

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**INFLUENCIA DEL CONSUMO DE SORBITOL EN LA
MICROBIOTA INTESTINAL DE UN MODELO AMINAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Luz Adriana Sarmiento Rubiano

Dirigida por:

Dra. María Jesús Yebra Yebra

Dr. Gaspar Pérez Martínez

Valencia-2008



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Consejo Superior
de Investigaciones
Científicas
INSTITUTO DE AGROQUÍMICA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

La Dra. María Jesús Yebra Yebra, Científica Titular del Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paterna, Valencia.

Y

El Dr. Gaspar Pérez Martínez, Investigador Científico del Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paterna, Valencia.

Hacen constar:

Que la memoria titulada **“INFLUENCIA DEL CONSUMO DE SORBITOL EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE UN MODELO AMINAL”** presentada por D^a. Luz Adriana Sarmiento Rubiano para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para ser defendida por su autor.

Valencia, 1 de Abril de 2003

Fdo.: Dra. María Jesús Yebra Yebra

Fdo.: Dr. Gaspar Pérez Martínez

RESUMEN

El sorbitol es un poliol natural que se utiliza ampliamente en la industria de alimentos, como edulcorante en productos bajos en calorías, estabilizante, espesante y humectante. Este azúcar alcohol es utilizado por algunas especies del género *Lactobacillus* y como fuente de carbono por bifidobacterias indígenas del intestino humano. Por esta razón, algunos autores han concluido que el sorbitol podría ser un prebiótico. Sin embargo, existen pocos datos experimentales acerca de su potencial efecto prebiótico. En este trabajo se han analizado los efectos *in vivo* del sorbitol sobre la microbiota del ciego, colon y heces de ratas y se han comparado con un reconocido prebiótico como son los fructooligosacáridos (FOS).

Se analizó la microbiota intestinal por métodos culturales tradicionales, así como mediante técnicas moleculares tales como PCR seguida de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Los resultados mostraron que el consumo de sorbitol y FOS modificó cualitativa y cuantitativamente la microbiota intestinal de manera similar. El sorbitol aumentó y favoreció, respectivamente, la permanencia de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus* sp. AD102 en el tracto gastrointestinal de las ratas. El análisis de las concentraciones de ácidos orgánicos en el contenido intestinal demostró que la ingestión de sorbitol aumenta los niveles de butirato en el ciego y en el colon. Por lo tanto, el sorbitol tiene la capacidad de modificar en nuestro modelo animal la actividad de la microbiota intestinal, de tal manera, que podría contribuir al mantenimiento de una mucosa intestinal sana.

Se han aislado cinco especies de *Lactobacillus* del contenido intestinal de ratas. La secuenciación del gen que codifica para el 16S rRNA y su posterior análisis filogenético, junto con organismos de referencia, han permitido identificar esas especies como *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus* y *Lactobacillus* sp. AD102. Esta última

no ha podido ser asignada a ninguna especie descrita, por lo que se llevó a cabo su clasificación taxonómica y ha sido propuesta como una nueva especie denominada *Lactobacillus iatae* sp. nov. Un análisis de Hibridación Genómica Comparada (HGC) mediante la técnica de “*Microarrays*”, revela que *L. iatae* sp.nov. y *L. johnsonii* NCC533 tienen en común un mayor número de secuencias de genes conservadas que las encontradas entre *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* NCC533 (BL298), lo que sugiere una posición filogenética intermedia para *L. iatae* sp. nov.

ABSTRACT

The sorbitol is a naturally occurring polyol, is widely used in the food industry as a sweetener in low calorie foods, humectant and texturizing agent. This sugar alcohol is used by some species of *Lactobacillus* and as carbon source by human intestinal bifidobacterias. For this reason, some authors have concluded that sorbitol could be a prebiotic. However, there are few experimental data concerning its potential as prebiotic. In this work, the *in vivo* effect of sorbitol has been analysed on cecal, colonic and fecal microbiota, using rats as an animal model, and its effect was compared to that of a well known prebiotic such as fructo-oligosaccharides (FOS).

Intestinal microbiota was studied by classic cultural methods and updated molecular techniques, such as PCR followed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitatively by real-time PCR (qPCR). Results showed that the consumption of sorbitol modified intestinal microbiota in a similar way to FOS, both qualitatively and quantitatively. Sorbitol increased and favored, respectively, the permanence of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus* sp. AD 102 in the gastrointestinal tract of the rats. Analysis of organic acid concentrations in the intestinal content showed that sorbitol intake significantly increased colonic and cecal butyrate levels. Therefore in our animal model, sorbitol has the ability of modifying the gut microbiota activity, possibly contributing to maintain a healthy colonic mucosa.

Five *Lactobacillus* species have been isolated from the intestinal content of rats. Partial 16S rRNA gene sequencing and subsequent phylogenetic analysis led to the identification of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus* and *Lactobacillus* sp. AD102. This strain could not be clearly assigned to any known species. A careful taxonomical identification was carried out and has been proposed as a new species named of *Lactobacillus iatae*

sp. nov. Microarray Genomic Comparative Hybridization (HGC) analysis showed that there are a greater number of conserved gene sequences between *L. iatae* sp. nov and *L. johnsonii* NCC533, than between *L. gasseri* DSMZ20243^T and *L. johnsonii* NCC533, suggesting an intermediate phylogenetic position for *L. iatae* sp. nov.

RESUM

El sorbitol és un poliol natural que s'utilitza ampliament en l'indústria d'aliments com edulcorant en productes baixos en caloríes, estabilitzant, espessant i humectant. Aquest sucre alcohol és utilitzat per algunes espècies del gènere *Lactobacillus* i com a font de carboni per bifidobactèries indígenes del intestí humà. Per aquesta raó, alguns autors han conclòs que el sorbitol podria ser un prebiòtic. En aquest treball s'han analitzat els efectes *in vivo* del sorbitol sobre la microbiota del cec, còlon i excrements de rates i s'han comparat amb un reconegut prebiòtic com són els fructooligosacàrids (FOS).

S'analitzà la microbiota intestinal per mètodes culturals tradicionals així com també mitjançant tècniques moleculars, tals com PCR seguida d'electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE) i PCR quantitativa a temps real (qPCR). Els resultats mostraren que el consum de sorbitol y FOS modificà qualitativa i quantitativament la microbiota intestinal de manera similar. El sorbitol augmentà y va afavorir, respectivament, la permanència de *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus sp. AD102* en el tracte gastrointestinal de les rates. L'anàlisi de les concentracions d'àcids orgànics en el contingut intestinal demostrà que l'ingestió de sorbitol augmentà els nivells de butirat en el cec i en el còlon. Per tant, el sorbitol té la capacitat de modificar, en el nostre model animal, l'activitat de la microbiota intestinal de tal manera que podria contribuir al manteniment de la mucosa intestinal sana.

S'han aïllat cinc espècies de *Lactobacillus* del contingut intestinal de les rates. La seqüenciació del gen que codifica per al 16S rRNA i el seu posterior anàlisi filogenètic, junt amb organismes de referència, han permès identificar eixes espècies com *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus* i *Lactobacillus sp. AD102*. Aquesta darrera no ha pogut ser assignada a cap espècie descrita, pel que es va dur a terme la seua

classificació taxonòmica i ha sigut proposada com a una nova espècie denominada *Lactobacillus iatae* sp. nov. Un anàlisi d'Hibridació Genòmica Comparada (HGC) mitjançant la tècnica de "Microarrays" revela que *Lactobacillus iatae* sp. nov. i *L. johnsonii* NCC533 tenen en comú un major nombre de seqüències de gens conservades que les trobades entre BL277 *L.gasseri* DSMZ20243^T i BL298 *L. johnsonii* NCC533, el que sugereix una posició filogenètica intermitja per a *Lactobacillus iatae* sp. nov.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN.	
1. AZÚCARES ALCOHOL.	1
1.1. Generalidades.	1
1.2. El sorbitol.	2
2. ALIMENTOS FUNCIONALES.	4
2.1. Los probióticos.	6
2.2. Los prebióticos.	7
2.3. Administración conjunta de pro y prebióticos: los “simbióticos”.	10
3. INVESTIGACIÓN DE PREBIÓTICOS <i>IN VIVO</i> .	11
3.1. La rata como modelo animal de investigación.	11
3.2. Estudio de la microbiota intestinal y la producción de ácidos orgánicos.	12
3.3. Aumento en la producción de inmunoglobulina A intestinal.	14
4. PRODUCCIÓN DE HIDROLASAS DE SALES BILIARES (HSB) POR BACTERIAS INTESTINALES.	15
5. TAXONOMÍA E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS.	17
5.1. El género <i>Lactobacillus</i> .	18
5.2. El grupo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	20
5.3. Métodos para la clasificación taxonómica de bacterias.	22
5.3.1. Técnicas moleculares en la clasificación taxonómica de bacterias.	22
5.3.1.1. Hibridación DNA-DNA.	22
5.3.1.2. Secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y análisis filogenético.	25
5.3.1.3. Otros genes utilizados en estudios filogenéticos.	28

5.3.1.4. Hibridación en “ <i>microarrays</i> ”.	29
5.4. Tipado de cepas de <i>Lactobacillus</i> .	32
5.4.1. Tipificación genética.	32
5.4.2. Tipado de cepas mediante electroforesis de proteína.	33

OBJETIVOS.

1. Objetivo general.	37
2. Objetivos específicos.	37

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> CON PREBIÓTICOS.	41
1.1. Animales y diseño experimental.	41
1.2. Recogida de muestras, medida de peso corporal, pH y lípidos en sangre.	41
1.3. Recuentos bacterianos utilizando cultivo en placa.	43
1.4. Estudio de la microbiota por métodos moleculares.	44
1.4.1. Extracción de DNA y amplificación de los genes que codifican para el 16S rRNA por PCR.	44
1.4.2. Análisis de los productos de PCR por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).	45
1.4.3. Aislamiento y secuenciación de DNA de bandas del gel de DGGE.	46
1.5. Aislamiento y caracterización de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> de intestino de rata.	47
1.5.1. Obtención de cultivos puros de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> y comprobación por PCR-DGGE.	47

1.5.2. Extracción de DNA e identificación de <i>Lactobacillus</i> .	48
1.5.3. Análisis filogenético de las secuencias de DNA.	49
1.6. Enumeración de dos especies de <i>Lactobacillus</i> por PCR cuantitativa.	49
1.6.1. Elaboración de patrones para la curva de calibración.	49
1.6.2. Cuantificación de <i>Lactobacillus reuteri</i> AD23 y <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	50
1.7. Determinación de ácidos orgánicos en las Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de ratas.	51
1.8. Determinación de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en heces de rata.	52
1.9. Actividad HSB en las cepas de <i>Lactobacillus</i> aislados de intestino de rata.	52
1.9.1. Ensayo en placa de la actividad HSB.	52
1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC de la actividad HSB.	53
1.10. Análisis estadísticos.	54
2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA TAXONOMÍA DE LACTOBACILOS.	54
2.1. Obtención de nuevos aislamientos de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	54
2.2. Cepas utilizadas y medios de cultivo.	55
2.3. Análisis fenotípicos.	55
2.4. Análisis filogenéticos mediante secuencias de DNA.	57
2.4.1. Amplificación y secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y gen <i>recA</i> .	57
2.4.2. Análisis filogenéticos.	58
2.5. Hibridación DNA-DNA.	59
2.5.1. Preparación del DNA.	59
2.5.2. Marcaje de sondas.	60
2.5.3. Preparación de las membranas.	60

