *S. mitis* ATCC49456 se han realizado gráficas del Ln(UFC) y del Ln(DO₆₀₀) para cada concentración de bacterias por separado. El tratamiento de los datos fue realizado con ayuda de la empresa MIXeSTAT Solutions.

3.5.3. Producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA).

3.5.3.1. Detección de presencia de la enzima Glutamato Decarboxilasa (GAD).

Se realizó un crecimiento mediante cultivo líquido y en este caso, dependiendo si eran lactobacilos o bifidobacterias el medio empleado y las condiciones de incubación fueron diferentes. Los lactobacilos se inocularon (1ml) en 10 ml de caldo MRS y se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo aerobiosis, mientras que las bifidobacterias se inocularon (1ml) en 10 ml de caldo MRSc (caldo MRS+L-Cys HCl 0,25%) y se incubaron durante 48 horas a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis. Para realizar esta prueba se empleó un control positivo (*E. coli* ATCC25922) y un control negativo (*S. aureus* ATCC25923). De cada una de las cepas control, se realizó un cultivo líquido,

resuspendiendo una colonia de cada microorganismo en 10 ml de caldo CASO y se llevó a incubar a 37°C, 200 rpm en aerobiosis durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación, los cultivos, tanto de los controles como de las cepas a evaluar, se llevaron a centrifugar a 3990 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de Solución Salina al 0.85% (SS) para realizar un lavado de las células y retirar el resto de medio que pudiera quedar presente. Los tubos se llevaron a centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones descritas anteriormente y el pellet obtenido se resuspendió en SS llevando todos los cultivos a un patrón de turbidez entre 0.2-0.4, el cual se midió mediante el uso de un espectrofotómetro (SmartSpec Plus- BioRad) a una longitud de onda de 600nm.

A continuación, de cada uno de los tubos se tomaron 500 µl y se mezclaron con 200 µl del reactivo GAD (ver composición en la **tabla 10**) en un tubo de 2 ml, se mezcló por inversión y se llevó a incubar a 37°C bajo condiciones de aerobiosis, realizando lecturas cada hora durante 4 horas y finalmente a las 24 horas.

La interpretación de la prueba se realizó mediante la observación de cambio de color, considerando la presencia de la enzima GAD (prueba positiva) como el cambio de color de la suspensión de amarillo a azul (**Fig. 21**).

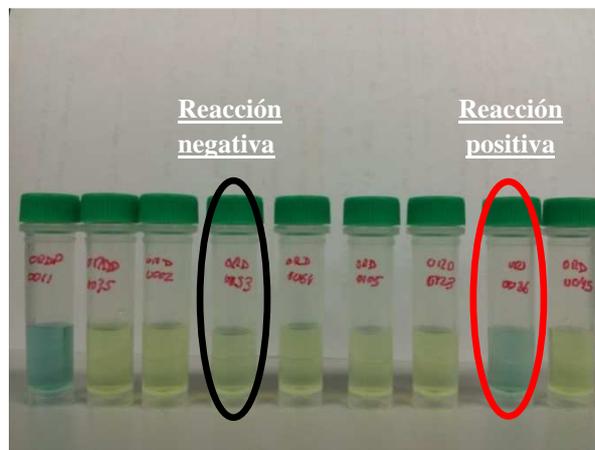


Figura 21. Interpretación visual de la prueba de la presencia de la enzima GAD.

Componente	Cantidad por 100 ml
Glutamato monoacídico comercial (Sigma-Aldrich)	0.1 g
Verde de bromocresol (Prolabo)	0.005 g
Cloruro de Sodio (NaCl) (Prolabo)	9 g
Na ₂ EDTA (Prolabo)	37 mg

Tabla 10. Composición del reactivo GAD. pH: 3,4 ajustado con HCl. Este reactivo fue esterilizado mediante filtración por 0.22 µm en un frasco ámbar y mantenido en nevera un máximo de 2 meses.

3.5.3.2. Análisis y determinación de la producción de GABA.

Una vez se determinó que cepas tenían la enzima GAD, se realizó un inóculo (1%) de cada una de estas cepas positivas en 10 ml de caldo MRSm (Caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%). La incubación se realizó durante 14 horas, a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis, para obtener un cultivo over-night (ON). Transcurrido el tiempo de incubación, se mezclaron bien los tubos y se realizó un subcultivo de cada uno de estos cultivos ON, manteniendo el mismo volumen de medio y concentración de inóculo y se llevaron a incubar bajo las mismas condiciones descritas previamente. Posteriormente, de cada uno de estos ON, se inocularon 200 µl en 20 ml de caldo MRSm + Monoglutamato de Sodio (MGS) (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones (0, 20, 30 y 50 mg/ml) y se llevaron a incubar a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis durante 72 horas. Finalizado el tiempo de incubación, los cultivos se llevaron a centrifugar a 3990 rpm durante 15 min. Se descartó el pellet y el sobrenadante fue filtrado mediante filtros de 0.22 µm y almacenado a -24°C hasta su análisis.

El análisis para determinar la concentración (mg/ml) de GABA producido y ácido glutámico consumido por cada una de las cepas fue llevado a cabo por la Unitat de Tècniques Separatives i Síntesi de Pèptids de los Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, quienes emplearon la técnica de espectrometría de masas mediante el uso del sistema UPCL Acquity (Water Chromatography) acoplado a un sistema AB Sciex API 3000. Para ello, se preparó una curva estándar de GABA desde 20 ppb (ng/ml) hasta 100 ppb usando agua MiliQ con 0.1% de ácido fórmico (Fluka). El estándar interno empleado estaba a 500 ppb.

Se realizaron dos análisis independientes, donde cada muestra (sobrenadante) fue diluida 1/10000 y analizada por triplicado. En un primer análisis, las muestras fueron diluidas 1:100 con agua MiliQ y nuevamente 1:100; mientras que para el segundo análisis, las diluciones de las muestras fueron diluidas 1:10 con agua MiliQ (1 ml de muestra en 10 ml) y luego diluidas tres veces más 1:10. Esto permitió disminuir el error acumulado que normalmente se obtiene al realizar diluciones, obteniendo de esta manera unas SD, dentro de las mediciones de una misma muestra, mucho más bajas.

Para el segundo análisis, las cepas y condiciones de cultivo, fueron las mismas que se emplearon en el ensayo anterior y las determinaciones se hicieron sólo para la producción de GABA, mientras que en el primer análisis se determinó tanto producción de GABA como ácido glutámico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de microorganismos en las muestras.

El último trimestre del embarazo está influenciado por señales hormonales así como cambios significativos en la microbiota intestinal de la madre y es el momento en el que las bacterias intestinales aparecen en el conducto mamario. Dichos cambios están ocasionados por un aumento en la presión de las arterias mesentéricas, ejercido por el feto, que como consecuencia produce un incremento en la translocación de bacterias del intestino de la madre hacia el torrente sanguíneo y las glándulas mamarias (Fernández *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta esto y que la concentración de bacterias decrece durante la lactancia, los tiempos de muestreo que se realizaron en este estudio, fueron a la semana, a los 15 y 30 días y finalmente a los tres meses de dar a luz. Asimismo, las muestras de heces de pareja madre-hijo, fueron recogidas el mismo día en que se recolectó la leche materna.

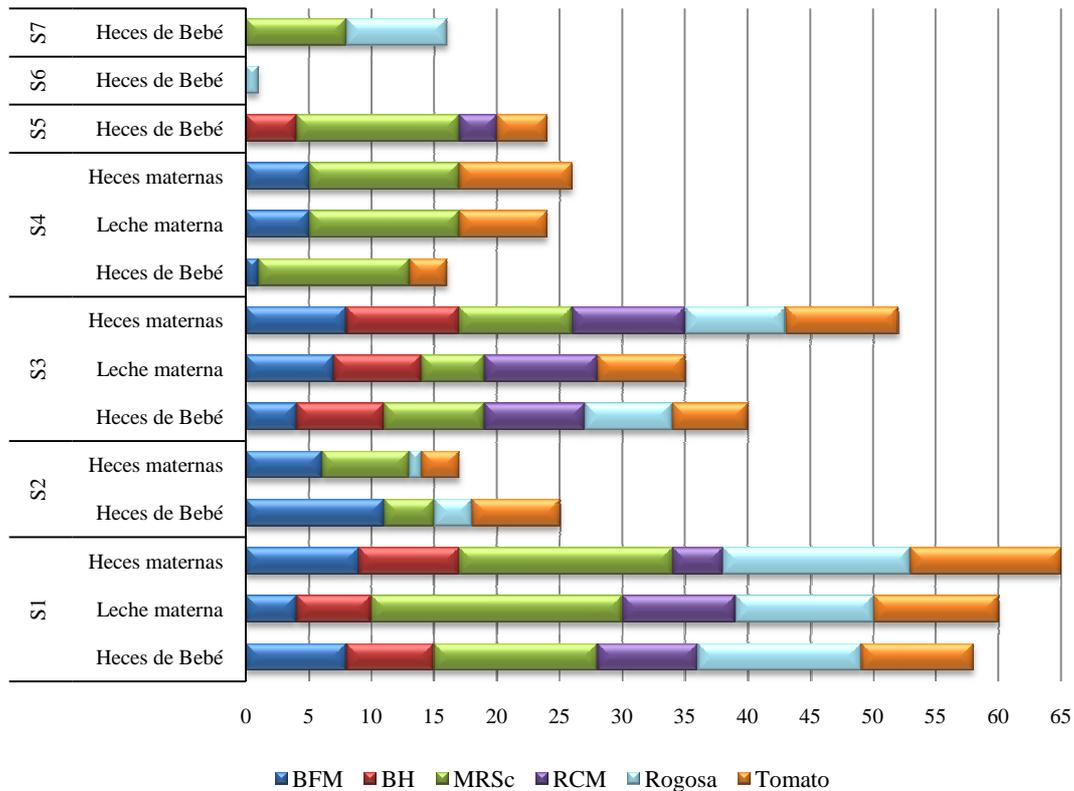
Las personas que accedieron a participar como donantes de muestras fueron 7 madres lactantes, aunque sólo de una madre (S1), fue posible recoger las cuatro muestras de leche y sus respectivas heces madre-hijo, mientras que de las otras madres se obtuvieron ciertas muestras de leche o solamente sus heces o las de su bebé. En total, se recogieron un total de 32 muestras (**Tabla 11**).

Muestra	Leche materna				Heces de madre				Heces de bebé			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
S1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
S2					✓				✓			
S3		✓	✓			✓	✓			✓	✓	
S4	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	
S5									✓			
S6										✓		
S7											✓	

Tabla 11. Muestras recolectadas para este estudio. El prefijo (S=sujeto) se refiere a las diferentes madres que accedieron a participar en este estudio, seguido de un número para diferenciarlas. Los números 1^a, 2^a, 3^a y 4^a, corresponden a los tiempos de muestreo: 7 días, 15 días, 30 días y 3 meses después de dar a luz, respectivamente.

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante el crecimiento de colonias aisladas en cultivos sólidos. De esta manera, todos los medios que se emplearon para el aislamiento primario de los microorganismos fueron efectivos, consiguiéndose aislar un total de 461 cepas (**Gráfica 1**). Es importante destacar, que de algunas muestras no fue posible obtener crecimiento de colonias en algunos de los medios de cultivo empleados, ya que muchos microorganismos presentes

en este tipo de muestras son no cultivables y es necesario el uso de técnicas independientes de cultivo para poder identificarlos (Gueimonde & Collado, 2012). En este caso en particular, como el objetivo de este trabajo era aislar microorganismos a partir de estas muestras y no determinar la cantidad y prevalencia en la composición de la microbiota de cada una de ellas, se decidió el uso de técnicas dependientes de cultivo. Por otro lado, en el agar BFM, el crecimiento de las colonias fue demasiado lento y a las 48 horas de incubación las colonias no estaban lo suficientemente grandes para poder realizar su aislamiento, por lo que las placas se tenían que dejar incubando hasta las 72 horas. La explicación a esto, puede ser el hecho que se trate de un medio selectivo, lo que puede ocasionar un retraso en la tasa de crecimiento de los microorganismos presentes. En algunos casos, el paso de cultivo de medio sólido a líquido, dificultó la recuperación de algunas cepas (0,26%), una posible explicación a esto, es la sensibilidad que tienen ciertos microorganismos a los cambios de fase de medio de cultivo, por lo que cualquier tipo de alteración en sus condiciones de cultivo, afectan de forma negativa su crecimiento.



Gráfica 1. Número de aislamientos obtenidos en los diferentes medios empleados para cada una de las muestras. Las madres participantes en el estudio se simbolizan con el prefijo S (sujeto) seguido de un número para diferenciarlas.

Las variaciones en la diversidad bacteriana (microbiota variable) pueden estar explicadas por factores externos como la nutrición, el sistema inmune y el estado fisiológico del hospedador, así como otros factores de estilo de vida y ambientales (Bergmann *et al.*, 2014). Esto puede explicar la notable diferencia de recuperación de cepas, tanto inter como intraindividual, ya que la carga microbiana no es la misma, a pesar de ser del mismo tipo de muestra, pero no el mismo donante (S). La obtención de una cantidad diversa de muestras, nos permitió aislar y conseguir una mayor biodiversidad de especies, representativa de cada una de las muestras analizadas.

Las diferencias generales respecto a las cepas bacterianas que se aislaron, también podrían ser causa de los métodos usados para determinar las bacterias presentes en las muestras (Bergmann *et al.*, 2014), que en este caso, el usar medios selectivos, que estimulan el crecimiento de ciertas especies de microorganismos e inhiben el desarrollo de otras, tuvieron una relación directa en la cantidad y prevalencia de ciertos microorganismos.

Es importante tener en cuenta que el objetivo del trabajo era el aislamiento de bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, por lo que se dirigió la metodología del estudio para conseguir el aislamiento de estos géneros bacterianos. En la **figura 22** se observan las colonias recuperadas en agar MRS, donde se diferencian dos tipos de morfologías, las colonias pequeñas opacas de color beige, de borde liso y regular correspondientes a bifidobacterias y por otro lado colonias de tamaño un poco más grande, con borde liso, brillantes y con un halo alrededor, pertenecientes al género *Lactobacillus*.

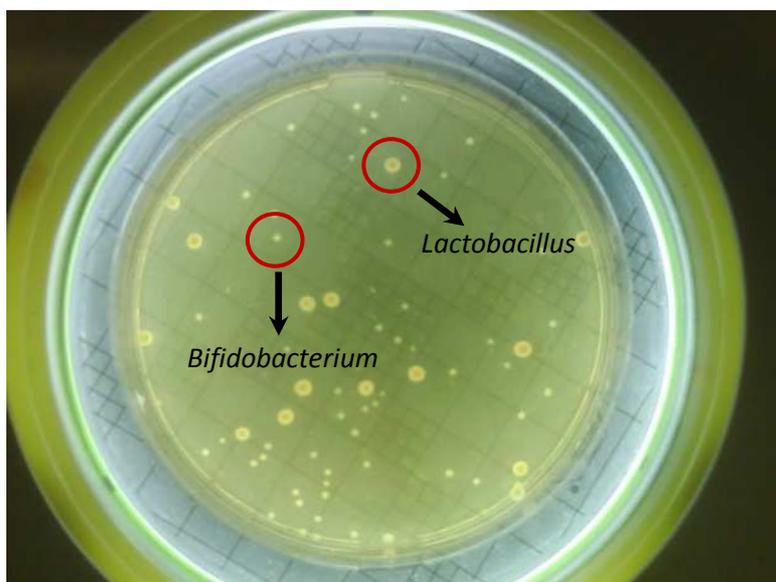


Figura 22. Colonias aisladas en agar MRSc (agar MRS+0.25% L-Cys-HCl), provenientes de una muestra de leche materna

Como primer paso para la clasificación de los diferentes aislados de las muestras, se creó una base de datos en Excel (**Anexo I -formato digital**), donde se introdujeron los datos correspondientes a la información de origen de cada una de las cepas. Un código consecutivo precedido por el prefijo ORD fue asignado a cada cepa, iniciando por el código 0001 y posteriormente se introdujo el medio de donde provenía, la muestra de la cual había sido aislada, el sujeto al que pertenecía la muestra, el número de toma de la muestra y seguidamente el resultado de las diferentes pruebas bioquímicas primarias (oxidasa, catalasa y aminopeptidasa), F6PPK y la tinción de Gram.

En base a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas primarias, se realizó una primera selección de cepas. Los resultados de las pruebas de la oxidasa, que en todos los casos fue negativa, y la catalasa, en la que sólo se obtuvieron unos pocos positivos, no fueron de mucha utilidad a la hora de discernir con que cepas se continuaba el estudio, por lo que pruebas bioquímicas primarias más diferenciales y relevantes fueron las que se tuvieron en cuenta para realizar la selección.

Se aplicó un primer filtro de acuerdo a los resultados de la prueba de la aminopeptidasa y la tinción de Gram, de esta última prueba se realizó una fotografía de la morfologías observadas al microscopio y fueron útiles para realizar una clasificación presuntiva de las posibles BAL aisladas. En las observaciones realizadas bajo el microscopio de las diferentes cepas, se observaron formas bacilares, bacilos en forma de “Y” curvos y cocos en racimos o en cadena (**Fig. 23**). Respecto a la prueba de la aminopeptidasa se usó como prueba complementaria, debido a que la tinción de Gram puede variar dependiendo de la edad del cultivo y los tiempos empleados en la tinción, evitando de esta manera descartar microorganismos que pudieran ser útiles para el estudio.

Pese a que la enzima F6PPK no permite la distinción a nivel de especie, es considerada una herramienta taxonómica para la identificación del género *Bifidobacterium* (Felis & Dellaglio, 2007; Ventura *et al.*, 2004). Por lo tanto, con los resultados obtenidos de esta prueba se realizó una clasificación preliminar y presuntiva de los microorganismos pertenecientes a este género.

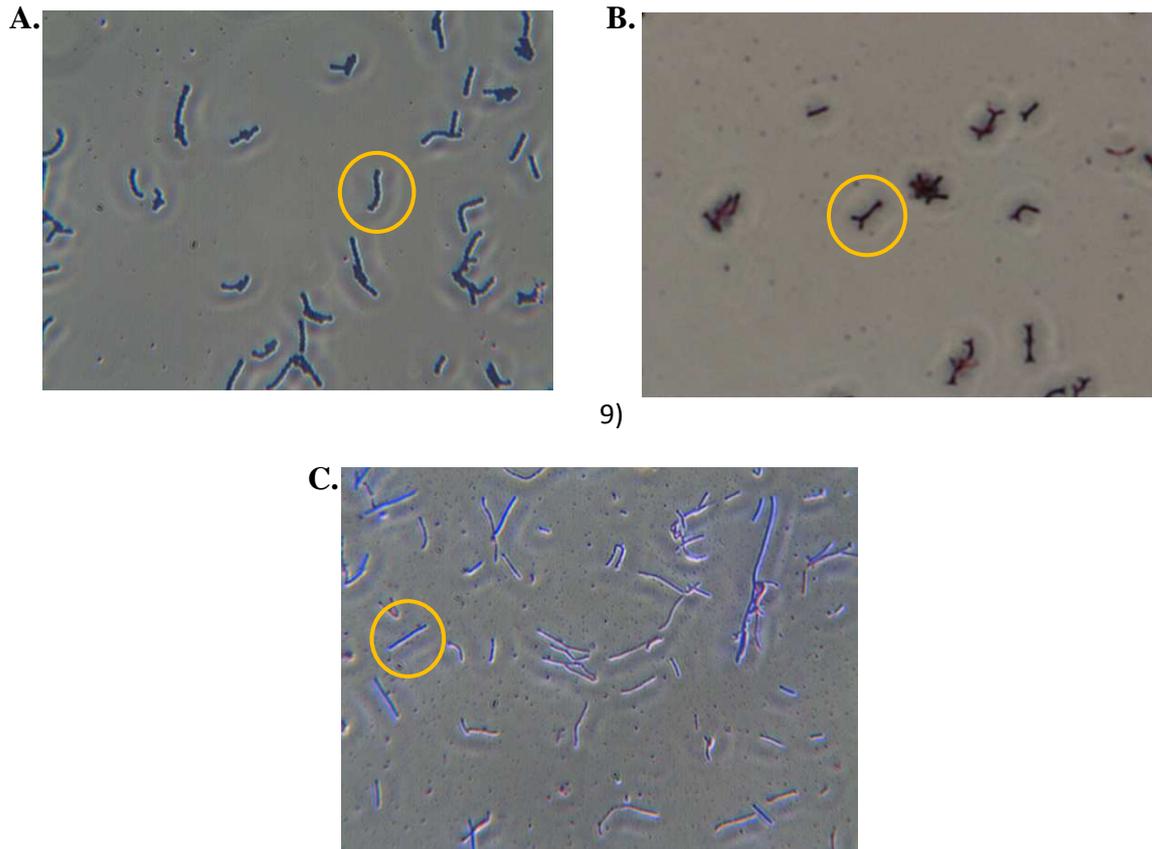
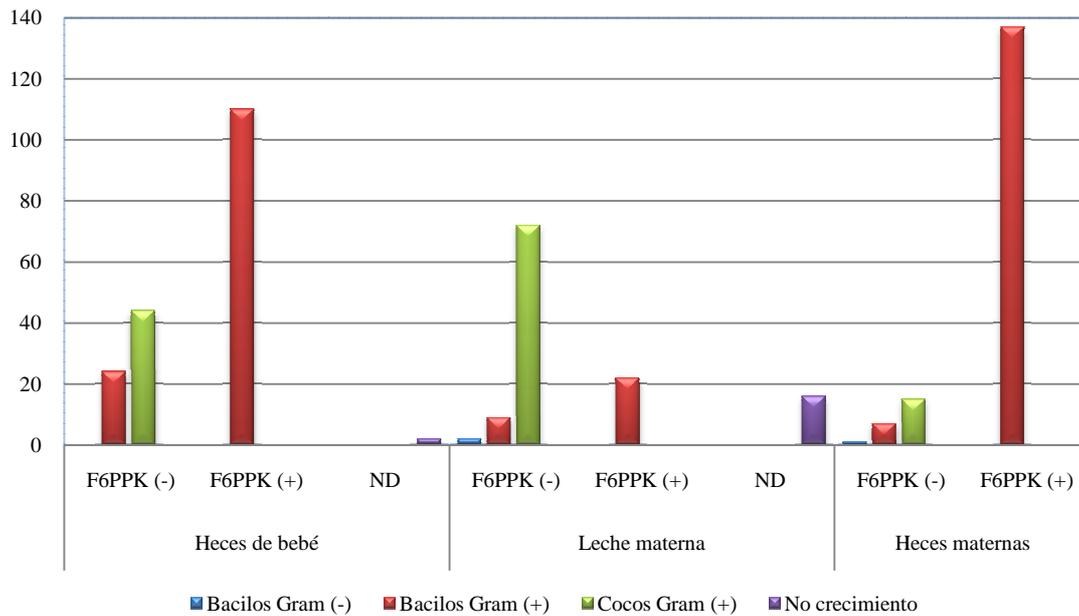


Figura 23. Diferentes morfologías observadas bajo el microscopio. **A.** Cocos Gram-positivos (ORD0233). **B.** Bacilos en forma de Y Gram-positivos-morfología típica de una bifidobacteria (ORD0454). **C.** Bacilos alargados Gram-positivos-morfología típica de un lactobacilo (ORD0185).

En la **gráfica 2**, se muestran de manera integrada los resultados de estas tres pruebas (Tinción de Gram, F6PPK y aminopeptidasa). De un 3,9 % del total de las cepas aisladas, no fue posible obtener resultados de las pruebas bioquímicas primarias, ya que al realizar los cultivos líquidos a partir de los viales de stock realizados previamente, no se obtuvo ningún tipo de crecimiento. Esto evidencia las condiciones especiales de crecimiento que tienen las BAL provenientes de este tipo de muestras (Martín *et al.*, 2009).

Respecto a las muestras de leche materna, se aislaron un total de 121 cepas, donde un 59,5% correspondió a cocos Gram positivos, un 25,62% a bacilos Gram positivos y un 1,66% a bacilos Gram negativos. El 13,22% restante, fueron las cepas a las que no fue posible realizarle las pruebas bioquímicas primarias. Se obtuvo un porcentaje muy elevado de cocos Gram positivos, resultado que coincide con los reportados por Martín y *col.* en 2003, Jost y *col.* en 2013 y Soto y *col.*, en 2014, quienes aislaron e identificaron gran cantidad de cocos Gram positivos, pertenecientes a dos géneros anaeróbicos facultativos que forman parte de la microbiota comensal de la leche

materna, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Asimismo, la presencia de estos géneros evidencia que las comunidades bacterianas de la piel, también pueden ser otra fuente de las bacterias presentes en la leche y que dicha interacción, permite su crecimiento a la hora de aislar microorganismos de la leche materna (Hunt *et al.*, 2011). Al no ser objeto de interés los cocos Gram positivos no fueron identificados genotípicamente. Respecto a los bacilos Gram positivos aislados, según los resultados obtenidos de la prueba de la F6PPK, un 24,6% pertenecían al género *Bifidobacterium*.



Gráfica 2. Resultados obtenidos de las tres pruebas más representativas para la primera selección de bacterias aisladas. ND: cepas que no presentaron crecimiento al momento de realizar el cultivo.

En cuanto a las heces de bebé, se aislaron 180 cepas, donde un 18,3% fueron cocos Gram positivos, hecho que no es extraño ya que durante las primeras semanas de vida, la microbiota gastrointestinal del bebé se asemeja a la microbiota vaginal, en el caso de parto natural; o de la piel de la madre, en caso de parto por cesárea; como lo son *Enterococcus* y *Streptococcus* (Arrieta *et al.*, 2014) y un 80,56% correspondieron a bacilos Gram positivos (de los cuales un 78,9% pertenecían al género *Bifidobacterium*). Una razón de haber aislado una mayor cantidad de BAL en heces de bebé que en leche materna, puede ser consecuencia de la diferencia de concentraciones de bacterias viables que tienen estas muestras ($>10^7$ UFC/g en heces vs. $<10^3$ UFC/ml en leche materna) (Martín *et al.*, 2009).

De las muestras de heces maternas, se aislaron un total de 160 cepas, donde un 9,38% eran cocos Gram positivos y un 90% bacilos Gram positivos, todos correspondientes al género *Bifidobacterium*, resultado a esperar ya que este género pertenece al *phylum Actinobacteria*, que después de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, es el siguiente más abundante en la microbiota de las personas adultas (Rodríguez *et al.*, 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas primarias, que nos fueron útiles para seleccionar las cepas que pasarían a la siguiente fase del estudio para ser identificadas, se observó que los medios de cultivo no siempre fueron selectivos para cada grupo de microorganismos para el cual estaban indicados, ya que en el medio RCM obtuvimos crecimiento de bifidobacterias siendo este medio indicado principalmente para el género *Clostridium*, del mismo modo que se obtuvo crecimiento de cocos Gram positivos en los demás medios indicados para el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos. Este hecho también fue observado por el grupo de Jost y *col.*, en 2013, quienes obtuvieron crecimiento de microorganismos en medios selectivos indicados para otras especies diferentes (Jost *et al.*, 2013).

4.2. Identificación y caracterización de las posibles cepas probióticas aisladas.

Una vez realizado el análisis de los datos obtenidos en todas las pruebas, se seleccionaron 288 cepas que cumplieron con los criterios primarios de selección para ser BAL y fueron a las que posteriormente se les realizó la amplificación del fragmento del gen 16s rARN para realizar la identificación a nivel de género y especie y en algunos casos, a nivel de cepa, si era posible; usando los dos pares de cebadores Y1/Y2 (348pb) y 16s1a/16s1b (1004pb). Dichos cebadores amplifican regiones conservadas del gen 16s rARN en bifidobacterias y lactobacilos respectivamente. En las **figuras 24 y 25**, se observan las electroforesis de los productos de PCR empleando los cebadores Y1Y2 y 16s1a16s1b, respectivamente.

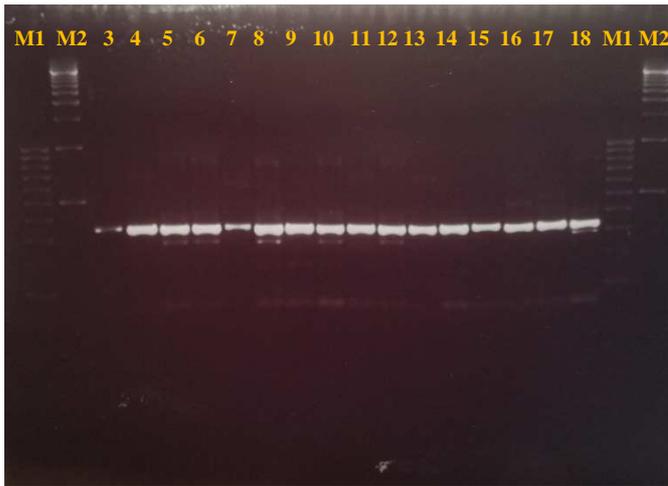


Figura 24. Amplificación de las muestras ORD0127-ORD0144 con los cebadores Y1Y2. Los carriles M1 y M2, corresponden a los marcadores moleculares de 100pb y 1 Kb, respectivamente

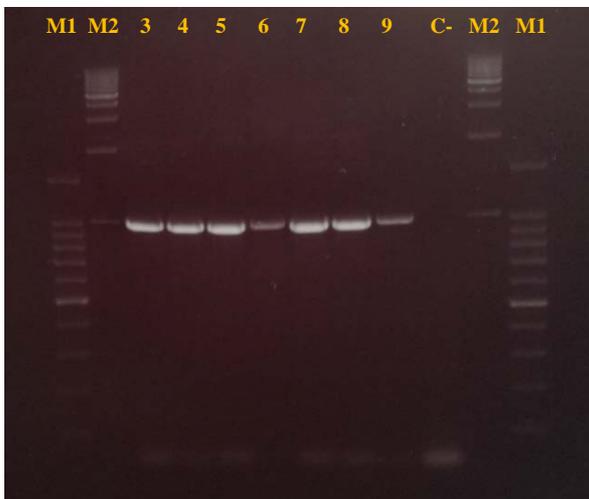


Figura 25. Amplificación de las muestras ORD0679-ORD0685 con los cebadores 16s1a y 16s1b. Los carriles M1 y M2, corresponden a los marcadores moleculares de 100pb y 1 Kb, respectivamente.

Se identificaron un total de 304 cepas, donde un 94,7% correspondió a bacterias ácido lácticas (BAL) y un 5,3% a otro tipo de microorganismos (enterococos y estafilococos), evidenciando de esta manera que los criterios de pre-selección antes de la secuenciación fueron adecuados. De las BAL identificadas un 8% correspondió a cepas aisladas de leche materna, un 44% a heces de bebé y un 48% a heces maternas. En las **gráficas 3A, B y C**, se observa la distribución de las cepas, en porcentajes, identificadas en las diferentes muestras.

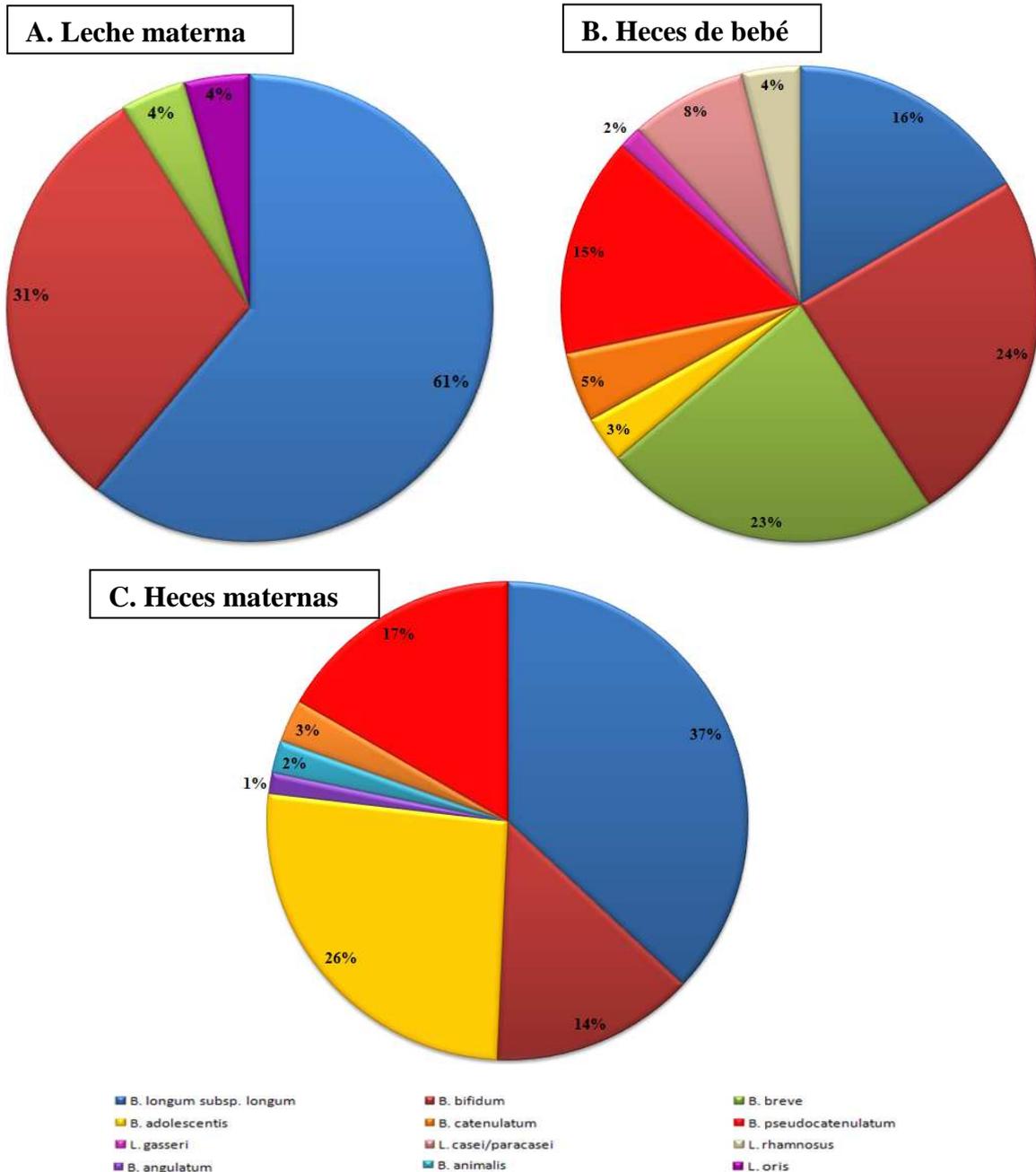
En las muestras de leche materna (**Gráfica 3A**), sólo fue posible aislar 23 cepas, donde la especie que se aisló mayoritariamente fue *B. longum* subsp. *longum* (61%), seguida de *B. bifidum* (31%), *B. breve* (4%) y por último *L. oris* (4%). La baja proporción de aislamientos obtenidos a partir de estas muestras, coinciden con los reportados por el grupo de Martin y col., en 2009, Jost y col., en 2013 y Soto y col., en 2014 quienes también obtuvieron una baja abundancia relativa tanto de *Lactobacillus* como

Bifidobacterium, hecho que no es extraño debido a las exigentes condiciones de crecimiento de estos microorganismos y a la baja concentración de bacterias viables en la leche materna ($< 3 \log \text{ UFC/ml}$), lo que hace que se encuentre cercano al límite de detección cuando se emplean métodos dependientes de cultivo (Martín *et al.*, 2009).

En general, las especies aisladas a partir de las muestras de leche materna, coinciden con las encontradas por diversos grupos de investigación, confirmando de esta manera que la leche materna es una fuente natural de BAL vivas, que ayudan a formar la microbiota del bebé mediante la lactancia, ejerciendo efectos beneficiosos para su salud, pudiéndola considerar, un alimento simbiótico (Martín *et al.*, 2003).

Respecto a las cepas identificadas de heces maternas y de bebé (**Gráficas 3B y 3C**), la biodiversidad que se obtuvo fue mucho mayor, tanto en bifidobacterias como lactobacilos, esto es debido en gran parte, a la alta concentración de bacterias que existe en las heces, lo que hace en cierta medida más fácil el aislamiento de microorganismos de estas muestras. Tanto en heces maternas como de bebé se identificaron *B. longum* subsp. *longum* (37% vs. 16%), *B. bifidum* (14% vs. 24%), *B. adolescentis* (26% vs. 3%), *B. catenulatum* (3% vs. 5%) y *B. pseudocatenulatum* (17% vs. 15%). Aunque *B. catenulatum* y *B. pseudocatenulatum*, se clasificaron por separado de acuerdo al BLAST realizado con la secuencia consenso obtenida; estas dos especies deberían ser tratadas como miembros del grupo *B. catenulatum*, debido a su similaridad en la fermentación de carbohidratos, tipo de mureína, en las secuencias del gen 16s rARN y la cercana homología ADN-ADN (70-76%) que tienen (Matsuki *et al.*, 1998).

Por otro lado, en las heces de bebé, se identificaron tanto lactobacilos como bifidobacterias, pero estas últimas se encontraron en mayor proporción, ya que generalmente, este tipo de microorganismos llegan a ser dominantes en el intestino del bebé al cabo de una semana después del nacimiento y esa tendencia se mantiene, hasta el destete (Makino *et al.*, 2011), ya que la presencia de oligosacáridos bifidogénicos en la leche materna, estimulan el crecimiento de este tipo de microorganismos (Gueimonde *et al.*, 2012). En cuanto a los lactobacilos identificados, coinciden con los encontrados por Rubio y col. en 2014, quienes también aislaron e identificaron *L. gasseri*, *L. rhamnosus* y *L. casei/paracasei* a partir de heces de bebés lactantes, aunque las proporciones de aislamiento fueron diferentes.



Gráfica 3. Distribución, mostrada en porcentajes, de las cepas identificadas a partir de las diferentes muestras analizadas en este estudio. **A.** Leche materna, **B.** Heces de bebé. **C.** Heces maternas.

Un inconveniente de usar cebadores que amplifican regiones conservadas del gen 16S rARN (cebadores universales) es que no permiten la diferenciación de especies estrechamente relacionadas, como es el caso de *L. casei* y *L. paracasei*. Aunque la taxonomía de estos dos microorganismos ha sido muy debatida, un estudio realizado por Ward y Timmins en 1999, tras realizar un alineamiento de la región V1 del gen 16s rARN de estas dos especies, encontraron diferencias entre las dos regiones, razón por la que diseñaron cebadores específicos para cada una de ellas, siendo capaces de

diferenciarlas entre sí. A pesar de esto, en 2002, Dellaglio y *col.*, propusieron que estas dos especies deberían ser miembros del mismo taxón por lo que tendrían que estar unidas bajo el nombre de *L. casei*. Sin embargo, la Comisión Judicial rechazó esta propuesta, razón por la que en la actualidad estas dos especies se siguen considerando diferentes. Hoy en día, una de las vías más empleadas para identificar lactobacilos, así como bifidobacterias y bacterias en general, es la secuenciación parcial o completa del gen 16S rARN. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la identificación basada en este gen no puede ser del todo precisa si se analizan especies estrechamente relacionadas, ya que este gen no es capaz de revelar diferencias significativas entre especies divergentes como es el caso de *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei*. En este caso, el análisis de la secuencia del gen 16S rARN puede indicar solo la pertenencia a un grupo, no a una especie definida (Felis & Dellaglio 2007). Por lo tanto, el uso de genes que codifican proteínas altamente conservadas, como es el caso de *hsp60*, *pheS* y *tuf*, podrían ser útiles para identificar y diferenciar este tipo de especies (Yu *et al.*, 2012).

Respecto a la identificación de cepas correspondientes a *L. gasseri*, es común en este tipo de muestras, ya que se ha evidenciado que durante el parto la microbiota vaginal se ve alterada, existiendo un incremento en las poblaciones de lactobacilos, especialmente *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. crispatus* y *L. jensenii* y por tanto, en el momento del nacimiento, estos lactobacilos vaginales pueden colonizar el GIT del bebé (Romero *et al.*, 2014).

El consumo de la leche materna introduce al bebé diversidad de bacterias, entre las que se encuentran tanto lactobacilos como bifidobacterias, que tienen una ruta directa al GIT del bebé mediante la lactancia. Esto podría explicar porqué la composición de la microbiota del GIT del bebé alimentado con leche materna está estrechamente relacionada a la encontrada en la leche materna de su respectiva madre y también, el porqué el desarrollo de una microbiota más diversa, coincide con el período de destete. Esta riqueza de bacterias, es un factor que podría contribuir a la diferencia de la microbiota fecal entre niños alimentados con leche materna y leche de fórmula (Roger *et al.*, 2010). Asimismo, es importante destacar que los oligosacáridos de la leche materna (HMOs), también juegan un papel clave en la conducción de la diversidad de la microbiota del GIT del bebé. Los HMOs son el tercer componente más grande de la leche materna, y aunque su complejidad estructural las hace no digeribles para el

huésped, son susceptibles a las enzimas hidrolíticas de la microbiota presente en el colon del bebé, actuando de esta manera como prebiótico, permitiendo el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias (Fernández *et al.*, 2012). Por otro lado, los lactobacilos presentes en la leche materna llegan a colonizar fácilmente el GIT del bebé, ya que parámetros, como el pH y el tiempo de vaciado, son menos drásticos en el estómago del bebé que en el adulto (Martin *et al.*, 2012). El pH gástrico en los bebés es menos ácido comparado con el de los adultos y esto ha sido determinado por diversos estudios, donde se ha observado que después de dos horas de haber ingerido el alimento, el pH gástrico en los bebés permanece entre 4-5, mientras que en adultos es inferior a 2, si bien en la fase intestinal, tanto bebés como adultos tienen un pH similar en el intestino delgado (Nguyen *et al.*, 2015). Por otro lado, los bebés tienen un tiempo de vaciado bajo o reducido (12-70 min) y solo alcanza los valores de un adulto después de los 6 meses de edad (Kaye, 2011), por lo que las bacterias están menos tiempo sometidas al pH ácido del estómago.

Se observó que varias de las especies identificadas estaban presentes tanto en heces de madre como de su respectivo bebé y en algunos casos en la leche materna; estos resultados sugieren de alguna manera, que no sólo existe una transferencia vertical madre-hijo mediante la lactancia materna, sino que también los microorganismos predominantes en el intestino de la madre embarazada (cepas específicas de *Bifidobacterium*) se transfieren al intestino del bebé, incrementando su número poco después del nacimiento y posteriormente llegan a colonizar (Mikami *et al.*, 2012). Este hecho fue estudiado y confirmado por el grupo de Makino y *col.*, en 2011, quienes encontraron cepas idénticas de *B. longum* subsp. *longum* en heces de madres (muestras tomadas antes del parto) y sus bebés (meconio, 3, 7, 30 y 90 días después del nacimiento) (Makino *et al.*, 2011).

Las cepas identificadas en las diferentes muestras analizadas en este trabajo, han sido detectadas mediante técnicas dependientes de cultivo por otros grupos de investigación, pero es importante tener en cuenta que las proporciones que dichos grupos han encontrado no son las mismas que las obtenidas en este trabajo, ya que su objetivo era determinar e identificar la cantidad y tipo de microorganismos que componen la microbiota de estas muestras y no exclusivamente el aislamiento de bacterias con un posible potencial probiótico, como es el caso de este trabajo. Asimismo, el empleo de diversos medios para lograr una mayor recuperación de todos los microorganismos

presentes, tiene una influencia directa en los diferentes porcentajes de recuperación obtenidos.

4.2.1. RAPD-PCR.

La técnica RAPD-PCR es sensible y específica porque usa de base el genoma completo del microorganismo para generar un perfil de ADN y la variación genómica entre especies bacterianas puede ser identificada por la diferencia en el número y tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos (Vincent *et al.*, 1998). Aunque en muchos casos esta técnica se emplea para identificar cepas a nivel de especie y de cepa, en este estudio, la técnica fue empleada para caracterizar, mediante el perfil de bandas obtenido, la similitud que existía entre cada una de las cepas de la misma especie, aisladas previamente, teniendo en cuenta además la muestra de donde se habían aislado. Para realizar las electroforesis y la posterior comparativa entre los diferentes perfiles obtenidos se usó el equipo Experion™ (BIO-RAD). El software de este equipo permitió realizar una comparativa de 40 perfiles de bandas, de forma simultánea.

En los RAPD obtenidos de las cepas de *B. catenulatum* se observaron diferentes patrones de bandas, encontrándose que las cepas del carril 1 al 3 (recuadro rojo) presentaban un patrón de bandas similar; y las cepas de los carriles 6 y 7 (recuadro verde), también presentaban una similitud en sus patrones (**Fig. 26**). En este caso, las cepas identificadas fueron aisladas de muestras de heces maternas (M3) y heces de bebé (B1), muestras que no tienen ninguna relación madre-hijo, con lo cual es coherente que no presentaran perfiles de bandas parecidos entre sí.

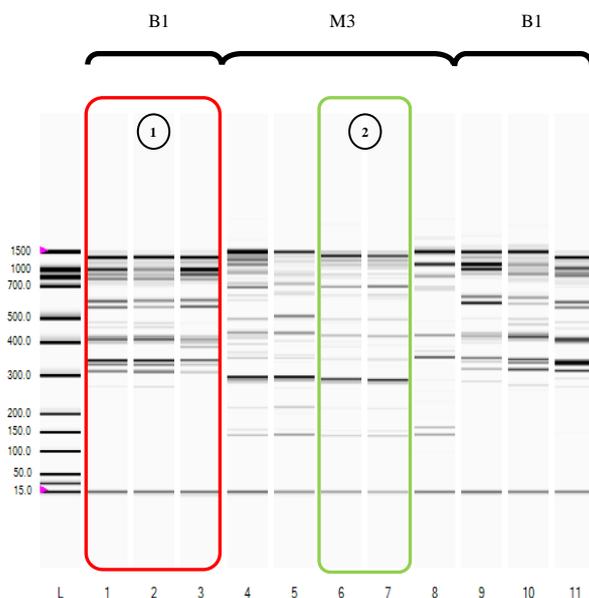


Figura 26. RAPD comparativos de las cepas de *B. catenulatum* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0341. 2. ORD0345. 3. ORD0356. 4. ORD0132. 5. ORD0137. 6. ORD0159. 7. ORD0164. 8. ORD0263. 9. ORD0340. 10. ORD0352. 11. ORD0192. Los recuadros de cada color significan que son cepas que comparten un perfil de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas y el número corresponde al donante de la muestra.

En cuanto a los perfiles RAPD de las cepas identificadas como *B. breve*, se observó una variedad más amplia de patrones de banda, llegando a observar hasta 9 grupos con perfiles de bandas parecidos entre las 26 cepas identificadas. Las cepas se aislaron de tres muestras diferentes, heces de bebé (B2 y B3) y leche materna (L3). Se observó que la cepa aislada de leche materna (carril 19-perfil 9) tenía un perfil parecido con la cepa aislada de las heces de bebé que fue alimentado con esa leche materna (carril 16-perfil 9), pudiendo suponer que son cepas iguales o parecidas (recuadros rojos-perfil 9). Hubo cepas aisladas de las muestras de heces de bebé recogidas a los 15 días (carril 15,21-perfil 8) y 30 días (carril 18- perfil 8) que compartieron el mismo perfil de bandas (recuadros azules), pudiendo suponer que son cepas que han evolucionado a partir de la misma cepa de bifidobacteria (**Fig. 27**).

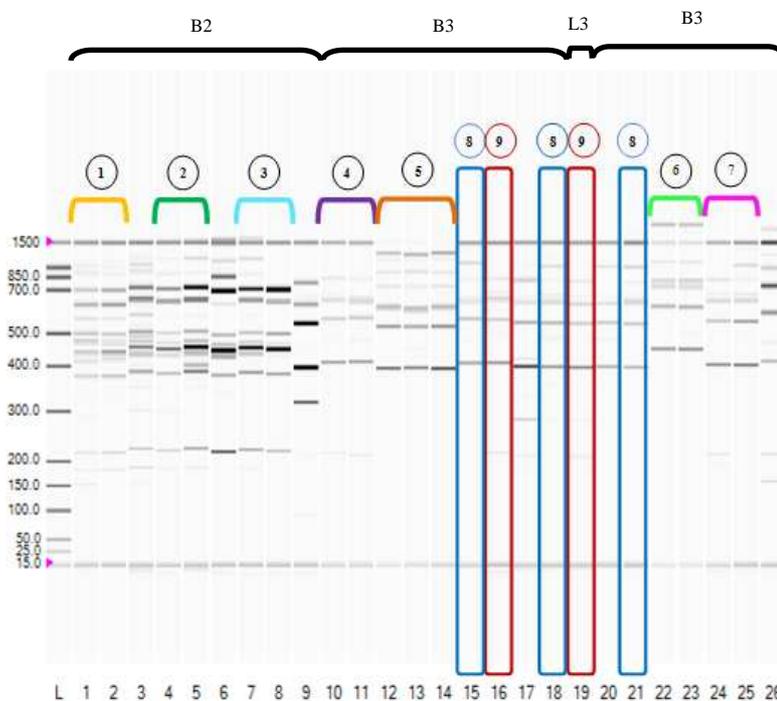


Figura 27. RAPD comparativos de las cepas de *B. breve* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb 1. ORD0051. 2. ORD0050. 3. ORD0059. 4. ORD0048. 5. ORD0092. 6. ORD0030. 7. ORD0035. 8. ORD0036. 9. ORD0038. 10. ORD0134. 11. ORD0138. 12. ORD0156. 13. ORD0160. 14. ORD0165. 15. ORD0124. 16. ORD0125. 17. ORD0128. 18. ORD0294. 19. ORD0129. 20. ORD0307. 21. ORD0123. 22. ORD0151. 23. ORD0153. 24. ORD0127. 25. ORD0291. 26. ORD0296. Los corchetes o recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, L: leche materna; y el número corresponde al donante de la muestra.

De los perfiles obtenidos de *B. animalis* (**Fig. 28A**), se observó que las tres cepas aisladas presentaron un perfil de bandas muy similar, hecho que no es extraño ya que fueron aisladas de la misma muestra (heces maternas del individuo 1 (M1)). En cuanto a

B. angulatum (**Fig. 28B**), se obtuvieron dos perfiles bien diferenciados entre las dos cepas identificadas, caso que es muy coherente, ya que cada cepa fue aislada de una muestra de heces maternas totalmente diferente, confirmando de esta manera que cada individuo tiene una microbiota propia y característica.

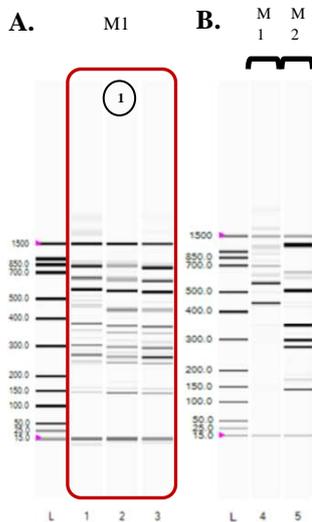


Figura 28. RAPD comparativos de las cepas de **A.** *B. animalis* L. marcador 1,5Kb. **1.** ORD0051. **2.** ORD0050. **3.** ORD0059 y **B.** *B. angulatum* L. marcador 1,5Kb. **4.** ORD0351. **5.** ORD0026. El recuadro de color significa que son cepas que comparten un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo M: heces maternas y el número corresponde al donante de la muestra.

En los RAPD comparativos de *L. rhamnosus* (**Fig. 29A**) se observó que todas las cepas aisladas tuvieron el mismo patrón de bandas, hecho similar que ocurrió con las cepas de *L.casei/paracasei* (**Fig. 29B**). Esto podría indicar que se trata de una misma cepa, ya que estas dos especies de lactobacilos se aislaron de la misma muestra (heces de bebé, B7). Los cebadores usados 16S1a/16s1b, no permitieron distinguir todas las cepas aisladas, pertenecientes a estas dos especies.

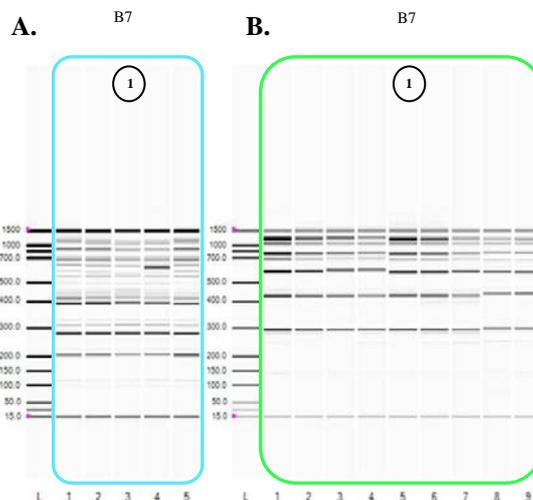


Figura 29. RAPD comparativos de las cepas de **A.** *L. rhamnosus*. L. marcador 1,5Kb. **1.** ORD0685. **2.** ORD0692. **3.** ORD0689 **4.** ORD0680. **5.** ORD0683. y **B.** *L. casei/paracasei* L. marcador 1,5Kb. **1.** ORD0681. **2.** ORD0682. **3.** ORD0686. **4.** ORD0687. **5.** ORD0690. **6.** ORD0691. **7.** ORD0694. **8.** ORD0679. **9.** ORD0688. Los recuadros de cada color indican cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé y el número corresponde al donante de la muestra.

De los perfiles obtenidos de *L. gasseri* (**Fig. 30A**), las dos cepas fueron aisladas de dos muestras de heces de bebé diferentes (B1 y B6), este hecho unido a que se obtuvieron patrones de bandas muy diferentes entre sí, apuntan a que podrían tratarse de cepas diferentes. En el caso de las bandas obtenidas de la cepa *L. oris* (**Fig. 30B**), no se pudo realizar ninguna comparación, ya que sólo se aisló una cepa correspondiente a esta especie.

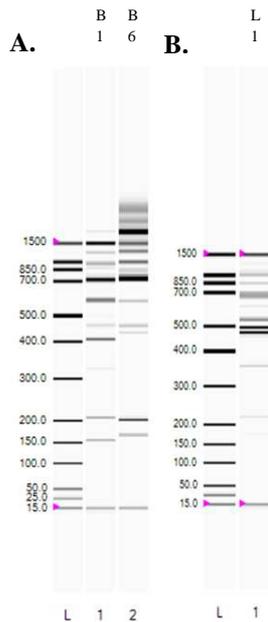


Figura 30. RAPD comparativos de las cepas de **A.** *L. gasseri*. L. marcador 1,5Kb. **1.** ORD0185. **2.** ORD0529. y **B.** *L. oris*. L. marcador 1,5Kb. **1.** ORD0255. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas, L: leche materna; y el número corresponde al donante de la muestra.

En cuanto a la comparación de los perfiles obtenidos por las diferentes cepas de *B. adolescentis* (**Fig. 31**), hubo un patrón de bandas muy variado, a pesar de que las cepas no han sido aisladas de tantas muestras como perfiles diferentes se observaron. En este caso, solo se consiguieron identificar 4 patrones iguales entre dos o más cepas, cada una correspondiente a cepas aisladas de la misma muestra y en ninguno de los casos, cepas encontradas en diferentes muestras coincidieron en tener patrones de bandas similares. Así pues, de las 17 cepas totales que fueron identificadas como *B. adolescentis* y aisladas de las muestras de heces maternas del individuo 1 (M1) se encontraron diversos perfiles de bandas y solo tres cepas presentaron perfiles de bandas similares (recuadros 1 y 3). En las muestras de heces maternas del individuo 3 (M3), se observó algo similar, ya que de las 15 cepas identificadas a partir de estas muestras, solo cuatro cepas compartían perfiles de bandas similares entre sí (perfiles 2 y 4). Es importante decir, que las cepas fueron identificadas de muestras de heces de cuatro individuos diferentes (M4, M1, M3, B5) y pertenecen a diferentes tiempos de muestreo, observándose de esta

manera que al cabo del paso del tiempo, tanto el bebé como la madre van adquiriendo un aumento en diversidad de las cepas de *B. adolescentis*.

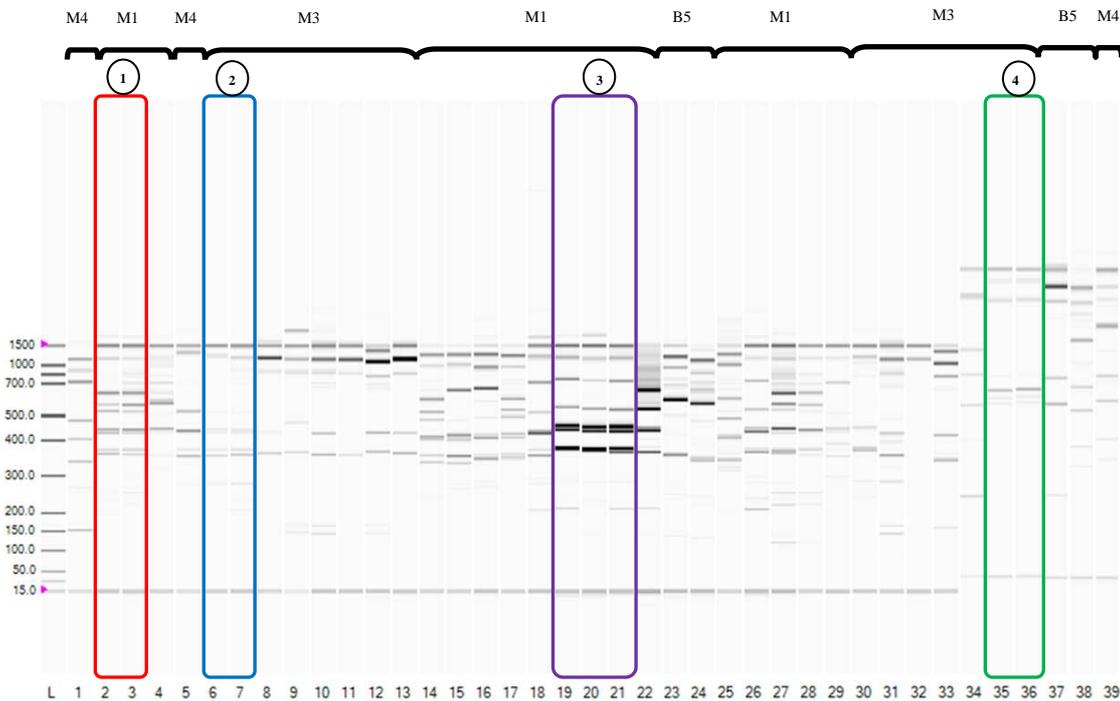


Figura 31. RAPD comparativos de las cepas de *B. adolescentis* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0410. 2. ORD0368. 3. ORD0378. 4. ORD0226. 5. ORD0408. 6. ORD0259. 7. ORD0270. 8. ORD0257. 9. ORD0152. 10. ORD0266. 11. ORD0272. 12. ORD0274. 13. ORD0275. 14. ORD0215. 15. ORD0216. 16. ORD0360. 17. ORD0210. 18. ORD0005. 19. ORD0106. 20. ORD0119. 21. ORD0098. 22. ORD0073. 23. ORD0456. 24. ORD0458. 25. ORD0227. 26. ORD0109. 27. ORD0208. 28. ORD0212. 29. ORD0010. 30. ORD0281. 31. ORD0264. 32. ORD0265. 33. ORD0169. 34. ORD0285. 35. ORD0301. 36. ORD0284. 37. ORD0459. 38. ORD0465. 39. ORD0391. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas; y el número corresponde al donante de la muestra.

En el caso de las cepas de *B. pseudocatenulatum*, también se obtuvieron múltiples perfiles entre las cepas identificadas de las diferentes muestras (**Fig. 32**) y varias cepas presentaron perfiles parecidos ya que fueron aisladas de las mismas muestras. Se observó también que algunas cepas aisladas de heces de bebé (B1) presentaron perfiles parecidos con algunas cepas aisladas de las heces maternas (H1) (recuadro 5), hecho que podría confirmar de alguna manera la teoría, de que no sólo existe una transferencia vertical madre-hijo mediante la leche materna, sino que también los microorganismos predominantes en el intestino de la madre embarazada (cepas específicas de *Bifidobacterium*) se transfieren al intestino del bebé, incrementando su número poco después del nacimiento para posteriormente colonizarlo (Mikami *et al.*, 2012).

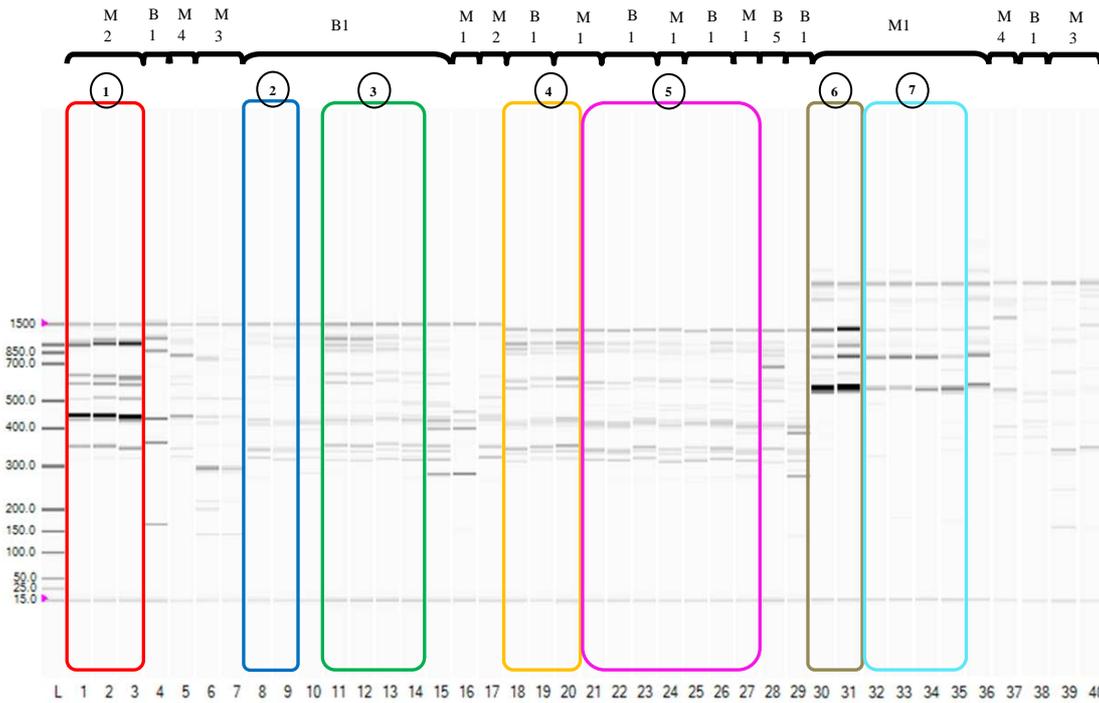


Figura 32. RAPD comparativos de las cepas de *B. pseudocatenulatum* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0037. 2. ORD0105. 3. ORD0027. 4. ORD0066. 5. ORD0387. 6. ORD0139. 7. ORD0140. 8. ORD0186. 9. ORD0220. 10. ORD0194. 11. ORD0205. 12. ORD0206. 13. ORD0200. 14. ORD0203. 15. ORD0229. 16. ORD0224. 17. ORD0080. 18. ORD0346. 19. ORD0041. 20. ORD0070. 21. ORD0189. 22. ORD0190. 23. ORD0187. 24. ORD0211. 25. ORD0209. 26. ORD0188. 27. ORD0230. 28. ORD0461. 29. ORD0228. 30. ORD0122. 31. ORD0097. 32. ORD0221. 33. ORD0335. 34. ORD0339. 35. ORD0110. 36. ORD0343. 37. ORD0392. 38. ORD0223. 39. ORD0130. 40. ORD0166. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas y el número corresponde al donante de la muestra.

Teniendo en cuenta que *B. longum* subsp. *longum* fue una de las especies mayoritariamente aisladas, los diferentes patrones de bandas obtenidos se muestran en tres RAPD comparativos diferentes (**Figuras 33, 34 y 35**). En general, se observó que algunas cepas aisladas de una misma muestra de heces maternas (M3) y heces de bebé (B3) presentaron perfiles de bandas similares, así como cepas aisladas de heces de pareja madre-hijo comparten perfiles parecidos. Se observó que cepas aisladas de heces de bebé (B1) y leche materna (L1) (**Figura 35-perfiles 11 y 14**), compartían el mismo perfil de bandas, confirmándose de esta manera que la leche materna es una fuente potencial de bacterias probióticas con capacidad de influenciar la colonización inicial del GIT del bebé (Soto *et al.*, 2014), tal y como se ha observado también en este estudio para *B. breve* y *B. bifidum*. Asimismo, cepas aisladas de heces de pareja madre-hijo y leche materna tuvieron un perfil de bandas parecido (**Fig.35-perfiles 12**), corroborando la existencia de la ruta entero-mamaria que algunos postulan y que permitiría la

translocación de las bacterias probióticas intestinales hacia la leche materna, que posteriormente se transmiten al bebé mediante la lactancia.

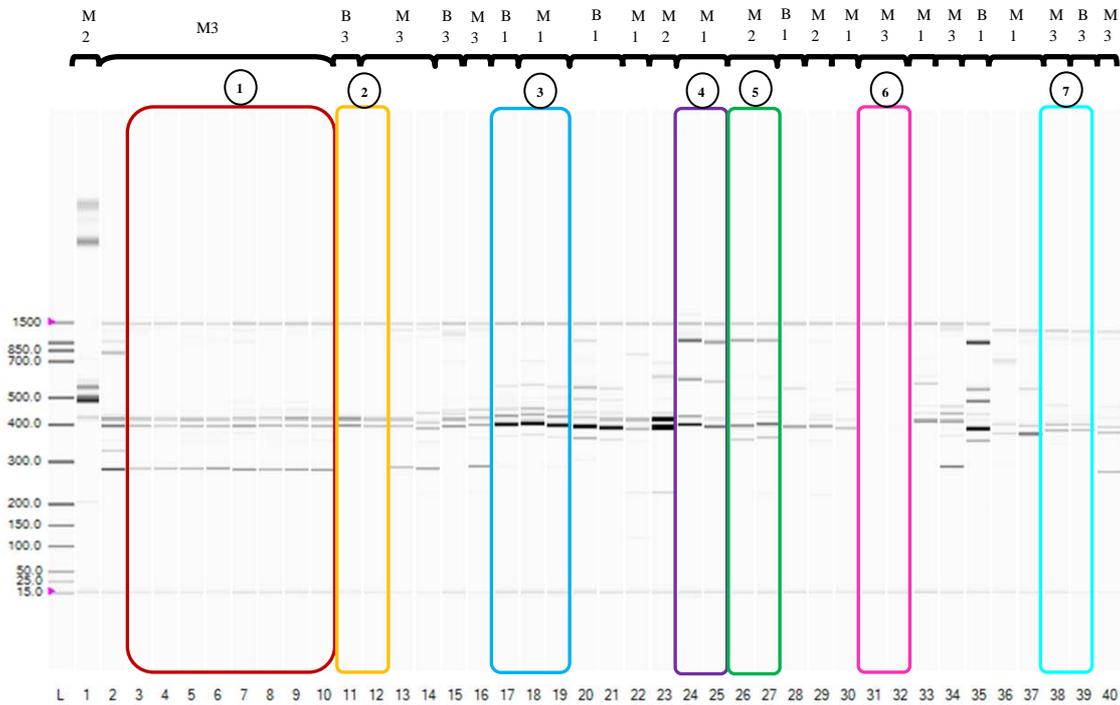


Figura 33. RAPD comparativos de las cepas de *B. longum* subsp. *longum* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0069. 2. ORD0131. 3. ORD0258. 4. ORD0269. 5. ORD0276. 6. ORD0277. 7. ORD0279. 8. ORD0260. 9. ORD0261. 10. ORD0262. 11. ORD0136. 12. ORD0271. 13. ORD0145. 14. ORD0148. 15. ORD0141. 16. ORD0157. 17. ORD0118. 18. ORD0117. 19. ORD0108. 20. ORD0100. 21. ORD0112. 22. ORD0113. 23. ORD0111. 24. ORD0086. 25. ORD0031. 26. ORD0078. 27. ORD0071. 28. ORD0033. 29. ORD0057. 30. ORD0197. 31. ORD0267. 32. ORD0268. 33. ORD0198. 34. ORD0154. 35. ORD0042. 36. ORD0232. 37. ORD0213. 38. ORD0167. 39. ORD0144. 40. ORD0162. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas; y el número corresponde al donante de la muestra.

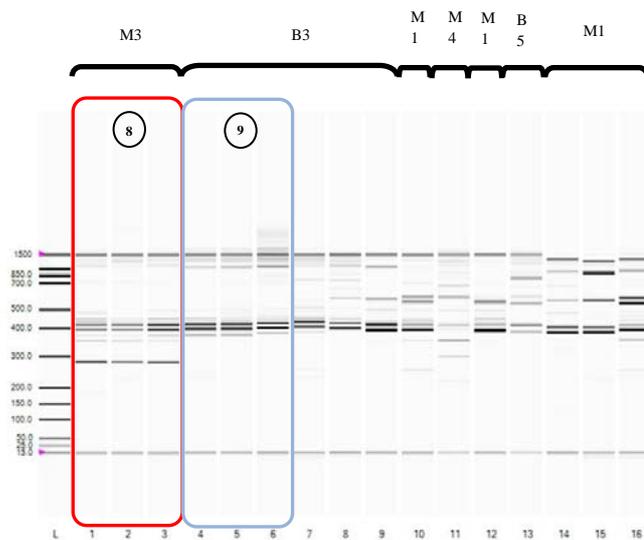


Figura 34. RAPD comparativos de las cepas de *B. longum* subsp. *longum* aisladas de las diferentes muestras. 1. ORD0282. 2. ORD0283. 3. ORD0280. 4. ORD0306. 5. ORD0310. 6. ORD0314. 7. ORD0286. 8. ORD0297. 9. ORD0308. 10. ORD0348. 11. ORD0393. 12. ORD0115. 13. ORD0455. 14. ORD0342. 15. ORD0355. 16. ORD0354. L. marcador 1,5Kb. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas; y el número corresponde al donante de la muestra.

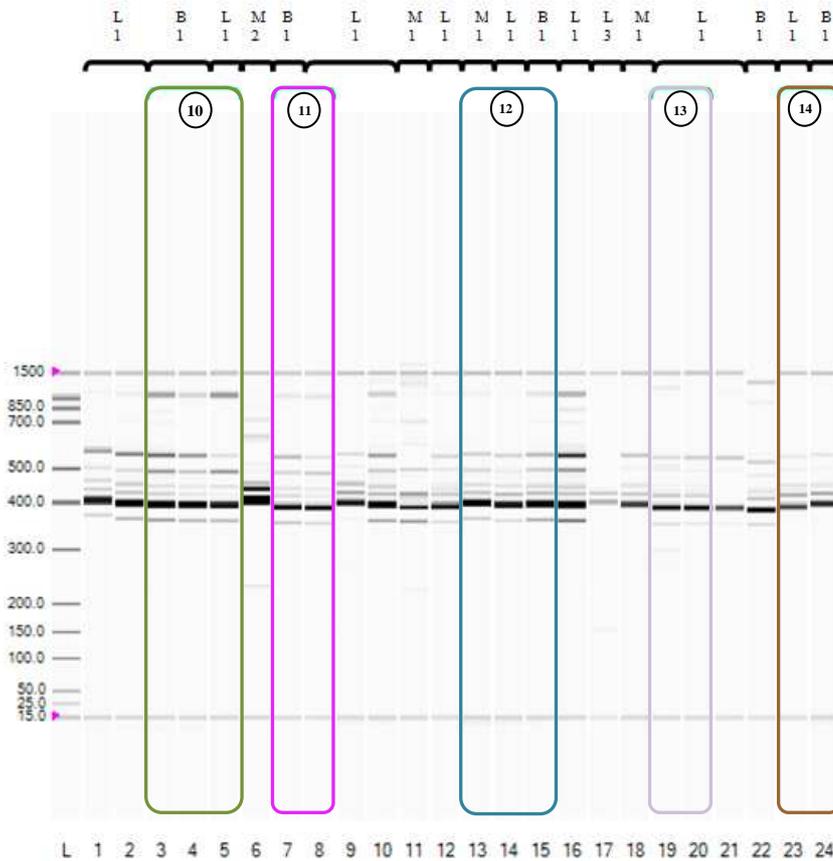


Figura 35. RAPD comparativos de las cepas de *B. longum* subsp. *longum* aisladas de las diferentes muestras. L: marcador 1,5Kb. 1. ORD0002. 2. ORD0015. 3. ORD0018. 4. ORD0021. 5. ORD0025. 6. ORD0034. 7. ORD0040. 8. ORD0001. 9. ORD0064. 10. ORD0046. 11. ORD0076. 12. ORD0084. 13. ORD0087. 14. ORD0090. 15. ORD0099. 16. ORD0102. 17. ORD0135. 18. ORD0334. 19. ORD0011. 20. ORD0012. 21. ORD0023. 22. ORD0003. 23. ORD0004. 24. ORD0067. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas, L: leche materna; y el número corresponde al donante de la muestra.

La especie *B. bifidum* fue la segunda más representativa en todas las muestras y los perfiles de bandas de las cepas aisladas se muestran en dos RAPD comparativos diferentes (**Figuras 36 y 37**). Se observó que cepas aisladas tanto de muestras de heces de bebé y heces maternas, presentaron perfiles de bandas similares. La prevalencia de perfiles de bandas similares entre heces de pareja madre-hijo y de leche materna y heces de bebé alimentado con esa leche materna fue más frecuente en este caso. Esto confirmó una vez más la transferencia vertical de bacterias probióticas que existe entre la madre y el lactante.

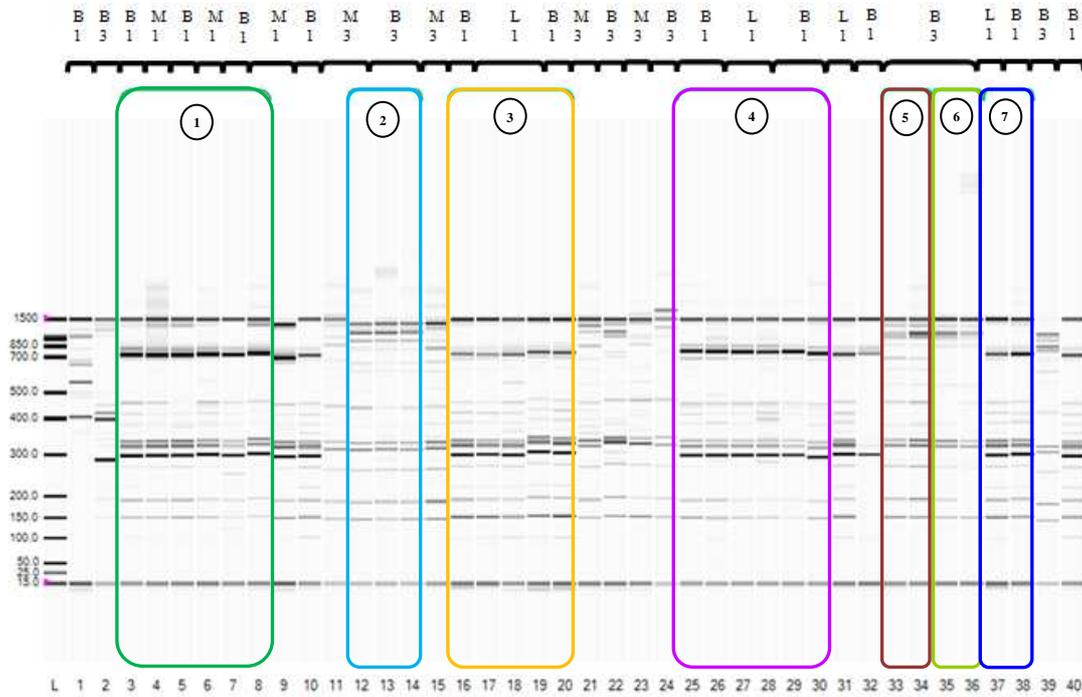


Figura 36. RAPD comparativos de las cepas de *B. bifidum* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0202. 2. ORD0158. 3. ORD0353. 4. ORD0372. 5. ORD0363. 6. ORD0337. 7. ORD0350. 8. ORD0344. 9. ORD0201. 10. ORD0053. 11. ORD0149. 12. ORD0146. 13. ORD0161. 14. ORD0163. 15. ORD0168. 16. ORD0089. 17. ORD0068. 18. ORD0049. 19. ORD0072. 20. ORD0085. 21. ORD0278. 22. ORD0312. 23. ORD0155. 24. ORD0150. 25. ORD0196. 26. ORD0247. 27. ORD0244. 28. ORD0242. 29. ORD0193. 30. ORD0219. 31. ORD0103. 32. ORD0336. 33. ORD0299. 34. ORD0302. 35. ORD0290. 36. ORD0295. 37. ORD0091. 38. ORD0104. 39. ORD0143. 40. ORD0142. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas, L: leche materna; y el número corresponde al donante de la muestra.