2.5.4. Prehibridación, hibridación y detección inmunológica.	60
2.5.5. Cuantificación.	61
2.6. Electroforesis de proteína total.	62
2.6.1. Preparación de la muestra.	62
2.6.2. Preparación del gel, electroforesis de proteína y análisis de resultados.	62
2.7. Genotipado mediante ERIC-PCR.	63
2.8. Comparación de cepas del grupo de <i>L. acidophilus</i> mediante “microarrays”.	64

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

CAPÍTULO I. Estudio del efecto prebiótico del sorbitol en rata.	67
1. RESULTADOS.	67
1.1. Efecto sobre el peso corporal, peso del tejido intestinal y pH del contenido intestinal y heces.	67
1.2. Efecto sobre la concentración de lípidos en sangre.	68
1.3. Concentración de lactato y ácidos grasos de cadena corta en heces y contenido intestinal de rata.	70
1.4. Determinación de inmunoglobulina A en heces de rata.	71
1.5. Análisis bacteriológico en las muestras de heces y contenido del colon y del ciego por métodos culturales.	73
1.6. Análisis de las muestras de Heces-Final y contenido del colon y del ciego por PCR-DGGE.	76
1.6.1. Microbiota total.	76
1.6.2. Especies de <i>Lactobacillus</i> .	77
1.6.3. Especies de <i>Bifidobacterium</i> .	81
1.7. Aislamiento e identificación de especies de <i>Lactobacillus</i> .	81

1.8. PCR cuantitativa de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102 y <i>L. reuteri</i> AD23 en heces, y contenido del colon y del ciego de rata.	83
1.9. Producción de HSB en las cepas de <i>Lactobacillus</i> aislados de intestino de rata.	88
1.9.1. Ensayo en placa de HSB.	88
1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC.	88
 2. DISCUSIÓN.	 92
 CAPITULO II. Clasificación taxonómica de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102 aislado de intestino de rata.	 101
 1. RESULTADOS.	 101
1.1. Obtención de nuevos aislamientos de <i>Lactobacillus</i> sp. AD102.	101
1.2. Características fenotípicas de las 26 cepas de <i>Lactobacillus</i> estudiados.	102
1.3. Análisis filogenético de cepas de <i>Lactobacillus</i> .	106
1.3.1. Análisis filogenético de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA	106
1.3.2. Análisis de secuencias del gen <i>recA</i> .	112
1.4. Hibridación DNA-DNA.	112
1.5. Análisis comparativo de perfiles de proteína de cepas de <i>Lactobacillus</i> del grupo de <i>L. acidophilus</i> .	120
1.6. Genotipado de cepas del grupo de <i>L. acidophilus</i> mediante ERIC-PCR.	122
1.7. Comparación del genoma de la cepa <i>L. johnsonii</i> NCC533 (BL298) con otros <i>Lactobacillus</i> mediante “microarrays”.	122
1.8. Características fenotípicas de las especies del grupo de <i>L. acidophilus</i> .	124

2. DISCUSIÓN.	125
---------------	-----

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

1. Discusión general.	135
2. Conclusiones generales.	136

BIBLIOGRAFIA.	141
----------------------	-----

ANEXO 1. Comparación del genoma de la cepa <i>L. johnsonii</i> NCC533 (BL298) con otros <i>Lactobacillus</i> mediante “ <i>microarrays</i> ”.	163
---	-----

ANEXO 2. Secuencias realizadas durante este trabajo que aun no han sido publicadas total o parcialmente y están incluidas en los resultados finales.	167
--	-----

INTRODUCCIÓN

1. AZÚCARES ALCOHOL

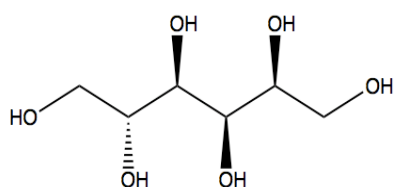
1.1. Generalidades

Los azúcares alcohol o polioles están presentes en la naturaleza en frutas y vegetales. Son producidos también industrialmente por hidrogenación catalítica de azúcares, reconociéndose químicamente tres categorías: (i) alcoholes de monosacáridos como el sorbitol, manitol y xilitol; (ii) alcoholes de disacáridos como el maltitol, lactitol e isomaltosa; (iii) alcoholes de oligosacáridos como el maltotriol. Estos polioles poseen baja digestibilidad y proveen el 60% de calorías por gramo en relación con la sacarosa, conservando su poder edulcorante (Zumbé *et al.*, 2001). Debido a esta propiedad, se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, principalmente en la elaboración de alimentos dietéticos y para diabéticos. Los polioles son utilizados también como emulgentes, estabilizadores, espesantes, antioxidantes, antiapelmazantes, humectantes y crioprotectores. La industria farmacéutica y cosmética utiliza igualmente gran cantidad de polioles.

Cada día son más los estudios que revelan los potenciales usos y ventajas fisiológicas de los polioles: mínimo aumento de los niveles de glucosa e insulina en sangre, modificación de la lipidemia disminuyendo el riesgo de enfermedad coronaria, baja acidificación oral ayudando a la prevención de la caries dental, bajo valor energético, sensación de saciedad, generación de butirato y acidificación del colon entre otras (Livesey, 2001). Se ha comprobado que el consumo continuo de xilitol reduce de manera importante el riesgo de caries dental (Hujoel *et al.*, 1999), y que previene la otitis media aguda en niños que lo consumen incorporado en goma de mascar, al inhibir el crecimiento y la adherencia en la mucosa nasofaríngea del *Neumococo* y de *Haemophilus influenzae* (Uhari *et al.*, 1996; Uhari *et al.*, 1998). En ratas alimentadas con xilitol y sorbitol se ha observado un aumento significativo de calcio en los huesos (Knuutila *et al.*, 1989). Se ha demostrado también, la actividad antioxidante en alimentos de algunos polioles como el sorbitol y manitol, cuando son incorporados

por ejemplo en una emulsión de aceite de pescado (Faraji and Lindsay, 2004).

1.2. El sorbitol.



Formula química: $C_6 H_{14} O_6$

Peso molecular: 182,17 g

Densidad: 0,68 g/cm³

Temperatura de fusión: 95°C

Punto de ebullición: 296°C

El sorbitol, clasificado como azúcar alcohol hexahídrico (hexitol), fue aislado por primera vez a finales de los años sesenta de las bayas del fresno silvestre y se encuentra frecuentemente en muchos frutos como peras y ciruelas. En la actualidad se produce industrialmente mediante la hidrogenación catalítica de soluciones de D-glucosa, en una reacción exotérmica que se realiza a alta presión y temperatura. La producción mundial de sorbitol está estimada en 500,000 toneladas al año, con un mercado en continuo crecimiento (Silveira and Jonas, 2002). La estructura química del sorbitol y su naturaleza polialcohólica le otorgan excelentes propiedades: gran estabilidad térmica y química (no se pardea hasta temperaturas superiores a 180°C, es resistente a ácidos y álcalis y no experimenta reacciones de Maillard), humectancia, plasticidad, disminución de la actividad de agua, estabilidad al calor y al pH, efecto antioxidante (al formar complejos con iones metálicos), es 20 veces más soluble que el manitol y es toxicológicamente inocuo. Además, tiene un valor calórico de 2,4 Kcal/g (valor adoptado por las directrices de la Unión Europea para todos los polioles) en relación a 4 Kcal/g de la sacarosa y otros azúcares utilizados en alimentación, con un similar poder edulcorante (Zumbe *et al.*, 2001). Las propiedades mencionadas llevan a que el

sorbitol sea ampliamente utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

El sorbitol, después de ser ingerido, se absorbe en parte en el intestino delgado y el resto llega al intestino grueso. La tasa de absorción por transporte pasivo en el intestino delgado depende del tiempo de retención y de la ocupación gastrointestinal. El sorbitol absorbido es metabolizado por un proceso insulino independiente, convirtiéndose en fructosa antes de entrar a la glucólisis, por lo tanto no induce un incremento de los niveles de glucosa en sangre. Otra ventaja del consumo de sorbitol es que no es fermentado por los microorganismos de la boca, por lo que no se convierte en ácidos que causan la desmineralización de los dientes y la caries dental. Posee además valor terapéutico como laxante, ésta característica, sin embargo, puede ser considerada como un problema y no como un beneficio en determinados grupos de población, sobre todo a dosis muy altas, puede causar diarrea en humanos y animales debido a retención osmótica, tanto en el intestino delgado como en el colon. La dosis máxima recomendada de ingesta de sorbitol es de 0,17 y 0,24 g/Kg peso en mujeres y hombres, respectivamente. El sorbitol que no es absorbido en el intestino delgado y alcanza el intestino grueso es fermentado por la microbiota colónica, produciendo hidrógeno, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena corta (Ellwood, 1995). Se ha descrito que este poliol es utilizado por especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo una fuente de carbono de fácil asimilación para bífidobacterias indígenas del intestino humano (Gómez Zavaglia *et al.*, 1998; Rhodes and Kator, 1999a; Yebra and Pérez-Martínez, 2002). Es por ello que se ha generalizado la idea de que este azúcar alcohol puede ser tratado como prebiótico, sin embargo, existen pocos experimentos que demuestren su potencial *in vivo*. En rumen cultivado y enriquecido con sorbitol, se observó un desplazamiento por exclusión competitiva de nutrientes de *Escherichia coli* O157:H7 (de Vaux *et al.*, 2002). La concentración de colesterol total en suero, decreció, en ratas alimentadas con una dieta que contenía azúcares alcohol incluido el sorbitol (Islam *et al.*, 2004).

2. ALIMENTOS FUNCIONALES.

Tradicionalmente se ha pensado que una alimentación sana se refleja en un cuerpo saludable, razón por la cual, desde tiempos inmemoriales el hombre siempre ha tratado de consumir alimentos que por su variedad y calidad nutricional le permitan un adecuado desarrollo físico y mental. En las últimas décadas y gracias a los avances científicos, ha sido posible establecer con mayor claridad, que las interacciones entre alimento y consumidor se desarrollan en un entorno complejo, en el que la microbiota bacteriana juega un papel fundamental. A finales de la década de los 80 en Japón se introduce por primera vez el término “alimentos funcionales”, considerados como aquellos que, además de hacer un aporte nutricional, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Son muchas las expectativas que a nivel mundial se generan alrededor del tema de los alimentos funcionales, no solo por su impacto en los hábitos de nutrición y consumo, si no por que involucra áreas tan importantes como la salud, la economía, la investigación científica, la legislación, y el comercio y desarrollo de mercados entre otras. El creciente interés en el tema de los alimentos funcionales, justifica que las autoridades de los diferentes países, establezcan políticas regulatorias en relación a los alimentos funcionales y las respectivas alegaciones en salud. En 1991 se establece en Japón el concepto de alimentos para uso específico en la salud “FOSHU” (Foods for Specified Health Use), los alimentos que se incluyen dentro de la categoría FOSHU deben estar autorizados por el ministerio de salud, previa presentación de la evidencia científica de que su consumo dentro de una dieta normal, genera beneficios para la salud (Saito, 2007). En los Estados Unidos de América la Administración para Alimentos y Medicamentos (FDA), permite desde 1993 alegaciones de salud en ciertos alimentos, siempre que existan evidencias científicas suficientes que las respalden y que estén autorizadas por organismos científicos federales como los Institutos Nacionales de Salud, o los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (Ross, 2000).