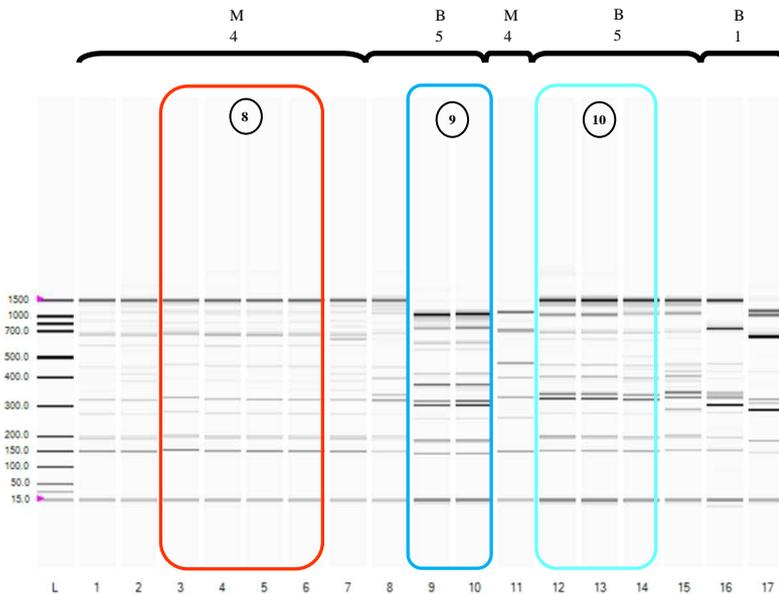


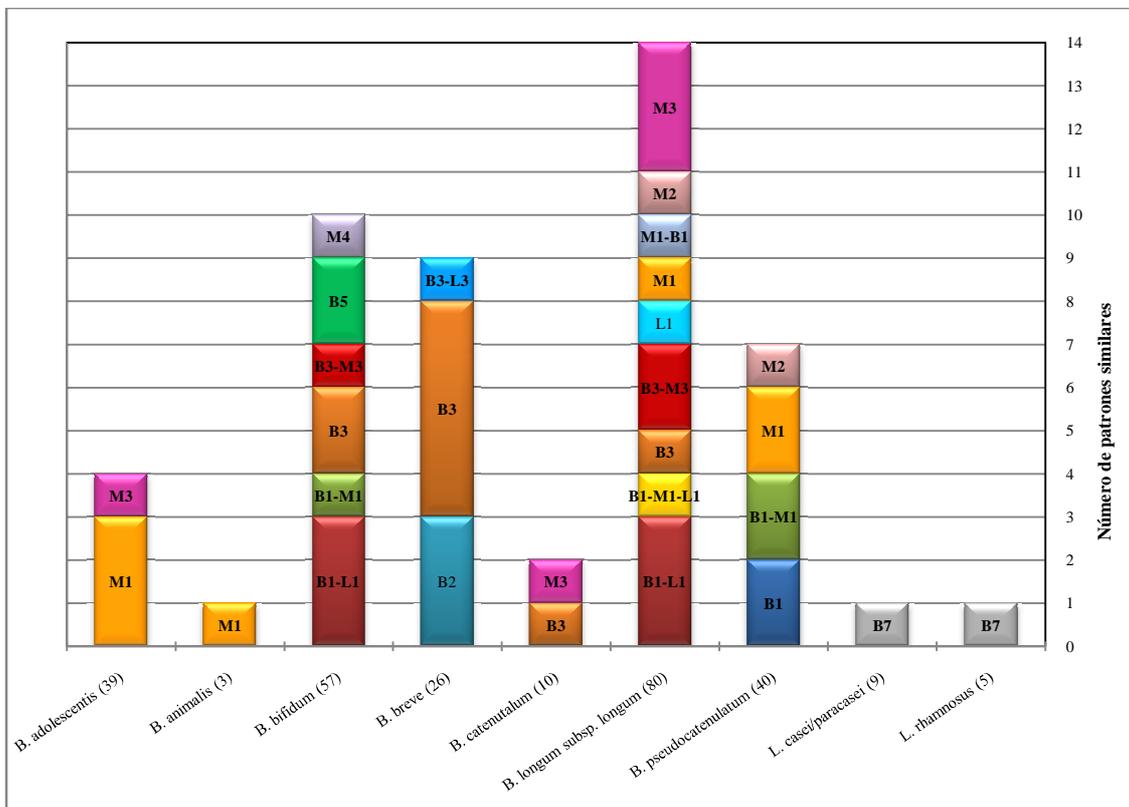
Figura 37. RAPD comparativos de las cepas de *B. bifidum* aisladas de las diferentes muestras. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0417. 2. ORD0422. 3. ORD0388. 4. ORD0386. 5. ORD0389. 6. ORD0390. 7. ORD0419. 8. ORD0454. 9. ORD0457. 10. ORD0460. 11. ORD0412. 12. ORD0471. 13. ORD0472. 14. ORD0474. 15. ORD0473. 16. ORD0013. 17. ORD0088. Los recuadros de cada color significan cepas que tienen un patrón de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé, M: heces maternas; y el número corresponde al donante de la muestra.

La aparición de bandas o no en cepas de la misma especie aisladas de la misma muestra, puede justificarse debido a la pérdida de regiones genómicas que experimentan las bacterias. Esto fue demostrado por J. Lee *y col.* en 2008, quienes detectaron que el hecho de realizar subcultivos de una misma bifidobacteria, generaba delección de regiones genómicas que permitía a la bacteria adaptarse más rápidamente al medio de cultivo de fermentación. Esta adaptación sugiere que las delecciones que experimenta dicha bacteria pueden generar pérdidas de sus habilidades competitivas en el tracto gastrointestinal, ya que el medio de fermentación es muy diferente al medio tamponado y anaeróbico que existe en el colon (Lee *et al.*, 2008).

En la **gráfica 4**, se representan el número de patrones de bandas similares que se observaron dentro de cada una de las especies identificadas en este estudio y aisladas de las diferentes muestras. La especie *B. longum* subsp. *longum* fue la que presentó un mayor número de patrones similares entre algunas de las cepas (14 en total), correspondientes a heces maternas, heces de bebé, leche materna, heces de pareja madre-hijo, heces de bebé-leche materna, y en un caso heces de pareja madre-hijo-leche materna. Asimismo *B. longum* subsp. *longum* fue la especie más abundante, tanto en número de cepas como en número de muestras de las que fueron aisladas. Respecto a la especie *B. bifidum*, se encontraron 6 patrones de bandas similares entre algunas de las 57 cepas identificadas y aisladas de las diferentes muestras, correspondientes a heces de bebé, heces maternas, heces de pareja madre-hijo y heces de bebé-leche materna. En cuanto a la especie *B. breve*, de las 26 cepas identificadas, se encontraron 9 perfiles de patrones de bandas similares, sólo entre algunas de las cepas, correspondientes a heces de bebé y heces de bebé-leche materna. Para las cepas de la especie *B. pseudocatenulatum* se observaron 7 perfiles de bandas similares entre algunas de las 40 cepas identificadas, correspondientes a heces pareja madre-hijo, heces de bebé y heces maternas. En relación a las cepas identificadas como *B. adolescentis*, solo se observaron 4 patrones de bandas similares entre algunas de las 39 cepas identificadas, correspondientes a heces maternas. Para las cepas identificadas como *B. catenulatum*, se observaron dos perfiles de bandas similares entre algunas de las 10 cepas identificadas, correspondientes a heces maternas y heces de bebé. Por el contrario, solo se identificó un único patrón de bandas similar para las cepas de cada una de las siguientes especies *B. animalis*, *L. casei/paracasei* y *L. rhamnosus*. Es importante tener en cuenta, que la similitud de los patrones de bandas relacionados en la gráfica dentro de las diferentes

especies, no fue para el total de las cepas aisladas en cada una de las muestras, sino que por el contrario, solo fueron algunas cepas las que presentaron un patrón similar; caso contrario que si ocurrió para las especies *B. animalis*, *L. casei/paracasei* y *L. rhamnosus*, donde el mismo patrón de bandas fue observado para la totalidad de las cepas aisladas, en cada uno de los casos.

En general, la técnica fue útil para evidenciar que, algunas cepas aisladas tanto de heces de parejas madre-hijo, leche materna-heces maternas, leche materna-heces de bebé y leche materna-heces pareja madre-hijo presentaron perfiles de bandas similares, suponiendo de esta manera que podrían tratarse de la misma cepa o ser provenientes de la misma cepa, corroborando de esta manera la teoría de que existe una transferencia de bacterias a través de la leche materna y de la madre al bebé.



Gráfica 4. Número de patrones de bandas similares observados dentro de cada especie identificada. Los números que se encuentran entre paréntesis junto a cada especie, corresponde al número de cepas identificadas en este estudio. Las letras y números en cada barra corresponden a la muestra de la que fueron aisladas las cepas, siendo M: heces maternas, B: heces de bebé y L: leche materna y los números corresponden al donante de la muestra.

4.2.2 Perfil de fermentación de carbohidratos y actividades enzimáticas.

Posterior a la identificación de las cepas mediante técnicas moleculares, a cada una de ellas se les realizó el perfil de fermentación de azúcares, empleando el sistema API 50CH[®], y la determinación de actividades enzimáticas hidrolíticas, empleando el sistema API ZYM[®], ambos sistemas de la compañía Biomerieux.

Aunque el sistema API 50CH[®] puede ser usado para identificar fenotípicamente especies del género *Lactobacillus*, existe una limitación por parte de este método bioquímico, lo que hace necesario realizar métodos moleculares para una correcta identificación de este tipo de microorganismos (Melo Brolazo *et al.*, 2011). Básicamente, el desarrollo de estas pruebas fueron tenidas en cuenta únicamente para caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas y los resultados obtenidos en cada uno de estos dos test, fueron introducidos y registrados en la base de datos creada inicialmente, obteniéndose de esta manera toda la información completa correspondiente a cada una de las cepas aisladas.

En la interpretación de los resultados del sistema API 50CH[®], se emplearon cuatro calificaciones: (-) no existe fermentación, (+) fermentación baja, (++) fermentación media y (+++) fermentación alta. El criterio utilizado para determinar si una cepa era capaz de fermentar un carbohidrato en concreto, fue que la cepa realizara una fermentación media y alta (++ y +++) en el sistema API 50CH[®]. El hecho que una cepa tuviera una fermentación baja, indicó de alguna manera que la presencia de determinados carbohidratos no eran favorables y por tanto su tasa de crecimiento era mucho más lenta. En cuanto a los resultados obtenidos, la cantidad de carbohidratos fermentados tanto por bifidobacterias como lactobacilos, variaron dependiendo de cada cepa y asimismo hubo variaciones entre cepas que pertenecían a la misma especie. Los resultados se muestran de acuerdo a los valores ++ y +++ que predominaron en cada una de las especies identificadas (**Tabla 12**).

Respecto a la fermentación de los carbohidratos, se ha descrito que los lactobacilos emplean dos vías para metabolizar las hexosas: una vía homofermentativa (usando la vía de Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicólisis), en la cual el ácido láctico es el producto principal y una vía heterofermentativa (usando la vía del 6-fosfogluconato) en la cual se producen ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol (Makarova *et al.*, 2006).

En cuanto a niveles enzimáticos, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfoctolatasas, pero no fructosa-1,6-difosfato (FDP) aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP, pero no fosfoctolatasas (Pot *et al.*, 2014).

Por otro lado las bifidobacterias, son capaces de metabolizar las hexosas, como la glucosa y la fructosa, para la producción de energía mediante la vía "bifid shunt", la cual involucra la fructosa-6-fosfato fosfoctolasa (F6PPK), enzima clave para esta vía (Mattarelli & Biavati, 2014). Asimismo, se ha determinado que las bifidobacterias poseen una gran variedad de genes para la utilización de carbohidratos complejos, permitiendo de esta manera la supervivencia de las bifidobacterias en dicho entorno, con lo cual la capacidad de las bifidobacterias para fermentar una amplia diversidad de carbohidratos, que no son absorbidos debido a la falta de capacidad digestiva y enzimática del hospedador, juega un papel importante en su colonización del colon (Fushinobi, 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el tipo de azúcar influya en la composición y abundancia de especies a lo largo del GIT. En este contexto, bacterias como los lactobacilos son prevalentes en el GIT superior, donde fermentan mono, di y tri-sacáridos simples, mientras que las bacterias activas en el colon, como las bifidobacterias, probablemente derivan su adquisición ecológica específica, de su capacidad para metabolizar carbohidratos complejos (Ventura *et al.*, 2007).

De manera general, la mayoría de las cepas, tanto de bifidobacterias como lactobacilos, fermentaron D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Maltosa, D-Lactosa, D-Melibiosa, D-Sacarosa, D-Rafinosa, Gentiobiosa y D-Turanosa. Pero es importante destacar que todas las cepas, previo a realizar esta prueba, presentaron un buen crecimiento en caldo MRS (que contiene glucosa, como fuente de carbono), pero al realizar la prueba no fue posible que todas fermentaran la D-glucosa, confirmando una vez más que el sistema API 50CH[®] no es apropiado para realizar la identificación de *Lactobacillus* u otros microorganismos por su falta de reproducibilidad.

Se ha descrito que los lactobacilos pueden utilizar una variedad de carbohidratos que refleja la disponibilidad de nutrientes en sus respectivos ambientes. Este hecho se observó con los resultados obtenidos, ya que hubo carbohidratos que fueron fermentados únicamente por cepas de lactobacilos, como fue el caso de *L. oris* para D-arabitol y *L. gasseri* para D-tagatosa. Respecto a esto, trabajos realizados por Azcarate-Peril y *col.* en 2008 describieron que diversas cepas de *L. gasseri* fueron capaces de

fermentar gran variedad de hexosas y disacáridos, incluyendo la manosa, galactosa, tagatosa, gentibiosa, maltosa, amigdalina, arbutina y salicina, observando que los grados de fermentación eran diferentes entre cepas de la misma especie, mientras que ninguna cepa fue capaz de fermentar las pentosas, polialcoholes ni desoxiazúcares, resultados similares a los obtenidos para las cepas de *L. gasseri* aisladas en este trabajo. Por otro lado, el hecho que *L. oris* haya sido capaz de fermentar el D-arabitol no es sorprendente, ya que trabajos realizados por Farrow & Collins, ya describieron en 1988 a *L. oris*, como una especie capaz de producir ácido a partir de la L-arabinosa, D-arabitol, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, lactosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, D-ribosa, sucrosa y D-xilosa, pero incapaz de fermentar carbohidratos como el L-arabitol, D-arabinosa, adonitol, dulcitol, eritriol, D-fucosa, L-fucosa, glicerol, glicógeno, inositol, D-lixosa, y xilitol.

El transporte de carbohidratos en la mayoría de los lactobacilos se realiza mediante transportadores PTS (sistema fosfotransferasa). En este sistema de transporte basado en fosfotransferasas, los azúcares son fosforilados mientras atraviesan la membrana celular, donde el fosfoenolpiruvato (PEP) es un compuesto clave en el transporte de estos azúcares y su posterior metabolismo. Los transportadores PTS están estrechamente vinculados a la vía EMP y, por lo tanto, no son comunes en lactobacilos heterofermentativos, en los cuales, la glucosa puede ser transportada mediante sistemas secundarios usando permeasas (Endo & Dicks 2014).

Respecto a las bifidobacterias, se ha descrito que son bacterias capaces de degradar polisacáridos complejos a oligosacáridos de bajo peso molecular, que posteriormente son degradados a monosacáridos y convertidos a intermediarios de la vía usada para la fermentación de las hexosas (llamada también vía de la fructosa-6-fosfato o *bifid shunt*), los cuales finalmente producen ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y otros compuestos orgánicos, proporcionando efectos beneficiosos para el hospedador. Existiendo de esta manera, una relación mutualista, donde el hospedador gana energía a través de la absorción de estos SCFAs (Pokusaeva *et al.*, 2011) (Ventura *et al.*, 2007).

Asimismo, la capacidad para metabolizar carbohidratos puede variar considerablemente entre diferentes cepas, ya que se ha descrito que las enzimas de la vía empleada por las bifidobacterias (*bifid shunt*) para fermentar los carbohidratos, no se expresan al mismo nivel en todas las especies de bifidobacterias, lo que podría explicar la razón de la preferencia por diferentes carbohidratos dentro de este género (Palframan *et al.*, 2003) (Pokusaeva *et al.*, 2011). Esto se evidenció en los resultados obtenidos, ya que sólo

algunas cepas de *B. longum* subsp. *longum* y de *B. breve* fueron capaces de fermentar algunos carbohidratos en particular, entre ellos D- arabinosa, L-xilosa, L-sorbosa, Dulcitol, L-rhamnosa, Inositol, L-fucosa, Xilitol, MetilαD-Manopiranosas, Inulina, D-Lixosa, hecho que no es sorprendente ya que se ha descrito que en estos microorganismos se puede predecir un enorme potencial de degradación y utilización de carbohidratos a partir de sus genomas, incluyendo una variedad de glicosil hidrolasas que se requieren para la utilización de diversas fibras dietéticas o carbohidratos complejos producidos por el hospedador, donde más del 8% de los genes anotados de *B. breve* UCC2003 y *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos (Ventura *et al.*, 2007).

El transporte de carbohidratos en las bifidobacterias ocurren vía permeasas y se dividen en cuatro clases: las glicosil-hidrolasas (GPH); transportadores de azúcar ABC; componentes PEP-PTS (PEP-fosfoenolpiruvato; PTS- fosfotransferasa); y sistemas MFS (major facilitator family) (Parche *et al.*, 2007). De acuerdo con Schell y *col.* quienes en 2002 realizaron un análisis del genoma de *B. longum* subsp. *longum* NCC2705, encontraron que dicha cepa tenía todos los genes homólogos necesarios para fermentar fructosa, N-Acetilglucosamina, N-Acetilgalactosamina, arabinosa, xilosa, ribosa, sucrosa, lactosa, celobiosa y melibiosa, dentro de la vía de la fructosa-6-fosfato, por lo que no es extraño que algunas cepas identificadas en este trabajo como *B. longum* subsp. *longum* hayan sido capaces de fermentar carbohidratos que otras especies no asimilaron. Asimismo, se ha descrito que una proporción significativa del genoma de *B. breve* está dedicado al metabolismo de los azúcares, teniendo más de 40 glicosil-hidrolasas cuyos sustratos representan una amplia gama de di, tri y oligosacáridos más complejos, donde sólo una pequeña cantidad de estas glicosidasas se encuentran de manera extracelular, mientras que el resto están presentes como enzimas citoplasmáticas (Ventura *et al.*, 2007) (Pokusaeva *et al.*, 2011). Trabajos realizados por Bottacini y *col.* en 2014, compararon los perfiles de fermentación de nueve cepas de *B. breve*, encontrando que todas estas cepas eran capaces de fermentar glucosa, lactosa, lactulosa, maltosa y rafinosa, mientras que la fermentación de otro tipo de azúcares como galactano, sorbitol, manitol, fructosa, melezitosa, celobiosa, xilosa y ribosa variaban entre las diferentes cepas. Por otro lado ninguna de las cepas evaluadas, fueron capaces de utilizar la inulina, arabinosa, maltulosa, manosa, trealosa y galactosa. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que algunas cepas de *B. breve* aisladas en este trabajo, fueron capaces de fermentar algunos de estos azúcares y de hecho, la fermentación de

algunos polialcoholes fueron exclusivos para cepas de esta especie, como fue el caso del dulcitol, inositol y xilitol. Respecto a esto, y teniendo en cuenta que en las bifidobacterias los genes involucrados en la utilización de un determinado carbohidrato se encuentran organizados frecuentemente en clústers, conteniendo genes que codifican una o más glicosil hidrolasas y otros sistemas de transporte asociado, Bottacini y *col*, en 2012 identificaron un clúster de genes en algunas cepas de *B. breve* que codifican elementos para la regulación, transporte y metabolismo de los polialcoholes, como el sorbitol. Este locus abarca un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa seguido de un gen que codifica para un transportador de azúcar ABC específico y que aparentemente es el responsable de la internalización de este carbohidrato.

La secuenciación del genoma de *B. breve* UCC2003 y *B. longum* subsp. *longum* NCC2705 son un buen ejemplo de la adaptación intrínseca al nicho intestinal (Ventura *et al.*, 2007) y los resultados obtenidos en esta prueba, confirman en cierta parte este hecho. Asimismo, otra adaptación que se ha descrito para *B. breve* UCC2003 es su capacidad de utilizar hidratos de carbono que contienen ácido siálico, los cuales están presentes en la leche materna (Wang *et al.*, 2001), hecho que de alguna manera se pudo evidenciar en este trabajo, logrando aislar una gran cantidad de *B. breve* (23%) en heces de bebé lactante. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los métodos empleados al ser dependientes de cultivo, no representan toda la microbiota presente en estas muestras.

Para la interpretación de los resultados del API ZYM[®], se asignaron, valores de 0 a 5, en función de la intensidad de color de cada reacción, siendo 0 ausencia de color y 5 intensidad de color alta. En este caso, el criterio utilizado para determinar si una cepa tenía la capacidad enzimática testada, fue que las cepas puntuaran entre 3 y 5 (correspondientes a una intensidad de color medio a alto, respectivamente). Los resultados se presentan de la misma manera que para el API 50CH[®], es decir, los valores máximos que predominaron en cada cepa (**Tabla 13**).

En general, la mayoría de las cepas mostraron actividad leucina arilamidasa, α y β galactosidasa; y, α y β glucosidasa. Estos dos últimos grupos de enzimas, forman parte de las glicosil hidrolasas, que parecen ser el grupo más crítico de enzimas para las bifidobacterias, ya que les permiten adaptarse y colonizar al hospedador mediante la hidrólisis de carbohidratos complejos provenientes de la dieta (Pokusaeva *et al.*, 2011). La presencia de diversas enzimas en algunas cepas del género *Bifidobacterium* puede explicar su capacidad para degradar los oligosacáridos de la leche materna (HMOs),

considerados por tener un efecto bifidogénico que promueve el crecimiento selectivo de las bifidobacterias, y por tanto esto podría explicar su mayor proporción en heces de bebés alimentados mediante lactancia materna. En este caso, ninguna de las cepas presentó actividad lipasa (C14) y β -glucuronidasa, hecho importante, ya que esta última, está involucrada en la formación de compuestos tóxicos y carcinogénicos en el intestino delgado (Edwards *et al.*, 2002). En cuanto a la α -fucosidasa, no se evidenció ninguna cepa con esta actividad, a pesar que ciertas cepas de *B. breve* tuvieron la capacidad de fermentar la L-fucosa.

	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. angulatum</i>	<i>B. longum subsp. longum</i>	<i>L. oris</i>	<i>L. gasseri</i>	Total general
Número de cepas	57	26	40	10	41	3	2	81	1	2	263
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritriol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-arabinosa	0	6	0	0	0	0	0	3	0	0	9
L-arabinosa	2	7	16	9	33	2	2	80	1	0	152
D-Ribosa	1	25	18	8	37	3	2	33	1	0	128
D-Xilosa	1	7	10	4	27	1	2	80	1	0	133
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
D-Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metil- β -Xilopiranosida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Galactosa	42	26	26	10	38	0	2	80	1	2	227
D-Glucosa	57	26	32	10	38	3	2	80	1	2	251
D-Fructosa	56	26	16	10	37	0	2	67	1	2	217
D-Mannosa	0	22	10	5	22	0	0	45	0	2	106
L-Sorbosa	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3
L-Rhamnosa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Dulcitol	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Inositol	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
D-Manitol	0	8	1	1	2	0	0	10	0	0	22
D-Sorbitol	3	9	11	9	35	0	2	9	0	0	78
Metil- α -Manopiranosida	0	5	0	0	0	0	0	7	0	0	12
Metil- α -Glucopiranosida	1	24	17	8	29	1	1	36	0	0	117
N-acetilglucosamina	17	21	1	1	1	0	0	5	0	2	48
Amigdalina	1	21	18	9	35	3	1	10	0	2	100
Arbutina	1	22	3	8	29	1	1	11	0	2	78
Esculina citrato férrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicina	1	25	12	9	35	3	2	25	0	2	114
D-Celobiosa	2	20	4	3	17	1	2	14	0	2	65
D-Maltosa	3	26	30	10	39	3	2	78	1	2	194
D-Lactosa	56	26	32	10	38	1	2	76	1	2	244
D-Melibiosa	7	26	31	10	39	3	2	80	1	0	199
D-Sacarosa	7	25	20	9	39	3	2	77	1	2	185
D-Trehalosa	0	14	0	4	16	0	1	9	0	2	46
Inulina	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	5
D-Melezitosa	0	11	1	1	0	0	0	35	0	0	48
D-Rafinosa	4	26	30	10	40	3	2	78	1	0	194
Almidón	2	16	21	6	26	0	1	1	0	2	75
D-Glicógeno	2	16	22	6	21	0	1	0	0	0	68
Xilitol	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Gentiobiosa	38	23	24	9	33	3	1	4	0	1	136
D-Turanosa	4	24	28	8	37	1	2	70	1	0	175
D-Lixosa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
D-Tagatosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
D-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Fucosa	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	13
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconato potásico	0	5	1	1	2	0	1	1	1	0	12
2-CetoGluconato potásico	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5-CetoGluconato potásico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carbohidratos fermentados	5	21	11	19	21	10	23	12	14	16	

Tabla 12. Consenso de resultados positivos de la prueba API 50CH[®]. Las celdas resaltadas en color rosa, son los carbohidratos fermentados por más del 50% de las cepas evaluadas. Las celdas resaltadas en color ámbar se refieren a los carbohidratos que fueron fermentados por ciertas cepas de *B. longum* subsp. *longum* y/o *B. breve*.

Las glicosil hidrolasas parecen ser el grupo de enzimas más crítico en las bifidobacterias, ya que les permite adaptarse y existir en el GIT del hospedador

mediante la hidrólisis de carbohidratos provenientes de la dieta o producidos por el hospedador. Entre las glicosil hidrolasas actualmente caracterizadas en bifidobacterias, se encuentran las β -galactosidasas que representan el grupo más común, así como el más estudiado de las glicosil hidrolasas de las bifidobacterias con actividad transglicosílica, la cual puede usarse para la síntesis de sustancias prebióticas a partir de la lactosa. Esta actividad es esencial para las bifidobacterias, ya que les permite crecer en la leche o sustratos derivados de la leche, (trans) galacto oligosacáridos derivados de la lactosa que contienen enlaces β -galactosídicos (Pokusaeva *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta esto, no es extraño que la mayoría de las cepas aisladas hayan presentado actividad β -galactosidasa. Asimismo, se observó que una alta proporción de bifidobacterias presentaron actividad α -glucosidasa, hecho que tampoco es sorprendente ya que se ha descrito que esta actividad enzimática es común en *Bifidobacterium* sp. (Pokusaeva *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en estas dos pruebas son útiles a la hora de considerar el uso de estas cepas como ingredientes en alimentos funcionales. El hecho que una cepa muestre un amplio rango de fermentación de diversos carbohidratos, la hace mejor candidata para ser empleada como probiótico, ya que una vez en el intestino su actividad y colonización, estará fuertemente influenciada por carbohidratos aportados por la dieta. Por otro lado, la combinación con diferentes prebióticos, sean oligosacáridos o polisacáridos, puede ser beneficiosa si la cepa a utilizar posee las enzimas necesarias para hidrolizarlo y posteriormente puede favorecer el crecimiento y colonización de la bacteria en el hospedador.

Es posible que esta prueba no haya revelado completamente la verdadera capacidad de las cepas evaluadas porque los sistemas enzimáticos inducibles pueden no haber sido reflejados adecuadamente. Además un ensayo *in vitro* no llega a mostrar la complejidad de la comunidad de microorganismos presentes en el GIT así como la mezcla de diferentes células y azúcares (Hedberg *et al.*, 2008)

	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. angulatum</i>	<i>B. longum subsp. longum</i>	<i>L. oris</i>	<i>L. gasseri</i>	Total general
Número de cepas evaluadas	57	26	40	10	41	3	2	81	1	2	263
Fosfatasa alcalina	35	2	0	0	1	0	0	0	1	0	39
Esterasa (C4)	2	4	0	3	2	0	2	12	0	0	25
Esterasa Lipasa (C8)	1	1	0	0	3	1	2	2	0	0	10
Lipasa (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leucina arilamidasa	57	26	40	10	40	3	2	80	1	2	261
Valina arilamidasa	6	10	0	0	0	2	0	4	0	0	22
Cistina arilamidasa	19	21	1	2	4	3	0	18	0	1	69
Tripsina	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
α -quimiotripsina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa ácida	46	13	4	9	31	3	2	58	1	1	168
Naftol-AS-BI-	1	1	0	0	2	3	1	0	1	2	11
α -galactosidasa	4	26	39	10	39	3	2	64	1	2	190
β -galactosidasa	57	26	39	10	40	3	2	73	1	0	251
β -glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -glucosidasa	19	26	39	10	40	3	2	67	1	0	207
β -glucosidasa	0	26	29	10	39	3	2	50	0	1	160
N-acetil- β -glucosaminidasa	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
α -mannosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -fucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Actividades enzimáticas	4	6	5	6	6	9	9	6	7	6	

Tabla 13. Consenso de resultados positivos de la prueba API ZYM®. Las celdas resaltadas en color rosa son las actividades enzimáticas que predominaron en el 50% de las cepas evaluadas. Las celdas resaltadas en color ámbar se refieren a las actividades enzimáticas que tuvieron únicamente ciertas cepas de una especie.

4.3. Análisis de la biodiversidad de las cepas probióticas aisladas.

La mayoría de los árboles filogenéticos se construyen a partir de datos moleculares: ADN o secuencias de proteínas, cuyo objetivo es "estimar" las relaciones entre las especies representadas, a partir del alineamiento de las diferentes secuencias. Para la construcción de un árbol filogenético son necesarios 4 pasos: 1) identificar y adquirir las diferentes secuencias de ADN o proteínas, según sea el caso; 2) alinear dichas secuencias; 3) estimar un árbol de las secuencias alineadas, y 4) presentar de una manera clara, la información relevante que este árbol representa (Hall, 2013).

En este trabajo, se emplearon las secuencias consenso del gen 16S rARN y para su alineamiento se empleo el método MUSCLE, ya que es el más usado por su alta precisión y rendimiento (Edgar, 2004) y posteriormente se aplico el algoritmo de *Neighbor-joining*, para la construcción de cada uno de los árboles filogenéticos. El uso de este algoritmo produce un árbol sin raíz, con lo cual es necesario agregar un *outgroup*, que corresponde a una especie que se sabe que está distante filogenéticamente con cada una de las especies restantes entre sí (Durbin *et al.*, 1998).

El gen 16S rARN es el gen más común en estudios de diversidad bacteriana, ya que es considerado un marcador universal bien conservado con funciones constantes, que no se ve afectado por presiones ambientales. Estos hechos, junto con el tamaño del gen, lo convierte en un buen reloj evolutivo (Mohania *et al.*, 2008).

En el caso del árbol filogenético del género *Bifidobacterium* (**Fig. 38**), el árbol fue enraizado con *Gardnerella vaginalis* y aunque se ha reportado que cuando se usan secuencias del 16S rARN es difícil una diferenciación entre ellas, el hecho que el porcentaje de G+C de *G. vaginalis* (42%) sea significativamente más bajo que en *Bifidobacterium* (55-65%), permitió en este caso, la formación de una rama diferenciada de las cepas de *Bifidobacterium* identificadas.

Es necesario tener en cuenta, que en este trabajo se emplearon dos pares de cebadores diferentes para la correcta identificación, tanto de bifidobacterias como de lactobacilos. Mientras que los cebadores 16s1a/16s1b, amplifican una región de 1004pb y fueron usados para la identificación de los diferentes lactobacilos; los cebadores Y1/Y2, amplifican una región más pequeña (348pb) pero más precisa para la identificación de las bifidobacterias, permitiendo una identificación a nivel de cepa en muchos de los casos.

Asimismo, es importante tener presente, que para la construcción de un árbol filogenético es necesario contar con secuencias de un tamaño similar o idéntico, ya que una vez realizado el alineamiento múltiple entre las diferentes secuencias, éste también debe editarse, de tal forma que las secuencias alineadas no difieran en su tamaño, algo que podría generar un árbol filogenético erróneo o de mala calidad. Para la edición de las secuencias alineadas, se debe tener en cuenta la cantidad de bases a descartar, evitando eliminar demasiados pares de bases, dejando secuencias muy cortas.

Teniendo en cuenta lo anterior y a pesar de que las secuencias empleadas para el diseño del árbol de las cepas identificadas como *Bifidobacterium* sp. eran demasiado cortas (300pb aprox.), se observó que todas las especies identificadas se agrupaban entre sí (cada una, diferenciada por colores); esto se pudo observar por la formación de una rama independiente para cada una de las especies identificadas y por los valores de *bootstrap* obtenidos (> de 50). Las cepas identificadas como *B. catenulatum* y *B. pseudocatenulatum* se ubicaron dentro de un mismo grupo, ya que se ha establecido que sus secuencias del gen 16S rARN son similares y que por tanto deben ser tratadas como bacterias pertenecientes al grupo *B. catenulatum* (Matsuki *et al.*, 1998).

Sin embargo, hubo algunas cepas aisladas que no se agruparon de manera correcta, esto pudo deberse al hecho de tener una secuencia demasiado corta y su posterior recorte, generando secuencias aún más cortas. Asimismo, se observó que la longitud de las ramas entre cepas de la misma especie eran de tamaño similar y la formación de nodos fue muy baja, hecho que también puso estar ocasionado por el empleo de secuencias demasiado cortas y que posiblemente el porcentaje de G+C era parecido entre las secuencias, generando ramas de la misma longitud.

Por otro lado se observó, que algunas cepas de referencia, en concreto *B. angulatum* ATCC27535 y *B. catenulatum* ATCC27539, no se agruparon junto con las cepas identificadas a cada una de estas especies. Esto de alguna manera corrobora, lo que el proyecto Prosafe señaló acerca de las bases de datos que contienen secuencias del gen 16S rARN, mostrando que existen secuencias incompletas o poco fiables y que por lo tanto es necesario realizar una lista de secuencias válidas de dicho gen, para una correcta identificación cuando se compara una secuencia de este gen con las que se encuentran en las bases de datos, ya que la calidad de las secuencias depositadas tienen un alto impacto para una identificación precisa (van Loveren *et al.*, 2012).

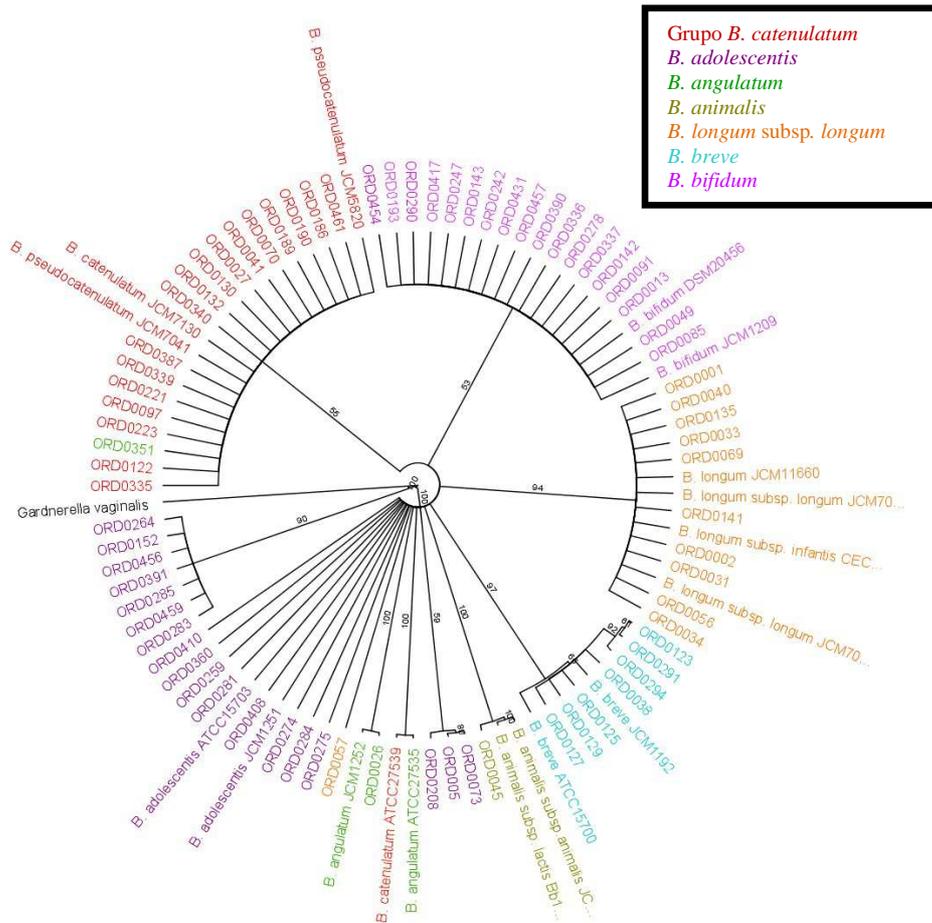


Figura 38. Árbol filogenético basado en las secuencias consenso del gen 16S rARN, representando la relación entre las diferentes bifidobacterias aisladas de las muestras y algunas bifidobacterias que existen en las colecciones de cultivo. El árbol fue enraizado con *Gardnerella vaginalis* y construido usando el método *neighbor-joining* con valores de *bootstrap* calculados de 100 árboles. Cada número en las ramas indica el número de veces (de cada 1000) que el nodo fue respaldado por los resultados de análisis de bootstrap. Cada uno de los colores, representa cada grupo de las diferentes especies identificadas.

Para la construcción del árbol filogenético de los lactobacilos (**Fig. 39**), se emplearon las secuencias amplificadas con los primers 16s1a/16s1b (950pb aprox.) lo que permitió una diferenciación más evidente entre las especies aisladas e identificadas así como con las cepas de referencia, ya que las ramas fueron de diferente longitud y hubo formación de nodos entre cepas de una misma especie, permitiendo establecer distancias filogenéticas entre una cepa y otra. El *outgroup* con el que se enraizó el árbol fue *Bacillus cereus*, al ser una especie diferente a nivel filogenético del género *Lactobacillus* (valor de *bootstrap*=100). En este árbol, se observó claramente, la formación de dos grandes grupos, el primero de ellos conformado por dos nodos principales. En el primer nodo, se logran diferenciar dos clústers, uno conformado por

las cepas de referencia *L. casei* y de *L. paracasei*, y por último la cepa ORD0679 (identificada como *L. casei/paracasei*), que en este caso está más relacionada con *L. paracasei*, aunque no se puede descartar su relación con *L. casei* ya que este grupo de bacterias salen del mismo nodo. De acuerdo a este clúster, se observó, que estas dos especies aparecían agrupadas entre sí y a pesar de que se ha propuesto incluir *L. paracasei* dentro de la especie *L. casei* (Dellaglio *et al.*,2002), el árbol mostró que *L. paracasei* formó un grupo derivado de *L. casei* con un valor de *bootstrap* elevado (valor=92) indicando que se encuentran bien diferenciadas una especie de otra. Respecto al segundo clúster, estuvo conformado por las cepas de *L. rhamnosus*, donde también estaban incluidas las cepas ORD0680 y ORD0683 (identificadas como *L. rhamnosus*) y la cepa de referencia *L. rhamnosus* GG (LGG), pero en este caso no se evidenció ninguna diferencia filogenética aparente entre estas cepas, ya que la longitud de las ramas dentro de este clúster fue la misma. Por otro lado, la cepa *L. rhamnosus* HN001 también fue empleada como cepa de referencia, ya que actualmente es la cepa que se usa en las leches infantiles producidas por Laboratorios Ordesa, con lo cual era interesante comparar a nivel filogenético, las cepas aisladas en este trabajo e identificadas como *L. rhamnosus* frente a esta cepa. Al realizar la búsqueda en la base de datos de la secuencia del gen 16S rARN de esta cepa, se observó que había sido retirada de la base de datos a principios de este año, con lo cual se trabajó con la secuencia contig de este gen, que se encontraba disponible. Sin embargo, cuando se construyó el árbol se observó que dicha secuencia, referenciada en el árbol como *L. rhamnosus* HN001 (Database), no se agrupaba con los demás *L. rhamnosus*, sino que formaba una rama totalmente independiente del resto de lactobacilos. Este hecho, nos llevó a realizar un aislamiento de esta cepa a partir de un lote de liofilizado que fue solicitado al proveedor de dicha cepa; a partir de este liofilizado se realizó la extracción de ADN y luego se amplificó mediante PCR un fragmento del gen 16S rARN empleando los mismos cebadores que se usaron para la identificación de los lactobacilos aislados en este trabajo (16s1a y 16s1b). Al determinar la secuencia consenso y realizar el BLAST, no se identificó como *L. rhamnosus* HN001, ya que como se dijo anteriormente dicho genoma fue retirado de la base de datos, pero si se identificó como una cepa de *L. rhamnosus* y asimismo se visualizó en el árbol, ya que en este caso, esta secuencia si se agrupó con los demás *L. rhamnosus*, referenciada en el árbol como *L. rhamnosus* HN001. Cabe anotar que no es extraño que *L. casei*, *L. paracasei* y *L.*

rhamnosus aparezcan formando un mismo grupo, ya que se ha descrito que estas tres especies forman parte del grupo *L. casei* (Felis & Dellaglio 2007; Salvetti *et al.*, 2012). En el segundo grupo del árbol se encuentran agrupados en un nodo principal, los *L. acidophilus* y *L. gasseri*, hecho que no es sorprendente ya que estas dos especies pertenecen al grupo de *Lactobacillus delbrueckii*. El clúster formado por las cepas de *L. gasseri*, mostró que la ORD0529 era más cercana a *L. gasseri* DSM20243 ya que se agruparon entre sí al mismo nivel, sin embargo la cepa ORD0185 a pesar de estar relacionada con estas cepas, ya que fue identificada como *L. gasseri*, formó parte de una rama independiente, suponiendo de esta manera que difiere filogenéticamente de la ORD0529, hecho que no es sorprendente, ya que estas dos cepas fueron aisladas de individuos diferentes. El segundo nodo principal, estuvo conformado por el clúster de las cepas de *L. oris*, que no estuvo agrupado con ninguna otra especie de lactobacilos, teniendo en cuenta que pertenece al grupo de *Lactobacillus reuteri*. En este caso, la cepa ORD0255, identificada como *L. oris* se agrupó al mismo nivel que con la cepa *L. oris* JCM11028.