En la Unión Europea durante la década de los 90, se desarrolla un importante número de proyectos de investigación en el área de alimentos y nutrición, temas como fibras alimentarias, probióticos, prebióticos y más recientemente antioxidantes, vitaminas, y fitoestrógenos, han sido estudiados para valorar el impacto de su consumo habitual en la salud (Verschuren, 2002). Partiendo de estos primeros pasos, la Unión Europea financió una acción concertada para la investigación sobre alimentos funcionales en Europa FUFOSE (Functional Food Science in Europe), conformada por investigadores en áreas relacionadas con nutrición y salud bajo la coordinación del ILSI (International Life Sciences Institute). En el año 1999 esta comisión de la Unión Europea adopta la siguiente definición para hacer referencia a los alimentos funcionales: Un alimento puede ser considerado como “funcional” si se ha demostrado claramente que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejora de la salud y el bienestar y/o reducción del riesgo de enfermedad (Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition* (1999), 81,S1-S27). Un alimento o componente alimenticio funcional puede ser un macronutriente con un efecto fisiológico específico o un micronutriente, pero también puede ser un componente alimenticio que, aunque no tenga un alto valor nutritivo o no sea esencial, su consumo logre la modulación de alguna función en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad. Como es el caso de los ácidos grasos $\Omega 3$, la fibra y algunos microorganismos viables (Roberfroid, 2000). Se considera funcional un alimento en su estado natural, o un alimento al cual se han adicionado, eliminado o modificado uno o más de sus componentes (Roberfroid, 2002). La Comisión Europea regula la comercialización y el consumo de los alimentos funcionales, mediante el Reglamento (CE) N° 1924/2006, relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos. Debe quedar demostrado la cantidad de alimento y las pautas de consumo requeridos para obtener el efecto declarado y solamente se autoriza el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, si se cumplen las siguientes condiciones respecto al componente funcional: (i) se ha demostrado científicamente el efecto beneficioso; (ii) está en el producto final en cantidad

suficiente y en una forma asimilable por el organismo; (iii) la cantidad que razonablemente cabe esperar que se consuma proporciona una cantidad significativa de la sustancia activa; y (iv) el consumidor medio comprende los efectos beneficiosos que se expresan en la declaración.

2.1. Los probióticos.

Desde Persia y Roma, pasando por investigadores como Metchnikoff, Tissier, Kopeloff y hasta la época actual, se tiene el conocimiento de que los microorganismos vivos ingeridos al consumir yogur, producen efectos beneficiosos para la salud. El término probiótico fue usado por primera vez en los años sesenta y después de varias evoluciones se puede definir como: “un microorganismo vivo que cuando se administra en la cantidad adecuada, confiere un beneficio en la salud del huésped” (Reid *et al.*, 2003). La definición de probiótico es aplicable a diferentes microorganismos independientemente de la forma de administración y el sitio de acción, incluyendo la cavidad oral, el intestino, la vagina y la piel (Schrezenmeir and de Vrese, 2001). Existe evidencia de que la administración de probióticos puede ser efectiva en el tratamiento de infección diarreica aguda en niños y en la prevención de diarreas asociadas a infecciones nosocomiales y terapia con antibióticos (Gill and Guarner, 2004; Vanderhoof, 2001). El consumo de probióticos tiene un efecto favorable en el tratamiento y reducción de riesgos derivados de la infección por *Helicobacter pylori*, agente causante de gastritis crónica y relacionado estrechamente con cáncer gástrico (Hamilton-Miller, 2003; Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007). Ciertas cepas probióticas son capaces de estimular la función inmune, aumentando la producción de Inmunoglobulina A intestinal o mediante el control del balance proinflamatorio y antiinflamatorio de las citoquinas. La especificidad en la inmunomodulación de los probióticos, podría permitir su uso en diferentes aplicaciones clínicas, como el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y la dermatitis atópica entre otras (Isolauri *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2005). Ciertas especies de lactobacilos, se relacionan con la prevención de enfermedad coronaria, debido a que su consumo genera la

6

disminución en los niveles séricos de colesterol por diferentes mecanismos, como la producción de HSB y la incorporación de colesterol a la membrana celular (Pereira *et al.*, 2003; Taranto *et al.*, 2000; Zhao and Yang, 2005).

Algunos investigadores consideran que existen ciertas características que necesariamente debe poseer una bacteria con potencial como probiótico, como son: resistencia a la acidez gástrica y a la toxicidad de la bilis, capacidad de adherirse al epitelio intestinal y colonizarlo, producir sustancias antimicrobianas y la modulación del sistema inmune (Dunne *et al.*, 2001). Actualmente se dispone de la secuencia completa del genoma de algunas cepas probióticas, lo que ha facilitado el estudio de su actividad metabólica, sistemas de transporte, respuesta al estrés, producción de proteínas de superficie, bacteriocinas y otros agentes antimicrobianos, esto ha permitido el entendimiento de los mecanismos de su actividad probiótica respecto a la inhibición de patógenos y la modulación del sistema inmune (Rastall *et al.*, 2005). Existen dos maneras de aumentar el número de bacterias beneficiosas para el huésped en el intestino, la primera es la administración oral de microorganismos vivos probióticos y puesto que estos microorganismos normalmente son indígenas de la microbiota del intestino, una segunda estrategia para aumentar su número, es administrarles a aquellos ya presentes en el intestino, una fuente selectiva de carbono y energía (prebióticos) que les dé una ventaja competitiva respecto a las otras bacterias del colon.

2.2. Los prebióticos.

Prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible, que tiene el potencial de mejorar la salud del huésped, por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon (Gibson *et al.*, 2004). La inulina y los fructooligosacáridos (FOS) han sido los prebióticos más estudiados, por su gran resistencia a ser digeridos por los ácidos gástricos y enzimas pancreáticas, llegando al colon para ser fermentados por las bacterias intestinales. Estos prebióticos afectan significativamente la composición de la

microbiota intestinal, reducen la incidencia de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la dermatitis atópica, tienen además un reconocido efecto bifidogénico (Aumento de la población de bifidobacterias en el colon) (Arslanoglu *et al.*, 2007;Guarner, 2007;Kolida and Gibson, 2007;Veereman, 2007). Sin embargo, existe otra gran variedad de candidatos tales como algunos almidones no digeribles, polisacáridos no almidones y azúcares alcoholes, capaces de modificar beneficiosamente la microbiota del colon (Cummings *et al.*, 2001;Wong and Jenkins, 2007). Las dianas convencionales para los prebióticos son especies que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rastall *et al.*, 2005).

Los cambios cualitativos y/o cuantitativos de las especies bacterianas o de los sustratos disponibles en el ecosistema intestinal que se derivan del consumo de prebióticos, generan a su vez cambios en la producción final de metabolitos en el intestino. Los ácidos orgánicos son el principal producto final de las reacciones de fermentación en el colon; acetato, propionato y butirato se producen en mayores proporciones que lactato, succinato, valerato y malato entre otros. El acetato y el propionato son adsorbidos y llegan al hígado a través de la vena porta. El acetato en el hepatocito se incorpora al proceso de lipogénesis y colesterogénesis, mientras que el propionato actúa como inhibidor competitivo impidiendo la entrada del acetato a la célula hepática, es por eso que un aumento en la producción de propionato se asocia con una reducción de los niveles de colesterol. El butirato es una importante fuente energética de las células del epitelio intestinal, regulando el crecimiento y diferenciación del colonocito (Kien *et al.*, 2007;Salminen *et al.*, 1998). Se ha demostrado que después de alimentar ratas con FOS durante 44 días, se logra una producción constante de butirato con efecto proliferativo de mucosa intestinal sana, estimulación de la actividad inmune y protección contra el cáncer de colon (Perrin *et al.*, 2001). El consumo de fibras no digeribles durante 14 días, logró una modificación en la microbiota intestinal de ratas y un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (Campbell *et al.*, 1997). En ratas tratadas con azoximetano y ácido deoxicólico para inducir carcinogénesis, la continua ingestión de gluconato de sodio que aumenta la concentración luminal de butirato, reduce la incidencia de desarrollo del tumor y la

8

generación de cáncer de colon (Kameue *et al.*, 2004). Existe controversia acerca de la influencia del butirato en la prevención del cáncer de colon y no se conocen plenamente los mecanismos por los cuales podría darse tal efecto, sin embargo se presume que la dosis y el tiempo de administración juegan un papel importante en la influencia del butirato para inhibir el desarrollo y la proliferación de las células cancerígenas (Lupton, 2004). Experimentos *in vitro*, realizados con el contenido intestinal de cerdos que habían consumido sorbitol, demostraron un aumento notable de la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente butirato (Kiryama, *et al.*, 1992).

Otros aspectos fisiológicos en los que se ha observado un cambio favorable relacionado con el consumo de prebióticos son:

(i) La regulación del sistema inmune, debida a la interacción de antígenos bacterianos con el abundante tejido linfoide presente en el intestino (10^6 linfocitos/g de tejido), generando un aumento en la producción de Inmunoglobulina A secretora (IgAs), la cual interviene en la primera línea de defensa del sistema inmune. En ratones alimentados con FOS durante cuatro semanas, se observó un incremento en la producción de IgA en heces y de interferón- γ e Interleuquinas 5, 6 y 10 en cultivos de células de las placas de Peyer de los mismos animales (Hosono *et al.*, 2003). En pacientes con enfermedad de Crohn el consumo de 15 g de FOS durante tres semanas logró una estimulación favorable del sistema inmune, un aumento en la población de bifidobacterias y una importante reducción de la enfermedad (Lindsay *et al.*, 2006).

(ii) Los prebióticos son capaces de regular la lipidemia y trigliceridemia en humanos y animales por mecanismos aún desconocidos (Delzenne and Kok, 2001). En pacientes hipercolesterolémicos, la administración de 7g/día de inulina durante cuatro semanas redujo significativamente los niveles de colesterol total, colesterol de alta densidad LDL y triglicéridos (Balcazar-Muñoz *et al.*, 2003b). La disminución en los niveles de colesterol sanguíneo, se ha relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta, el consumo de colesterol por

bacterias probióticas y la capacidad de algunas bacterias de producir hidrolasas de sales biliares (Pereira and Gibson, 2002).

(iii) La proliferación y diferenciación de células de la mucosa intestinal, la cual está directamente relacionada con un aumento en la producción de butirato y que se ha asociado con una disminución significativa del riesgo de cáncer de colon y con una saludable remoción de células dañadas por un regulado proceso apoptótico (Brady *et al.*, 2000; Hughes and Rowland, 2001; Leu *et al.*, 2002).

(iv) Otro efecto positivo del consumo de prebióticos se observó en ratas alimentadas con inulina, las cuales mostraron un incremento en la absorción de calcio y su respectiva fijación en huesos (Roberfroid *et al.*, 2002). El consumo de inulina durante 8 semanas aumentó significativamente la absorción de calcio y la mineralización ósea de adolescentes, siendo esta absorción influenciada también por factores genéticos y la disponibilidad de vitamina D (Abrams *et al.*, 2005). Igualmente, se ha demostrado que la oligofructosa, glucooligosacáridos, galactooligosacáridos y azúcares alcohol, estimulan la absorción y retención de algunos minerales, particularmente magnesio, calcio y hierro (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Scholz-Ahrens *et al.*, 2007).

2.3. Administración conjunta de pro y prebióticos: los "simbióticos".

El término "simbióticos" hace referencia a aquellos alimentos que contienen una mezcla específica de bacterias probióticas y sustancias prebióticas. Esta combinación, potencia los efectos beneficiosos de los probióticos y los prebióticos y está siendo empleada principalmente para la elaboración de alimentos infantiles, con muy buenos resultados en la prevención y tratamiento de desórdenes gastrointestinales y tienen como principal ventaja la persistencia en el tracto gastrointestinal del probiótico (Usenko *et al.*, 2007; Van den Driessche and Veereman-Wauters, 2002). Se ha observado en pacientes post hepatectomía, que el consumo de "simbióticos" reduce significativamente las complicaciones

infecciosas post cirugía (Kanazawa *et al.*, 2005). En pacientes con cáncer de colon se observó una significativa reducción del tumor, posterior a 12 semanas de un tratamiento combinado de oligofruktosa e inulina con *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* (Rafter *et al.*, 2007).

3. INVESTIGACIÓN DE PREBIÓTICOS *IN VIVO*.

La verificación científica de los beneficios para la salud que aportan los prebióticos cuando son consumidos habitualmente, ha llevado a la identificación de marcadores biológicos capaces de sustentar científicamente dichos efectos. Algunos de estos marcadores son: cambios en la microbiota gastrointestinal y en el metabolismo global del ambiente gástrico, como la producción de ácidos orgánicos (Schneeman, 2002); modulación del sistema inmune, valorando procesos inflamatorios e inmunoglobulinas (Calder and Kew, 2002); reducción de riesgo de enfermedades como el cáncer (Rafter, 2002); prevención de enfermedades coronarias por reducción del colesterol (Demigne *et al.*, 1995); determinación de la densidad ósea y la absorción de calcio y otros minerales en la disminución de riesgo de osteoporosis (Weaver and Liebman, 2002). La utilización de modelos animales de experimentación es una importante herramienta en la investigación y verificación de las propiedades beneficiosas derivadas del consumo de prebióticos.

3.1. La rata como modelo animal de investigación.

Existen diferentes especies animales que son utilizadas en experimentación, sin embargo, la rata es un modelo animal con frecuencia empleado debido a características como tamaño pequeño, docilidad, bajo costo y fácil de mantener. La rata es un mamífero y omnívoro, al igual que el hombre, lo que permite que sus dietas sean relativamente comparables, sin embargo existen diferencias en su aparato digestivo. La rata posee un saco voluminoso identificado como ciego que

está localizado entre la parte distal del intestino delgado (el ileon) y la parte proximal del colon, allí se almacena el material no digerible y es fermentado por acción de las bacterias. En el colon de la rata, el tiempo de retención del contenido intestinal es corto con una rápida deshidratación y formación de las heces. En contraste, en el ser humano el colon es el mayor sitio de retención de las materias no digeribles y es allí donde sucede la mayor interacción de las sustancias fermentables con las bacterias intestinales. A pesar de esta diferencia, la rata es un modelo animal que permite una excelente investigación de los procesos que ocurren en el ambiente intestinal y es por ello que ha sido utilizada previamente en algunos estudios para la investigación de prebióticos (Le Blay *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2001; Montesi *et al.*, 2005). La rata Wistar en particular es un animal muy bien adaptado al ambiente del bioterio, tiene una vida media de 2,5 a 3 años, con un periodo gestacional de 3 semanas al cabo de las cuales nacen entre 8 a 12 crías que se destetan a los 28 días con un peso corporal de 20 g aproximadamente, alcanzan la edad adulta a los 120 días con un peso promedio de 380 g. Una dieta equilibrada para la rata Wistar requiere 20% de proteína, 5% de fibra y 5% de grasa, su consumo diario de alimentos es de 100 g/ Kg de peso, con una ingesta de agua de 80 a 110 ml/ Kg de peso.

3.2. Estudio de la microbiota intestinal y la producción de ácidos orgánicos

El intestino humano es el hábitat natural de un gran número de bacterias, las cuales están principalmente concentradas en el colon, con un importante impacto en la fisiología intestinal y en el estado general del huésped. De las relaciones existentes entre el epitelio colónico, los nutrientes disponibles, la variedad y cantidad de bacterias presentes y la interacción de estas con el sistema inmune asociado a la mucosa colónica, dependen importantes funciones fisiológicas, entre otras, la regulación del colesterol, la integridad de la mucosa, la absorción de vitaminas y minerales, el desarrollo de la inmunidad y el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, con todo lo que su deterioro podría implicar sobre la salud del huésped.

El estudio de la microbiota intestinal y las complejas relaciones que establece con el huésped es de fundamental importancia para el desarrollo futuro de la industria alimentaria y la implementación de nuevos prebióticos. El número total de bacterias en el intestino humano, 10^{14} ufc/g, es de diez a veinte veces mayor que el número total de células de todos los tejidos del cuerpo (Suau *et al.*, 1999), por lo que esa masa celular, biológicamente activa, ejerce una gran influencia sobre la salud o enfermedad del huésped. Las técnicas de cultivo tradicionales no logran satisfacer completamente las expectativas en el estudio de la microbiota intestinal, limitándose solo a una pequeña parte de la población debido a la gran cantidad de bacterias no cultivables, la limitada variedad de medios de cultivo selectivos y a la complejidad de las pruebas bioquímicas. Los métodos moleculares en la caracterización de los genes que codifican para el 16S rRNA, han facilitado la investigación de la microbiota de ambientes complejos como el intestino. La separación de los productos amplificados por PCR en una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), produce un perfil de bandas característico de las especies bacterianas presentes, ese perfil se genera por diferencias en la estabilidad química de los fragmentos amplificados en relación con un gradiente de desnaturalización, diferenciando los fragmentos de los genes que codifican para el 16S rRNA por la composición de sus bases. PCR-DGGE puede permitir una apreciación casi semicuantitativa al comparar la intensidad de las bandas generadas por dos o más muestras que han sido procesadas bajo las mismas condiciones. La secuenciación de productos de PCR reamplificados directamente de las bandas de DNA escindidas del gel, permite la identificación al nivel de género o especie. La técnica PCR-DGGE ha sido utilizada por otros autores en previos estudios de la microbiota intestinal, para evaluar su modificación en procesos patológicos como la colitis en ratones (Bibiloni *et al.*, 2005), la enfermedad de Crohn (Scanlan *et al.*, 2006) y los cambios de la microbiota posteriores a la administración de prebióticos o probióticos (Deng *et al.*, 2007; Garcia-Albiach *et al.*, 2008; Montesi *et al.*, 2005a; Vanhoutte *et al.*, 2006). Una cuantificación definitiva de una determinada especie o cepa bacteriana presente en un ecosistema complejo, puede lograrse mediante el uso de la técnica PCR cuantitativa y el empleo de cebadores específicos que logren amplificar una

secuencia presente en copia única dentro del genoma de la bacteria a cuantificar, lo cual permite establecer una relación directa entre el número de fragmentos amplificados y el número de bacterias presentes en la muestra.

Determinar con exactitud la cantidad total de ácidos orgánicos producida diariamente en un organismo es bastante difícil, ya que muchos de ellos entran vía porta a la circulación y son rápidamente metabolizados principalmente en el epitelio intestinal, hígado y músculo. Aun así, es posible hacer una estimación de un aumento en la producción de ácidos orgánicos, cuando se logra hacer una determinación fiable de su presencia en el contenido intestinal y en las heces utilizando métodos cuantitativos. La técnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography) es sensible y precisa, con un alto poder de resolución y reproducibilidad de los resultados y ha sido utilizada previamente para la determinación de ácidos orgánicos en el estudio de prebióticos (Fernandes *et al.*, 2000; Guerrant *et al.*, 1982; Manderson *et al.*, 2005).

3.3. Aumento en la producción de inmunoglobulina A intestinal.

El tracto gastrointestinal es un importante órgano linfático que participa en la regulación inmunológica del organismo, la mucosa intestinal es una barrera protectora contra la colonización de patógenos mediante procesos de exclusión y eliminación inmune, es además, el sitio más importante de presentación antigénica manteniendo la homeostasis por reconocimiento de los antígenos como peligrosos y no peligrosos, jugando un papel fundamental en el control de procesos alérgicos. La regulación inmunofisiológica del intestino está influenciada por la microbiota, la dieta y los antígenos circulantes, es por ello, que el consumo de sustancias que logren modificar el ecosistema intestinal tiene una influencia directa sobre el sistema inmune, como es el caso de los prebióticos.

Uno de los marcadores fundamentales para evaluar si los cambios en el ecosistema intestinal relacionados con el sistema inmune son o no favorables, es

la cuantificación de la inmunoglobulina A secretora (IgAs). La IgAs es un dímero de la unidad básica de inmunoglobulina A unido a un componente secretor (polipéptido glicosilado) que le permite mayor estabilidad para el transporte en las membranas, adherencia al mucus y protección contra la digestión proteolítica, con la ventaja adicional que no activa el complemento y no genera reacción inflamatoria. La IgAs es producida por linfocitos B en la lámina propia y es transportada a la superficie de las mucosas. Se encuentra en todas las mucosas y secreciones del organismo pero principalmente en la mucosa intestinal, donde su papel fundamental es la neutralización de virus y antígenos proteicos alimentarios, impidiendo su entrada al torrente sanguíneo y participando en la presentación antigénica. La cuantificación de los niveles de IgAs en muestras intestinales se realiza generalmente mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) tipo sándwich y ha sido previamente utilizada por otros autores en el estudio del efecto de prebióticos como isomaltooligosacáridos o inulina en el sistema inmune (Mizubuchi *et al.*, 2005; Roller *et al.*, 2004).