La principal discrepancia en la taxonomía del género *Lactobacillus* es la falta de correlación entre la ubicación filogenética y las propiedades metabólicas. De acuerdo a su perfil de fermentación, los lactobacilos pueden ser clasificados en tres grupos diferentes: homofermentativos obligados, heterofermentativos facultativos y heterofermentativos obligados (Felis & Dellaglio 2007). En este caso, se observó que el árbol filogenético construido en este trabajo, separó las diferentes cepas de *Lactobacillus* de acuerdo a su perfil de fermentación reportado en la bibliografía, donde en el grupo 1 se agruparon los lactobacilos heterofermentativos facultativos (grupo *L. casei*) y en el grupo 2, se agruparon en dos nodos diferentes los homofermentativos obligados (grupo *L. delbrueckii*) y los heterofermentativos obligados (grupo *L. reuteri*). Sin embargo es importante anotar, que las especies identificadas que se agruparon en un mismo nodo junto a las cepas de referencia, no siempre compartieron los mismos patrones de fermentación de azúcares, hecho que también fue observado por Salvetti y *col.* en 2012 quienes al recopilar datos taxonómicos de diferentes especies de lactobacilos vieron que los grupos previamente definidos y los recientemente definidos eran fenotípicamente heterogéneos con respecto al contenido de GC, el isómero de ácido láctico producido, el tipo de peptidoglicano en la pared y lo más importante, el perfil metabólico, definido en términos de tipos de azúcares fermentados y productos finales de fermentación (Salvetti *et al.*, 2012).

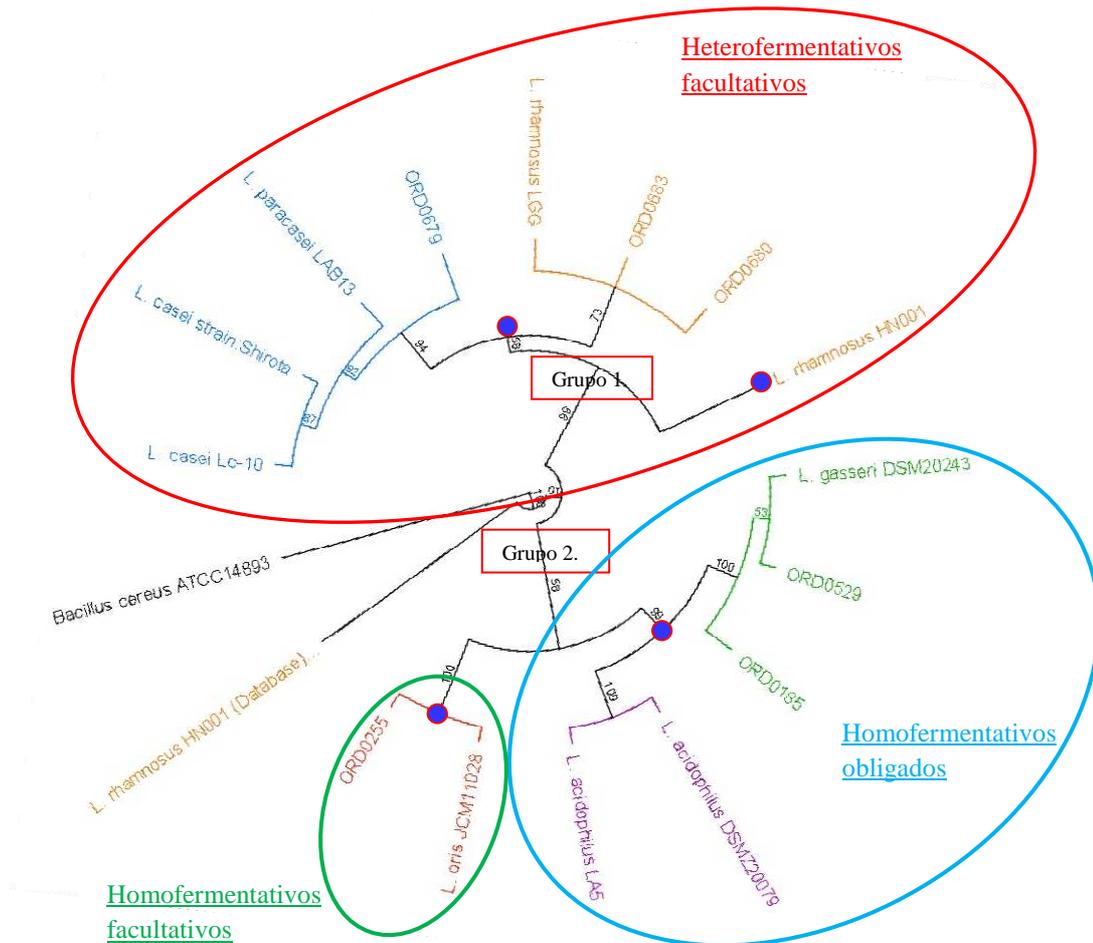


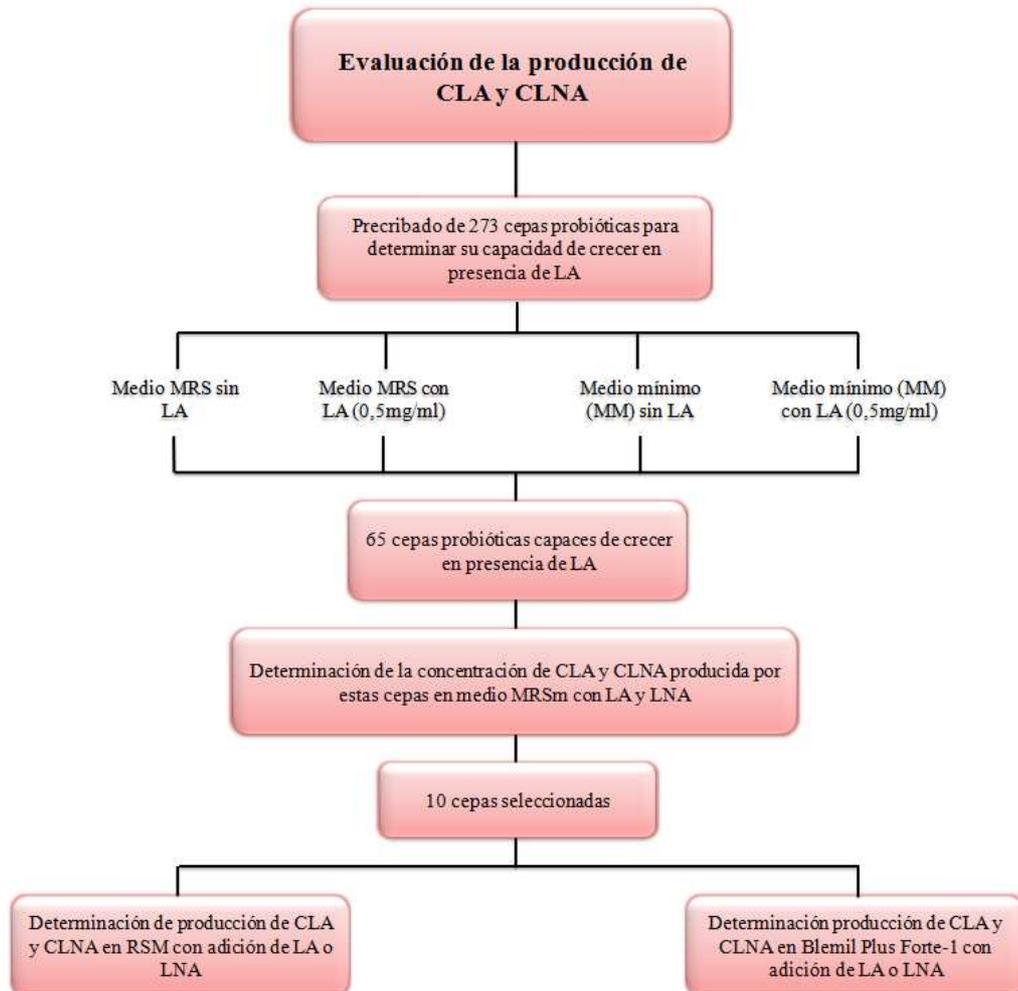
Figura 39. Árbol filogenético basado en las secuencias consenso del gen 16S rARN, representando la relación entre los diferentes lactobacilos aislados de las muestras y algunos lactobacilos comerciales. El árbol fue enraizado con *Bacillus cereus* y construido usando el método *neighbor-joining* con valores de *bootstrap* calculados de 1000 árboles. Cada número en las ramas indica el número de veces (de cada 1000) que el nodo fue respaldado por los resultados de análisis de *bootstrap*. ● indica la formación de los nodos principales en los grupos. Cada elipse simboliza los diferentes perfiles de fermentación presentes en los lactobacilos que se encuentran en el árbol filogenético.

El análisis de la biodiversidad basada en los consensos obtenidos de un fragmento del gen 16S rARN fueron útiles para observar el grado de divergencia de las cepas aisladas frente a bacterias probióticas de la misma especie y que actualmente son empleadas en productos o se encuentran depositadas en la colecciones de cultivos reconocidas. Sin embargo, con base en estos análisis, no es apropiado decir que dos cepas son idénticas ya que no se están considerando los diferentes genes funcionales, ni tampoco diferentes propiedades fenotípicas que pueden tener las cepas a la hora de realizar los árboles filogenéticos.

4.4. Evaluación de propiedades funcionales.

4.4.1. Evaluación de la producción de ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido linolénico conjugado (CLNA).

En el **esquema 2**, se representa la metodología que se ha seguido para la evaluación de la producción de estos dos ácidos grasos conjugados.



Esquema 2. Metodología empleada para la evaluación de la producción de CLA y CLNA de las cepas probióticas aisladas en este trabajo.

4.4.1.1. Crecimiento de las cepas en presencia de ácido linoléico (LA).

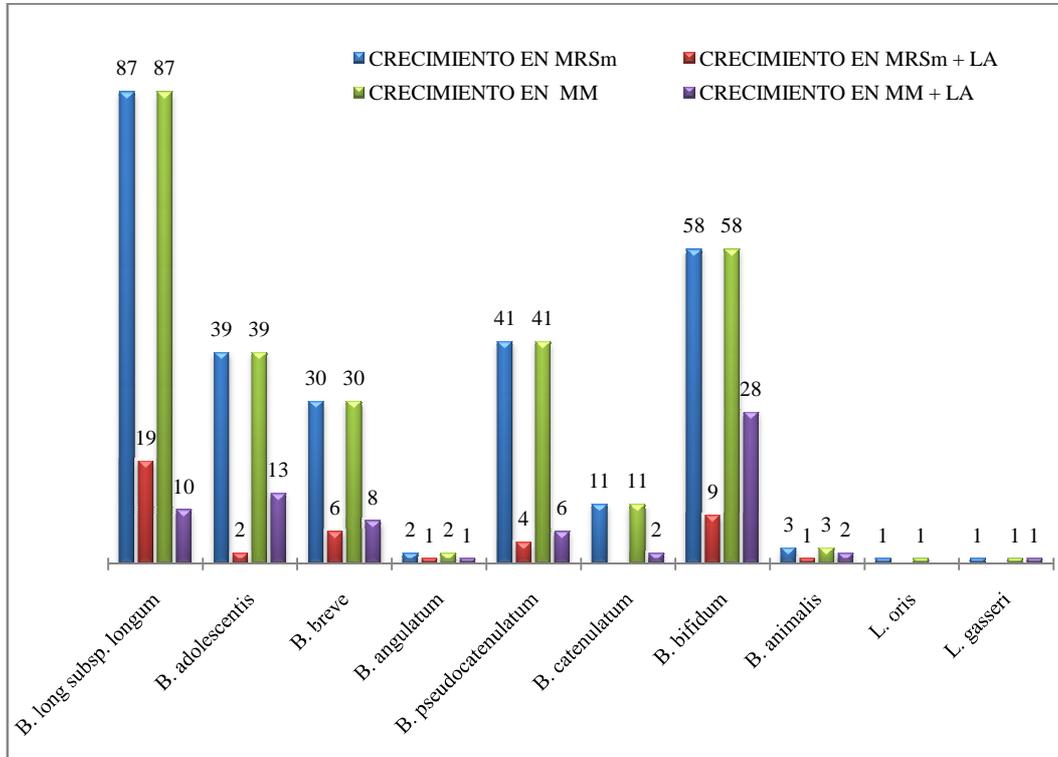
Se ha evidenciado que ciertas especies de lactobacilos y bifidobacterias del GIT pueden producir ácidos grasos conjugados, como el CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA (ácido linolénico conjugado), a partir de ácidos grasos libres, como el ácido linoléico (LA) y el ácido linolénico (LNA). Sin embargo, se ha descrito que estos ácidos grasos

tienen propiedades antimicrobianas, alterando la permeabilidad de la membrana plasmática de algunas bacterias, especialmente las Gram-positivas (Nieman, 1954). Debido a esto, se decidió realizar un precibado para evaluar la resistencia que tenían las distintas cepas aisladas por Laboratorios ORDESA frente a este ácido graso, teniendo como hipótesis, que aquellas cepas que pudieran crecer en presencia de este ácido graso, potencialmente podrían conjugarlo, puesto que se ha postulado la conjugación como un mecanismo de detoxificación que tienen estas bacterias para protegerse del efecto nocivo de este ácido graso. Para ello, se decidió medir por densidad óptica (DO) el crecimiento de estas bacterias en presencia de LA, calculando el porcentaje de crecimiento en base a la diferencia del crecimiento del microorganismo en medio con y sin LA.

En este precibado, se evaluaron 273 cepas realizándose el crecimiento en dos medios diferentes, MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80 y MM (Medio Mínimo de Norris), con el fin de valorar, como afectaba la composición del medio al crecimiento de las cepas en presencia de LA. En estudios anteriores, el MM ya había sido empleado para crecer BAL y en general las cepas presentaron un buen crecimiento, descartando de esta manera que la composición del medio mínimo, pudiera influir en los resultados de estos ensayos. La adición de Tween 80 en uno de los medios, se realizó para neutralizar la actividad antimicrobiana del LA libre y mejorar la solubilidad de este ácido graso en un medio acuoso (Oh *et al.*, 2003).

Como se observa en la **gráfica 5**, todas las cepas evaluadas, crecieron tanto en MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80, como en MM (Medio Mínimo de Norris) sin LA libre, indicando que los dos medios fueron favorables para el crecimiento de estas BAL, descartándose por tanto que la composición del medio de cultivo afectara a los resultados. En MM con LA crecieron el 26% del total de cepas cultivadas en este medio por contra en el MRSm con LA crecieron el 15,4% de las cepas cultivadas. Este resultado podría suponer, que en un medio mínimo (MM) el mecanismo ante el estrés esta mejor activado que en un medio rico (MRSm) y esto podría explicar el porqué, muchas cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son capaces de crecer en MM con adición de LA comparado con el MRSm con LA. Asimismo, es probable también que la adición de Tween 80 pueda generar un exceso de potenciales cepas con capacidad de conjugar LA (falsos positivos).

En general, el número y biodiversidad de cepas que fueron capaces de crecer en presencia de LA en ambos medios fue considerable, seleccionando de esta manera, 65 cepas, que incluyeron todas las especies identificadas.



Gráfica 5. Crecimiento de cepas en MRSm (Caldo MRS+L-Cys HCl 0.05%)+0.2% Tween 80 y MM (Medio Mínimo de Norris) vs. MRSm +LA y MM + LA. Los números en la parte superior de cada barra indican el número de cepas que crecieron en el medio correspondiente.

4.4.1.2. Determinación de producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA (ácido linolénico conjugado) de las cepas seleccionadas.

Los estudios para la determinación de la producción de los ácidos grasos conjugados fueron realizados en el Departamento de bioactividad y análisis de alimentos, por el grupo de biomarcadores lipídicos en alimentación y salud del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente, se seleccionaron las cepas con mejores crecimientos (65 cepas), en presencia de LA (ácido linoléico) en ambos medios de cultivo, enviadas en tubos con glicerol al 30% para su posterior evaluación.

4.4.1.2.1. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80.

Se realizó un crecimiento de las cepas seleccionadas, en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80 con adición de LA (0.5mg/ml), para evaluar su

capacidad de producir CLA a partir de LA libre y realizar la cuantificación mediante el método de metilación directa que combina metilato de sodio y ácido sulfúrico (Castro-Gómez *et al.*, 2014), que permite una identificación rápida de las bacterias productoras de este tipo de lípidos bioactivos. De las 65 cepas seleccionadas, solamente 10 cepas fueron capaces de convertir eficientemente el LA en CLA, siendo mayoritariamente bacterias del género *Bifidobacterium* y pertenecientes a diferentes especies como *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084), *B. pseudocatenulatum* (ORD0105), *B. breve* (ORD0123, ORD0124, ORD0128, ORD0134, ORD0138 y ORD0294) y *B. bifidum* (ORD0202). Del género *Lactobacillus*, sólo se obtuvo una cepa productora, *L. oris* (ORD0255) (**Tabla 13**). Todas estas cepas, excepto la ORD0084 y la ORD0105, fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los siguientes números de acceso: CECT8241, CECT8242, CECT8239, CECT8243, CECT8244, CECT8246, CECT8245 y CECT8240, respectivamente. Los resultados obtenidos, coinciden con los reportados por otros grupos de investigación, quienes también realizaron cribados para identificar bacterias productoras de CLA y/o CLNA en diferentes medios de cultivo, como caldo MRS, leche desnatada, leche de búfalo, entre otros (M. Coakley *et al.*, 2003; Gorissen *et al.*, 2010; Soo *et al.*, 2008).

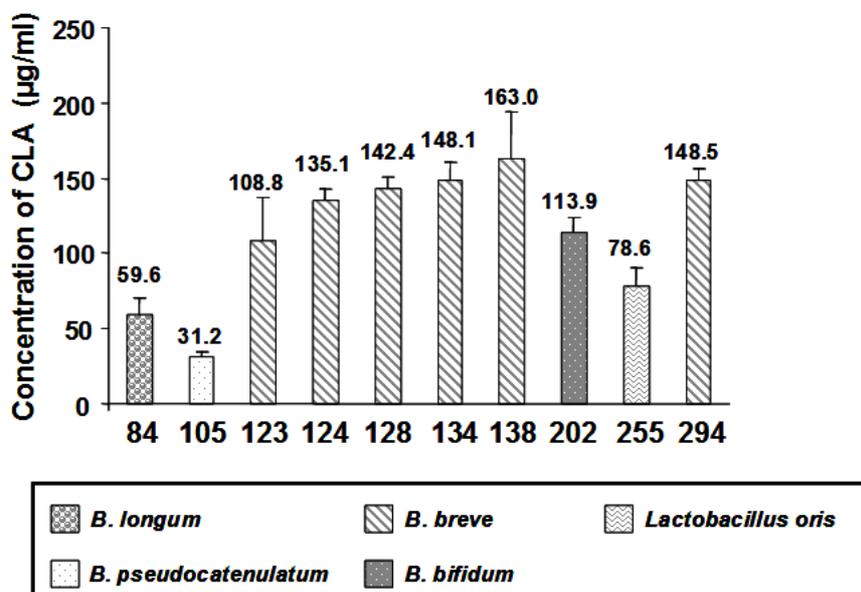
CÓDIGO	CEPA	Origen de aislamiento	Producción CLA (µg/ml)
ORD0010	<i>B. adolescentis</i>	Heces mamá	-
ORD0013	<i>B. bifidum</i>	Heces bebé	-
ORD0021	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces mamá	-
ORD0025	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Leche materna	-
ORD0026	<i>B. angulatum</i>	Heces maternas	-
ORD0030	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	-
ORD0036	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	-
ORD0045	<i>B. animalis</i>	Heces maternas	-
ORD0048	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	-
ORD0050	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	-
ORD0052	<i>B. animalis</i>	Heces maternas	-
ORD0053	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0056	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0066	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces de bebé	-
ORD0067	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces de bebé	-
ORD0072	<i>B. bifidum</i>	Leche materna	-
ORD0077	<i>B. animalis</i>	Heces maternas	-
ORD0080	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	-
ORD0084	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Leche materna	+
ORD0085	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0086	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0088	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0090	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Leche materna	-
ORD0091	<i>B. bifidum</i>	Leche materna	-
ORD0092	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	-
ORD0097	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	-

CÓDIGO	CEPA	Origen de aislamiento	Producción CLA (µg/ml)
ORD0099	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces de bebé	-
ORD0102	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Leche materna	-
ORD0104	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0105	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	+
ORD0108	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0111	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0123	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0124	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0128	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0134	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0138	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0142	<i>B. bifidum</i>	Heces maternas	-
ORD0185	<i>L. gasseri</i>	Heces de bebé	-
ORD0202	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	+++
ORD0213	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0219	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0221	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	-
ORD0232	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0255	<i>L. oris</i>	Leche materna	++
ORD0258	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0260	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0261	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0262	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0269	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0271	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0277	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0278	<i>B. bifidum</i>	Heces maternas	-
ORD0280	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0294	<i>B. breve</i>	Heces de bebé	+++
ORD0295	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0302	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0308	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces de bebé	-
ORD0310	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces de bebé	-
ORD0334	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0339	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	-
ORD0343	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces maternas	-
ORD0363	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-
ORD0393	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Heces maternas	-
ORD0460	<i>B. bifidum</i>	Heces de bebé	-

Tabla 13. Lista de las 65 cepas seleccionadas y su capacidad de producción de CLA (ácido linoléico conjugado) en medio MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80. (+) producción de CLA < 50 µg/ml, (++) producción de CLA de 50 a 100 µg/ml, (+++) producción de CLA > 100 µg/ml y (-) no hay producción.

Las concentraciones de CLA producidas variaron dependiendo de la especie, pero en general, los resultados obtenidos en este prueba mostraron que las cepas de *B. breve* tienden a ser las mejores productoras de CLA en caldo MRSm, encontrando rangos desde 108,8 a 163 µg/ml de CLA en *B. breve* (ORD0123) y *B. breve* (ORD0138). También se observó que *B. bifidum* (ORD0202) tenía una buena capacidad para producir CLA (113,9 µg/ml), mientras que *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y *L. oris* fueron productores moderados con concentraciones de 59,6 µg/ml y 78,6 µg/ml de

CLA, respectivamente. Por último, *B. pseudocatenulatum* (ORD0105), fue la cepa con menor capacidad de producción de CLA, con valores de 31,2 µg/ml (**Gráfica 6**).



Gráfica 6. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) de las cepas seleccionadas en caldo MRS_m (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

Los RAPDs comparativos de las diferentes especies, también fueron útiles para observar la similitud de los patrones de bandas de las cepas productoras vs. las no productoras de CLA, para cada una de las especies. En el caso de las cepas de *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum* y *B. longum* subsp. *longum*, se observó que no existía una similitud en el perfil de bandas entre la cepa positiva de producción de CLA vs. las otras cepas evaluadas de la misma especie. Por otro lado *B. breve*, especie que presentó varias cepas positivas para la producción de CLA (6 cepas), se observó en la comparativa de sus RAPDs, que algunas cepas productoras de CLA tenían perfiles de bandas similares entre ellas, pero ninguna tenía perfiles similares con las que no fueron capaces de producir CLA (**Fig. 40**). El encontrar perfiles de bandas similares entre algunas de las cepas productoras no es sorprendente, ya que todas estas cepas fueron aisladas de la misma muestra (heces de bebé, B3) y al realizar un aislamiento a partir de observaciones macroscópicas, en muchos casos se puede aislar la misma colonia.

De esta manera, los resultados obtenidos evidencian que la capacidad de conversión para formar isómeros de CLA es cepa dependiente y por tanto, no puede ser generalizado a nivel de especie (Gorissen *et al.*, 2010).

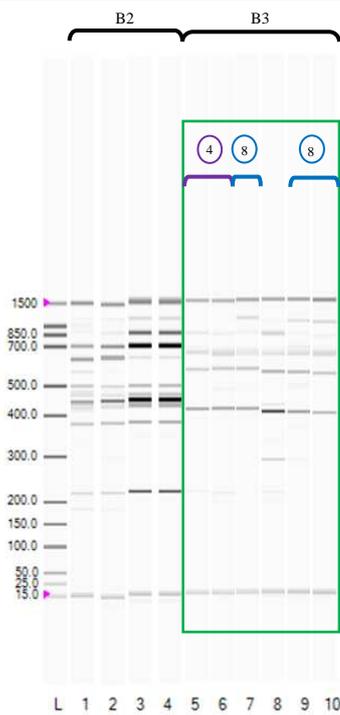


Figura 40. RAPD comparativo de las cepas seleccionadas para evaluar su producción de CLA (ácido linoléico conjugado) en MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80, pertenecientes a la especie *B. breve*. L. marcador 1,5Kb. 1. ORD0050. 2. ORD0048. 3. ORD0030. 4. ORD0036. 5. ORD0134. 6. ORD0138. 7. ORD0124. 8. ORD0128. 9. ORD0294. 10. ORD0123. El recuadro verde indica las cepas productoras de CLA en caldo MRSm y los números en la parte superior de los carriles, indican las cepas que comparten un perfil de bandas similar. Las muestras se simbolizan en la parte de arriba de cada carril, siendo B: heces de bebé y el número corresponde al donante de la muestra.

Es importante destacar que a pesar de que todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer en medio con adición de LA (ácido linoléico), no todas fueron capaces de producir alguna cantidad detectable de CLA mediante el método empleado. Asimismo, en algunas ocasiones, el CLA producido se puede encontrar en la membrana celular de la bacteria como lípidos estructurales, y en este caso, al ser analizado solo el sobrenadante, para realizar una primera selección de cepas productoras, no fue posible determinar dicho ácido conjugado (Oh *et al.*, 2003).

Trabajos realizados por Kim *y col.*, en 2002, han descrito que es probable que la producción de CLA dependa más de la densidad celular que de las concentraciones de LA presentes en el medio. Por lo tanto, es posible que al no haber determinado la concentración celular inicial de las cepas al realizar el subcultivo en medio con adición de LA, no se haya sido posible detectar la producción de CLA. Asimismo, trabajos recientes llevados a cabo por Renes *y col.* en 2017 han comprobado que el tiempo de incubación es un factor importante a considerar en la producción de CLA por BAL, con lo cual es posible que un tiempo de incubación más prolongado causara un incremento en los niveles de CLA producido por las cepas.

Se realizó el cálculo del porcentaje de conversión de LA, empleando la fórmula $(CLA/(CLA+LA))*100$. Los porcentajes de conversión variaron entre las 10 cepas, obteniendo un rango amplio de valores, desde 17,8% hasta 79,1 %. También se observó,

que todas las cepas de *B. breve* tienden a realizar una conversión de LA a CLA más eficiente comparado con las otras especies, resultados que coinciden con los obtenidos por el grupo de Gorissen y *col.* en 2010, quienes reportaron porcentajes de conversión de cepas de *B. breve* dentro de un rango de 19,5 hasta 53, 5% en caldo MRS (Gorissen *et al.*, 2010). De hecho, en nuestro estudio los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *B. breve* evaluadas, tenían porcentajes de conversión más altos que los obtenidos por este grupo, con rangos de conversión que van del 59,4 hasta 79,1% (Tabla 14).

Cepas	µg CLA/ ml MRS	% <i>cis9 trans11</i>	% Conversión de LA	µg CLNA/ ml MRS	% <i>cis9 trans11 cis15</i>	% Conversión de LNA
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ORD0084	59.6 ± 10.3	76.5 ± 3.3	30.4 ± 4.9	116.1 ± 67	87.3 ± 1.4	68.0 ± 47.0
<i>B. pseudocatenulatum</i> ORD105	31.2 ± 3.3	69.5 ± 1.3	17.8 ± 3.8	183.1 ± 53	80.3 ± 2.0	96.7 ± 0.4
<i>B. breve</i> ORD123	108.8 ± 28.9	74.3 ± 13.3	59.4 ± 18.1	209.0 ± 56	88.8 ± 0.5	98.8 ± 0.1
<i>B. breve</i> ORD124	135.1 ± 7.4	82.7 ± 1.8	72.5 ± 7.3	197.8 ± 51	87.7 ± 0.8	98.7 ± 0.2
<i>B. breve</i> ORD128	142.4 ± 8.3	79.5 ± 1.4	72.4 ± 9.9	208.9 ± 72	72.2 ± 20.8	99.2 ± 0.3
<i>B. breve</i> ORD134	148.1 ± 13.0	81.4 ± 2.8	73.3 ± 7.0	198.0 ± 53	86.1 ± 0.9	98.9 ± 0.4
<i>B. breve</i> ORD138	163.0 ± 30.9	76.5 ± 8.9	79.1 ± 13.2	201.8 ± 51	82.4 ± 4.8	99.3 ± 0.4
<i>B. bifidum</i> ORD202	113.9 ± 9.9	78.5 ± 6.5	57.5 ± 10.2	217.9 ± 86	82.0 ± 2.7	98.9 ± 0.3
<i>L. oris</i> ORD255	78.6 ± 11.8	79.0 ± 3.6	38.2 ± 6.0	191.3 ± 66	91.6 ± 1.4	97.7 ± 0.2
<i>B. breve</i> ORD294	148.5 ± 7.9	83.2 ± 3.3	68.7 ± 6.6	190.7 ± 53	85.1 ± 1.8	99.1 ± 0.3

Tabla 14. Producción de CLA/CLNA y los respectivos isómeros producidos en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80 de las cepas seleccionadas. Los valores corresponden al promedio y la SD de tres experimentos.

En los cromatogramas que se obtuvieron, se observó que estas bacterias producían diferentes isómeros de CLA, específicamente *cis9 trans11*, *trans10 cis12* y *trans9 trans11*(Fig. 41). El isómero mayoritario que se produjo en las 10 cepas seleccionadas, fue *cis9 trans11* (ácido ruménico) y su porcentaje en la cantidad total de CLA estuvo alrededor del 80%. Estos resultados no son sorprendentes, ya que varios estudios han reportado que el género *Bifidobacterium* y otros géneros, producen mayoritariamente este isómero (Gorissen *et al.*, 2010; O’Shea *et al.*, 2012).

El isómero *cis9 trans11* ejerce un efecto potenciador en la activación del Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), que regula la diferenciación a adipocitos (adipogénesis), actuando como un estimulador de la secreción de adiponectina (hormona que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos) (Yuan *et al.*, 2015). Por lo tanto, este mecanismo podría explicar en cierta medida, los efectos antihipertensivos, antihiperlipidémicos y antidiabéticos (Yuan *et al.*,

2014). Mientras que el isómero *trans10 cis12* aumenta la lipólisis y tiene la función de disminuir la síntesis de ácidos grasos (Lehnen *et al.*, 2015), lo que explicaría, en parte, los posibles mecanismos de acción del CLA sobre la composición corporal. Aunque muchos de los estudios se han realizado *in vitro*, las hipótesis metabólicas para explicar la acción reductora de la grasa corporal del CLA comenzaron basándose en el control de la expresión de genes implicados en la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos maduros, es decir, la expresión de estos genes resultaría en la reducción de la lipogénesis (Lehnen *et al.*, 2015). Por otro lado, el isómero *trans9 trans11* parece ser el metabolito final de la vía de producción de CLA de las bifidobacterias. Aunque el mecanismo de esta conversión (química o enzimática) aún no es del todo clara, éste isómero ha mostrado un efecto más potente como anticarcinogénico contra dos líneas celulares de cáncer (SW480 y HT-29) que el isómero *cis9 trans11* (Coakley *et al.*, 2006) (Gorissen *et al.* 2010) (Coakley *et al.*, 2003).

Aunque, ciertos efectos biológicos del CLA se deben a la acción separada de los isómeros más estudiados, *cis9 trans11* y *trans10 cis12*; también es probable que algunos efectos sean inducidos y/o potenciados por estos isómeros, actuando de manera sinérgica (Churruca *et al.*, 2009). En este sentido se ha reportado que el CLA ejerce una reducción en la proliferación de las células cancerosas, el cual es dependiente del tiempo y de la dosis. Tanto el isómero *cis9 trans11*, como el *trans10 cis12*, así como sus mezclas, han demostrado una reducción en la proliferación de varias líneas celulares de cáncer, estos estudios *in vitro* sugieren que el CLA puede alterar la expresión de proteínas clave que regulan el ciclo celular, como la ciclina D y A que son proteínas clave involucradas en facilitar la entrada de las células en el ciclo celular y la progresión a través de la fase S, respectivamente (Belury, 2002b) (Coakley *et al.*, 2009). Asimismo se ha evidenciado que el CLA puede modular el metabolismo de los lípidos, en parte por un mecanismo dependiente de la activación del grupo de factores nucleares (PPARs). En el hígado, el PPAR α es un factor de transcripción crítico para el metabolismo de los lípidos, porque varios genes que codifican para enzimas que están involucradas en la β -oxidación (tanto en peroxisomas como en mitocondrias) contienen un elemento funcional sensible al PPAR, en sus regiones potenciadoras (Belury, 2002b). Por otro lado, se ha demostrado que el CLA mitiga los efectos adversos de la estimulación inmune, reduciendo las respuestas inflamatorias y la hipersensibilidad en modelos animales, sin embargo, hay evidencia limitada con respecto a respuestas inmunes mejoradas en humanos, que incluyen la supresión de respuestas alérgicas,

mejora de la producción de anticuerpos después de la vacunación, reducción de los síntomas de la dermatitis atópica y reducción de los síntomas de la infección por rinovirus (Kim *et al.*, 2016).

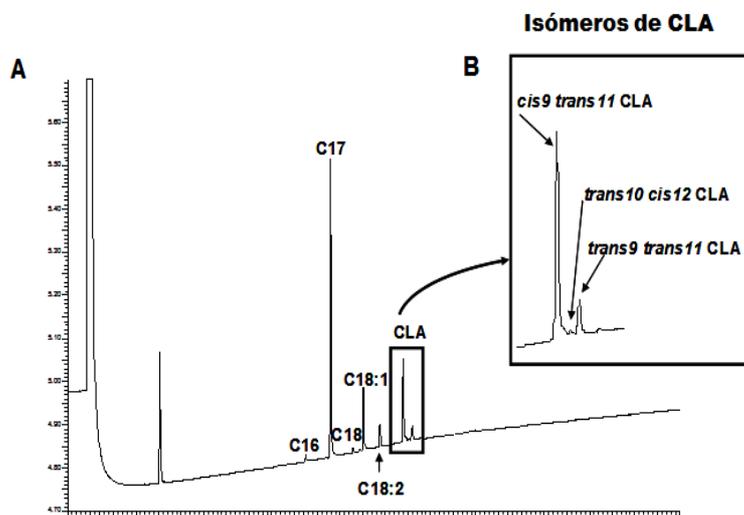


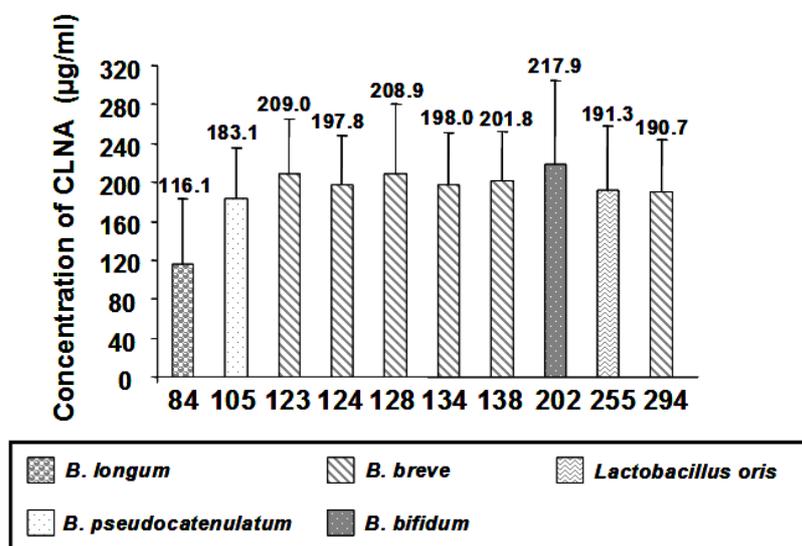
Figura 41. A. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases del cultivo de la cepa *B. breve* (ORD0138) en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80 con 0.5mg/ml de LA. B. Ampliación del cromatograma, donde se indican los isómeros de CLA.

Un análisis completo de los ácidos grasos mostró que la producción de CLA de estas 10 cepas se encontraba principalmente en el sobrenadante, donde se obtuvo un 97% del CLA, mientras que en los pellets celulares solo se recuperó un 3% del CLA, después de 24 horas de incubación.

4.4.1.2.2. Producción de CLNA (ácido linolénico conjugado) en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80.

Las diez cepas que fueron capaces de producir CLA, fueron evaluadas para observar su capacidad de convertir LNA (ácido linolénico) a CLNA (ácido linolénico conjugado) en caldo MRSm, usando como sustrato 0,5mg/ml de ácido linolénico libre. Los resultados obtenidos indicaron una mayor producción de CLNA por parte de estas bacterias comparado con la producción de CLA en medio MRSm. En este caso, las concentraciones producidas por la mayoría de las cepas fueron de 200 μ g/ml, excepto *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) que su producción fue de 116, 1 μ g/ml (**Gráfica 7**). Trabajos realizados por el grupo de Gorissen y *col.*, en 2010 y 2012, también observaron una alta producción de CLNA de diferentes cepas del género *Bifidobacterium* en caldo MRS. Coakley y *col.* en 2003, argumentan que la razón por la que las bacterias convierten el LA a CLA y el LNA a CLNA es debida a la presencia de un mecanismo de detoxificación que ayudaría a proteger las bacterias de los efectos

tóxicos, que pueden generar estos ácidos grasos libres en la bacteria (Coakley *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto y que el LNA es mucho más tóxico para estas bacterias comparado con el LA libre, se podría explicar el porqué la producción de CLNA es mayor, y más eficiente si cabe, que el CLA producido.



Gráfica 7. Producción de CLNA (ácido linolénico conjugado) de las cepas seleccionadas en caldo MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

Como en el punto anterior, para calcular la tasa de conversión del LNA, se empleó la siguiente fórmula $(CLNA/(CLNA+LNA))*100$. La conversión de LNA a CLNA de la mayoría de las cepas fue cercana al 100%, excepto *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) que fue del 68%. En los cromatogramas, se identificaron dos isómeros de CLNA: *cis9 trans11 cis15* y *trans9 trans11 cis15* (**Fig. 42**), pero el producido en mayor cantidad fue el *cis9 trans11 cis15* (ácido rumelenico), resultados que coinciden con los reportados por el grupo de Gorissen y *col.*, en 2010. El porcentaje de este ácido en la cantidad total de CLNA fue aproximadamente del 80%, en todas las cepas (Tabla 14). Se ha evidenciado, principalmente de estudios *in vitro* y con animales, que los isómeros del CLNA tienen potentes efectos anti-carcinogénicos en varias líneas celulares de cáncer (Coakley *et al.*, 2009), evidenciando que las reducciones en la expresión o las concentraciones celulares de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y la síntesis de prostaglandinas podrían ser factores contribuyentes en la actividad anti-cancerígena (Hennessy *et al.*, 2011). También se han sugerido otros mecanismos, incluido el aumento de la expresión del PPAR γ y de los genes de detención del ciclo celular GADD45 y p53, junto con una disminución en la expresión del supresor de apoptosis

Bcl-2 (Yuan *et al.*, 2015). Por otro lado, los isómeros de CLNA se han asociado por tener propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras. Las investigaciones sobre los mecanismos a través de los cuales son mediadas estas actividades han destacado la importancia de a) la disminución de la producción de eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos); b) aumento de la respuesta anti-inflamatoria mediada por PPARs; c) supresión de la respuesta anti-inflamatoria a través de la regulación de la transcripción celular del Nuclear factor kappa (NF- κ B); y d) la reducción de la expresión de las proteínas anti-inflamatorias como el Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), interleucina-6 e interleucina-1 beta. Del mismo modo, el CLNA se ha asociado con la mejora de la respuesta inmune, reduciendo la proliferación de células mononucleares de sangre periférica sin afectar la concentración de células helper y supresoras o linfocitos T y B (Hennessy *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha evidenciado que el CLNA tiene propiedades anti-adipogénicas y dicha actividad ha sido atribuída a diferentes factores, como son: a) la alta proporción de ácidos grasos que se somete a la β -oxidación; b) el bajo almacenamiento del CLNA en el tejido adiposo; y c) la capacidad del CLNA para regular los genes asociados con el metabolismo de los ácidos grasos (Hennessy *et al.*, 2011).

Así como ocurrió con el CLA, la producción de CLNA por parte de estas bacterias se encontró principalmente en el sobrenadante.

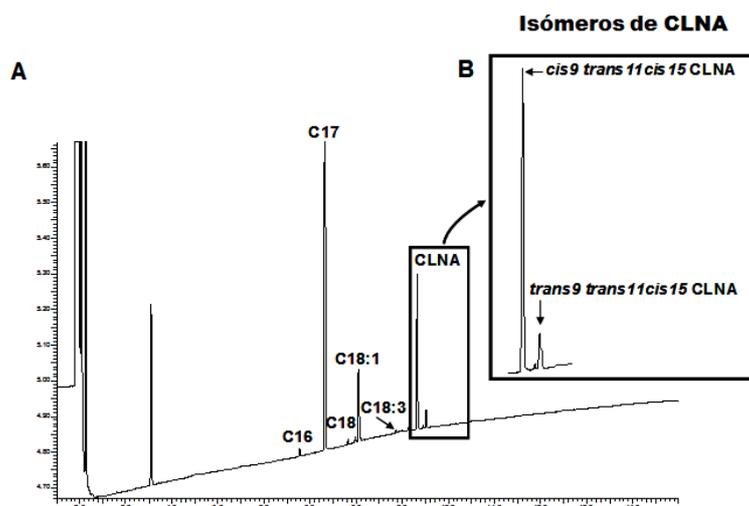
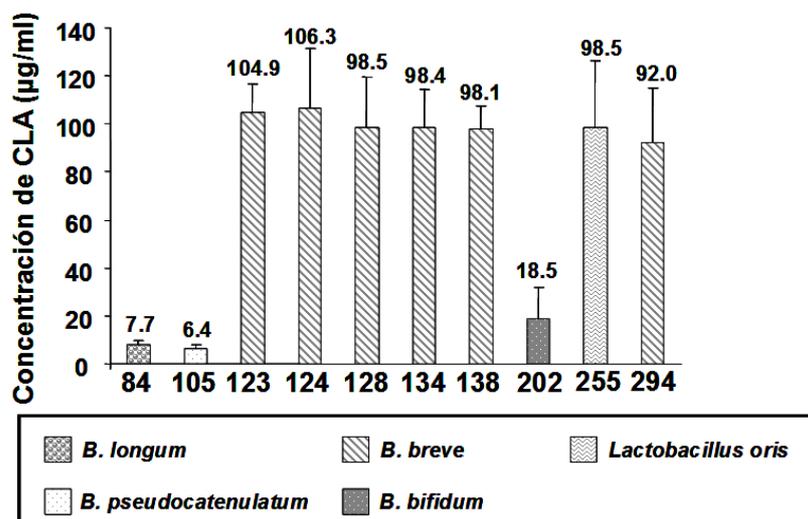


Figura 42. A. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases del cultivo de la cepa *B. breve* (ORD 0138) en caldo MRSm con 0.5mg/ml de LNA. B. Ampliación del cromatograma, donde se indican los isómeros de CLNA.

4.4.1.2.3. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA (ácido linoléico conjugado) de las bacterias seleccionadas en leche desnatada reconstituida (RSM: Reconstituted Skim Milk) suplementado.

Para verificar la capacidad de producción de CLA y CLNA de estas cepas en leche, se evaluó dicha producción cultivando estas bacterias en medio de leche desnatada reconstituida (RSM) y tras la fermentación bacteriana, se realizó la determinación de CLA y CLNA en el medio.

En el caso de la producción de CLA, las bacterias que produjeron una mayor concentración de CLA fueron todas las cepas de *B. breve* y el *L. oris* (ORD0255), mostrando unos valores que iban de 92 $\mu\text{g/ml}$ hasta 106.3 $\mu\text{g/ml}$ para *B. breve* (ORD0294) y *B. breve* (ORD0124), respectivamente; y *L. oris* (ORD0255) con un valor de 98.5 $\mu\text{g/ml}$. Por contra, la *B. longum* subsp. *longum* (ORD00084), *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) tuvieron valores alrededor de 7 $\mu\text{g/ml}$ y *B. bifidum* (ORD0202), valores de un 18 $\mu\text{g/ml}$ (**Gráfica 8**). Una posible explicación a esta baja producción de CLA, es que el crecimiento en este medio suele ser menor, debido a que no es un medio rico como el MRS y por tanto poco óptimo para las bifidobacterias, ya que estas bacterias no tienen una maquinaria proteolítica potente que les permita un crecimiento fácil en leche.



Gráfica 8. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) de las cepas seleccionadas en medio RSM (Reconstituted Skim Milk) suplementado. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

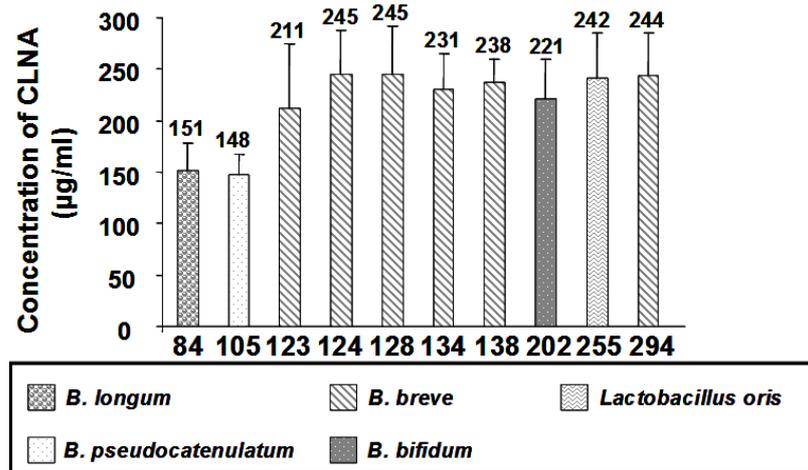
Los porcentajes de conversión del LA en este medio fueron más bajos comparados con los obtenidos en el MRSm (caldo MRS+L-Cys HCl 0.5%)+0.2% Tween 80 y los valores calculados se encontraron dentro de un rango de 36.2% hasta 40.3% de *B. breve*

(ORD0123) y *L. oris* (ORD0255), respectivamente. Mientras que para las cepas de *B. longum* subsp. *longum* (ORD00084), *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) estuvieron alrededor de un 3% y para *B. bifidum* (ORD0202) fue de un 7%. El isómero de CLA producido en mayor cantidad fue el *cis9 trans11*, encontrándose valores alrededor del 90% para las cepas de *B. breve*, mientras que para *L. oris* fue el 75% y para *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084), *B. bifidum* (ORD0202) y *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) los porcentajes de conversión tuvieron valores alrededor del 80% del total de CLA (Tabla 15).

Cepas	µg CLA/ ml RSM	% <i>cis9 trans11</i>	% Conversión de LA	µg CLNA/ ml RSM	% <i>cis9 trans11 cis15</i>	% Conversión de LNA
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ORD0084	7.7 ± 1.8	74.3 ± 2.3	2.7 ± 0.7	151.4 ± 26.2	91.6 ± 3.2	63.6 ± 4.6
<i>B. pseudocatenulatum</i> ORD0105	6.4 ± 1.7	72.4 ± 1.8	2.6 ± 0.6	147.9 ± 19.5	90.2 ± 1.9	64.1 ± 10.2
<i>B. breve</i> ORD0123	104.9 ± 11.6	90.2 ± 1.2	36.2 ± 5.1	211.3 ± 62.8	91.2 ± 2.9	97.3 ± 0.9
<i>B. breve</i> ORD0124	106.3 ± 25.2	90.1 ± 3.2	38.2 ± 3.2	244.5 ± 43.5	92.3 ± 0.4	97.5 ± 0.8
<i>B. breve</i> ORD0128	98.5 ± 21.0	90.5 ± 2.4	38.7 ± 5.2	244.9 ± 46.5	91.6 ± 0.9	97.4 ± 0.8
<i>B. breve</i> ORD0134	98.4 ± 16.1	90.0 ± 2.9	36.8 ± 5.6	230.5 ± 34.7	87.9 ± 6.0	97.5 ± 0.8
<i>B. breve</i> ORD0138	98.1 ± 9.3	90.9 ± 2.2	37.7 ± 2.9	237.5 ± 23.0	91.7 ± 1.5	97.3 ± 0.9
<i>B. bifidum</i> ORD0202	18.5 ± 13.3	79.9 ± 14.9	6.8 ± 4.9	220.5 ± 38.7	94.1 ± 0.7	93.0 ± 2.0
<i>L.s oris</i> ORD0255	98.5 ± 27.7	75.7 ± 8.8	40.3 ± 4.2	241.6 ± 44.0	91.8 ± 2.8	96.6 ± 1.8
<i>B. breve</i> ORD0294	92.0 ± 23.2	89.6 ± 1.3	36.9 ± 8.1	243.6 ± 41.5	91.2 ± 1.1	97.7 ± 0.6

Tabla 15. Producción de CLA/CLNA y los respectivos isómeros producidos en RSM (Reconstituted Skim Milk) de las cepas seleccionadas. Los valores corresponden al promedio y la SD de tres experimentos.

Asimismo, todas las cepas de *B. breve*, *B. bifidum* (ORD0202) y *L. oris* (ORD0255) fueron las mejores productoras de CLNA en RSM (Reconstituted Skim Milk), con concentraciones comprendidas entre 211 a 245 µg/ml de CLNA para *B. breve* (ORD0123) y *B. breve* (ORD0128), respectivamente, mientras que las cepas de *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y *B. pseudocatenulatum* (ORD0105), fueron cepas con una producción moderada en este medio, con concentraciones cercanas a 150 µg/ml (Gráfica 9). De esta manera, estos resultados, comprobaron de alguna manera que la conversión de LA y LNA a CLA y CLNA respectivamente, es un mecanismo de detoxificación, a pesar de que el medio RSM no era un medio óptimo para el crecimiento de estas bacterias.



Gráfica 9. Producción de CLNA (ácido linoléico conjugado) de las cepas seleccionadas en medio RSM (Reconstituted Skim Milk) suplementado. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

Las tasas de conversión de LNA en RSM (Reconstituted Skim Milk) fueron cercanas al 100% en las cepas de *B. breve*, *B. bifidum* (ORD0202) y *L. oris* (ORD0255). En cuanto a *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) se obtuvieron porcentajes de 63.6 y 64.1%, respectivamente. En todas las cepas, el isómero mayoritario fue el ácido rumelenico (*cis9 trans11-cis15*), con aproximadamente el 90% de la cantidad total de CLNA (**Tabla 15**). Todas las cepas seleccionadas fueron capaces de producir altas cantidades de CLNA en medio RSM, más de 200 µg/ml en casi todas las cepas excepto *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) con producciones de 150 µg/ml, mientras que solo las cepas de *B. breve* y *L. oris* (ORD0255) fueron capaces de producir altas concentraciones de CLA en este medio.

La suplementación del RSM con L-cisteína-HCl y casaminoácidos (RSM+Cys+CAA) del RSM (Reconstituted Skim Milk), se realizó para potenciar el crecimiento de estos microorganismos en este medio. Por una parte, la suplementación con cisteína incrementa las condiciones de anaerobiosis requeridas por este tipo de bacterias (Soo *et al.*, 2008). Mientras que los casaminoácidos sirven como complejo nutricional, debido a que como anteriormente se ha mencionado, las bifidobacterias tienen una actividad proteolítica baja y están limitadas para utilizar la caseína bovina de la leche, como fuente esencial de aminoácidos y péptidos pequeños.

Teniendo en cuenta que el RSM no es un medio ideal para el crecimiento de las bifidobacterias, a pesar de haberlo suplementado, es probable que esto pudiera afectar el

crecimiento de los microorganismos e influir directamente en una producción más baja de CLA y CLNA en este medio.

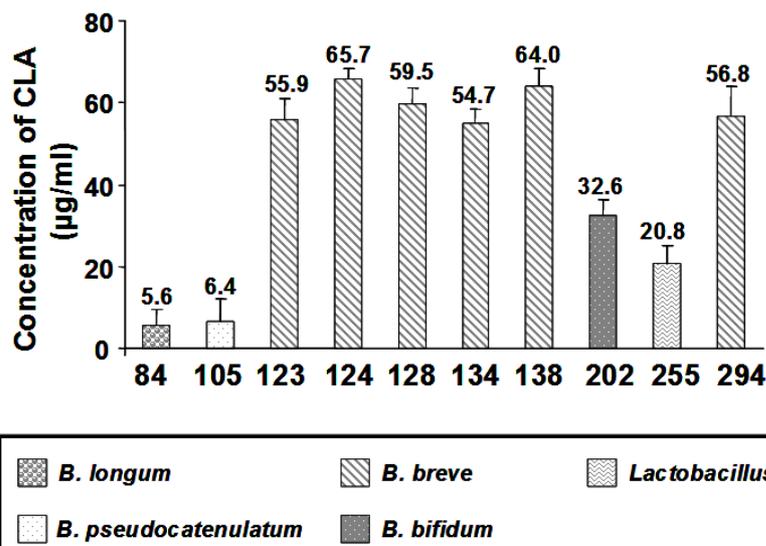
4.4.1.2.4. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) y CLNA(ácido linolénico conjugado) de las bacterias seleccionadas en fórmula infantil Blemil Plus Forte-1.

Tras corroborar que las 10 cepas productoras eran capaces de crecer y producir CLA y CLNA en RSM, se decidió probar si eran capaces de crecer y producir estos ácidos grasos conjugados en una fórmula infantil, para ello se empleó la fórmula del mercado Blemil Plus Forte-1 (ver composición en la **tabla 16**).

Ingrediente	Cantidad por 100 ml
Proteínas	1,35g
Hidratos de carbono	7,2g
Lactosa	6,5g
Dextrinomaltoza	0,7g
Grasas	3,5g
Ácido linoléico (LA)	569mg
Ácido linolénico (LNA)	49mg
Ácido araquidónico (AA)	15,8mg
Ácido docosahexaenoico (DHA)	11,2mg
Fibra	0,8g
Fructooligosacáridos	0,8g
Minerales	0,3g
Colina	13,5mg
Taurina	4,5mg
Inositol	6,1mg
L-Carnitina	2,3mg

Tabla16. Composición de la fórmula infantil Blemil Plus Forte-1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas de *B. breve* fueron las mejores productoras de CLA en esta fórmula infantil, tal y como había ocurrido con el RSM suplementado, obteniéndose concentraciones cercanas a 60 µg/ml, mientras que con las cepas de *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) se obtuvieron concentraciones inferiores a 10 µg/ml. En este caso, la cantidad de CLA producida por la cepa de *L. oris* (ORD0255) fue casi 4 veces más baja (20.8 µg/ml) que la obtenida cuando creció en medio RSM suplementado (**Gráfica 10**).



Gráfica 10. Producción de CLA (ácido linoléico conjugado) de las cepas seleccionadas en la fórmula infantil Blemil Plus Forte-1. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

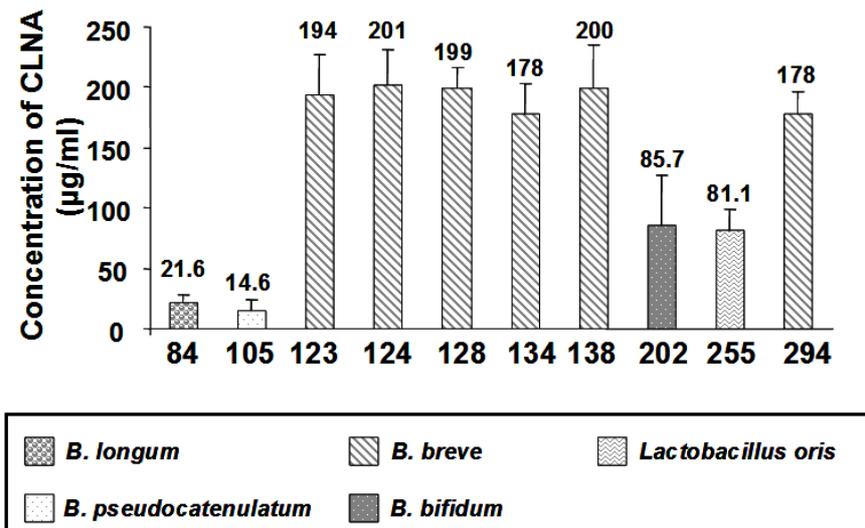
Las tasas de conversión de LA, fueron más bajas comparadas con los resultados obtenidos en el medio RSM. Se encontraron porcentajes alrededor del 15% para todas las cepas de *B. breve*, donde el isómero *cis9-trans11* (ácido ruménico) correspondió al 80% de la cantidad total de CLA. Por el contrario, los porcentajes de conversión por *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudocatenulatum* fueron cercanos al 2% y un 47% del total de CLA producido, correspondió al isómero *cis9-trans11* (ácido ruménico) y en el caso de *B. bifidum*, la tasa de conversión fue de un 8%, del cual un 80% correspondió al isómero *cis9-trans11* (Tabla 17).

En cuanto a la producción de CLNA, las cepas de *B. breve* y *B. bifidum* (ORD0202) fueron las mejores productoras de CLNA en esta leche de fórmula. Las concentraciones obtenidas estuvieron en un rango desde 201 hasta 85.7 µg/ml de CLNA, para *B. breve* (ORD0124) y *B. bifidum* (ORD 0202), respectivamente. Mientras que de las cepas de *B. longum* subsp. *longum* (ORD0084) y de *B. pseudocatenulatum* (ORD0105) se obtuvieron valores de 21,6 µg/ml y 14,6 µg/ml, respectivamente. En cuanto a *L. oris*, los valores fueron dos veces más bajos (81,1 µg/ml) que los obtenidos cuando la cepa creció en RSM (Gráfica 11).

Cepas	µg CLA/ ml Formula	% cis9 trans11	% Conversión de LA	µg CLNA/ ml Formula	% cis9 trans11 cis15	% Conversión de LNA
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ORD0084	5.6 ± 3.7	47.5 ± 15.4	1.9 ± 0.9	21.6 ± 6.9	89.1 ± 2.7	8.9 ± 3.9
<i>B. pseudocatenulatum</i> ORD0105	6.4 ± 5.9	47.3 ± 11.9	2.4 ± 1.8	14.6 ± 9.0	85.1 ± 4.5	6.0 ± 3.0
<i>B. breve</i> ORD0123	55.9 ± 4.9	88.6 ± 3.2	14.2 ± 2.2	193.7 ± 33.8	94.3 ± 0.2	78.0 ± 8.0
<i>B. breve</i> ORD0124	65.7 ± 2.6	88.9 ± 4.9	16.3 ± 3.1	201.3 ± 30.6	94.6 ± 0.2	79.0 ± 7.9
<i>B. breve</i> ORD0128	59.5 ± 3.9	89.1 ± 3.8	14.5 ± 3.5	199.2 ± 17.1	94.7 ± 0.4	76.7 ± 4.4
<i>B. breve</i> ORD0134	54.7 ± 3.5	86.9 ± 6.0	13.4 ± 2.5	177.9 ± 25.2	94.6 ± 0.1	73.3 ± 2.9
<i>B. breve</i> ORD0138	64.0 ± 4.2	89.3 ± 2.8	16.1 ± 3.5	199.7 ± 34.9	94.0 ± 0.2	78.5 ± 1.9
<i>B. bifidum</i> ORD0202	32.6 ± 3.6	83.6 ± 6.4	8.0 ± 1.1	85.7 ± 41.6	88.9 ± 8.8	36.9 ± 21.1
<i>L. oris</i> ORD0255	20.8 ± 4.2	77.5 ± 6.7	5.6 ± 2.3	81.1 ± 18.3	80.7 ± 6.4	33.7 ± 4.7
<i>B. breve</i> ORD0294	56.8 ± 7.1	89.0 ± 1.4	14.6 ± 4.6	177.8 ± 19.1	93.9 ± 0.6	73.6 ± 5.1

Tabla 17. Producción de CLA/CLNA y los respectivos isómeros producidos en Blemil Plus Forte-1 de las cepas seleccionadas. Los valores corresponden al promedio y la SD de tres experimentos.

Las tasas de conversión de LNA dieron valores alrededor del 75%, excepto *L. oris* (ORD0255) y *B. bifidum* (ORD0202) donde se obtuvo un 33.7 y 36.9%, respectivamente. En todos los casos, el isómero predominante fue el cis9 trans11 cis15 con aproximadamente el 90% de la cantidad total de LNA. *B. longum* subsp. *longum* (ORD 0084) y *B. pseudocatenulatum* (ORD 0105) no produjeron grandes cantidades de CLNA en la fórmula infantil comparadas con las otras cepas, obteniéndose valores de 8,9% y 6%, respectivamente (Tabla 17).



Gráfica 11. Producción de CLNA (ácido linolénico conjugado) de las cepas seleccionadas en la fórmula infantil Blemil Plus Forte-1. Los valores corresponden a los promedios y la desviación estándar (SD) de tres experimentos.

Es importante resaltar que la cantidad de CLA y CLNA producida en este medio, así como las tasas de conversión y la cantidad de los isómeros *cis9 trans11* de CLA y *cis9 trans11 cis15* de CLNA fueron menores que los obtenidos en los medios RSM y MRSm; esto puede ser debido a que la leche de fórmula al ser un medio más complejo podría dificultar el crecimiento de estas cepas y por tanto no producir una cantidad de CLA y CLNA mayor, comparada con los otros medios evaluados anteriormente.

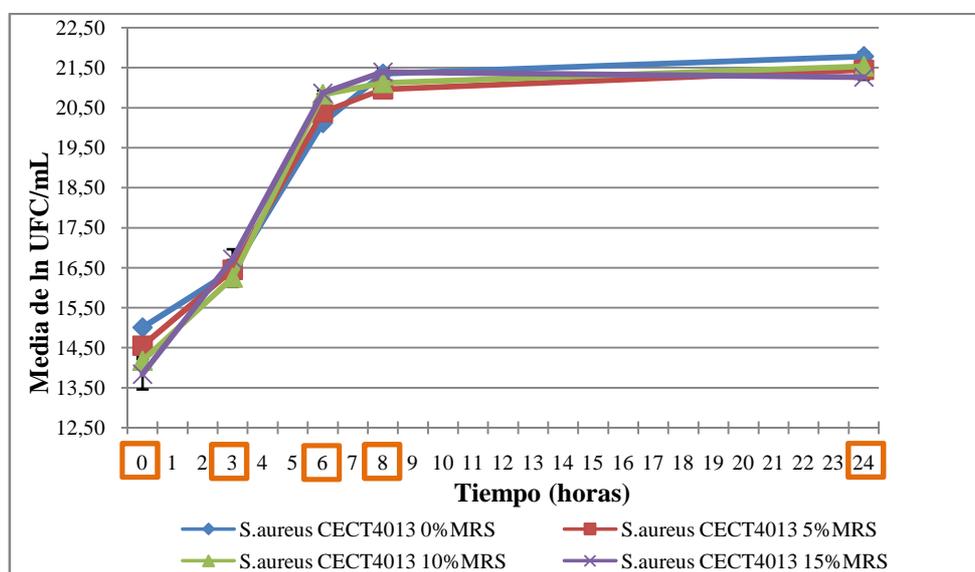
Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se observó que la formación del isómero *cis9 trans11* de LA y el isómero *cis9 trans11 cis15* del LNA fueron predominantes en todos los casos, esto puede deberse a que la formación de estos isómeros está más relacionada a la fase logarítmica del crecimiento celular de las cepas, mientras que los isómeros *trans9 trans11* de CLA y *trans9 trans11 trans15* del CLNA, están más relacionados con la fase estacionaria o de muerte celular, que para estas cepas generalmente ocurre a las 72 horas, y en el caso de este estudio al incubarse las bacterias 48 horas no se permitió que las bacterias llegaran a esta fase, con lo cual las cantidades detectadas de estos isómeros *trans* fueron más bajas (Gorissen *et al.*, 2010). La enzima responsable de la conversión de LA y LNA a CLA y CLNA respectivamente, es la linoleato isomerasa (LAI) y hasta hace muy poco se pensaba que esta enzima también estaba implicada en la conversión de los isómeros *cis9 trans11* a *trans9 trans11*; sin embargo, trabajos realizados por Gorissen *et al.* en 2012 han concluido que esta conversión es más una reacción química que enzimática y por tanto no es llevada a cabo por la LAI. Las bifidobacterias parecen realizar dicha conversión en la fase estacionaria de crecimiento, cuando la LAI ya no estaría disponible, como reacción a las concentraciones crecientes de sustancias tóxicas (LA y LNA) (Gorissen *et al.*, 2012). Por otro lado, existe un mecanismo de conversión de los isómeros *cis* a *trans* en cepas de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*, lo que les permite cambiar su fluidez en la membrana en respuesta a un aumento de la temperatura o como adaptación a compuestos tóxicos, respectivamente (Heipieper *et al.*, 2003).

Los experimentos y resultados obtenidos en este trabajo han permitido desarrollar y patentar un método de producción de CLNA, en particular el *cis9 trans11 cis15*, a partir de LNA con altas tasas de conversión, en el cual estaban involucradas BAL y bifidobacterias (en concreto, cepas de *B. breve*, *B. bifidum* y *L. oris*) para promover su conversión en diferentes medios, incluyendo matrices alimentarias como es el caso de la

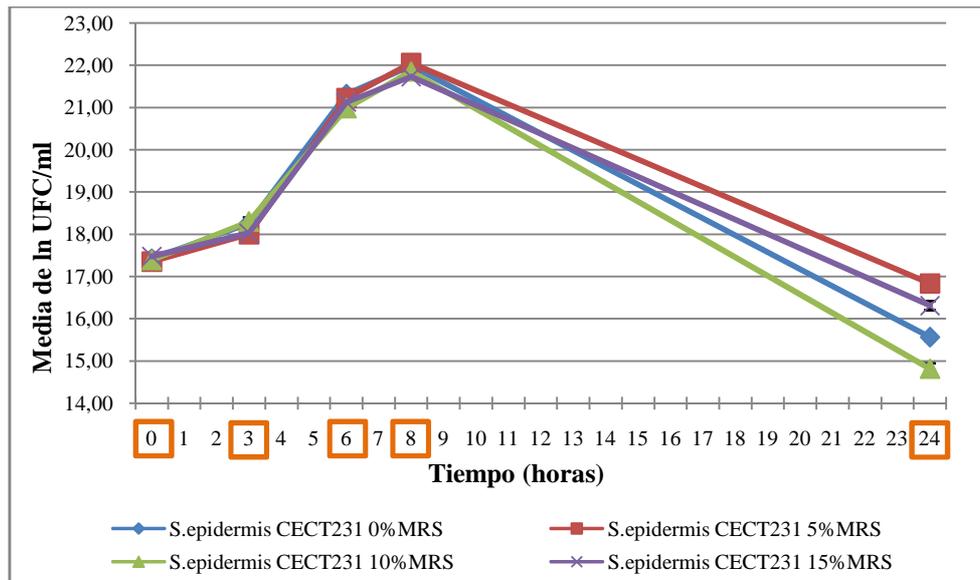
leche de fórmula, logrando de esta manera obtener un producto alimenticio enriquecido. La patente ha sido publicada bajo el número WO 2014/096352 A2.

4.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas.

Antes de evaluar la capacidad antimicrobiana de las cepas aisladas, se comprobó que el MRS (medio empleado para crecer las cepas probióticas y obtener los sobrenadantes testados) por sí solo, no tuviera ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los patógenos, ya que el medio óptimo de crecimiento de los patógenos empleados era el caldo Trypticase de Soja (CASO). Para esto, se realizaron curvas de crecimiento utilizando cultivos de las cepas patógenas en caldo CASO con diferentes porcentajes de MRS y realizando siembras en placa a diferentes tiempos (**Gráficas 12 y 13**). Los resultados obtenidos, mostraron que la adición de los porcentajes probados de MRS al caldo CASO no afectaba el crecimiento de los dos patógenos. Para las pruebas de inhibición de crecimiento se usó la adición de un 15% de sobrenadante, que fue el porcentaje máximo probado. De forma paralela en cada experimento de inhibición de crecimiento, se realizó una curva control de crecimiento con cada patógeno.



Gráfica 12. Curva de crecimiento en UFC/ml de *S. aureus* CECT4013 con diferentes porcentajes de MRS. Los resultados se expresan como la media del ln de las UFC/ml de 6 placas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.



Gráfica 13. Curva de crecimiento en UFC/ml de *S. epidermidis* CECT231 con diferentes porcentajes de MRS. Los resultados se expresan como la media del ln de las UFC/ml de 6 placas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron, se simbolizan con un recuadro naranja.

4.4.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* CECT4013.

Antes de realizar la evaluación de los diferentes sobrenadantes, se valoró la actividad antimicrobiana de los dos controles positivos. Estos controles, fueron aislados de dos productos que están orientados a madres que sufren de mastitis en la lactancia: el Lactanza[®] hereditum[®] contiene la cepa *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (comercializado en España) y Profutura[™] mama que contiene la cepa *Lactobacillus salivarius* CECT5713 (comercializado en Alemania). Trabajos realizados por el grupo de Olivares y col. en 2006, determinaron mediante experimentos *in vitro*, que estas dos cepas mostraban una buena actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos, entre ellos, *Staphylococcus aureus* CECT4013, microorganismo involucrado en el desarrollo de la mastitis (Olivares *et al.*, 2006).

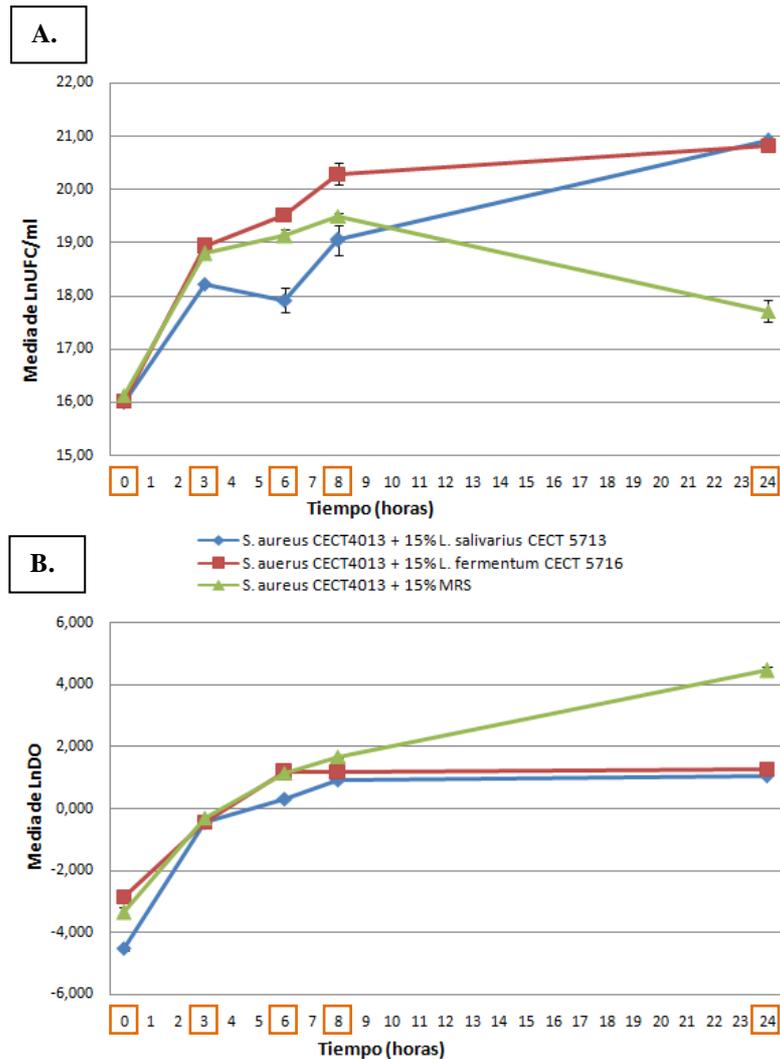
Como se observa en la **gráfica 14A**, el sobrenadante de *L. salivarius* CECT5713 tiende a inhibir el crecimiento de *S. aureus* CECT4013, ya que los valores de UFCs obtenidos son menores en presencia del sobrenadante y se evidencia por una pendiente de crecimiento menos inclinada comparada con la curva de crecimiento del patógeno. Asimismo, se observó que a las 24 horas, los cultivos de *S. aureus* CECT4013 que crecieron con muestras que tenían los sobrenadantes tanto de *L. salivarius* CECT5713 como de *L. fermentum* CECT5716, presentaron un incremento en sus recuentos, lo que podría suponer que aún se encontraban en fase logarítmica. El hecho de no haber

realizado un recuento posterior y que el tiempo transcurrido entre las dos últimas tomas de muestra es bastante amplio, no permitió confirmar este hecho; sin embargo, si se compara la curva de crecimiento del patógeno (*S. aureus* CECT4013 +15% MRS), respecto a las que tenían sobrenadantes, se podría decir que estos últimos tienen algún tipo de compuesto que estimula o mantiene el crecimiento del patógeno, alterando de alguna manera el ciclo celular normal de esta bacteria.

En cuanto a las medidas de la DO₆₀₀ (**Gráfica 14B**) se observó que el control de crecimiento del patógeno (*S. aureus* CECT4013 +15% MRS) mostró unos valores mayores, respecto a las muestras que tenían sobrenadantes. Esto puede deberse, a que este microorganismo al crecer en forma de racimos ocasiona que la medida de la DO₆₀₀ no sea precisa y en algunos casos exista una sobrestimación. Por otro lado, se observó que la muestra con el sobrenadante de *L. salivarius* CECT5713 tendía a unos valores un poco inferiores respecto al control de crecimiento del patógeno (*S. aureus* CECT4013+15% MRS), siendo la hora 6 donde se obtuvo una DO₆₀₀ menor.

Una curva de crecimiento representa la cantidad de células viables presentes en un cultivo y tiempo determinado. En este trabajo, para determinar la actividad antimicrobiana se decidió realizar medidas tanto de UFC/ml, como de DO₆₀₀ del microorganismo patógeno crecido en caldo CASO, con 15% de sobrenadante neutralizado de cultivos de las diferentes cepas probióticas, pertenecientes al cepario de Laboratorios ORDESA. Se sabe que la medida de la DO₆₀₀ no es del todo precisa, ya que esta técnica no permite diferenciar la viabilidad y/o estado metabólico en el que se encuentran las células en el momento de la medida. Por otro lado, se considera que la técnica de recuento en placa es la más adecuada a la hora de realizar una curva de crecimiento porque permite detectar la cantidad de células viables presentes en determinado período de tiempo, sin embargo esta técnica también tiene ciertas limitaciones ya que es necesario tener una cantidad representativa de placas sembradas y en muchas ocasiones las UFC no se encuentran dentro del rango óptimo (30-300 UFC/ml). Así pues, se ha de considerar que estas dos técnicas se complementan, razón por la cual han sido usadas en este trabajo para evaluar la actividad antimicrobiana.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los sobrenadantes de los dos controles positivos, se decidió emplear como único control positivo el sobrenadante de la cepa *L. salivarius* CECT5713 ya que se conseguían resultados más consistentes y duraderos en el tiempo.