4. PRODUCCIÓN DE HIDROLASAS DE SALES BILIARES (HSB) POR BACTERIAS INTESTINALES.

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de moléculas de colesterol y secretados como sus conjugados con glicina o taurina en el intestino delgado, en donde emulsionan grasas y vitaminas liposolubles facilitando su absorción. En humanos hay dos sales biliares principales, el ácido cólico (CA) y el ácido quenodeoxicólico (CDCA) y tres secundarias, ácido deoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA) y ácido deursodeoxicólico (UDCA), con sus respectivas glicinas y taurinas conjugadas, estas quince sales biliares están también presentes en ratas (Ando *et al.*, 2006). Una vez cumplen su función digestiva, aproximadamente el 95% de las sales biliares regresan al hígado para su reutilización varias veces al día cumpliendo un ciclo enterohepático, el 5% restante son eliminados por acción de los microorganismos de la microbiota intestinal al sufrir deshidroxilación a ácidos biliares secundarios ó deconjugación de la glicina o de la taurina, perdiendo

su acción emulsificante de las grasas, precipitando y siendo eliminadas por las heces. El hígado responde a esa pérdida de sales biliares con un aumento de la síntesis a partir de colesterol endógeno, favoreciendo la disminución de los niveles de colesterol en el organismo.

La deconjugación de las sales biliares es catalizada por los enzimas hidrolasas de sales biliares (HSB), los cuales han sido detectados en bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Begley *et al.*, 2006). La función de las HSB en las bacterias intestinales no es aún bien conocida, pero se cree que al desconjugar las sales biliares, las bacterias pueden aprovechar los aminoácidos liberados como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Así, en *Bifidobacterium longum* la transcripción del gen *bsh* está acoplada a la de un gen homólogo a *glnE*, el cual codifica una glutamina sintetasa adeniltransferasa que forma parte de la ruta de regulación del metabolismo del nitrógeno (Tanaka *et al.*, 2000). Otras funciones adscritas a las HSB están relacionadas con la modificación de la superficie celular bacteriana, al facilitar por ejemplo, la incorporación del colesterol en la membrana, lo cual potencialmente podría aumentar la resistencia a la lisis bacteriana y favorecer su persistencia en el intestino (Dambekodi and Gilliland, 1998). Igualmente, mutantes para genes que codifican HSB en *Lactobacillus plantarum* (De Smet *et al.*, 1995) y en *Listeria monocytogenes* (Begley *et al.*, 2005) son más sensibles a la presencia de bilis y sales biliares, esto apoya la hipótesis de la función de HSB como aumento de la supervivencia en el intestino. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que las HSB juegan un papel en la tolerancia a la bilis, no está todavía esclarecido y otros factores podrían intervenir. Así, en *Lactobacillus* se ha demostrado que el ácido biliar DCA es más tóxico que la sal taurodeoxicolato (TDCA) (Taranto *et al.*, 2006). La naturaleza química de las HSB ha sido estudiada en varios microorganismos y aunque se han encontrado marcadas diferencias de una especie a otra, tienen en común su naturaleza polipeptídica, especificidad de sustrato y una actividad óptima a pH ácido (Lundeen and Savage, 1992; Tanaka *et al.*, 2000).

5. TAXONOMÍA E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS.

La clasificación taxonómica en procariotas ha evolucionado continuamente de forma paralela a los avances en las técnicas de laboratorio, permitiendo cada día el uso de mayor información para la adecuada discriminación de las especies. El desarrollo de la taxonomía numérica por Sokal y Sneath en la década de los setenta (SNEATH and SOKAL, 1962) y los acelerados avances en informática, hacen posible en la actualidad el manejo de grandes cantidades de datos que reúnen las características de un gran número de cepas bacterianas. Esto sumado al desarrollo de la biología molecular durante los años 60 que permitió el conocimiento de las propiedades del DNA, han hecho de la taxonomía una ciencia en continua evolución, que permite la adecuada clasificación de las especies. Para la clasificación de los organismos en grupos o taxones en función de sus semejanzas, es necesaria la aplicación de un variado número de técnicas que permitan conocer sus características fenotípicas y su información genética, la integración de estos parámetros y la medición de las relaciones existentes entre ellos se conoce como "taxonomía polifásica" (Vandamme *et al.*, 1996). Entre las características fenotípicas que tienen valor discriminativo entre cepas o especies bacterianas tenemos: composición química de la pared celular, requerimientos nutricionales, capacidad de usar diferentes fuentes de carbono, productos de fermentación, tolerancia a diferentes temperaturas, crecimiento a diferentes concentraciones de sal o diferentes pH, características inmunológicas, sensibilidad a antibióticos, ácidos grasos celulares, etc. La información genética hace referencia a la que puede ser obtenida desde los ácidos nucleicos y ésta puede ser directa, como en el caso de la secuenciación o indirecta a través de parámetros como la hibridación DNA-DNA o el porcentaje de guanina más citosina (G+C).

La unidad taxonómica en microbiología es la cepa, que corresponde a una población de células genéticamente idénticas derivadas de la división sucesiva de una sola célula. Un grupo de cepas que muestran un alto grado de similitud entre ellas y difieren considerablemente de otro grupo de cepas con respecto a unas

determinadas características, se denomina especie. El parámetro numérico más aceptado para establecer los límites entre especies en procariotas, es la similitud de su DNA expresado como porcentaje, el cual debe ser mayor al 70% entre cepas de la misma especie sometidas a un análisis de hibridación DNA-DNA (Rossello-Mora and Amann, 2001). Otro parámetro aceptado en la clasificación de especies consiste en la temperatura de fusión T_m (temperatura a la cual el 50% de la cadena de DNA está disociada), dicha temperatura depende de la longitud de la molécula, en moléculas de DNA grandes como genomas completos y a una concentración de sales fija, la T_m es característica para cada especie, ya que depende exclusivamente de la proporción de guanina más citosina presentes, entre cepas de la misma especie la diferencia en la T_m debe ser inferior a 5°C (Grimont, 1988).

5.1. El género *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* está conformado por bacilos o cocobacilos Gram positivos, no formadores de esporas, estrictamente fermentativos, anaerobios facultativos, con importantes requerimientos nutricionales y un contenido de G+C en su DNA inferior al 50%. Beijerinck en 1901 propone el género *Lactobacillus* y Orlan-Jensen en 1919 hace una primera clasificación de este grupo basado en características morfológicas, de crecimiento y la utilización de algunos azúcares. Con glucosa como fuente de carbono, los *Lactobacillus* pueden ser homofermentativos, cuando el producto final de su metabolismo es casi exclusivamente ácido láctico, o heterofermentativos cuando producen una mezcla de ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético. Esta característica permitió a Kandler y Weiss en 1986 clasificar los *Lactobacillus* en tres grupos: grupo A, homofermentativos obligados, solo pueden fermentar los azúcares por la vía de la glucólisis, poseen el enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa, pero carecen de fosfoetolasa, por lo que no fermentan pentosas ni gluconato; grupo B, heterofermentativos facultativos, poseen tanto fructosa-1,6-bifosfato aldolasa como fosfoetolasa; grupo C, heterofermentativos estrictos, solo pueden fermentar las

hexosas por la vía de las pentosas fosfato, también denominada vía del fosfogluconato, debido a que carecen de fructosa-1,6-difosfato aldolasa (Wood and Holzapel 1995). En 1991 Collins y col. basándose en el análisis de las relaciones filogenéticas de acuerdo a la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA, forman tres subgrupos que no difieren mucho de la primera clasificación: grupo **a** de *Lactobacillus delbrueckii*; grupo **b** de *Lactobacillus casei-Pediococcus*; y grupo **c** de *Leuconostoc* (Vandamme *et al.*, 1996). La utilización de letras mayúsculas para asignar los grupos según las características fenotípicas y las letras minúsculas para los grupos filogenéticos se debe a Hammes and Vogel, que en 1995 propusieron una nomenclatura basada en la combinación de ambas propiedades. Así por ejemplo Aa sería un *Lactobacillus* homofermentativo obligado del grupo filogenético de *L. delbrueckii* (Vandamme *et al.*, 1996). Actualmente el género *Lactobacillus* cuenta con algo más de 80 especies reconocidas, caracterizadas por una alta diversidad, la disponibilidad de las secuencias completas del genoma de algunos miembros de este género ha permitido confirmar su extrema divergencia, que se refleja en la dificultad para su clasificación taxonómica (Canchaya *et al.*, 2006). Los *Lactobacillus* son habitantes normales del tracto gastrointestinal y mucosas de mamíferos y otros animales, también se encuentran en vegetales y en alimentos fermentados de origen animal y vegetal, en la industria alimentaria y desde tiempos antiguos los lactobacilos han sido utilizados para la elaboración y conservación de alimentos. Se cree desde la antigüedad y actualmente se ha comprobado, que algunos *Lactobacillus* tienen propiedades beneficiosas para la salud resultado de su consumo y permanencia en el tracto gastrointestinal, en algunas cepas de *Lactobacillus* se ha comprobado científicamente dichas propiedades beneficiosas (cepas probióticas). En la tabla 1 se muestra una relación de las especies de lactobacilos más comúnmente utilizadas como probióticos en humanos (Sanders and Klaenhammer, 2001). En la actualidad una de las principales áreas de investigación en el género *Lactobacillus*, se basa en la comprobación de las propiedades probióticas que tienen muchos de sus miembros. El descubrimiento de nuevos probióticos o nuevas aplicaciones de los ya existentes, genera grandes expectativas para el desarrollo en campos como la nutrición, la salud y la industria alimentaria.

Homofermentativo obligado	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obligado
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>		

Tabla 1. Especies de *Lactobacillus* usadas como probióticos en humanos. Tomado de Sanders and Klaenhammer, 2001.

5.2. El grupo de *Lactobacillus acidophilus*.

L. acidophilus fue aislado y cultivado por primera vez por Moro en el año 1900 a partir de heces de lactante. En 1901 Rodella lo aisló nuevamente de heces y observó su pleomorfismo desde formas cocoides hasta largos bacilos en los medios de cultivo. Weiss, en 1904, comprobó que el consumo de grandes cantidades de leche producía el incremento en heces, de los *Lactobacillus* referidos por Moro. Doderlein en 1892 descubrió un “bacilo ácido” en secreciones normales de vagina y Jotten en 1922 lo relacionó con *L. acidophilus* (Kulp and Rettger, 1924). Hasta la década de los 70 todos los aislamientos de este microorganismo a partir de diferentes muestras eran considerados como *L. acidophilus*, aunque ya se hacía referencia a una marcada heterogeneidad dentro del grupo y a la posible existencia de diferentes tipos de *L. acidophilus* (Carlsson and Gothefors, 1975). En los años 80 Johnson y col. y Lauer y col. (Jonson *et al.*, 1980; Lauer and Kandler, 1980) de manera independiente lograron hacer una clasificación de este grupo basados en la homología del DNA, esta clasificación permanece vigente y comprende seis especies, las cuales no son fácilmente

diferenciables por análisis fenotípicos tradicionales (Tabla 2) (Klein *et al.*, 1998). En general todas las especies del grupo son bacilos de longitud variable que se disponen aislados o por pares, frecuentemente algo flexionados en la unión. Las colonias son generalmente pequeñas y pueden variar en su forma: de la opaca, redonda y lisa, a aplanada, translúcida e irregular.