Gráfica 14. A. Curvas de crecimiento en UFC de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO_{600} de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

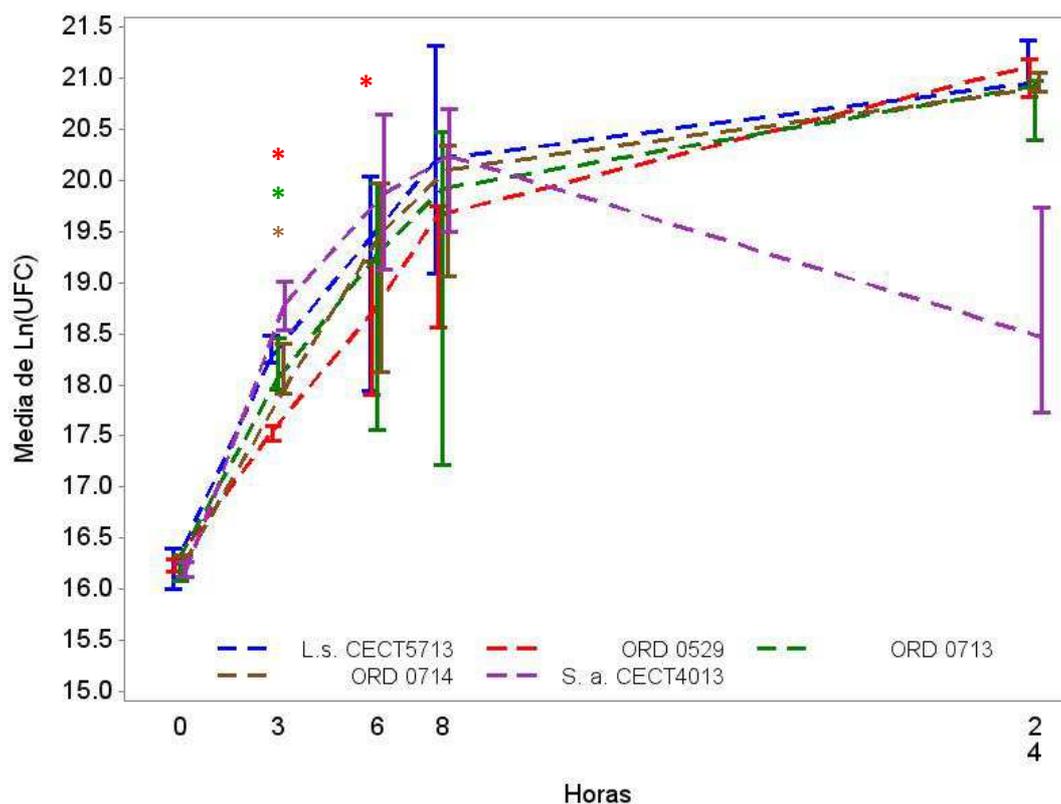
Las cepas probióticas que se evaluaron en este cribado fueron la ORD0529, ORD0713 y ORD0714, todas ellas cepas de *L. gasseri*, ya que como se mencionó en el capítulo Material y Métodos, es una especie que ha sido descrita en la bibliografía, por tener un efecto inhibitorio frente a algunos de los patógenos evaluados en este trabajo. El hecho de utilizar sobrenadantes neutralizados para realizar los diferentes experimentos de inhibición, permitió descartar el efecto que podía tener el pH y de manera indirecta, la producción de ácidos orgánicos sobre el crecimiento del patógeno, para de esta manera,

evaluar otro tipo de compuestos producidos por las cepas probióticas con posible efecto antimicrobiano, como lo son la producción de peróxido de hidrógeno o bacteriocinas.

Al evaluar los diferentes sobrenadantes, se observó que hubo una interacción significativa del tiempo sobre el logaritmo neperiano (\ln) de las UFC/ml y asimismo hubo una interacción significativa del tiempo con el sobrenadante (**Gráfica 15**), observándose que a las 3 y 6 horas, el sobrenadante de la cepa ORD0529 fue la que mejor efecto de inhibición tuvo, ocasionando un retraso en el crecimiento del *S. aureus* CECT4013, comparado con las demás cepas evaluadas, incluyendo el control positivo (*L. salivarius* CECT5713). Asimismo, se observó que la fase logarítmica del cultivo en presencia de los diferentes sobrenadantes se mantenía al finalizar el experimento (24horas), por lo que es posible que exista algún tipo de metabolito secundario en los sobrenadantes, que actúe de buffer y evite que las células lleguen a la muerte celular, caso contrario que se observó en el cultivo sin presencia de sobrenadante.

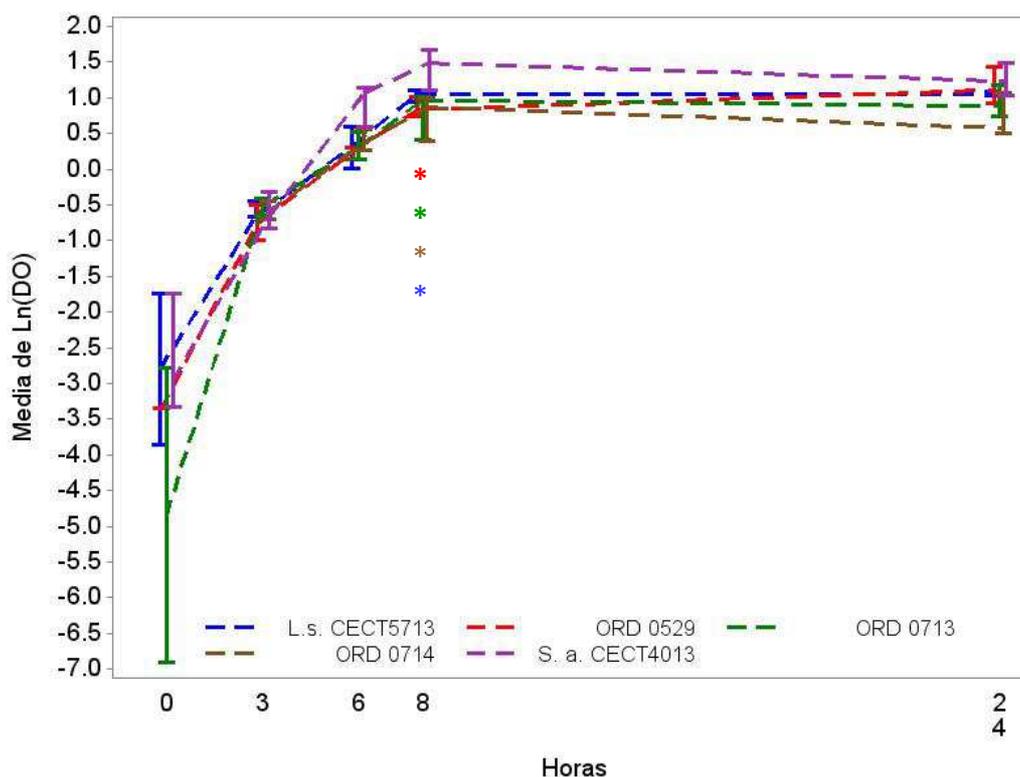
Trabajos realizados por Olivares y *col.* en 2006 demostraron, empleando la técnica de difusión en placa, que sobrenadantes ácidos de ciertas cepas, incluidos el de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716 eran efectivos frente a *S. aureus* CECT4013, sin embargo al neutralizar estos mismos sobrenadantes no pudieron detectar zonas de inhibición. Asimismo, dicho grupo de investigación, detectó que *L. salivarius* CECT5713 a pesar de ser catalasa negativa, era capaz de producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hecho que no es extraño, ya que se ha sugerido que este tipo de microorganismos contienen flavoproteínas oxidasas, que catalizan la producción de H_2O_2 (Ocaña *et al.*, 1999).

Por tanto, no es sorprendente, los resultados que se obtuvieron en este experimento, principalmente debido a que en este caso se usaron sobrenadantes neutralizados, empleando la técnica de inhibición en cultivo. Sin embargo, es posible que no se hayan conseguido resultados bacteriostáticos o bactericidas empleando el sobrenadante de la cepa *L. salivarius* CECT5713, en este trabajo usado como control positivo, debido a la baja concentración de peróxido de hidrógeno presente o al bajo porcentaje de sobrenadante que se añadió al realizar los experimentos.



Gráfica 15. Curvas de crecimiento en UFC/ml de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, la ORD0713, la ORD0714 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes \pm SD, $p < 0.05$.

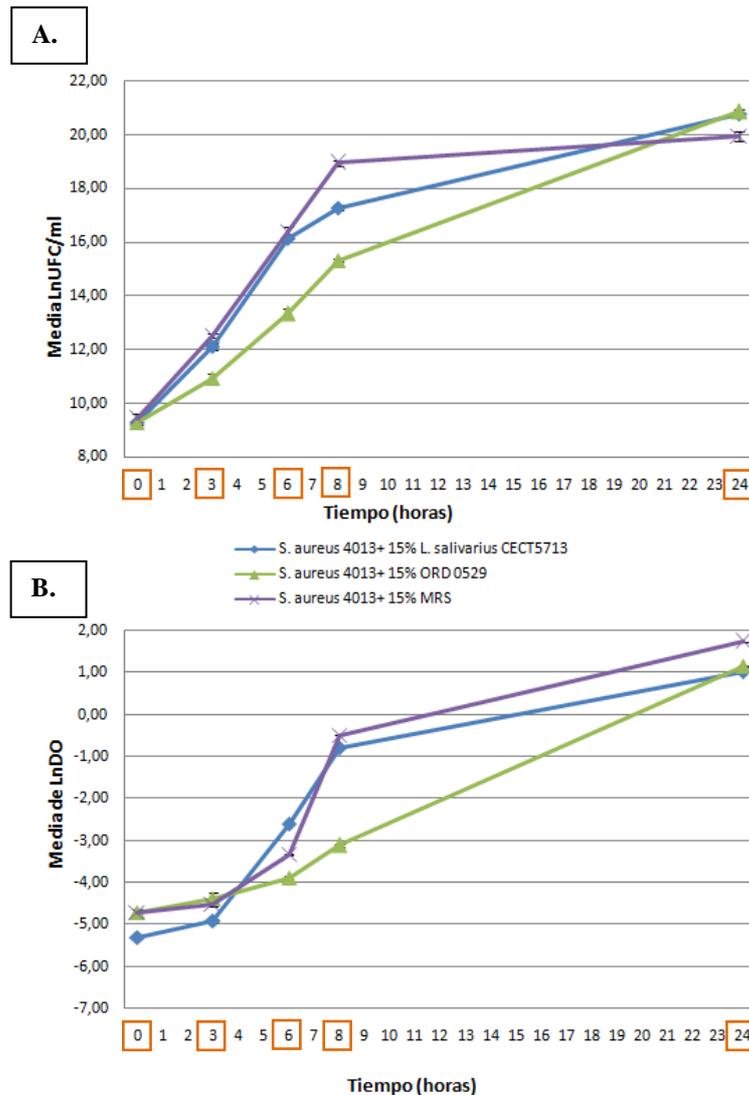
Respecto a las medidas de la DO_{600} , así como ocurrió en los experimentos anteriores, no fueron equivalentes a las UFC obtenidas en los recuentos, ya que sólo se observaron diferencias significativas a las 8 horas de todos los sobrenadantes, respecto al control de crecimiento, existiendo un efecto de retraso de crecimiento del patógeno (**Gráfica 16**). Sin embargo, a las 24 horas todos los cultivos tuvieron una DO_{600} similar, caso contrario a lo que ocurrió con las UFC, hecho que puede deberse a que la medida de la DO_{600} no permite diferenciar entre células vivas y muertas, ni tampoco su estado metabólico. De esta manera, si un cultivo se encuentra en fase de muerte celular, sus células se pueden encontrar demasiado agregadas entre sí y obtenerse unos valores altos de DO_{600} , pudiendo sobreestimar la cantidad de células vivas presentes en dicho cultivo.



Gráfica 16. Curvas de crecimiento de la DO_{600} de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, la ORD0713, la ORD0714 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes \pm SD, $p < 0.05$.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el sobrenadante de la cepa ORD0529 fue la que tuvo un mejor efecto de inhibición frente al patógeno *S. aureus* CECT4013, por tanto se decidió realizar un experimento adicional usando dicho sobrenadante pero con una concentración de patógeno más baja (10^4 UFC/ml) y de esta manera determinar si se conseguía un mayor efecto negativo sobre el crecimiento de *S. aureus* CECT4013. En este caso, los resultados mostraron que el sobrenadante de la cepa ORD0529, comparado con el experimento anterior, tiende a retrasar mucho más el crecimiento del patógeno en la hora 3, 6 y 8, ya que los valores de UFC obtenidos fueron uno, y en algunos casos, dos logaritmos menos respecto al control de crecimiento (*S. aureus* CECT4013 + 15% MRS); mientras que la tendencia del sobrenadante de *L. salivarius* CECT5713 (usado como control positivo) solo mostró este efecto en la hora 8, con una reducción de un logaritmo respecto al control de crecimiento del patógeno (**Gráfica 17A**). En cuanto a los resultados de la DO_{600} (**Gráfica 17B**), se observó que no fue hasta la hora 8, y en algún caso a la hora 6, que empezó la fase exponencial del patógeno, considerando de esta manera que durante las horas previas existió una aparente fase de latencia, hecho que pudo deberse a que la concentración de células

presentes se encontraba por debajo del límite de detección del espectrofotómetro (10^6 - 10^7 UFC/ml), cuando realmente el cultivo se encontraba en fase logarítmica desde un comienzo, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante recuento (UFC/ml).

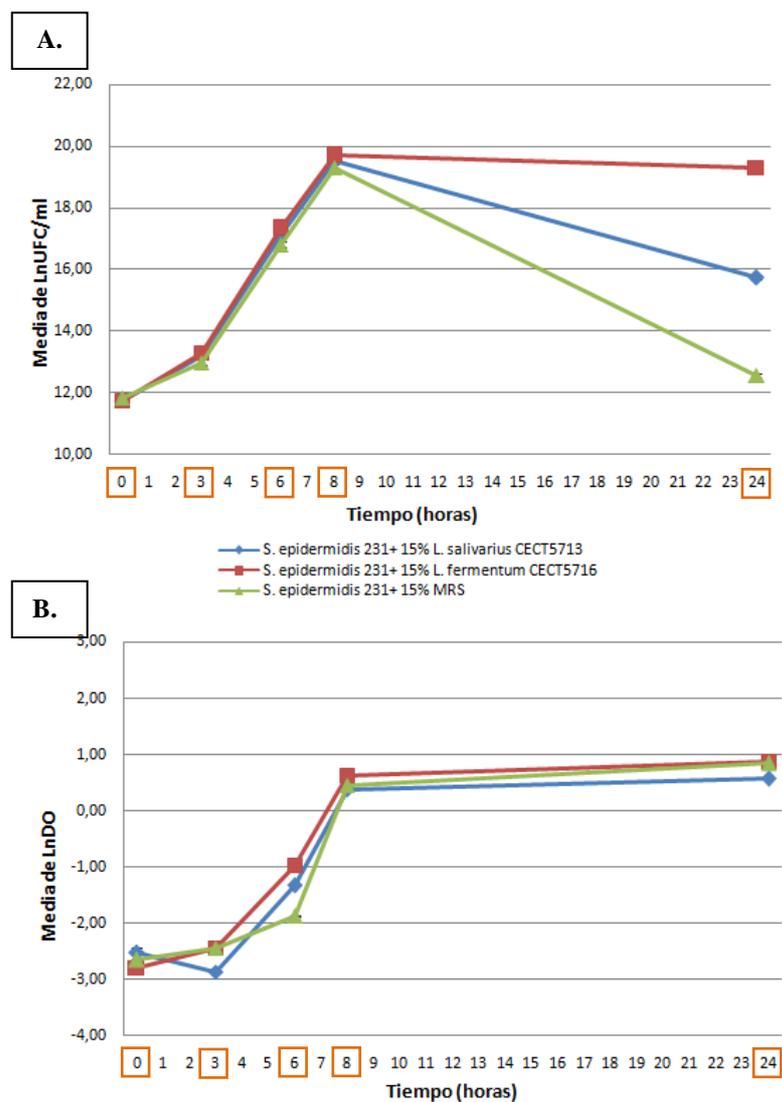


Gráfica 17. A Curvas de crecimiento en UFC de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO₆₀₀ de *S. aureus* CECT4013 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

4.4.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis* CECT231.

De la misma manera que en el experimento anterior, se evaluó el efecto de los sobrenadantes de los dos controles positivos, sobre el crecimiento de *S. epidermidis* CECT231. En este caso, como se muestra en la **gráfica 18A**, los datos obtenidos no nos permiten ver inhibición ni retraso del crecimiento del patógeno, ya que las curvas

obtenidas con adición de los sobrenadantes de los controles positivos son muy similares a la curva de crecimiento del patógeno. En cuanto a las medidas de la DO₆₀₀ (**gráfica 18B**), se evidencia nuevamente la poca sensibilidad de esta medida, ya que los valores que se obtuvieron indicaron una aparente fase de latencia desde la hora 0 hasta la hora 3, no siendo directamente proporcionales a los recuentos obtenidos durante estas mismas horas. Esto puede explicarse a que la concentración celular a estas horas se encontraba alrededor de 10⁵UFC/ml, concentración que se encontraba por debajo del límite de detección del espectrofotómetro, generando de esta manera una *pseudo* fase de latencia.



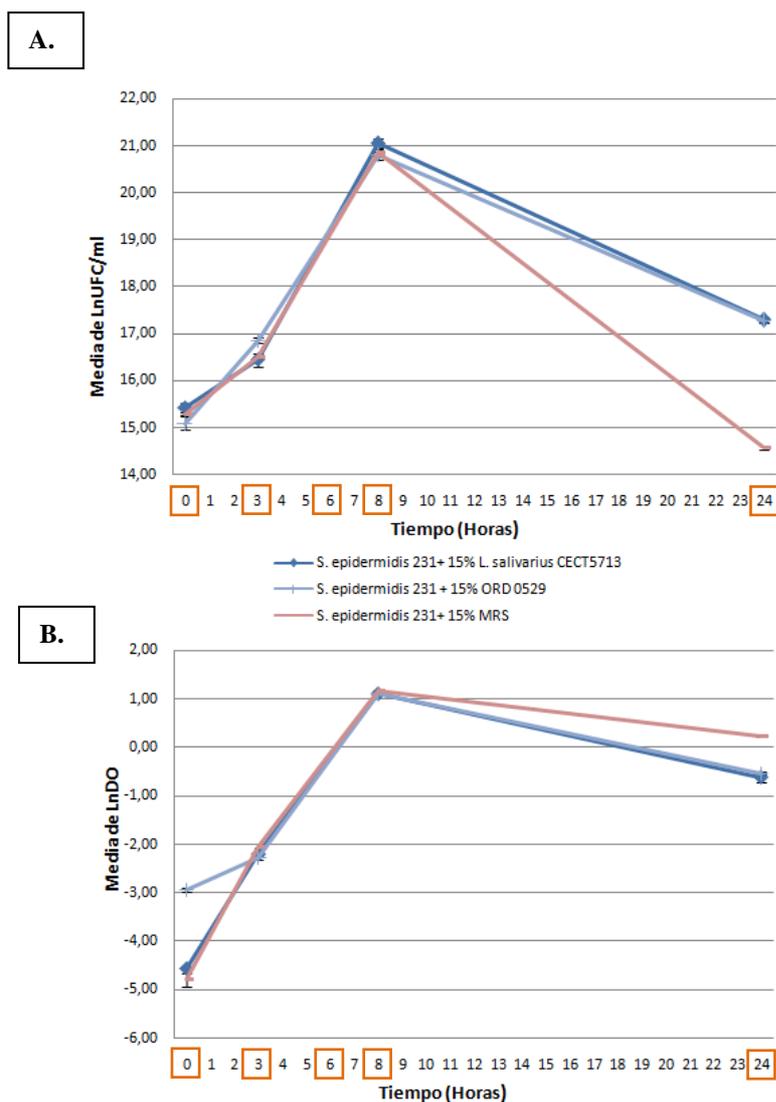
Gráfica 18. A Curvas de crecimiento en UFC de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO₆₀₀ de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

Sin embargo, teniendo en cuenta los trabajos realizados por Martin y *col.* en 2006, donde determinaron que la cepa *L. salivarius* CECT5713 inhibía el crecimiento de este patógeno, se decidió usar esta cepa como control positivo en este ensayo. Asimismo, es importante tener en cuenta que los experimentos llevados a cabo por este grupo, aparte de usar los sobrenadantes sin neutralizar, emplearon un sistema de cribado (técnica de difusión en agar), diferente al sistema usado en este trabajo (técnica de inhibición en cultivo).

Para realizar la actividad antimicrobiana frente a *S. epidermidis* CECT213, se decidió escoger sólo el sobrenadante de la cepa ORD0529 ya que fue la única que mostró actividad frente a *S. aureus* CECT4013, teniendo, incluso, un mejor efecto que el *L. salivarius* CECT5713, considerado el control positivo en estos experimentos.

Los resultados no mostraron ninguna tendencia de efecto ni bacteriostático ni bactericida frente a *S. epidermidis* CECT213 por parte de ningún sobrenadante, ya que los recuentos fueron muy similares a los obtenidos con el patógeno sin adición de sobrenadante (control de crecimiento) (**Gráfica 19A**) y aunque en este caso, las tres curvas mostraron una tendencia de descenso en el recuento y no se observó ningún efecto potenciador de crecimiento ni efecto buffer, como en el caso del *S. aureus* CECT4013, el patógeno tuvo casi un logaritmo menos, comparado con los recuentos obtenidos con los diferentes sobrenadantes. De la misma forma, las medidas de la DO₆₀₀ (**Gráfica 19B**) tuvieron un comportamiento similar al de las UFCs, aunque a la hora 24, la DO₆₀₀ del patógeno fue un poco mayor, esto pudo deberse a que este cultivo al encontrarse en fase de muerte, sus células podrían encontrarse agregadas y ocasionar de esta manera, unas medidas de DO₆₀₀ mayores respecto a las que tenían sobrenadante.

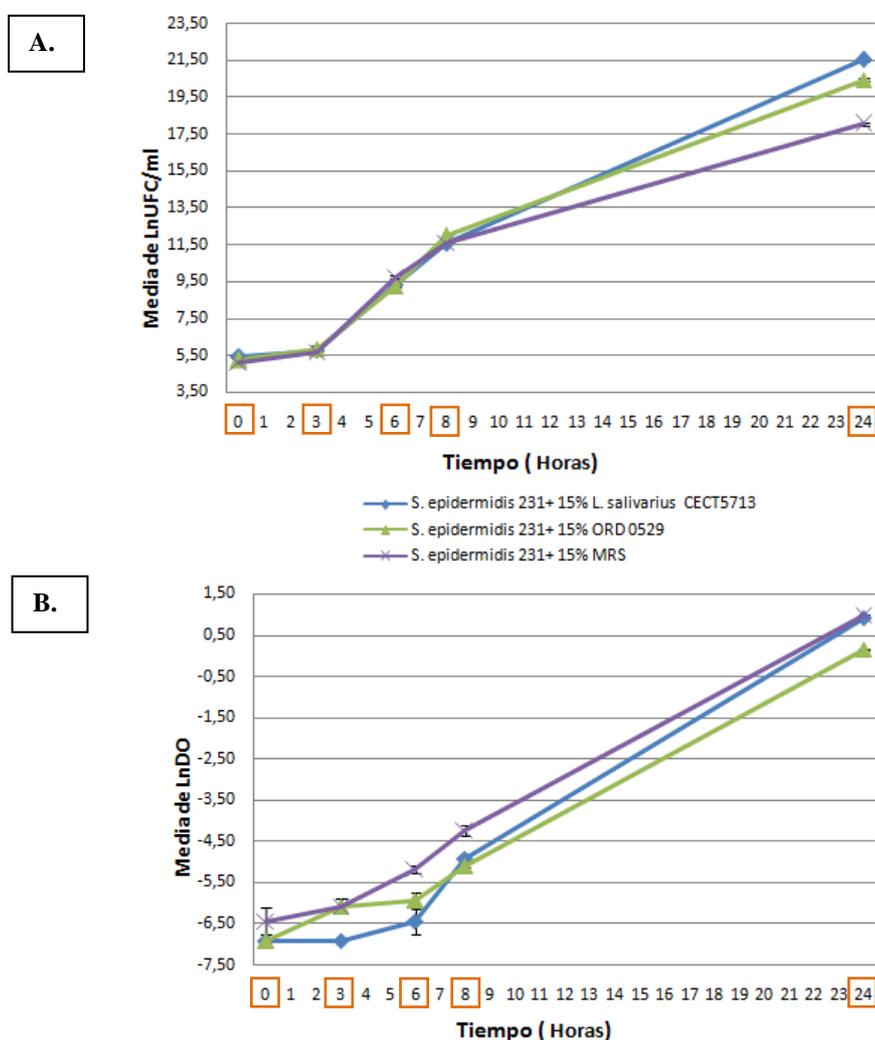
Es importante resaltar, que el grupo de Martin y *col.* en 2006, reportaron actividad antimicrobiana de *L. salivarius* CECT5713 frente a *S. epidermidis* CECT213 empleando sobrenadantes ácidos, sin embargo cuando se emplearon sobrenadantes neutralizados (pH: 6,2), no se observó ningún tipo de efecto. Por lo tanto, no es sorprendente, que en este trabajo tampoco se obtuvieran resultados positivos con *L. salivarius* CECT5713.



Gráfica 19. A. Curvas de crecimiento en UFC de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO₆₀₀ de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

Teniendo en cuenta la medida de las UFC/ml del experimento previ3, se observ3 que el crecimiento de *S. epidermidis* CECT213 era demasiado r3pido, d3nde a las 8 horas de cultivo, la fase exponencial de este pat3geno finalizaba. Por lo tanto, se decidi3 evaluar una concentraci3n m3s baja de pat3geno y de esta manera obtener una mejor curva de crecimiento. De esta manera, se observ3 que todos los cultivos a las 24 tienden a permanecer en fase exponencial y no se evidenci3 ning3n tipo de efecto antimicrobiano frente al pat3geno, ni del control positivo (*L. salivarius* CECT5713) ni de la ORD0529. De hecho, las UFC obtenidas del cultivo sin adici3n de sobrenadante (control de crecimiento) tienden a ser m3s bajas, comparadas con los cultivos que ten3an los

sobrenadantes, llegando a obtenerse recuentos de uno o incluso dos logaritmos más, en el caso de *L. salivarius* CECT5713, comparado con el cultivo sin adición de sobrenadante (control de crecimiento) (**Gráfica 20A**). Respecto a las lecturas de la DO_{600} (**Gráfica 20B**), se observó que la tendencia en las primeras 8 horas de muestreo, las medidas estuvieron alrededor de 0,01 y no fue sino hasta la hora 24 cuando se observó un crecimiento del patógeno. De esta manera, se evidenció que cuando se emplean concentraciones de inóculo muy bajas, la medida de la DO_{600} en estos casos, no es una técnica muy sensible, ya que no detecta la cantidad real de bacterias presentes en el cultivo, comparada con los recuentos de las UFC.

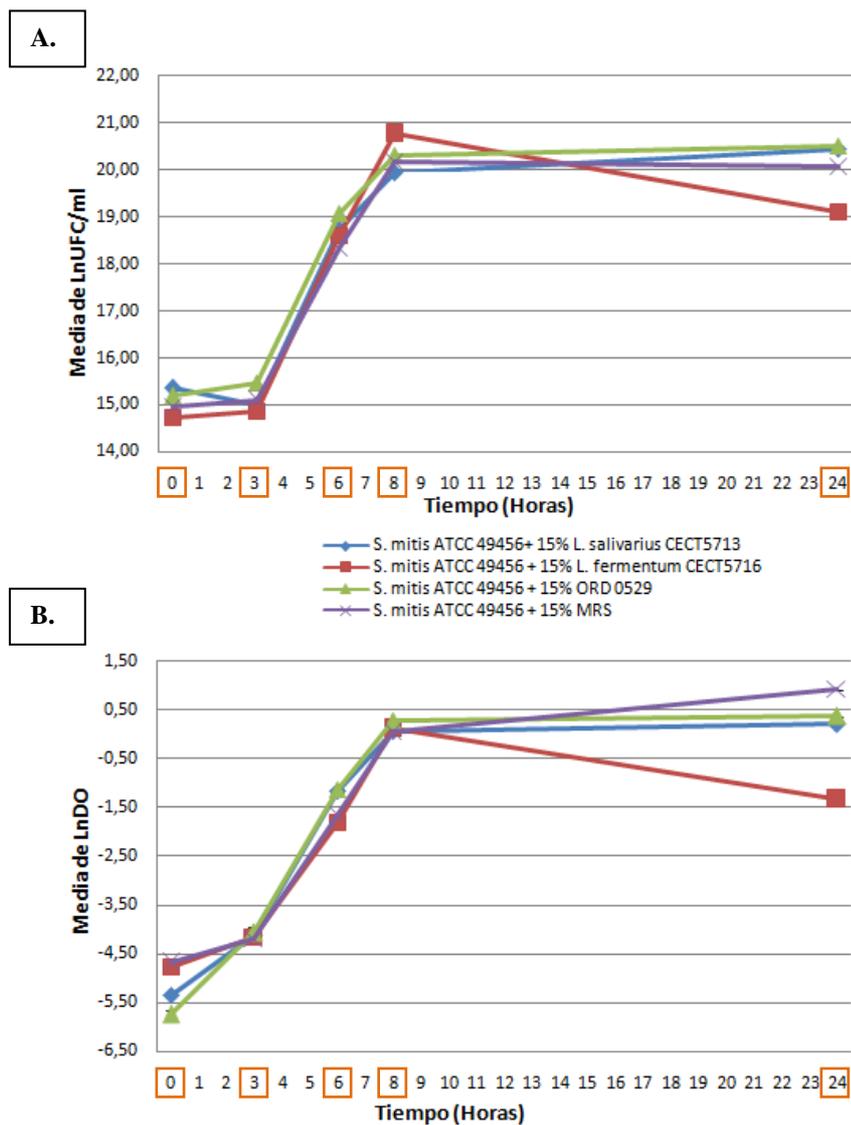


Gráfica 20. A. Curvas de crecimiento en UFC de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO_{600} de *S. epidermidis* CECT231 con sobrenadantes (15%) *L. salivarius* CECT5713 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

4.4.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mitis* ATCC49456.

Teniendo en cuenta que *S. mitis*, también es considerado un microorganismo causante de la mastitis, se decidió evaluar el posible efecto antimicrobiano de los diferentes sobrenadantes sobre este patógeno. En este caso en concreto, se decidió evaluar tanto el sobrenadante de *L. salivarius* CECT5713 como el de *L. fermentum* CECT5716, ya que no existen investigaciones *in vitro* que evidencien algún efecto antimicrobiano por parte de estas dos cepas frente a *S. mitis*, con lo cual no se tenía un control positivo para este ensayo.

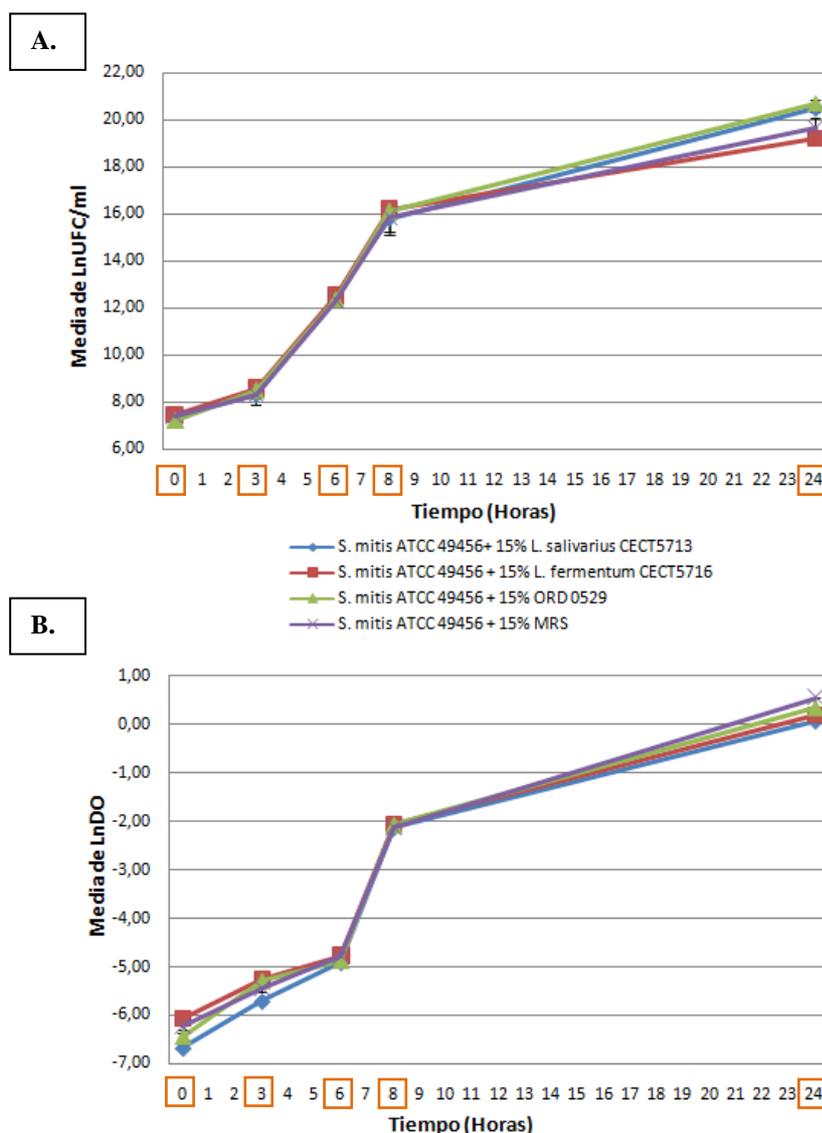
Los resultados de los recuentos (**Gráfica 21A**) mostraron que no hubo efecto antimicrobiano por parte de ninguno de los sobrenadantes, ya que la curva de crecimiento de todas las muestras fue similar entre ellas. Aunque a las 24 horas se observó una leve tendencia de descenso de la muestra con el sobrenadante de *L. fermentum* CECT5716, la disminución de las UFC obtenidas se mantienen dentro del mismo logaritmo. Respecto a las medidas de la DO₆₀₀ (**Gráfica 21B**), las curvas fueron semejantes a las obtenidas con las UFC, incluyendo la hora 24 donde también se observó un ligero descenso de la muestra que contenía el sobrenadante de la cepa *L. fermentum* CECT5716.



Gráfica 21. A. Curvas de crecimiento en UFC de *S. mitis* ATCC49456 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, *L. fermentum* CECT5716 y la ORD 0529. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO_{600} de *S. mitis* ATCC49456 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, *L. fermentum* CECT5716 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

De la misma manera que en los experimentos anteriores, se decidió realizar una curva de crecimiento con una concentración más baja de inóculo inicial de patógeno y de esta manera, observar si teniendo una fase logarítmica más prolongada se conseguía algún tipo de efecto antimicrobiano por parte de los sobrenadantes. De los recuentos de UFC obtenidos (**Gráfica 22A**) no se observó ningún tipo de efecto antimicrobiano de los sobrenadantes respecto al control de crecimiento. Según la gráfica obtenida, aparentemente pasadas las 24 horas, todos los cultivos seguían en fase exponencial, sin embargo este hecho no se puede asegurar debido a que transcurrió un tiempo muy

prolongado de horas (16 horas), con lo cual puede haber empezado una fase estacionaria previa a las 24 horas pero que no fue posible determinarla (**Gráficas 22A**). Respecto a las medidas de la DO (**Gráfica 22B**) se observó que hasta las 8 no fue cuando comenzó la fase logarítmica de los diferentes cultivos, indicando una fase de latencia que no fue correspondiente a las UFC/ml obtenidas. Este comportamiento fue similar a los experimentos anteriores cuando la concentración de inóculo del patógeno era baja (10^2 - 10^3 UFC/ml). Sin embargo, teniendo en cuenta las medidas de la DO_{600} tampoco se observó algún tipo de efecto antimicrobiano por parte de los sobrenadantes.



Gráfica 22. A. Curvas de crecimiento en UFC de *S. mitis* ATCC49456 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, *L. fermentum* CECT5716 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de UFC/ml de 8 placas \pm SD. **B.** Curvas de crecimiento en DO_{600} de *S. mitis* ATCC49456 con sobrenadantes (15%) de *L. salivarius* CECT5713, *L. fermentum* CECT5716 y la ORD0529. Los resultados se expresan como la media del ln de tres lecturas \pm SD. Los tiempos de muestreo que se analizaron se simbolizan con un recuadro naranja.

Aunque no se obtuvo ningún resultado positivo de los sobrenadantes, que retrasara o inhibiera el crecimiento de *S. epidermidis* CECT231 y *S. mitis* ATCC49456, es importante tener en cuenta, que la actividad antimicrobiana que pueden tener diferentes cepas, es un proceso multifactorial, en el que están involucrados, no solo la producción de ácidos orgánicos, H₂O₂ y bacteriocinas, sino también mecanismos de exclusión competitiva de receptores o nutrientes (Olivares *et al.*, 2006)(Martín *et al.*, 2005). Se ha descrito que el consumo de cepas probióticas durante la última etapa del embarazo y/o la lactancia incrementan la concentración de inmunoglobulina A (IgA) y del transforming growth factor (TGF-β₂) en la leche materna, lo cual puede controlar el crecimiento local de bacterias causantes de la mastitis al tiempo que limita su capacidad de acceder o estropear el epitelio mamario (Nikniaz *et al.*, 2013). Asimismo, la exclusión competitiva local y la producción de sustancias antimicrobianas, también podrían explicar el control que tienen ciertos lactobacilos hacia las bacterias causantes de la mastitis. Este hecho, implicaría que una cepa de *Lactobacillus* debería ser capaz de alcanzar la glándula mamaria al momento de la ingestión, hecho que ya se ha evidenciado mediante la existencia de la ruta entero-mamaria, permitiendo una transferencia bacteriana del intestino materno a la glándula mamaria (Fernández *et al.*, 2016).

Por otro lado, la actividad antimicrobiana más importante y mejor caracterizada en las BAL es la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y acético en cepas de lactobacilos, y su efecto inhibitorio es causado principalmente por la forma no disociada de la molécula, que se difunde a través de la membrana celular hacia el citosol, que es más alcalino e interfiere en las funciones metabólicas esenciales celulares. Los efectos tóxicos del ácido láctico y acético incluyen la reducción del pH intracelular y la disipación del potencial de membrana. Mientras que la actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno ha sido atribuido al fuerte efecto oxidativo que ocasiona en la célula bacteriana y a la destrucción de las estructuras moleculares básicas de las proteínas celulares (Šušković *et al.*, 2010) (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012).

4.4.3. Determinación de la producción de GABA (ácido gamma-aminobutírico) de las cepas seleccionadas.

4.4.3.1. Detección de la presencia de la enzima GAD (Glutamato descarboxilasa).

La biosíntesis de GABA es una reacción en una etapa que implica la descarboxilación de glutamato de sodio a GABA que es catalizada por la enzima GAD, jugando esta conversión un papel importante en varias funciones del cerebro (Dhakal *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que esta enzima es clave para la producción de GABA, se realizó una prueba cualitativa para determinar las cepas pertenecientes al cepario de Laboratorios Ordesa, que tuvieran la presencia de la enzima GAD. Para ello, el reactivo usado para desarrollar esta prueba contenía como sustrato, Monoglutamato de Sodio (MGS) en una solución hipertónica, compuesta de Cloruro de Sodio y EDTA, que actúan como agentes líticos desestabilizando la membrana plasmática y facilitando el contenido plasmático. De esta manera, si la cepa tenía la enzima GAD, esta sería inducida por el MGS, con lo cual se produciría GABA que sería liberado al medio al causarse la lisis, produciendo un cambio de color en el indicador de pH, en este caso verde de bromocresol, de amarillo a azul.

Los resultados de esta prueba se clasificaron de acuerdo a la intensidad del desarrollo de color, comparado con el control positivo empleado, que en este caso fue el patógeno *E. coli* ATCC25923: + (azul ligero, menor al control positivo), ++ (intensidad de azul igual que el control positivo) y +++ (azul intenso, mayor que el control positivo). En total, se evaluaron 320 cepas, de las cuales 16 fueron positivas para esta enzima (**Tabla 18**). Los resultados positivos obtenidos, se confirmaron mediante la repetición de la prueba y fueron consistentes.

La enzima GAD está presente en una amplia variedad de organismos de todos los reinos. En mamíferos, el glutamato es el principal excitador y el GABA el principal neurotransmisor inhibitorio, y su conversión de una a otra por la enzima GAD, juega un papel importante en diversas funciones cerebrales. Sin embargo en plantas y microorganismos parece tener otros roles. En plantas, el sistema GAD se expresa en respuesta a una variedad de condiciones de estrés como un shock de temperatura, hipoxia o incremento de los niveles de Ca^{2+} . Mientras que en microorganismos, este sistema parece tener una función diferente a la de los vertebrados y estaría relacionada con la capacidad de conferir resistencia a la bacteria frente a condiciones ácidas. El

sistema GAD ha sido descrito como el mecanismo más importante en la alta resistencia a condiciones ácidas que tiene *E. coli*. Además, esta propiedad se puede considerar como un factor de virulencia o probiótico, ya que permite que patógenos o bacterias probióticas, respectivamente, puedan resistir las condiciones de pH extremadamente bajas, presentes en el estómago (Feehily & Karatzas, 2013) y sobrevivir al paso por el GIT. Se ha descrito que esta descarboxilasa en presencia del correspondiente aminoácido (ácido glutámico), es expresada durante la fase estacionaria de crecimiento y tras la acidificación del medio de crecimiento. Por lo tanto, se ha propuesto que la función biológica de esta enzima reside en un "mecanismo de neutralización desarrollado por la célula como un método para estabilizar el entorno interno frente a los cambios desfavorables en el entorno externo" (Gale, 2006). Asimismo, se ha descrito que ciertas condiciones ambientales, tales como, acidez, estrés osmótico o agotamiento de nutrientes, inducen la expresión de la enzima GAD en: cepas iniciadoras lácticas de *L. lactis*, *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*; cepas lácticas no iniciadoras como *L. brevis*, *L. paracasei* y *L. plantarum*, así como lactobacilos aislados del tracto gastrointestinal humano y animal (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Cepa	Especie	Fuente de aislamiento	GAD
ORD0026	<i>B. angulatum</i>	Heces maternas	+++
ORD0410	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+++
ORD0106	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	++
ORD0119	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	++
ORD0208	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	++
ORD0459	<i>B. adolescentis</i>	Heces de bebé	++
ORD0465	<i>B. adolescentis</i>	Heces de bebé	++
ORD0010	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0109	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0210	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0216	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0227	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0360	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0368	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0378	<i>B. adolescentis</i>	Heces maternas	+
ORD0458	<i>B. adolescentis</i>	Heces de bebé	+

Tabla 18. Resultados de la prueba de detección de la enzima GAD. + (azul ligero, inferior al control positivo), ++ (intensidad de azul igual que el control positivo), +++ (azul intenso, mayor que el control positivo)

4.4.3.2. Determinación de la producción de GABA (ácido gamma-aminobutírico).

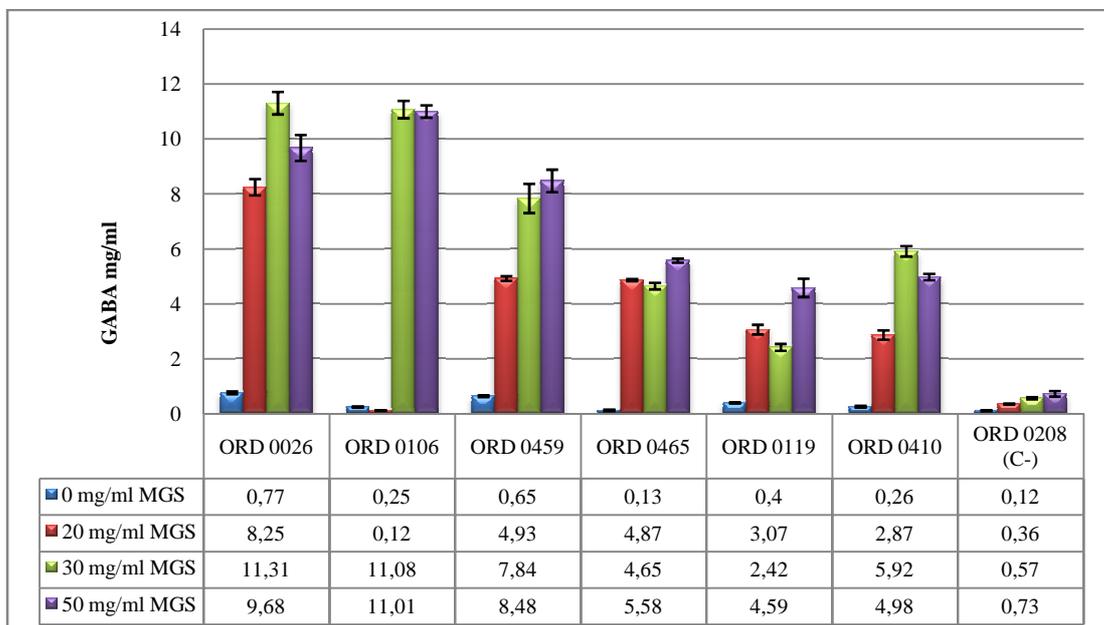
De las 16 cepas positivas para la enzima GAD, se decidió evaluar sólo las cepas que dieron un resultado igual o mayor que el control positivo (7 cepas), en referencia al desarrollo de color obtenido.

Teniendo en cuenta que el GABA es sintetizado por la acción de la enzima GAD que cataliza la α -descarboxilación del L-glutamato o sus sales tales, como Monoglutamato de Sodio (MGS), se decidió realizar el crecimiento de las cepas seleccionadas durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de MGS (0, 20, 30 y 50 mg/ml) y posteriormente determinar la concentración de GABA producida. Debido a que las cepas seleccionadas pertenecían al género *Bifidobacterium*, y que su fase logarítmica finaliza alrededor de las 48 h, se estableció incubar 24 horas más (hasta las 72 horas) los cultivos, generando de esta manera unas condiciones de estrés para la bacteria que facilitarían que la enzima GAD se expresara, con una posterior producción de GABA a partir del MGS presente en el medio.

En un primer análisis, se determinó tanto la concentración de GABA producida, como la del ácido glutámico que no fue consumido por la bacteria (**Gráficas 23 y 24**). De acuerdo a los valores obtenidos, se observó que la tendencia de las concentraciones de ácido glutámico y GABA eran inversamente proporcionales, es decir, el ácido glutámico presente en el medio disminuía a medida que era convertido en GABA y este aumentaba. Se ha descrito que existe un sistema GAD intracelular, compuesto por la enzima GAD y el antiporter glutamato:GABA, responsable de la producción de GABA en bacterias. El glutamato es importado dentro de la célula por el antiporter, luego es descarboxilado por la enzima intracelular GAD para producir GABA y posteriormente, el GABA es exportado de la célula via antiporter (Li *et al.*, 2013). Se cree que el efecto protector del sistema GAD surge a través del consumo de un protón que se produce durante la reacción de descarboxilación del glutamato, lo que ayuda a mantener el pH del citoplasma cuando disminuye el pH externo. A pH neutro, la enzima GAD está localizada en el citoplasma, mientras que a condiciones ácidas se sitúa en la membrana, donde es capaz de trabajar de forma sinérgica con el antiporter glutamato:GABA (Karatzas *et al.*, 2010). En las BAL y bifidobacterias el gen que codifica para la enzima GAD es el *gadB* y el que codifica para el antiporter glutamato:GABA es el *gadC*

(Yunes *et al.*, 2016). Este operón es regulado por la proteína GadR, codificada por *gadR*, que reconoce la presencia de glutamato e induce la expresión de los genes *gadBC* (Li *et al.*, 2013).

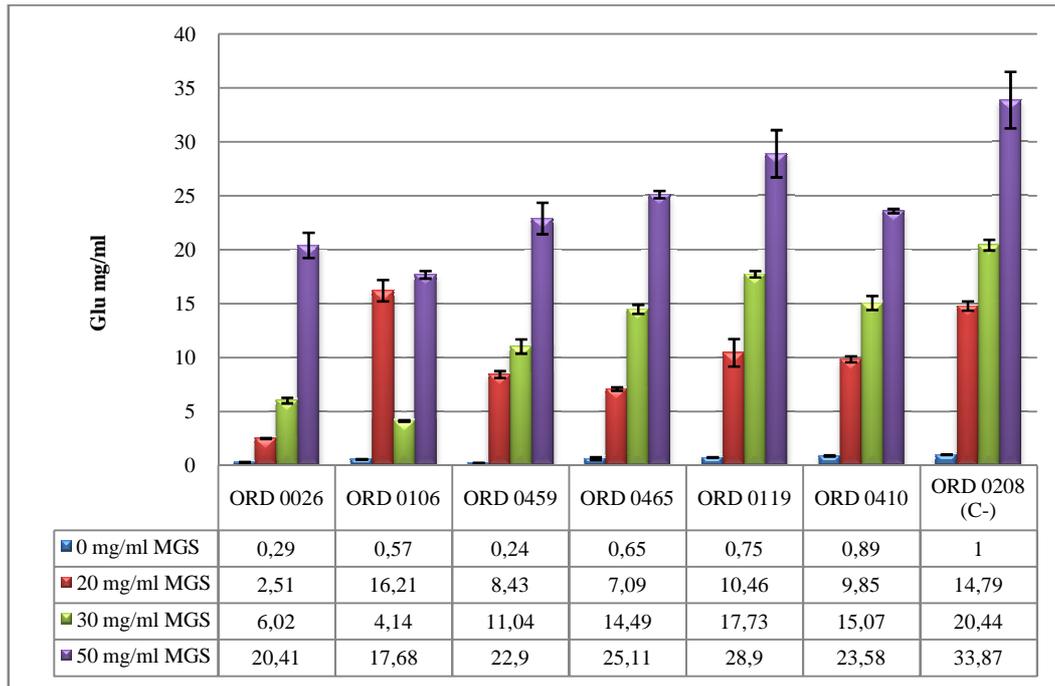
Respecto a la concentración de GABA producida por las diferentes cepas seleccionadas, los datos obtenidos mostraron que en ausencia de MGS, las cepas tienden a producir una mínima cantidad de GABA, pero al aumentar la concentración de MGS, aunque no en todos los casos, el aumento fue directamente proporcional a la cantidad de GABA producida, evidenciando de manera indirecta, que en este caso no existe una represión por sustrato.



Gráfica 23. Concentración de GABA de las cepas seleccionadas a partir de las diferentes concentraciones de MGS. Los datos se expresan como la media de tres lecturas \pm SD.

Por otro lado, la cepa ORD0208 (*B. adolescentis*) a pesar de tener la enzima GAD, no mostró una capacidad aparente para sintetizar GABA, hecho similar al que reportó Yunes y *col.* en 2016, quienes identificaron ciertas cepas de *L. fermentum* que tenían el sistema GAD mediante la amplificación del gen *gadB*, pero no detectaron síntesis de GABA. La explicación a esto, puede deberse a que el sistema GAD que poseen algunas cepas, tiene una mutación/delección en el gen *gadC* que codifica el antiporter glutamato: ácido gamma-aminobutírico, responsable de exportar el GABA de las células bacterianas (Yunes *et al.*, 2016). En nuestro estudio, se consideró a la cepa ORD0208, como un control negativo, respecto a la producción de GABA, al no ser capaz de

exportarlo y por tanto no poder ser detectado en el sobrenadante, que en este caso, fue el que se usó para determinar las concentraciones de GABA producidas por las diferentes bacterias seleccionadas. Sin embargo, se observó para esta cepa (ORD0208), que las concentraciones de ácido glutámico eran mucho mayores, comparado con los valores obtenidos por las otras cepas, indicando de alguna manera que dicha cepa no es una buena productora de GABA, independientemente que no sea capaz de exportar el GABA al medio extracelular, ya que su consumo de MGS es muy bajo.

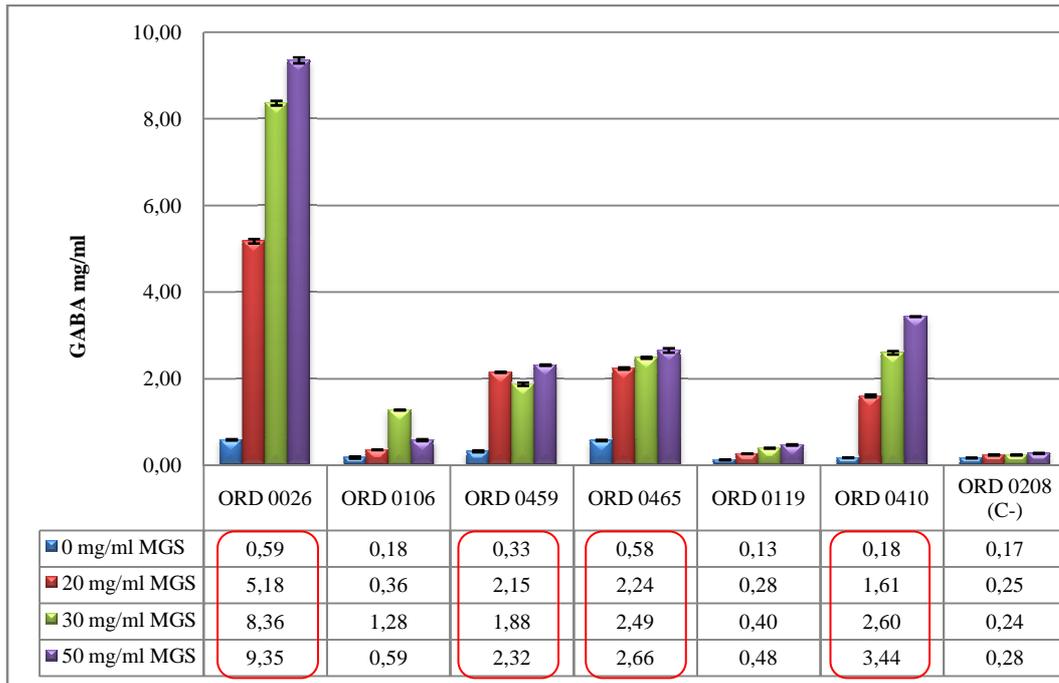


Gráfica 24. Concentración de ácido glutámico de las cepas seleccionadas a partir de las diferentes concentraciones de MGS. Los datos se expresan como la media de tres lecturas \pm SD.

A pesar de que se detectó que las cepas eran capaces de utilizar el MGS para producir GABA, los resultados obtenidos fueron un tanto erráticos debido a la metodología usada para hacer las diluciones de los sobrenadantes testados, ya que para alcanzar la dilución requerida (1/10000) se realizaron diluciones 1/100. Por tanto, se decidió realizar un segundo experimento, analizando los sobrenadantes de las mismas cepas probióticas testadas en el ensayo anterior, pero modificando la metodología de dilución (diluciones seriadas 1/10) hasta alcanzar la dilución requerida (1/10000).

En los resultados obtenidos en este segundo experimento, se observó de nuevo una tendencia inversamente proporcional entre las concentraciones de GABA y MGS, excepto en las cepas ORD0106 y ORD0459 para la concentración de MGS de 30mg/ml, de hecho, las concentraciones de GABA que se obtuvieron fueron más bajas que en el

experimento anterior, evidenciando que la metódica de dilución utilizada, permite la obtención de unos resultados más fiables, con un claro efecto dosis/respuesta, algo menos obvio en el primer experimento. Por otro lado, se observó que el control negativo, en este caso la cepa ORD0208, se mantuvo con unos valores mínimos de producción de GABA, siendo iguales y de hecho en algunos casos, más bajos que los obtenidos en el ensayo anterior (**Gráfica 25**).



Gráfica 25. Concentración de GABA de las cepas seleccionadas a partir de las diferentes concentraciones de MGS. Los datos se expresan como la media de tres lecturas \pm SD.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las mejores cepas productoras de GABA fueron la ORD0459, 0465 y 0410 (siendo todas *B. adolescentis*), aunque la cepa ORD0410 es la que a mayor concentración de MGS, mayor cantidad de GABA produjo (3.44 mg/ml); sin embargo, la ORD0026 (*B. angulatum*) fue con diferencia la mayor productora de GABA, produciendo más del doble de lo producido por cualquiera de las cepas evaluadas en este estudio. Comportamientos similares a los obtenidos en este estudio, fueron reportados en trabajos realizados por el grupo de Barret *et al.*, en 2012, quienes evaluaron la capacidad de producción de GABA de ciertas BAL en presencia de diferentes concentraciones de MGS, entre ellas cepas del género *Bifidobacterium* aisladas del GIT y observaron que en algunas de las cepas evaluadas, la producción de GABA no aumentaba a medida que se aumentaba la concentración de MGS en el

medio. Sin embargo, las concentraciones de GABA que se obtuvieron en nuestro estudio con la cepa ORD0026 (*B. angulatum*), *a priori*, son mayores en algunos casos, comparado con los obtenidos por las cepas del grupo de Barret *y col.* en 2012.

Teniendo en cuenta que de las 7 cepas productoras de GABA, 6 de ellas pertenecían a la especie *B. adolescentis*, se realizó un perfil comparativo de los RAPDs obtenidos, para de esta manera, determinar la similitud de los patrones de bandas que existía entre las diferentes cepas (**Fig. 43**). Se observó que la cepa ORD410 (carril 1), que fue la mayor productora de GABA dentro de los *B. adolescentis* evaluados, tenía un perfil de bandas completamente diferente al resto de las cepas, resultado coherente ya que esta cepa fue aislada de heces maternas (M4). En cuanto a las cepas ORD0106 y ORD0119 (carriles 2 y 3, respectivamente) mostraron unos perfiles más parecidos entre ellas (recuadro violeta), hecho que no es sorprendente, ya que fueron cepas aisladas de la misma muestra de heces maternas (M1), caso contrario sucedió con la cepa ORD0208 (carril 4), que a pesar de tener el mismo origen que las cepas ORD0106 y ORD0119, su perfil de bandas fue totalmente diferente, hecho que también se vio reflejado en las bajas concentraciones de GABA producidas por esta cepa. Por último, las cepas ORD459 y ORD465 (carriles 5 y 6, respectivamente), a pesar de haber sido aisladas de la misma muestra de heces de bebé (B5) mostraron un patrón de bandas diferentes, a pesar de producir concentraciones de GABA similares.

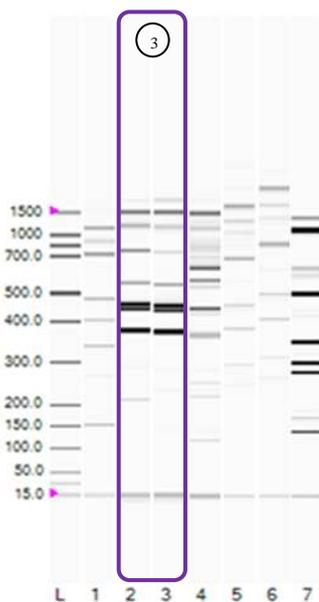
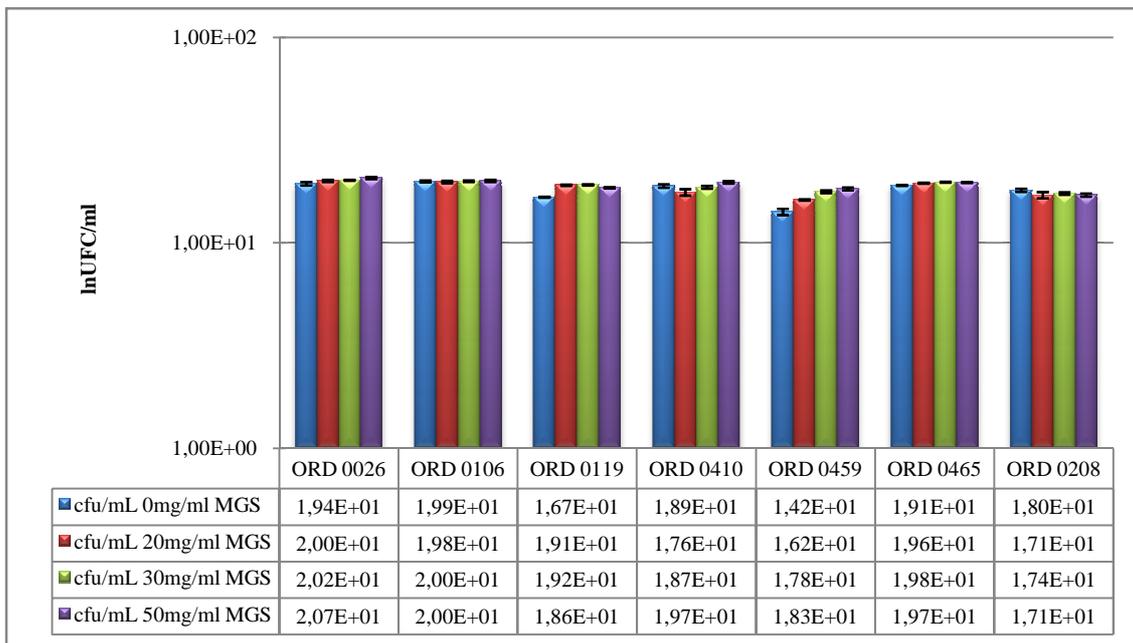


Figura 43. RAPDs comparativos de las 7 cepas seleccionadas para el screening de producción de GABA. L: marcador 1,5 Kb 1: ORD0410. 2: ORD0106. 3: ORD0119. 4: ORD0208. 5: ORD0459. 6: ORD0465. 7: ORD0026. Las cepas de los carriles 1 al 6 corresponden a cepas de *B. adolescentis* y el carril 7 corresponde a la cepa *B. angulatum*.

Finalmente, se realizó un recuento de las UFCs obtenidas al finalizar las 72 horas de incubación, para así determinar si las diferentes concentraciones de MGS afectaban o no

el crecimiento de las cepas. En general se observó que todas las cepas alcanzaron una concentración de $10^7 - 10^8$ UFC /ml, confirmando de alguna manera que las 24 horas de incubación adicionales, lograron someter las cepas a una condición de acidez y estrés, permitiendo expresar la enzima GAD para la posterior producción de GABA y asimismo, las diferentes concentraciones de MGS no afectaron el crecimiento de las cepas (**Gráfica 26**). En trabajos realizados por el grupo de Yunes y *col.* en 2016, la producción máxima de GABA se alcanzó pasadas las 72 y 48 h de incubación, para lactobacilos y bifidobacterias respectivamente, períodos correspondientes a las fases estacionaria y muerte celular, por lo que plantean la hipótesis de que el aumento de la concentración de GABA se produce a lo largo del crecimiento celular y se debe a su acumulación en el medio o a la expresión tardía del gen *gadB*.

Asimismo, trabajos recientes llevados a cabo por Renes y *col.* en 2017 han comprobado que existe un incremento significativo, respecto a la producción de GABA, en cepas de *Lactobacillus* que son incubadas 24 y 72 horas. Por lo tanto, diferentes factores, entre ellos el tiempo de incubación, pueden afectar la síntesis de GABA (Dhakal *et al.*, 2012).



Gráfica 26. Recuentos de las cepas seleccionadas productoras de GABA finalizado el tiempo de incubación en las diferentes concentraciones de MGS (72h). Los datos se expresan como la media de la siembra de cuatro placas de agar \pm SD.

En trabajos anteriores, Ventura y *col.* en 2009 reportaron que *Bifidobacterium dentium* poseía el sistema GAD, mientras que las demás cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* no lo tenían, de acuerdo a los genomas de las cepas de estas especies que habían sido descritos hasta el momento. Pero tanto los resultados obtenidos en este

trabajo como los reportados por Yunes y *col.* en 2016, han demostrado que existen cepas del género *Bifidobacterium*, diferentes de *B. dentium*, concretamente *B. adolescentis* y *B. angulatum*, capaces de sintetizar GABA (Dyachkova *et al.*, 2015) (Yunes *et al.*, 2016). Presuntamente nuestras cepas poseen el sistema GAD, así como los genes *gadB* y *gadC*, necesarios para la síntesis y exportación de GABA en las bacterias, a falta de una demostración genética de la presencia de estos genes. Asimismo, este estudio ha demostrado que la producción de GABA es cepa dependiente, y por tanto no se puede generalizar a la especie.

5. CONCLUSIONES

- Se han aislado, identificado y caracterizado bacterias con propiedades probióticas a partir de muestras de leche materna, heces maternas y heces de bebé, que han permitido crear una colección de cepas probióticas, propiedad de Laboratorios ORDESA S.L.
- Se han aislado un total de 288 cepas, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con posible actividad probiótica, donde la especie mayoritariamente aislada en heces de madre lactante y leche materna ha sido *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* y en heces de bebé, *Bifidobacterium bifidum*.
- La realización de las pruebas bioquímicas API 50CH y API ZYM han permitido determinar los patrones de fermentación y las actividades enzimáticas características de las cepas aisladas, evidenciando que algunas de las especies como *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* y *Bifidobacterium breve* son claros ejemplos de la adaptación intrínseca al GIT de este tipo de bacterias.
- La caracterización genotípica utilizando la técnica RAPD y la secuenciación de un fragmento del gen 16s rARN de las cepas probióticas aisladas, han permitido valorar la biodiversidad encontrada dentro de las muestras empleadas, permitiendo diferenciar cepas probióticas dentro de una misma especie, mediante la utilización conjunta de árboles filogenéticos basados en la secuencia del gen 16s rARN y los patrones de bandas obtenidos mediante el uso de la técnica RAPD. Este análisis de la biodiversidad ha permitido también, establecer las diferencias de las cepas aisladas con cepas ya disponibles en el mercado.
- Se han identificado 10 cepas (*B. longum* subsp. *longum* ORD0084, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ORD0105, *B. breve* ORD0123, *B. breve* ORD0124, *B. breve* ORD0128, *B. breve* ORD0134, *B. breve* ORD0138, *B. breve* ORD0294, *Bifidobacterium bifidum* ORD0202 y *Lactobacillus oris* ORD0255) capaces de crecer en presencia de ácido linoléico (LA) y ácido linolénico (LNA) y producir los respectivos ácidos grasos conjugados: (ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido linolénico conjugado (CLNA)) en tres medios diferentes (caldo MRS, leche desnatada reconstituida (RSM) y fórmula

infantil Blemil Plus Forte-1). Los resultados mostraron que la producción de CLA y CLNA es especie y cepa-dependiente.

- El método utilizado para el cribado de cepas productoras de CLA y CLNA ha resultado apropiado y ha permitido desarrollar y patentar un método de producción de CLNA (isómero *cis9 trans11 cis15*) a partir de LNA con altas tasas de conversión (Patente: WO 2014/096352 A2).
- El método de cribado utilizado en el presente trabajo para detectar la inhibición de crecimiento de diferentes patógenos ha permitido identificar que la cepa de *L. gasseri* ORD0529 es capaz de inhibir el crecimiento del patógeno *Staphylococcus aureus* CECT4013, uno de los microorganismos causante de la mastitis en la lactancia.
- Se han encontrado 7 cepas productoras de GABA, todas ellas pertenecientes al género *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium angulatum* ORD0026, *Bifidobacterium adolescentis* ORD0106, *B. adolescentis* ORD0119, *B. adolescentis* ORD0208, *B. adolescentis* ORD0410, *B. adolescentis* ORD0459 y *B. adolescentis* ORD0465). *Bifidobacterium angulatum* ORD0026, es la cepa que con diferencia produce mayores concentraciones de GABA, comparada con las otras cepas productoras. Las cantidades de GABA producidas sustentan la posibilidad de utilizar esta cepa para el desarrollo de un complemento alimenticio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abd El-Salam, M. H., El-Shafei, K., Sharaf, O. M., Effat, B. A., Asem, F. M., & El-Aasar, M. (2010). Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability to synthesis conjugated linoleic acid. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00541.x>
- Abildgaard, A., Elfving, B., Hokland, M., Wegener, G., & Lund, S. (2017). Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.02.014>
- Abrahamsson, T. R., Wu, R. Y., & Jenmalm, M. C. (2015). Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatric Research*, 77(1–2), 214–219. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.165>
- Alarcón, P., González, M., & Castro, É. (2016, July). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Revista Médica de Chile*. Sociedad Médica de Santiago. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000700013>
- Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146(6), 1564–1572. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.058>
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S., & Vogel, R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>
- Amaretti, A., Tamburini, E., Bernardi, T., Pompei, A., Zanoni, S., Vaccari, G., ... Rossi, M. (2006). Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: Compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 654–662. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0500-9>
- Andrade, J. C., Ascensão, K., Gullón, P., Henriques, S. M. S., Pinto, J. M. S., Rocha-Santos, T. A. P., ... Gomes, A. M. (2012). Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 467–481. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00871.x>
- Angelopoulou, A., Field, D., Ryan, C. A., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2018). The microbiology and treatment of human mastitis. *Medical Microbiology and Immunology*, 1. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0532-z>

- Arnold, I. C., Dehzad, N., Reuter, S., Martin, H., Becher, B., Taube, C., & Müller, A. (2011). Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest*, *121*(8), 3088–3093. <https://doi.org/10.1172/JCI45041DS1>
- Arrieta, M., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology*, *5*(September), 427. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin.Infect.Dis.*, *50*(1537–6591 (Electronic)), 1551–1558. <https://doi.org/10.1086/652763>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... Poulain, J. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Atienzar, F. A., & Jha, A. N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research*, *613*(2–3), 76–102. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2006.06.001>
- Avall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(3 SPEC. ISS.), 511–529. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.003>
- Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Yong, J. G., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R. B., Pfeiler, E. A., ... Klaenhammer, T. R. (2008). Analysis of the genome sequence of Lactobacillus gasseri ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 74, pp. 4610–4625). <https://doi.org/10.1128/AEM.00054-08>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5717), 1915–20. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Baffoni, L., Stenico, V., Strahsburger, E., Gaggia, F., Di Gioia, D., Modesto, M., ... Biavati, B. (2013). Identification of species belonging to the Bifidobacterium genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. *BMC Microbiology*, *13*(1), 149. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-149>
- Bager, P., Wohlfahrt, J., & Westergaard, T. (2008). Caesarean delivery and risk of atopy

- and allergic disease: Meta-analyses. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(4), 634–642. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x>
- Balamurugan, R., George, G., Kabeerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A. M., & Ramakrishna, B. S. (2010). Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br J Nutr*, 103(3), 335–338. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992182>
- Barrett, E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007). Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2333–2337. <https://doi.org/10.1128/AEM.01855-06>
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). Gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85–93. <https://doi.org/10.1038/nature18849>
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V., & Allaker, R. P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(5), 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x>
- Beerens, H. (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 11(3), 155–157. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00148.x>
- Belury, M. A. (2002a). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 505–31. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842>
- Belury, M. A. (2002b). Recent Advances in Nutritional Sciences Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid : Potential Mechanisms of Action 1. *Recent Advances in Nutritional Sciences*, (July), 2995–2998.
- Bengmark, S. (2013). Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.002>
- Bercik, P., Collins, S. M., & Verdu, E. F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology and Motility*. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2982.2012.01906.x

- Bergey, D. H. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag New York Inc. <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Bergmann, H., Rodríguez, J. M., Salminen, S., & Szajewska, H. (2014). Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *British Journal of Nutrition*, *112*(7), 1119–1128. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001949>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.009>
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., & Bottazzi, V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, *50*, 117–131. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.583.7996&rep=rep1&type=pdf>
- Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *36*(6), 775–780. <https://doi.org/10.1086/368080>
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2014). Specificity of infant digestive conditions: some clues for developing relevant in vitro models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(11), 1427–57. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.640757>
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (1997). The metabolims and Functions of gamma-Aminobutyric Acid. *Plant Physiology*, *115*, 1–5.
- Bruewer, M., Samarin, S., & Nusrat, A. (2006). Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1072, pp. 242–252). BioMed Central. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.017>
- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., & Klaenhammer, T. R. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 71(12), 8344–8351.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005>
- Burgess, C. M., Smid, E. J., & van Sinderen, D. (2009, July). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012>
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., & Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(3), 544–551. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P., & Spano, G. (2012, December 24). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4440-2>
- Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., & Ringel, Y. (2012). Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>
- Castro-Gómez, P., Fontecha, J., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2014). A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*, 128, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.051>
- Castro, A., González, M., Tarín, J. J., & Cano, A. (2015). Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 26–29. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8704>
- Castro, L. Á., & Rovetto, C. de. (2006). Probiotics: clinical perspectives. *Colombia Médica*, 37(4), 308–314.
- Centanni, M. (2012). *Bifidobacterium - Human Host Interaction : Role of Human Plasminogen*. Retrieved from http://amsdottorato.unibo.it/4677/1/Centanni_Manuela_tesi.pdf
- Cerdó, T., Ruíz, A., Suárez, A., & Campoy, C. (2017). Probiotic, Prebiotic, and Brain Development. *Nutrients*, 9(11), 1247. <https://doi.org/10.3390/nu9111247>
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of gamma-aminobutyric

- acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104–109.
- Chu, D., Prince, A., Ma, J., Baquero, K., Blundell, P., Takahashi, D., ... Aagaard, K. (2017). Evidence of fetal microbiota and its maternal origins in a non-human primate model. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 216, S80–S80. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.1004>
- Churrua, I., Fernández-Quintela, A., & Portillo, M. P. (2009). Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects. *BioFactors*, 35(1), 105–111. <https://doi.org/10.1002/biof.13>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., ... O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Suppl. 1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Coakley, M., Banni, S., Johnson, M. C., Mills, S., Devery, R., Fitzgerald, G., ... Stanton, C. (2009). Inhibitory effect of conjugated α -linolenic acid from bifidobacteria of intestinal origin on SW480 cancer cells. *Lipids*, 44(3), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3269-z>
- Coakley, M., Johnson, M. C., Mcgrath, E., Rahman, S., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., ... Produce, T. (2006). Intestinal Bifidobacteria That Produce trans-9 , trans-11 Conjugated Linoleic Acid : A Fatty Acid With Antiproliferative Activity Against Human Colon SW480 and HT-29 Cancer Cells Intestinal Bifidobacteria That Produce trans -9 , trans -11 Conjugated Linol. *Nutrition and Cancer*, 56(December 2014), 95–102. <https://doi.org/10.1207/s15327914nc5601>
- Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., & Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 138–145. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01814.x>
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the

- role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672–2678. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2672>
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735–742. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>
- Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., & Cresci, A. (2014). In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 and SYN BIO against pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.12544>
- Conlon, M. A., & Bird, A. R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., ... Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 99–118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology*, 40(2), 465–475. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02398.x>
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., & Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 199–210. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90119-8)
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019>
- Cryan, J. F. (2016). Stress and the microbiota-gut-brain axis: An evolving concept in psychiatry. *Canadian Journal of Psychiatry*, 61(4), 201–203. <https://doi.org/10.1177/0706743716635538>
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2015). More than a Gut Feeling: the Microbiota Regulates Neurodevelopment and Behavior. *Neuropsychopharmacology*, 40(1), 241–242. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.224>
- Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: From bowel to behavior. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(3), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x>

- Da Silva, K. (2014). Microbiota: Dysbiosis as a diagnostic. *Nature Medicine*, 20(4), 348–348. <https://doi.org/10.1038/nm.3535>
- de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C. R., & Sant'Ana, A. de S. (2015, May 21). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6582-5>
- De Palma, G., Collins, S. M., Bercik, P., & Verdu, E. F. (2014). The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? *The Journal of Physiology*, 592(Pt 14), 2989–97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273995>
- De Palma, G., Nadal, I., Medina, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2010). Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiology*, 10(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-63>
- de Sousa Moraes, L. F., Grzeskowiak, L. M., de Sales Teixeira, T. F., & do Carmo Gouveia Peluzio, M. (2014). Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 482–489. <https://doi.org/10.1128/CMR.00106-13>
- de Vries, W., & Stouthamer, A. H. (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93(2), 574–576.
- de Vries, W., & Stouthamer, A. H. (1968). Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol, and xylose by bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 96(2), 472–478.
- Deguchi, Y., Morishita, T., & Mutai, M. (1985). Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(1), 13–19. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.49.13>
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., ... Capurso, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38(SUPPL. 2), S248–S255. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60004-8](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60004-8)
- Delgado, S., Arroyo, R., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2008). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-51>
- Dellaglio, F., Felis, G. E., & Torriani, S. (2002). The status of the species *Lactobacillus*

- casei (Orla-Jensen 1916) Hansen and lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 285–287. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-285>
- Devaraj, S., Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). The human intestinal microbiota and body metabolism: Implications with obesity and diabetes [La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes]. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(2), 421–434. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84888262426&partnerID=40&md5=17cfbdfae7593b37d824a1315cb5b8b3>
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2012). Production of GABA (gamma-aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1230–1241. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>
- Dicks, L. M. T., & Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: Health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*, 1(1), 11–29. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0012>
- Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Engstrand, L., and Jansson, J. . (2008). Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.*, 2, 716–727.
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>
- Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Doré, J., C. G. (2010). Le microbiote intestinal. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(1), S7–S15. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70015-4](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70015-4)
- Durbin, R., Eddy, S. R., & Krogh, A. (1998). Building phylogenetic trees. In *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids* (pp. 161–192).

- Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Zakharevich, N. V, Nezametdinova, V. Z., Averina, O. V, & Danilenko, V. N. (2015). Draft Genome Sequences of *Bifidobacterium angulatum* GT102 and *Bifidobacterium adolescentis* 150: Focusing on the Genes Potentially Involved in the Gut-Brain Axis. *Genome Announcements*, 3(4), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00709-15>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–8. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, C. A., & Parrett, A. M. (2002). Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1, S11–S18. <https://doi.org/10.1079/BJN2002625>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update) 1, 10(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.3020>.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., ... Flavell, R. A. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145(5), 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>
- Elliot, K. A. ., & Jasper, H. . (1959). Gamma-aminobutyric acid. *Physiological Review*, 39(99), 383–406.
- Endo, A., & Dicks, L. M. T. (2014). Physiology of the LAB. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 13–30). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch2>
- European Commission. (2010). Functional Foods. *University of Nebraska Extension*, 26. <https://doi.org/10.1002/9780470995754.ch9>
- Farrow, J. A. E., & Collins, M. D. (1988). Notes: *Lactobacillus oris* sp. nov. from the Human Oral Cavity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(1), 116–118. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-116>
- Feehily, C., & Karatzas, K. A. G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 11–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05434.x>

- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61.
- Felske, A., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4581–4587.
- Fernández, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marín, M., Jiménez, E., & Rodríguez, J. M. (2014). Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial Microbes*, 5(2), 169–183.
- Fernández, L., Cárdenas, N., Arroyo, R., Manzano, S., Jiménez, E., Martín, V., & Rodríguez, J. M. (2016). Prevention of Infectious Mastitis by Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during Late Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 62(5), 568–573. <https://doi.org/10.1093/cid/civ974>
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., & Maldonado, A. (2012). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Field, C. J., & Schley, P. D. (2004). Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Retrieved from https://watermark.silverchair.com/1190s.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9khhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAakwggGIBgkqhkiG9w0BBwagggGWMIIBkgIBADCCAYsGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMwQzquQumruJzRmnGAgEQgIIBXNIwx1qOITgVILDwNisSNiv5ssytG3uq5xX25voP_hzlQA6qU
- Fijan, S. (2016). Chapter from the book Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. In *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health>
- Finegold, S. M., & Angeles, L. (1969). Intestinal bacteria. The role they play in normal physiology, pathologic physiology, and infection. *California Medicine*, 110(6), 455–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1503548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Finegold, S. M., Downes, J., & Summanen, P. H. (2012). Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*, *18*(2), 260–262. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.018>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>
- Forsythe, P., & Kunze, W. A. (2013). Voices from within: Gut microbes and the CNS. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1028-z>
- Foster, J. A., Lyte, M., Meyer, E., & Cryan, J. F. (2016). Gut microbiota and brain function: An evolving field in neuroscience. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv114>
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>
- Fox, C., & Eichelberger, K. (2015). Maternal microbiome and pregnancy outcomes. *Fertility and Sterility*, *104*(6), 1358–1363. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.037>
- Foxman, B., D'Arcy, H., Gillespie, B., Bobo, J. K., & Schwartz, K. (2002). Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol*, *155*, 103–114. Retrieved from https://oup-silverchair-cdn-com.ore.uab.cat/oup/backfile/Content_public/Journal/aje/155/2/10.1093/aje/155.2.103/2/103.pdf?Expires=1492075439&Signature=O56PvFahACWHA vzLtPNX7k wTrknaIKznYtiHQxJxVYGRsGUa95AP0IZ1ITq-bdm6EIS1eWg4lriuj5toAyJpbenMh-4gnRnep1dRldb
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *9*(6), 312–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>
- Francl, A. L., Thongaram, T., & Miller, M. J. (2010). The PTS transporters of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *BMC Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-77>

- Frick, J.-S., & Autenrieth, I. B. (2013). The gut microflora and its variety of roles in health and disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 273–89. https://doi.org/10.1007/82_2012_217
- Fujimura, K. E., & Lynch, S. V. (2015). Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.007>
- Fushinobi, S. (2010). Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(12), 2374–2384. <https://doi.org/10.1271/bbb.100494>
- Gale, E. F. (2006). The Bacterial Amino Acid Decarboxylases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 6(14), 1–32. <https://doi.org/10.1002/9780470122518.ch1>
- Gangaraju, D., Murty, V. R., & Prapulla, S. G. (2014). Probiotic-mediated biotransformation of monosodium glutamate to gamma-aminobutyric acid: Differential production in complex and minimal media and kinetic modelling. *Annals of Microbiology*, 64(1), 229–237. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0655-4>
- Gänzle, M. G., & Follador, R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Frontiers in Microbiology*, 3(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00340>
- Gao, Z., Tseng, C. -h., Pei, Z., & Blaser, M. J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2927–2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607077104>
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & De Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes and Nutrition*, 6(3), 209–240. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0229-7>
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., ... Xavier, R. J. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host and Microbe*, 15(3), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>
- Ghoddusi, H. B. (2011). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 456–458. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00676.x>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic

- microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gill, H. S. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80(947), 516–526. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.008664>
- Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., & Collado, M. C. (2016). The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 21(6), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>
- Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S., & Leroy, F. (2012). Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.012>
- Gorissen, L., Leroy, F., De Vuyst, L., De Smet, S., & Raes, K. (2013). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (January 2015), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.706243>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2257–2266. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2713-1>
- Gorissen, L., Weckx, S., Vlaeminck, B., Raes, K., de Vuyst, L., de Smet, S., & Leroy, F. (2011). Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 593–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05087.x>
- Gosalbes, M. J., Llop, S., Vallès, Y., Moya, A., Ballester, F., & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and Experimental Allergy*, 43(2), 198–211. <https://doi.org/10.1111/cea.12063>
- Goulet, O. (2015, August 14). Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition Reviews*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv039>
- Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., & Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota.

- Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26164.
<https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26164>
- Grönlund, M. M., Grzeskowiak, Ł., Isolauri, E., & Salminen, S. (2011). Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes*, 2(4), 227–233. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16799>
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Guaraldi, F., & Salvatori, G. (2012). Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Gueimonde, M., & Collado, M. C. (2012). Metagenomics and probiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(SUPPL. 4), 32–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03873.x>
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Gueimonde, M., Laitinen, K., ... Isolauri, E. (2012). Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Pediatrīya*, 52(2), 46–47. <https://doi.org/10.1159/000100088>
- Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1(1), 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word “probiotic.” *British Journal of Nutrition*, 90(4), 845. <https://doi.org/10.1079/BJN2003954>
- Hansen, R., Russell, R. K., Reiff, C., Louis, P., McIntosh, F., Berry, S. H., ... Hold, G. L. (2012). Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(12), 1913–22. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.335>

- Hansen, R., Scott, K. P., Khan, S., Martin, J. C., Berry, S. H., Stevenson, M., ... Hold, G. L. (2015). First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLoS ONE*, *10*(7), e0133320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133320>
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(4), 723–736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria-an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*, *23*(6), 482–485. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00457.x>
- Heikkilä, M. P. P., Saris, P. E. J. E. J., Heikkilä, M. P., Saris, P. E. J. E. J., Heikkilä, M. P. P., & Saris, P. E. J. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(3), 471–478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x>
- Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D. L., & de Vos, W. M. (2002). Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(1), 114–123. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.114>
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F., & Segura, A. (2003). The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiology Letters*, *229*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00792-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00792-4)
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Thaïss, C. A., Licona-Limon, P., & Flavell, R. A. (2013). Role of the intestinal microbiome in liver disease. *Journal of Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.07.001>
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Devery, R., & Stanton, C. (2011). The health promoting properties of the conjugated isomers of alpha-linolenic acid. *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3501-5>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... 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. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August 2014), 9. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*, 73, 365S–373S.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881–884. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Hoover, D. G. (2014). Bifidobacterium. *Encyclopedia of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00033-1>
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schütte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., ... McGuire, M. A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021313>
- Huttenhower, C., & Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–14. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Ishibashi, N., & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 73).
- Isolauri, E., & Ouwehand, A. C. (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 299–313. <https://doi.org/10.1053/ybega.2004.443>
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 73, pp. 299–313). <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.006>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of*

- Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jeffery, I. B., O'Toole, P. W., Ohman, L., Claesson, M. J., Deane, J., Quigley, E. M. M., & Simren, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*, 61(7), 997–1006. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301501>
- Jiang, D., Ji, H., Ye, Y., & Hou, J. (2011). Studies on screening of higher gamma-aminobutyric acid-producing *Monascus* and optimization of fermentative parameters. *European Food Research and Technology*, 232(3), 541–547. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1413-5>
- Jiang, J., Björck, L., & Fondén, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 95–102. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00481.x>
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2008). Oral Administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 74, pp. 4650–4655). <https://doi.org/10.1128/AEM.02599-07>
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., ... Rodríguez, J. M. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51(4), 270–274. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., ... Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
- Jiménez, E., Villar-Tajadura, M. A., Marín, M., Fontecha, J., Requena, T., Arroyo, R., ... Rodríguez, J. M. (2012). Complete genome sequence of *Bifidobacterium breve* CECT 7263, a strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*, 194(14), 3762–3763. <https://doi.org/10.1128/JB.00691-12>
- Johansson, M. E. V, Larsson, J. M. H., & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl(Supplement 1), 4659–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>

- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., ... Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the Faecal Microbiota in Patients with Crohn's Disease and Their Unaffected Relatives. *Gut*, *60*, 631–637.
<https://doi.org/10.5217/ir.2011.9.2.166>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, *110*(7), 1253–62.
<https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., & Chassard, C. (2014). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology*, *16*(9), 2891–2904. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12238>
- Kaplan, H. (2002). Metabolism of fructo-oligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. <https://doi.org/10.3102/00346543067001043>
- Kaplan, H., & Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria †, *66*(6), 6–9.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2682-2684.2000.Updated>
- Karatzas, K.-A. G., Brennan, O., Heavin, S., Morrissey, J., & O'Byrne, C. P. (2010). Intracellular accumulation of high levels of gamma-aminobutyrate by *Listeria monocytogenes* 10403S in response to low pH: uncoupling of gamma-aminobutyrate synthesis from efflux in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(11), 3529–37.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03063-09>
- Karatzas, K. A. G., Suur, L., & O'Byrne, C. P. (2012). Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: Analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(10), 3571–3579.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00227-12>
- Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M., & Meile, L. (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(4), 1268–1273.
- Kaye, J. L. (2011). Review of paediatric gastrointestinal physiology data relevant to oral drug delivery. *International Journal of Clinical Pharmacy*.

- <https://doi.org/10.1007/s11096-010-9455-0>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Kim, J. H., Kim, Y., Kim, Y. J., & Park, Y. (2016). Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 221–244. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033028>
- Kim, Y., & Liu, R. (2000). Effect of Linoleic Acid Concentration on Conjugated Linoleic Acid Production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5226–5230. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5226-5230.2000>. Updated
- Kishino, S., Ogawa, J., Ando, A., Iwashita, T., Fujita, T., Kawashima, H., & Shimizu, S. (2003). Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by *Lactobacillus plantarum*, and factors affecting isomer production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(1), 179–82. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.179>
- Kishino, S., Ogawa, J., Ando, A., & Shimizu, S. (2003). Conjugated α -linolenic acid production from α -linolenic acid by *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(10), 572–577. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300806>
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K., & Shimizu, S. (2002). Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria. *Jaocs*, 159–163.
- Kleerebezem, M., & Vaughan, E. E. (2009). Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103–125. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X)
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>

- Koren, O., & Ley, R. E. (2015). The Human Intestinal Microbiota and Microbiome. In *Yamada's Textbook of Gastroenterology* (pp. 617–625).
<https://doi.org/10.1002/9781118512074.ch32>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, *146*(6), 1489–1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
- Kumari, N., & Thakur, S. K. (2014). Randomly Amplified Polymorphic DNA - a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Science*, *9*(1), 6–13.
<https://doi.org/10.3844/ajavssp.2014.6.13>
- Laiño, J. E., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. (2013). Folate production by lactic acid bacteria. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease* (pp. 251–270). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397154-8.00030-0>
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F., & Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(8), 3069–3075. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00726.x>
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Rodríguez, J. M., Boza, J., & Xaus, J. (2007). Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *The British Journal of Nutrition*, *98 Suppl 1*, S96–S100.
<https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>
- LeBlanc, J. G., Burgess, C., Sesma, F., de Giori, G. S., & van Sinderen, D. (2005). Ingestion of Milk Fermented by Genetically Modified *Lactococcus lactis* Improves the Riboflavin Status of Deficient Rats. *Journal of Dairy Science*, *88*(10), 3435–3442. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73027-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73027-7)
- Leblanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., ... Sesma, F. (2011, December). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(6), 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lee, J.-H., Karamychev, V., Kozyavkin, S., Mills, D., Pavlov, A., Pavlova, N., ...

- O'Sullivan, D. (2008). Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics*, 9(1), 247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-247>
- Lee, J.-H., & O'Sullivan, D. J. (2010). Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 378–416. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-10>
- Lee, S. O., Kim, C. S., Cho, S. K., Choi, H. J., Ji, G. E., & Oh, D. K. (2003). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters*, 25(12), 935–938. <https://doi.org/10.1023/A:1024084203052>
- Lehnen, T. E., da Silva, M. R., Camacho, A., Marcadenti, A., & Lehnen, A. M. (2015). A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0097-4>
- Lei, Y. M. K., Nair, L., & Alegre, M. L. (2015). The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.10.008>
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1978>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, H., & Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0582-7>
- Li, H., Li, W., Liu, X., & Cao, Y. (2013). *gadA* gene locus in *Lactobacillus brevis* NCL912 and its expression during fed-batch fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2), 108–116. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12301>
- Li, H., Qiu, T., Gao, D., & Cao, Y. (2010a). Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino Acids*, 38(5), 1439–1445. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0355-3>
- Li, H., Qiu, T., Gao, D., & Cao, Y. (2010b). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Amino Acids*, 38(5), 1439–1445. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0355-3>

- Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology*, *18*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0187-3>
- Loh, G., & Blaut, M. (2012). Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*, *3*(6), 544–555. <https://doi.org/10.4161/gmic.22156>
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., ... Saier, M. H. (2007). Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: Comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.007>
- Lucia Ferreira, C., Magalhães, M., Gueimonde, M., & Salminen, S. (2010). Probiotics: From Origin to Labeling from a European and Brazilian Perspective. *Probiotics and Health Claims*, 75–87. <https://doi.org/10.1002/9781444329384.ch5>
- Lugli, G. A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Ferrario, C., Viappiani, A., ... Ventura, M. (2014). Investigation of the evolutionary development of the genus bifidobacterium by comparative genomics. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(20), 6383–6394. <https://doi.org/10.1128/AEM.02004-14>
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays*, *33*(8), 574–581. <https://doi.org/10.1002/bies.201100024>
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, *52*(6), 827–833. <https://doi.org/10.1136/gut.52.6.827>
- Mackie, R. I., Sghir, A., & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 69, p. 1035S–45S). Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/69/5/1035s.full.pdf>
- Macouzet, M., Lee, B. H., & Robert, N. (2010). Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(6), 2128–2134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04844.x>
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., & Offenbacher, S. (2013, April). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12082>

- Mahajan, B., & Singh, V. (2014). Recent trends in probiotics and health management: a Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(5), 1643–1652. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(5\).1643-52](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(5).1643-52)
- Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G., ... Neu, J. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020647>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., ... Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15611–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Muylaert, D., Kubota, H., Sakai, T., ... Tanaka, R. (2011). Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6788–6793. <https://doi.org/10.1128/AEM.05346-11>
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2578–90. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7551>
- María, L., Fernández, S., & Sosa, M. (2010). Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. *Centro de Estudios Biotecnológicos . Facultad de Agronomía. Universidad de Matanza, reseña*, 34. Retrieved from <http://monografias.umcc.cu/monos/2001/mono11.pdf>
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Doré, J., ... Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
- Markets and Markets. (2015). Probiotic Ingredients Market by Function, Application, Region - 2020 Markets and Markets. Retrieved February 3, 2017, from <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>
- Marshall, S. M., Melito, P. L., Woodward, D. L., Johnson, W. M., Rodgers, F. G., & Mulvey, M. R. (1999). Rapid Identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* Isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 4158–

4160. Retrieved from <http://jcm.asm.org/content/37/12/4158.abstract>
- Marsland, B. J., & Gollwitzer, E. S. (2014). Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(12), 827–835.
<https://doi.org/10.1038/nri3769>
- Martin, J.-C., & Valeille, K. (2003). Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reproduction, Nutrition, Development*, *42*(6), 525–36.
<https://doi.org/10.1051/rnd>
- Martín, R., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Jiménez, E., Fernández, L., Smidt, H., & Rodríguez, J. M. (2007). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, *158*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.004>
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., & Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(4), 965–969. <https://doi.org/10.1128/AEM.02063-08>
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, *112*(1), 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.011>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., ... Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, *143*(6), 754–758.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2005). Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, *21*(1), 8-17-21, 41.
<https://doi.org/10.1177/0890334404272393>
- Martin, V., Maldonado-Barragan, A., Moles, L., Rodriguez-Banos, M., Campo, R. D., Fernandez, L., ... Jimenez, E. (2012). Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *Journal of Human Lactation*, *28*(1), 36–44.
<https://doi.org/10.1177/0890334411424729>

- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., & De La Cochetiere, M. F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.12.001>
- Mateos-Lindemann, M. L., Pérez-Castro, S., Rodríguez-Iglesias, M., & Pérez-Gracia, M. T. (2017). Diagnóstico microbiológico de la infección por virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 35(9), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.05.008>
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., & Takada, T. (2004). Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7220–7228. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7220>
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., & Oyaizu, H. (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4506–4512. <https://doi.org/10.1093/nar/19.suppl.1987>
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., & Oyaizu, H. (1998). Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 113–121.
- Mattarelli, P., & Biavati, B. (2014). The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 509–541). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch29>
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future Probiotic foods. In *International Dairy Journal* (Vol. 12, pp. 173–182). [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 926–938. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>
- McDougall, I. A. (2011). The Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients - Health Benefits and Food Applications. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 456–456. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00670.x>

- Mcfarland, L. V. (2008). Antibiotic-associated diarrhea : epidemiology , trends and treatment. *Future Microbiology*, 3(5), 563–578.
- McLaughlin, H. P., Motherway, M. O. C., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Paul Ross, R., Brulc, J., ... van Sinderen, D. (2015). Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.008>
- Melo Brolazo, E., Silva Leite, D., Ribeiero Tiba, M., Villarroel, M., Marconi, C., & Simoes, J. A. (2011). Correlation between API 50 CH and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 225–232. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v42n1/v42n1a28.pdf>
- Mercenier, A., Pavan, S., & Pot, B. (2003). Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(2), 175–191. <https://doi.org/10.2174/1381612033392224>
- Michail S, Durbin M, Turner D, Griffiths AM, Mack DR, Hyams J, et al. (2012). Alterations in the gut microbiome of children with severe ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18, 1799–1808.
- Mikami, K., Kimura, M., & Takahashi, H. (2012). Influence of maternal bifidobacteria on the development of gut bifidobacteria in infants. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph5060629>
- Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., ... Ventura, M. (2016). Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>
- Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D., & Paul, M. (2013). Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12172>
- Miranda, J., Lasa, A., Fernández-Quintela, A., García-Marzo, C., Ayo, J., Dentin, R., & Portillo, M. P. (2011). cis-9,trans-11,cis-15 and cis-9,trans-13,cis-15 CLNA mixture activates PPAR α in HEK293 and reduces triacylglycerols in 3T3-L1 cells. *Lipids*, 46(11), 1005–1012. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3615-4>
- Miyake ', T., Watanabe ', K., Watanabe, T., & Oyaizu2, H. (1998). Phylogenetic Analysis of the Genus *Bifidobacterium* and Related Genera Based on 16S rDNA Sequences. *Microbiol. Immunol*, 42(10), 661–667. [215](https://doi.org/10.1111/j.1348-</p></div><div data-bbox=)

0421.1998.tb02337.x

- Mizock, B. A. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, *61*(7), 259–290.
<https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.03.011>
- Modler, H. W. (1994). Bifidogenic factors - Sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*, *4*(5), 383–407. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90055-8)
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., ... Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, *9*(4), 190–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2008.00345.x>
- Montesi, A., García-Albiach, R., Pozuelo, M. J., Pintado, C., Goñi, I., & Rotger, R. (2005). Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *98*(3), 281–289.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.005>
- Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Rastegar, H., & Mortazaei, G. R. (2010). Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian Journal of Food Science*, *22*(1), 98–104.
- Mu, C., Yang, Y., & Zhu, W. (2016). Gut microbiota: The brain peacekeeper. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00345>
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., ... Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6032), 970–4. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>
- Natividad, J. M. M., & Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Orlando, P., & Coppola, R. (2012). Biochemical traits, survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source. *Pharmaceuticals*, *5*(5), 481–492. <https://doi.org/10.3390/ph5050481>
- Nebra, Y., & Blanch, A. R. (1999). A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(11), 5173–5176. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543841>
- Neefs, J. M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, *21*(13), 3025–3049. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/21.13.3025>
- Nguyen, T. T. P., Bhandari, B., Cichero, J., & Prakash, S. (2015). A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.016>
- Nieman, C. (1954). Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews*, *18*(2), 147–63. Retrieved from <http://mmbr.asm.org.are.uab.cat/content/18/2/147.full.pdf>
- Nikniaz, L., Ostadrahimi, A., Mahdavi, R., Hejazi, M. A., & Hosseini Salekdeh, G. (2013). Effects of synbiotic supplementation on breast milk levels of IgA, TGF- β 1, and TGF- β 2. *Journal of Human Lactation*, *29*(4), 591–596. <https://doi.org/10.1177/0890334413490833>
- Nishio, J., & Honda, K. (2012). Immunoregulation by the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0993-6>
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 3327–3332.
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., & Koren, O. (2016). Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in Microbiology*, *7*(JUL), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01031>
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*, *152*(3), 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>
- Ocaña, V. S., Pesce De Ruiz Holgado, A. A., & Nader-Macías, M. E. (1999). Selection of vaginal H₂O₂-generating Lactobacillus species for probiotic use. *Current Microbiology*, *38*(5), 279–284. <https://doi.org/10.1007/PL00006802>
- Odamaki, T., Horigome, A., Sugahara, H., Hashikura, N., Minami, J., Xiao, J.-Z., & Abe, F. (2015). Comparative Genomics Revealed Genetic Diversity and Species/Strain-Level Differences in Carbohydrate Metabolism of Three Probiotic Bifidobacterial Species. *International Journal of Genomics*, *2015*, 1–12.

- <https://doi.org/10.1155/2015/567809>
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 355–364. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.355>
- Oh, D. K., Hong, G. H., Lee, Y., Min, S., Sin, H. S., & Cho, S. K. (2003). Production of conjugated linoleic acid by isolated Bifidobacterium strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 907–912. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000007313.90368.0c>
- Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80(4), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00645.x>
- Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298(6), G807-19. <https://doi.org/ajpgi.00243.2009> [pii]\r10.1152/ajpgi.00243.2009
- Ohno, H. (2014). Host-gut microbiota metabolic interactions by integrated-omics analysis. *Therapeutic Research*, 35(9), 787–788. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., & Xaus, J. (2006). Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 72–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x>
- Olveira, G., & González-molero, I. (2016). Endocrinología y Nutrición Actualización de probióticos , prebióticos y simbióticos. *Endocrinología Y Nutrición*, 63(9), 482–494.
- Ötles, S., Çagindi, Ö., & Akçiçek, E. (2003, January 7). Probiotics and health. (W. Kneifel & S. Salminen, Eds.), *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444329384>
- Ouwehand, A., Vesterlund, S. (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs*, 6(6), 573–580.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., & Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1), 184–6.

- <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.1.184>
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate Preferences of Bifidobacterium Species Isolated from the Human Gut. *Curr. Issues Intest. Microbiol*, 4, 71–75. Retrieved from <https://www.caister.com/ciim/v/v4/08.pdf>
- Palomar, M. M., Maldonado Galdeano, C., & Perdigón, G. (2014). Influence of a probiotic lactobacillus strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35, 77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.08.015>
- Pandey, N., Malik, R. K., Kaushik, J. K., & Singroha, G. (2013). Gassericin A: A circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(11), 1977–1987.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1368-3>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., ... Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837–890.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- Papizadeh, M., Rohani, M., Nahrevanian, H., Javadi, A., & Pourshafie, M. R. (2017). Probiotic characters of Bifidobacterium and Lactobacillus are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.021>
- Parche, S., Amon, J., Jankovic, I., Rezzonico, E., Beleut, M., Barutçu, H., ... Titgemeyer, F. (2007). Sugar Transport Systems of Bifidobacterium longum NCC2705. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 12, 9–19.
<https://doi.org/10.1159/000096455>
- Park, H. G., Cho, H. T., Song, M. C., Kim, S. B., Kwon, E. G., Choi, N. J., & Kim, Y. J. (2012). Production of a conjugated fatty acid by Bifidobacterium breve LMC520 from α -linolenic acid: Conjugated linolenic acid (CLnA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3204–3210. <https://doi.org/10.1021/jf2041559>
- Park, H. G., Cho, S. DO, Kim, J. H., Lee, H., Chung, S. H., Kim, S. B., ... Kim, Y. J. (2009). Characterization of conjugated linoleic acid production by bifidobacterium breve LMC 520. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7571–7575.
<https://doi.org/10.1021/jf9014813>
- Park, Y., Storkson, J. M., Albright, K. J., Liu, W., & Pariza, M. W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body

- composition changes in mice. *Lipids*, 34(3), 235–41.
<https://doi.org/10.1007/s11745-999-0358-8>
- Patel, S. H., Vaidya, Y. H., Joshi, C. G., & Kunjadia, A. P. (2016). Culture-dependent assessment of bacterial diversity from human milk with lactational mastitis. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2205-x>
- Patterson, E., Cryan, J. F., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 73(4), 477–89.
<https://doi.org/10.1017/S0029665114001426>
- Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., & Nitert, M. D. (2016). Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.003>
- Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2012). Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology*, 7(December 2011), 99–122.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421>
- Poirier, I., Maréchal, P. A., Richard, S., & Gervais, P. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 87–92.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00638.x>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Pokusaeva, K., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2009). Characterization of two novel α -glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1135–1143. <https://doi.org/10.1128/AEM.02391-08>
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2007). Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 179–185.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01763-06>
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria, 57(3), 543–594. Retrieved from <http://mmbr.asm.org.are.uab.cat/content/57/3/543.full.pdf>

- Pot, B., Felis, G. E., Bruyne, K. De, Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (pp. 249–353). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch19>
- Poupard, J. A., Husain, I., & Norris, R. F. (1973). Biology of the bifidobacteria. *Bacteriological Reviews*, 37(June 1973), 136–165. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413809/pdf/bactrev00041-0040.pdf>
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *The British Journal of Nutrition*, 111(3), 387–402. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002560>
- Prince, A. L., Antony, K. M., Chu, D. M., & Aagaard, K. M. (2014). The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *Journal of Reproductive Immunology*, 104–105, 12–9. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.03.006>
- Proctor, L. M., Chhibba, S., Mcewen, J., Peterson, J., Wellington, C., Baker, C., ... Lunsford, R. D. (2013). The NIH human microbiome project. In *The Human Microbiota: How Microbial Communities Affect Health and Disease* (pp. 1–50). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118409855.ch1>
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S., & Å, H. J. F. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon - 133.full.pdf. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 133–139. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x>
- Quigley, E. M. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 9(9), 560–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3983973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Raimondi, S., Amaretti, A., Leonardi, A., Quartieri, A., Gozzoli, C., & Rossi, M. (2016). Conjugated Linoleic Acid Production by Bifidobacteria: Screening, Kinetic, and Composition. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8654317>
- Renes, E., Linares, D. M., González, L., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Stanton, C. (2017). Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by

- autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *Journal of Functional Foods*, 34, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.014>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., ... Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Revisi, C. D. E., Ruiz, V., Pe, Y. P., Rodr, M., Grado, I. I., Auxiliar, I., ... Titular, P. (2010). Microbiota intestinal , sistema inmune y obesidad Intestinal microbiota , immune system and obesity. *Revista CUbana de Investigaciones Biomédicas*, 29(3), 364–397. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Robinson, C. J., Bohannan, B. J. M., & Young, V. B. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 453–76. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-10>
- Rodríguez-Alcalá, L. M., Braga, T., Xavier Malcata, F., Gomes, A., & Fontecha, J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. *Food Chemistry*, 125(4), 1373–1378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.008>
- Rodríguez, J. M. (2014). The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 5(6), 779–784. <https://doi.org/10.3945/an.114.007229>
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: Del laboratorio al consumidor. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 33–47. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8705>
- Rodríguez, J. M., Jiménez, E., Merino, V., Maldonado, A., Marín, M. L., Fernández, L., & Martín, R. (2008). Microbiota de la leche humana. *Acta Pediatrica Española*, 66, 77–82.
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., ... Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed

- infants during the first 18 months of life. *Microbiology*, 156(11), 3329–3341.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.043224-0>
- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., ... Ravel, J. (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-4>
- Romero Cabello, R. (2008). *Microbiología y Parasitología Humana*. Panamericana.
- Rossi, M., Amaretti, A., & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu3010118>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Rev Immunology*, 9(May), 313–324.
<https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., & Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*, 38, 303–311.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.015>
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.003>
- Ryan, K. A., Jayaraman, T., Daly, P., Canchaya, C., Curran, S., Fang, F., ... O'Toole, P. W. (2008). Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 269–274.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02416.x>
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. M., & Fernández, L. (2014). Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(1), 78–88.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>
- Saarela, M. (2007). Methods to improve the viability and stability of probiotics. *Functional Dairy Products*, 2, 391–400.
<https://doi.org/10.1533/9781845693107.3.391>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Salazar, N., Arboleya, S., Valdés, L., Stanton, C., Ross, P., Ruiz, L., ... de los Reyes-

- Gavilán, C. G. (2014). The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Frontiers in Genetics*.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00406>
- Salinas Salcedo, I. A. (2012). *Prueba del ácido glutámico descarboxilasa modificado para la rápida identificación de escherichia coli aisladas en urocultivos*.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217–226.
<https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2016, January). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, p. 1600240.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Sanz, Y., Collado, M. C., Haros, M., & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*, 62(11), 520–526.
- Saraswati, S., & Sitaraman, R. (2015). Aging and the human gut microbiota—from correlation to causality. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–4.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00764>
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. J. (2016). Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>
- Sarkar, S. (2013). Probiotics as functional foods: documented health benefits. *Nutrition & Food Science*, 43(2), 107–115. <https://doi.org/10.1108/00346651311313445>
- Saulnier, D. M., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.002>
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & De Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003>
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., ... Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14422–7.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.212527599>
- Scott, K. P., Antoine, J.-M., Midtvedt, T., & van Hemert, S. (2015). Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 25877. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.25877>
- Sebastián Domingo, J. J. (2017). The new Rome criteria (IV) of functional digestive disorders in clinical practice. *Medicina Clínica (English Edition)*, 148(10), 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.12.070>
- Sekirov, I., Russell, S., & Antunes, L. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- Serra, L., & Aranceta, J. (2002). Guía de alimentos funcionales. *Sociedad Española Nutrición Comunitaria. Instituto Omega 3. Confederación de Consumidores Y Usuarios.*, 2–14.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405–440. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Shanahan, F., Dinan, T. G., Ross, P., & Hill, C. (2012). Probiotics in Transition. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(11), 1220–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.09.020>
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Research International*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7283–7290. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07>
- Sjögren, Y. M., Jenmalm, M. C., Böttcher, M. F., Björkstén, B., & Sverremark-

- Ekström, E. (2009). Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(4), 518–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03156.x>
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J. P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., ... Doraé, J. (2009). Low counts of faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(8), 1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903>
- Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16(3), 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.02.004>
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(4), 227–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Song, Y.-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.-X., Song, Y.-L., Kato, N., ... Liu, C.-X. (1999). Identification of and Hydrogen Peroxide Production by Fecal and Vaginal Lactobacilli Isolated from Japanese Women and Newborn Infants Identification of and Hydrogen Peroxide Production by Fecal and Vaginal Lactobacilli Isolated from Japanese Women and New. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 37(9), 3062–3064. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85459/pdf/jm003062.pdf>
- Soo, H. C., In, H. K., Hui, G. P., Hye, S. K., Chil, S. Y., Ha, Y. J., ... Young, J. K. (2008). Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived Bifidobacterium breve LMC 017: Utilization as a functional starter culture for milk fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3311–3316. <https://doi.org/10.1021/jf0730789>
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. M., & Fernández, L. (2014). Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(1), 78–88. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>
- Stewart, C. J., Marrs, E. C. L., Magorrian, S., Nelson, A., Lanyon, C., Perry, J. D., ... Berrington, J. E. (2012). The preterm gut microbiota: Changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 101(11), 1121–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1651->

2227.2012.02801.x

- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Matoć, S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, *48*(3), 296–307. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429>
- Teitelbaum, J. E., & Walker, W. A. (2002). Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, *22*(1), 107–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.110901.145412>
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, *18*(5), 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.004>
- Terán, V., Pizarro, P. L., Zacarías, M. F., Vinderola, G., Medina, R., & Van Nieuwenhove, C. (2015). Production of conjugated dienoic and trienoic fatty acids by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Functional Foods*, *19*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.046>
- the European Parliament and the Council of the European Union. (2006). Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the council. *Official Journal of the European Union*, *3*(1924), 1–30. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1924-20121129&from=EN>
- Thomas, L. V, Ockhuizen, T., & Suzuki, K. (2014). Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report. *British Journal of Nutrition*, *112*, S1–S18. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001275>
- Thwaites, D. T., Basterfield, L., McCleave, P. M. J., Carter, S. M., & Simmons, N. L. (2000). Gamma-aminobutyric acid (GABA) transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers. *British Journal of Pharmacology*, *129*(3), 457–464. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703069>
- Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., & Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.004>
- Tillakaratne, N. J. K., Medina-Kauwe, L., & Gibson, K. M. (1995). Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*.

- [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00099-2)
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Tripathi, P., Beaussart, A., Andre, G., Rolain, T., Lebeer, S., Vanderleyden, J., ... Dufrene, Y. F. (2012). Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*, 43(12), 1323–1330. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.01.001>
- Tungland, B. C., & Meyer, D. (2002). Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 90–109.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x>
- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., & Gibson, G. R. (2003, August 1). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*.
[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02746-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02746-6)
- Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 94(1), 35–50. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9232-4>
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., & Saxelin, M. (2001). Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. *VTT Publications*, 65(454), 69–75.
- Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00114-4)
- Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G. B., & Reid, G. (2016). Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0145-y>
- Valdés-Varela, L., Ruas-Madiedo, P., & Gueimonde, M. (2017). In vitro fermentation of different fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* strains for the selection of synbiotic combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 19–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.011>
- Van Den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J. P., & Voragen, A. G. J. (2008). Bifidobacterium carbohydrases-their role in breakdown and synthesis

- of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 146–163.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200700121>
- Van Limbergen, J., Philpott, D., & Griffiths, A. M. (2011, November). Genetic profiling in inflammatory bowel disease: From association to bedside. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.018>
- van Loveren, H., Sanz, Y., & Salminen, S. (2012). Health Claims in Europe: Probiotics and Prebiotics as Case Examples. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 247–261. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-food-022811-101206>
- van Tassel, M. L., & Miller, M. J. (2011, May). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/nu3050613>
- Varughese, C. A., Vakil, N. H., & Phillips, K. M. (2013). Antibiotic-Associated Diarrhea: A Refresher on Causes and Possible Prevention With Probiotics-Continuing Education Article. *Journal of Pharmacy Practice*, 25(5), 476–482.
<https://doi.org/10.1177/0897190013499523>
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- Vaughan, E. E., Heilig, H. G. H. J., Ben-Amor, K., & De Vos, W. M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3 SPEC. ISS.), 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.009>
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., & Zink, R. (2001). Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 113–121.
- Ventura, M., Lee, J., Canchaya, C., Zink, R., Leahy, S., Higgins, D., ... Sullivan, D. J. O. (2005). Prophage-Like Elements in Bifidobacteria: Insights from Genomics, Transcription, Integration, Distribution, and Phylogenetic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8692–8705.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8692>

- Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2007). From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1–2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.011>
- Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., ... Van Sinderen, D. (2009). The bifidobacterium dentium Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genetics*, *5*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000785>
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., & Zink, R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000047930.11029.ec>
- Veyrat, A., Miralles, M. C., & Pérez-Martínez, G. (1999). A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00795.x>
- Vigod, S. N., Strasburg, K., Daskalakis, Z. J., & Blumberger, D. M. (2014). Systematic review of gamma-aminobutyric-acid inhibitory deficits across the reproductive life cycle. *Archives of Women's Mental Health*, *17*(2), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00737-013-0403-6>
- Villar-Tajadura, M. A., Rodríguez-Alcalá, L. M., Martín, V., Gómez De Segura, A., Rodríguez, J. M., Requena, T., & Fontecha, J. (2014). Production of conjugated linoleic and conjugated α -linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by bifidobacterial strains isolated from human breast milk. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/725406>
- Vincent, D., Roy, D., Mondou, F., & Déry, C. (1998). Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, *43*(3), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00109-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00109-3)
- W. Allan Walker. (2008). Mechanisms of Action of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(Suppl2), 87–91. <https://doi.org/10.1086/523335>
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., & Petocz, P. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, *74*(4), 510–515. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/74/4/510.full.pdf>
- Wang, J., & Jia, H. (2016). Metagenome-wide association studies: Fine-mining the

- microbiome. *Nature Reviews Microbiology*.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2011). Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(18), 6718–6721.
<https://doi.org/10.1128/AEM.05212-11>
- Wang, X., Buhimschi, C. S., Temoin, S., Bhandari, V., Han, Y. W., & Buhimschi, I. A. (2013). Comparative Microbial Analysis of Paired Amniotic Fluid and Cord Blood from Pregnancies Complicated by Preterm Birth and Early-Onset Neonatal Sepsis. *PLoS ONE*, *8*(2), e56131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056131>
- Wang, Y., Hoenig, J. D., Malin, K. J., Qamar, S., Petrof, E. O., Sun, J., ... Claud, E. C. (2009). 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *The ISME Journal*, *3*(8), 944–954.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.37>
- Ward, L. J., & Timmins, M. J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, *29*, 90–92.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x>
- Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y., & Kumemura, M. (2003). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*(3), 587–591. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.105>
- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M. H. C., van Neerven, R. J. J., Nauta, A., & Van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(4), 1132–1146. <https://doi.org/10.1111/jam.12105>
- Weitz Vattuone, J. C., Berger Fleiszig, Z., Sabah Telias, S., & Silva Calcagni, H. (2013). *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- West, C. E., Jenmalm, M. C., & Prescott, S. L. (2015). The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: A wider perspective. *Clinical and Experimental Allergy*. <https://doi.org/10.1111/cea.12332>

- West, C. E., Renz, H., Jenmalm, M. C., Kozyrskyj, A. L., Allen, K. J., Vuillermin, P., & Prescott, S. L. (2015). The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: Associations and potentials for gut microbiota therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.012>
- West, D. B., Delany, J. P., Camet, P. M., Blohm, F., Truett, A. A., & Scimeca, J. (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275(3), R667–R672. Retrieved from <http://ajpregu.physiology.org/content/275/3/R667.abstract>
- Williams, B. L., Hornig, M., Parekh, T., & Ian Lipkin, W. (2012). Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00261-11>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiology*, 51(2), 221–271. <https://doi.org/10.1139/m88-093>
- Woodcock, A., Moradi, M., Smillie, F. I., Murray, C. S., Burnie, J. P., & Custovic, A. (2002). *Clostridium difficile*, atopy and wheeze during the first year of life. *Pediatric Allergy Immunol*, 13(3), 357–360.
- World Health Organization. (2000). Mastitis - Causes and Management. *World Health Organization*, 1–44. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66230/1/WHO_FCH_CAH_00.13_eng.pdf
- Xiaoxue, L. U., Chunyan, X. I. E., & ZhenXin, G. U. (2009). Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(6), 433–442.
- Xu, H., Lee, H. Y., Hwang, B., Nam, J. H., Kang, H. Y., & Ahn, J. (2008). Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2239–2247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03937.x>
- Xu, Z., & Knight, R. (2014). Dietary effects on human gut microbiome diversity. *The British Journal of Nutrition*, 113 Suppl, 1–5. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004127>
- Yang, S.-Y., Lu, Z.-X., Lü, F.-X., Bie, X.-M., Sun, L.-J., & Zeng, X.-X. (2006). A simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase

- activities. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 14(3), 291–298. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2006.00054.x>
- Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., ... Mohamadzadeh, M. (2015). Gut Dysbiosis is Linked to Hypertension. *Hypertension*, 65(6), 1331–1340. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315>
- Yildirim, Z., Winters, D. K., & Johnson, M. G. (1999). Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 45–54. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x>
- Younes, J. A., Lievens, E., Hummelen, R., van der Westen, R., Reid, G., & Petrova, M. I. (2018). Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship. *Trends in Microbiology*, 26(1), 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.008>
- Young, J. P. W., Downer, H. L., & Eardly, B. D. (1991). Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2271–2277.
- Yu, J., Sun, Z., Liu, W., Bao, Q., Zhang, J., & Zhang, H. (2012). Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial hsp60, pheS and tuf gene sequences. *European Food Research and Technology*, 234(6), 927–934. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1712-0>
- Yuan, G.-F., Chen, X.-E., & Li, D. (2014). Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. *Food & Function*, 5(November), 1360–1368. <https://doi.org/10.1039/c4fo00037d>
- Yuan, G., Chen, X., & Li, D. (2015). Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) by conjugated fatty acid in obesity and inflammatory bowel disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1883–1895. <https://doi.org/10.1021/jf505050c>
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., ... Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>
- Yunes, R., Dyachkova, M., Kozlovsky, Y., Poluektova, E., Chertovitch, N., Averina, O., ... Danilenko, V. (2015). Gamma-aminobutyric acid producing *Lactobacillus*

and Bifidobacterium strains isolated from the human body-candidates for future psychobiotics-.

- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., ...
Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(7), 2365–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812600106>
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., & Gänzle, M. (2015). A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7233–7243.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>
- Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., & Schmidt, M. A. (2007). Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology*, *9*(3), 804–816.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x>