Especie	Primera descripción	DNA- Homología	
		Johnson y col.	Lauer y col.
<i>L. acidophilus</i>	Moro, 1900; Hansen y Moquot 1970	A1	Ia
<i>L. crispatus</i>	Brygoo y Aladame 1953; Cato <i>et al</i> 1983	A2	Ib
<i>L. amylovorus</i>	Nakamura 1981.	A3	Ic
<i>L. gallinarum</i>	Fujisawa <i>et al</i> 1992.	A4	Id
<i>L. gasseri</i>	Lauer y Kandler 1980	B1	IIa
<i>L. johnsonii</i>	Fujisawa, 1992	B2	IIb

Tabla 2. Descripción de las especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*. Tomado de (Klein *et al.*, 1998).

Algunas cepas pertenecientes a especies del grupo de *L. acidophilus* han sido utilizadas como probióticos en humanos y animales, en general poseen diferentes características que les permiten la supervivencia y colonización en el tracto gastrointestinal: la resistencia a las sales biliares, tolerancia a pH ácido, adherencia a la mucosa intestinal y actividad antimicrobiana frente a patógenos intestinales por inhibición competitiva ó la producción de bacteriocinas (Fernández *et al.*, 2003; Kos *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2000). Los beneficios que el consumo de estos probióticos genera en el huésped han sido importante materia de estudio en los últimos años. Por ejemplo, otros autores han propuesto el uso de *Lactobacillus crispatus* para el tratamiento de infecciones urinarias recurrentes en mujeres,

gracias a su adherencia al epitelio vaginal (Kwok *et al.*, 2006); *Lactobacillus johnsonii* tiene efecto antiinflamatorio en la mucosa gástrica afectada por *H. pylori* (Sgouras *et al.*, 2005), este efecto también ha sido observado para *Lactobacillus gasseri* cepa OLL2716 (Sakamoto *et al.*, 2001).

5.3. Métodos para la clasificación taxonómica de bacterias.

Para una adecuada clasificación taxonómica es importante tener en cuenta los parámetros fenotípicos, los genotípicos y los filogénicos. Una amplia variedad de técnicas pueden ser utilizadas rutinariamente para la clasificación de bacterias, sin embargo, el correcto uso de la información que nos brindan dichas técnicas es esencial para hacer una adecuada agrupación de los organismos en un determinado taxón. En la figura 1 se puede apreciar la información taxonómica aportada y el grado de discriminación de algunas de las pruebas comúnmente utilizadas (Vandamme *et al.*, 1996).

5.3.1. Técnicas moleculares en la clasificación taxonómica de bacterias

5.3.1.1. Hibridación DNA-DNA.

La hibridación DNA-DNA es un parámetro indirecto para conocer la similitud entre los genomas completos de dos diferentes microorganismos, se expresa en porcentaje, siendo el 100% la hibridación entre dos cadenas sencillas de DNA del mismo microorganismo en estrictas y controladas condiciones experimentales. Diferentes métodos han sido descritos para establecer dicha relación entre dos hebras de DNA, los más conocidos son: la hibridación de dos hebras de DNA monocatenario en medio líquido y la posterior comparación de la temperatura de fusión de los DNA originales y del híbrido obtenido (De Ley *et al.*, 1970); método de la hydroxiapatita (Brenner *et al.*, 1969), posteriormente modificado a micro-

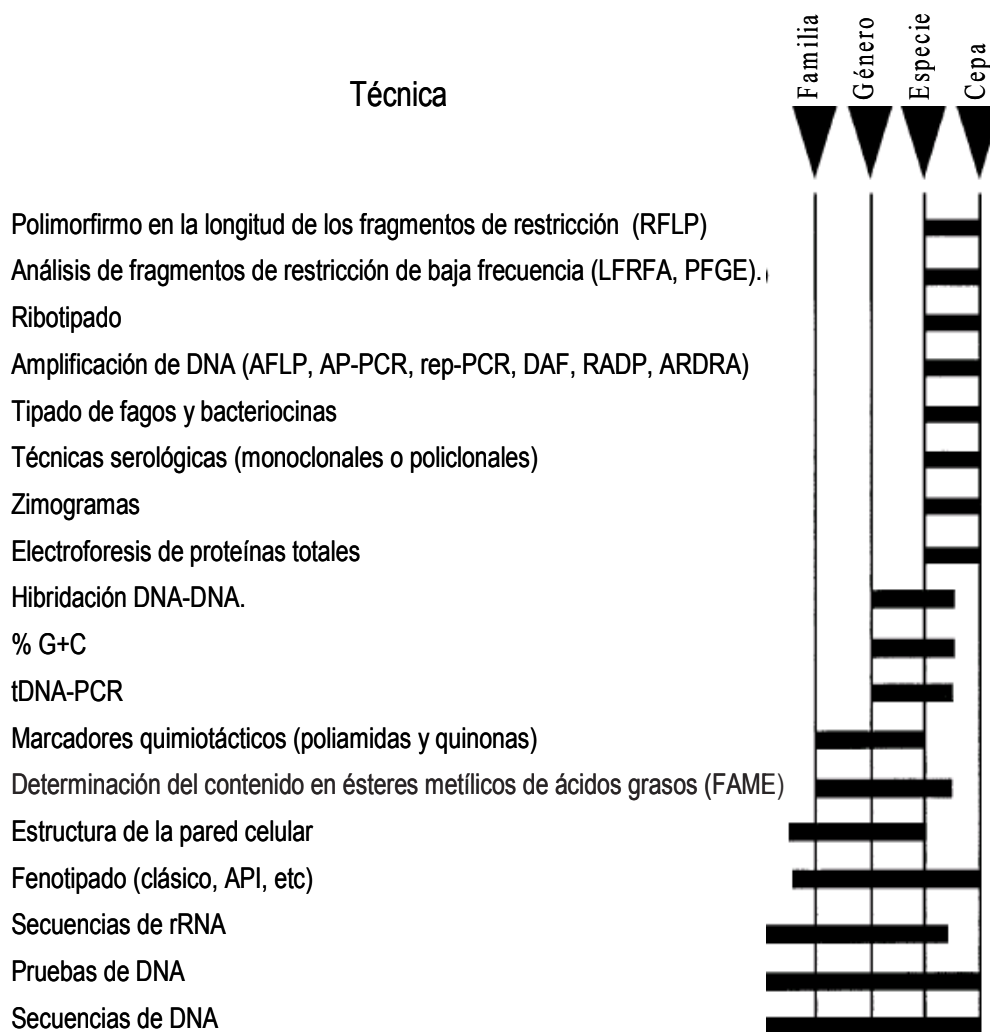


Figura 1. Esquema comparativo del nivel de resolución de algunas técnicas utilizadas comúnmente en la clasificación de bacterias. Tomado de Vandamme *et al* (1996). PFGE, electroforesis de campo pulsado; AFLP, amplificación de fragmentos de tamaño polimórfico; AP-PCR, amplificación por PCR con cebadores arbitrarios; rep-PCR, amplificación por PCR de elementos extragénicos palindrómicos repetidos; ARDRA, análisis de restricción de DNA ribosómico amplificado por PCR; DAF, huellas dactilares por amplificación de DNA; RADP, amplificación aleatoria de segmentos de DNA.

escala utilizando menores cantidades de DNA y marcador digoxigenina (Ziemke *et al.*, 1998); método de la nucleasa S1 (Crosa *et al.*, 1973); hibridación en filtros de membrana (Johnson,1985); hibridación en placas de microdilución con cuantificación fluorimétrica (Ezaki *et al.*, 1988). En general el método está basado en la formación de moléculas de doble cadena, por reasociación entre dos muestras de DNA de distintos microorganismos desnaturalizado por calentamiento a 100°C, en donde una de las cadenas está marcada con un radioisótopo o colorante fluorescente, la reasociación de las cadenas se realiza en unas determinadas condiciones de concentración de sal y temperatura. En la figura 2 se observa un esquema de la hibridación DNA-DNA cuando una de las dos hebras de DNA se encuentra adherida a una matriz como en el caso de las membranas de nylon.

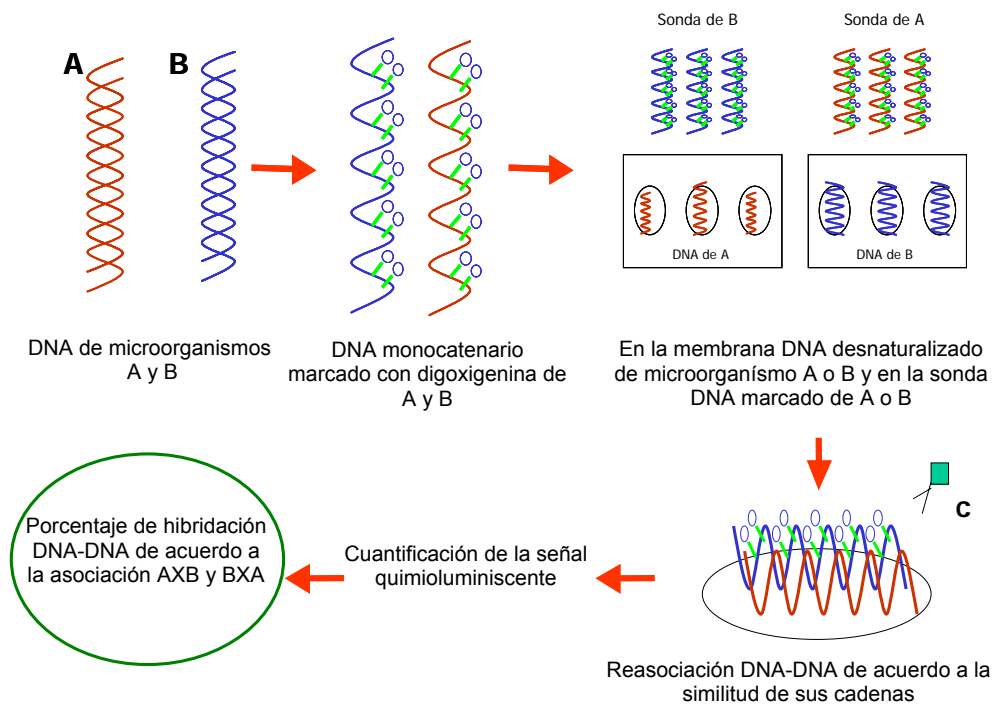


Figura 2. Esquema de la hibridación DNA-DNA cuando DNA monocatenario del microorganismo A o B se encuentra adherido a una membrana o marcado con digoxigenina; **A** y **B**, DNA genómico de dos microorganismos diferentes; **C** anticuerpo antidigoxigenina marcado con una sustancia quimioluminiscente.

En el informe del comité para la re-evaluación de la definición de especie en bacteriología, se ha considerado el valor de 70% de similitud entre dos hebras de DNA en la hibridación DNA-DNA, propuesto por Rosello-Mora en el 2001, como el límite para considerar que dos cepas se pueden clasificar dentro de la misma especie en procariotas (Rosello-Mora and Amann, 2001; Stackebrandt *et al.*, 2002), sin embargo, algunos autores consideran que este parámetro es demasiado amplio en comparación con las eucariotas, si se tiene en cuenta por ejemplo, que el porcentaje de asociación del DNA entre el humano y diferentes primates está alrededor del 97%, lo que los ubicaría dentro de la misma especie (Oren, 2004). Además teniendo en cuenta que los procariotas son numéricamente los organismos más abundantes que habitan sobre la tierra, siendo un importante reservorio de biodiversidad del cual aún se tiene mucho desconocimiento, es posible que la actual definición de especie en procariotas basada en la hibridación DNA-DNA y el límite establecido del 70% puedan ser modificados en el futuro (Konstantinidis *et al.*, 2006)

5.3.1.2. Secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y análisis filogenético.

Carl Woese en 1990 basado en la comparación de secuencias de los genes que codifican el 16S rRNA, propuso la hoy aceptada división de los organismos vivos en tres dominios, Archaea, Bacteria y Eucaria (Woese *et al.*, 1990). El ribosoma bacteriano de sedimentación 70S (unidades Svedberg) está compuesto por dos subunidades 30S y 50S, la subunidad 30S contiene una molécula de 16S rRNA y la subunidad 50S contiene rRNA 5S y 23S. Estos tres fragmentos 5S, 16S y 23S han sido utilizados por diferentes investigadores para realizar estudios filogenéticos, pero es el 16S con sus aproximadamente 1550 pares de bases es el más adecuado para estudios en procariotas. Al ser una secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S rRNA se pliega en una estructura secundaria conformando segmentos de doble cadena y segmentos de cadena sencilla, algunos de estos segmentos son altamente conservados y otros presentan

variaciones generalmente concentradas en zonas específicas, esto hace posible encontrar regiones de 20 o más bases que son exclusivas de microorganismos pertenecientes a un determinado grupo filogenético. Estas zonas con una variabilidad específica para determinado grupo, han hecho posible la elaboración de sondas o cebadores específicos para la investigación y seguimiento de poblaciones bacterianas en medios complejos. La estabilidad de especies de *Lactobacillus* y algunas otras bacterias ácido lácticas relacionadas como *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*, han sido estudiadas en el tracto gastrointestinal humano gracias a la elaboración de cebadores específicos basados en secuencias del gen que codifica el 16S rRNA (Heilig *et al.*, 2002). *Lactobacillus fermentum* agente causal de caries dental puede ser fácil y rápidamente diagnosticado en muestras bucales, con cebadores específicos de especie, basados en secuencias conservadas del gen que codifica el 16S rRNA (Dickson *et al.*, 2005). Existen entre 1 y 15 copias de los genes que codifican el 16S rRNA en el genoma completo de una bacteria y aunque se ha observado que puede haber una cierta variabilidad entre las copias, por lo general suelen ser idénticas.

La filogenia estudia las relaciones evolutivas entre los organismos y trata de establecer líneas, similares a los árboles genealógicos, donde se refleje la descendencia y grado de parentesco entre grupos de seres vivos. La filogenética es la ciencia dedicada al estudio de las relaciones evolutivas basadas en caracteres homólogos dependientes de un antepasado común reciente y que apuntan al linaje evolutivo, estas relaciones se representan en un árbol en el cual cada rama representa un grupo (monofilético) de organismos y cada nodo su antepasado común más reciente. En filogenética molecular los datos sobre los que se basa el árbol son secuencias de genes o de aminoácidos de una proteína en forma de un alineamiento múltiple, en el que se pueden analizar las distancias entre las secuencias o los caracteres individuales encontrados en las mismas. Existen diferentes métodos de reconstrucción filogenética, el UPGMA, de las siglas en inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, es uno de los más sencillos y se basa en la existencia de un reloj molecular evolutivo,

26

asumiendo que el ritmo de cambios de una determinada molécula es similar a lo largo de la historia en distintos organismos (Drummond and Rodrigo, 2000). El método de Neighbor Joining (NJ) basado también en las distancias entre secuencias es uno de los más utilizados, se basa en el principio de evolución mínima y busca el árbol más sencillo en el que la distancia entre los grupos sea la más corta sin tener en cuenta el principio del reloj molecular evolutivo (Saitou and Nei, 1987). El método de Máxima Parsimonia (MP) analiza caracteres de las secuencias y se basa en la búsqueda del árbol en el que el menor número de cambios explique la filogenia del grupo, siguiendo el principio de parsimonia (la hipótesis más sencilla es siempre la más deseable). El método de máxima verosimilitud (ML), de las siglas en inglés Maximum Likelihood, consiste en encontrar el árbol con más alta probabilidad de haber dado lugar a los datos observados, la estimación filogenética mediante máxima verosimilitud debe basarse en un modelo evolutivo cuidadosamente seleccionado para el cálculo de probabilidades (Tuffley and Steel, 1997). El método Bayesiano (BY) evalúa para cada árbol, de los muchos que pueden ser conformados dependiendo del número de secuencias analizadas, la probabilidad de ser el correcto, así podremos saber si además del árbol más probable obtenido por ML existen otros con probabilidad similar (Ball, 2001). La aplicación de estos métodos puede hacerse repetidas veces para las mismas secuencias alineadas y obtener como resultado final un árbol consenso en el que se expresa el número de veces que un determinado nodo coincide respecto al total de árboles formados, esto es lo que se conoce como "*Bootstrapping*". Afortunadamente la bioinformática ha puesto a disposición de la filogenética múltiples programas de alineamiento y análisis de secuencias que permiten realizar un adecuado estudio evolutivo de las especies en relativamente corto tiempo y de forma sencilla, es criterio del investigador elegir correctamente las alternativas que ha de utilizar y la interpretación de los resultados obtenidos.

5.3.1.3. Otros genes utilizados en estudios filogenéticos.

El análisis de secuencias de genes que codifican para determinadas proteínas tiene gran utilidad en el estudio de las relaciones evolutivas entre especies y consiste en analizar en un determinado gen, un fragmento interno cuyo nivel de variabilidad proporcione un alto grado de discriminación. Algunas de estas secuencias que han sido utilizadas para la caracterización e identificación de especies bacterianas son la subunidad alfa de la RNA polimerasa (*rpoA*) y fenilalanina tRNA sintetasa (*pheS*) para la identificación de enterococos (Naser *et al.*, 2005), el factor de elongación EF-2 (*fusA*), isoleusina tRNA sintetasa (*ileS*) y leucina tRNA sintetasa (*leuS*) para la tipificación de *Lactobacillus casei* (DIANCOURT *et al.*, 2007) entre otros.

El gen *recA*, inicialmente estudiado en *E. coli*, codifica la proteína recombinasa A de 325 aminoácidos y un peso molecular de 38 kDa. Esta proteína forma parte del sistema SOS de reparación del DNA. Cuando el DNA sufre daño, la proteína recombinasa A activa su capacidad proteolítica provocando la degradación del represor LexA, permitiendo la transcripción de los genes del sistema SOS y estimulando los mecanismos de reparación celular, cuando cesa el daño celular se recuperan los niveles basales de recombinasa A y de LexA reprimiéndose nuevamente el regulón (Ivancic-Bace *et al.*, 2006; Little *et al.*, 1981). La secuencia de DNA del gen *recA* que codifica para la proteína recombinasa A ha sido utilizada para establecer relaciones taxonómicas y filogenéticas en la clasificación de algunas especies (Blackwood *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2005), en el caso de bacterias del género *Lactobacillus* ha sido utilizado para la clasificación de *L. casei* y *L. plantarum* entre otros (Dellaglio *et al.*, 2004; Felis *et al.*, 2001).

El extraordinario avance en las técnicas de secuenciación durante los últimos años, ha permitido la obtención de la secuencia genómica de numerosas especies bacterianas, la mayoría de ellas ya disponibles en bases de datos públicas (EMBL, GenBank, etc), o incluso el origen de consorcios para la secuenciación masiva de genomas con sus propias bases de datos abiertas, como

el DOE Joint Genome Institute (www.jgi.doe.com/). La comparación directa de dos secuencias genómicas sería el modo ideal de establecer relaciones taxonómicas y filogenéticas. No obstante, la obtención de la secuencia genómica completa de un determinado microorganismo no es accesible a cualquier laboratorio y las cepas bacterianas cuyo genoma se ha secuenciado pertenecen normalmente a especies representativas, o de interés para la industria o la salud. Sin embargo, la obtención de secuencias completas y su anotación ha permitido diseñar “arrays” y “microarrays” que, si bien se utilizan normalmente para estudios de expresión génica (transcriptómica), pueden también emplearse con éxito en estudios de Hibridación Genómica Comparada (CGH).

5.3.1.4. Hibridación en “microarrays”

En la década de los 80 científicos de la empresa Affymetrix desarrollaron una novedosa tecnología basada en la ordenación de oligonucleótidos en una superficie sólida (Fodor *et al.*, 1993), esta tecnología denominada genechips, dio posteriormente origen a los “microarrays”. El principio básico de los “microarrays” es la complementariedad en la hibridación de los ácidos nucleicos, con la alta especificidad y selectividad de técnicas tradicionales como el Southern o Northern pero a diferencia de estas, los “microarrays” permiten realizar estudios que rinden cantidades masivas de información con cantidades relativamente pequeñas de muestra, e incluso la hibridación simultánea con dos muestras marcadas con diferentes fluoróforos (Lida and Nishimura, 2002). Los “microarrays” combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y la detección por fluorescencia, están diseñados a partir de ácidos nucleicos como cDNA, oligonucleótidos, productos de PCR o moléculas de DNA monocatenario o RNA ordenadas e inmovilizadas por microimpresión, o generadas *in situ* sobre un sustrato sólido, formando una matriz en dos dimensiones, sobre la cual se incuban muestras del DNA a analizar marcado, permitiendo la hibridación de cadenas complementarias que puede ser posteriormente cuantificada. En la actualidad existen diversas bases de datos capaces de recibir los resultados obtenidos en los “arrays” como el “Microarray”

Suite (MAS) 5.0 método de Affymetrix y el robust multichip average (RMA) usados comúnmente en la práctica (Bolstad *et al.*,2003), pero se hace necesaria la estandarización de los procedimientos de análisis y almacenamiento de la información, encontrando unas normas comunes que se puedan aplicar a las herramientas informáticas empleadas (Affara, 2003;Bowtell, 1999;Verducci *et al.*, 2006). En la figura 3 se puede observar un esquema sencillo de la fabricación y el uso de los “*microarrays*”.

Respecto a la sensibilidad, análisis realizados por la empresa Affymetrix revelan que los “*microarrays*” pueden detectar una molécula entre 100.000 con un margen de error inferior al 1% y una gran reproducibilidad de los resultados (Affymetrix 2007). La aplicación inicial de los “*biochips*” de DNA fue la determinación de perfiles de transcripción, pero actualmente se utilizan también para investigación a nivel genómico en la detección de polimorfismos puntuales o variaciones del genoma mediante “*arrays*” de Hibridación Genómica Comparada (CGH) (Barrett *et al.*, 2004;Edwards-Ingram *et al.*, 2007). En experimentos con muestras humanas, los “*microarrays*” han sido utilizados en la investigación de la regulación y expresión de genes relacionados con diferentes tipos de cáncer, en el seguimiento de los efectos metabólicos de algunos fármacos y la investigación de complejos procesos metabólicos (Macgregor and Squire, 2002;Ross *et al.*, 2002;Vignaud *et al.*, 2005). En microbiología son muchos los aportes de esta novedosa tecnología, por ejemplo: los “*microarrays*” han sido utilizados para analizar las diferencias en la expresión génica de *L. acidophilus* (cepa NCFM) cuando este microorganismo es cultivado en presencia de diferentes carbohidratos (Barrangou *et al.*, 2006). En *L. johnsonii* (cepa NCC533) mediante el uso de “*microarrays*” se han estudiado las diferencias de expresión génica entre las condiciones de crecimiento en un medio complejo como la mucosa intestinal y en medio de cultivo (Denou *et al.*, 2007). En *Lactobacillus plantarum* se ha estudiado la diversidad génica de 20 cepas de esta especie mediante el uso de “*microarrays*” (Molenaar *et al.*, 2005). En un “*microarray*” que incluye el 96% de los genes con

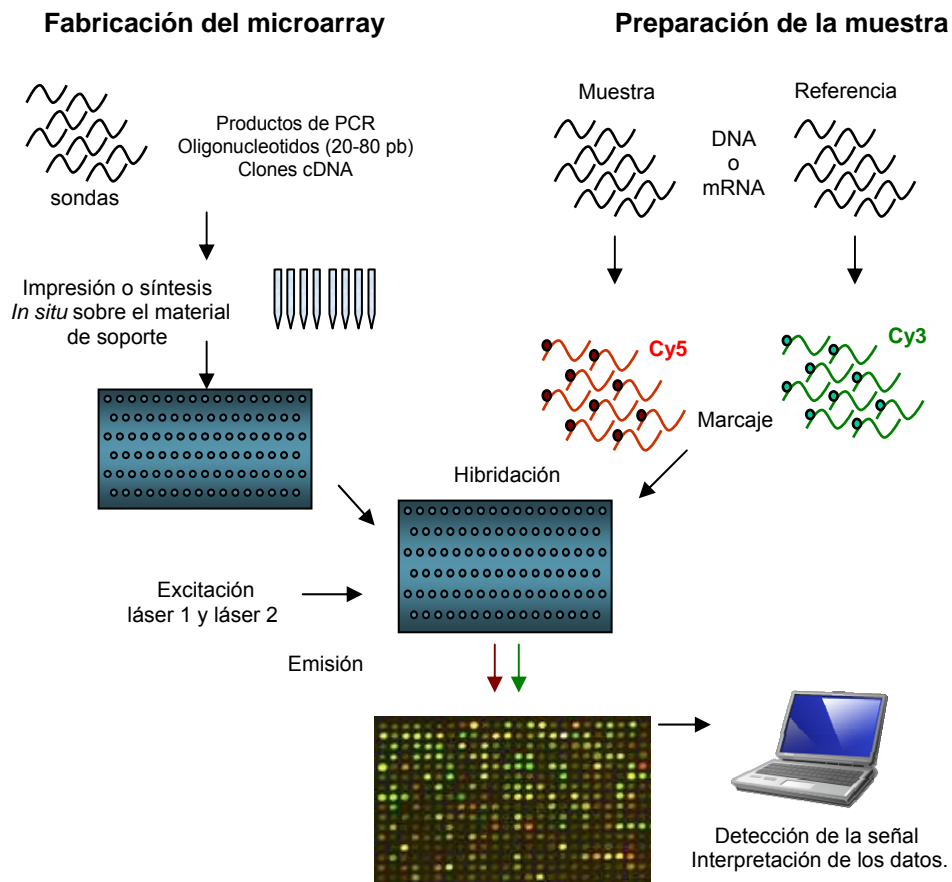


Figura.3. Esquema de la fabricación y utilización de “*microarrays*”. Las sondas que se depositan en la superficie del soporte son generadas por PCR a partir de clones de cDNA, librerías genómicas o RNA. Cuando se utilizan oligonucleótidos, estos suelen tener un tamaño entre 20 y 100 pb. Los soportes comúnmente empleados son de dos clases: porosos como geles o membranas de nylon o nitrocelulosa y los no porosos de cristal, silicio o plástico. Los métodos empleados para la inmovilización de la sonda sobre el soporte están basados en la unión covalente de la sonda al sustrato por medio de procedimientos químicos mediante el empleo de brazos robotizados, la síntesis *in situ* está basada en técnicas fotolitográficas. El DNA de la muestra que se quiere hibridar con el material inmovilizado sobre el soporte, debe ser marcado utilizándose comúnmente los fluoróforos Cy3 (cianina3) o el Cy5 (cianina5). Para la detección el marcador fluorescente es excitado a una determinada longitud de onda emitiendo una señal que es captada, cuantificada e interpretada mediante herramientas de software capaces de analizar los datos mediante modelos estadísticos.

pauta de lectura abierta del genoma completo de *L. johnsonii* NCC533, se realizó un análisis comparativo con los genomas de algunas cepas de *Lactobacillus* de especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*, observándose que esta técnica puede contribuir al esclarecimiento de las relaciones taxonómicas en este complejo grupo (Berger *et al.*, 2007).

5.4. Tipado de cepas de *Lactobacillus*.

El tipado de cepas tiene como objeto clasificar los aislamientos bacterianos en tipos o grupos de características similares, tiene un importante valor epidemiológico en el reconocimiento y detección de fuentes de infección, control de patógenos nosocomiales, reconocimiento de cepas virulentas, monitorización de programas de vacunación y seguimiento de poblaciones bacterianas en ambientes complejos (Olive and Bean, 1999). Aunque el tipado es utilizado principalmente en estudios de poblaciones, algunos autores consideran que puede tener valor taxonómico en determinados grupos dependiendo del método utilizado y de la población estudiada (Kersters and De Ley, 1975; Pot *et al.*, 1993a). Un método de tipado se puede llevar a cabo mediante el estudio de características fenotípicas o genotípicas, y debe ser reproducible, tener un importante valor discriminatorio, ser de bajo costo, poca complejidad y fácilmente accesible (van Belkum *et al.*, 2001).

5.4.1. Tipificación genética.

Las técnicas de tipificación por amplificación de ácidos nucleicos se basan en la amplificación de secuencias de DNA y la separación de éstas en una electroforesis, produciendo un patrón de bandas característico para una determinada cepa. Entre estas técnicas se destacan: los RADP (Random Amplified Polymorphic DNA) que utilizan iniciadores arbitrarios que hibridan en regiones inespecíficas del genoma con bajas temperaturas de anillado; Los rep-

PCR (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas) que utilizan cebadores que hibridan con secuencias de DNA repetidas que se encuentran distribuidas en todo el genoma; Y los ERIC-PCR (secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias) que amplifican las regiones que separan las secuencias ERIC repetidas dentro del genoma, generando un patrón de bandas dependiente de la repetición de dichas secuencias y la distancia entre copias contiguas. Estas técnicas son de gran utilidad en la rápida tipificación de cepas aisladas de diferentes ambientes y aunque no se considera que tengan un importante valor taxonómico para la clasificación de especies, en algunas ocasiones pueden permitir una discriminación adecuada entre especies y han sido utilizadas para la obtención de información adicional en taxonomía (Berger *et al.*, 2007; Dellaglio *et al.*, 2004; Ventura and Zink, 2002).

5.4.2. Tipado de cepas mediante electroforesis de proteína.

La electroforesis de proteínas solubles totales en geles de poliacrilamida-dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) se ha utilizado para la comparación de cepas bacterianas. Considerando que el perfil de proteínas de una determinada célula bacteriana es de alguna forma la expresión de su contenido genómico, se puede presumir que indirectamente se estaría comparando también parte del genoma de las cepas. Un análisis de proteínas puede estar dirigido solo a las proteínas de la pared, las proteínas citoplasmáticas, las proteínas solubles etc. La electroforesis de proteínas totales ha sido utilizada por algunos autores para la clasificación de cepas bacterianas logrando una buena discriminación entre especies (Costas, 1990; Kersters and De Ley, 1975; Kersters and De Ley, 1980).

OBJETIVOS

1. Objetivo general.

El principal objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la inclusión de sorbitol en la dieta de un animal modelo como la rata, con el fin de evaluar su papel como prebiótico. Se han analizado los cambios producidos en parámetros microbiológicos, bioquímicos y morfológicos del intestino en las ratas tratadas, tomándose como referencia un prebiótico conocido como los fructooligosacáridos (FOS).

2. Objetivos específicos.

2.1. Evaluar si el consumo del sorbitol modifica la microbiota intestinal, principalmente de las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

2.2. Analizar diferentes aspectos fisiológicos en las ratas que se puedan relacionar con el consumo de sorbitol para su definición como prebiótico: cuantificación de lactato, ácidos grasos de cadena corta e IgA en el intestino y determinación del perfil lipídico en el suero.

2.3. Aislar y caracterizar las especies de *Lactobacillus* residentes en el intestino de rata: análisis filogenético y taxonómico; determinación de la actividad hidrolasa de sales biliares y discusión de su función hipotética como mecanismo de supervivencia para los lactobacilos en el intestino.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ENSAYOS *IN VIVO* CON PREBIÓTICOS

1.1. Animales y diseño experimental

Diecisiete ratas Wistar macho con 40 días de edad y $150,8 \pm 10$ g, de peso corporal promedio, fueron recibidas en el Animalario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 5 ó 6 individuos y se colocaron en jaulas de tamaño estándar con capacidad para 8 animales, sometidos a periodos de luz y oscuridad de 12 horas y una temperatura promedio de 22°C. Todos los animales fueron alimentados con la dieta AO4 de Panlab s.l. de mantenimiento estándar que contiene: Humedad 12%, proteína 15,4%, grasa 2,9%, glúcidos 60,5%, azúcares totales 2,5%, almidón 41%, fibra 3,9%, minerales 5,3%, aminoácidos y vitaminas. Los primeros doce días de estancia de las ratas en el animalario se destinaron a periodo de adaptación, al cabo del cual, los animales alcanzaron un peso corporal promedio de 259,3 g. La etapa experimental se realizó durante 16 días en los que el grupo-control de cinco ratas bebió agua sin azúcar añadido, el grupo-sorbitol de seis ratas bebió agua con sorbitol al 10% (Sigma) y el grupo-FOS de seis ratas bebió agua con FOS al 10% (Raftilose P95, cortesía de ORAFIT, Active Food Ingredientes, Barcelona) en condiciones estériles. Los animales continuaron la dieta AO4 de mantenimiento y bebieron las soluciones azucaradas a su libre apetencia (Figura 4).

1.2. Recogida de muestras, medida de peso corporal, pH y lípidos en sangre.

Durante la etapa experimental se recogieron muestras de heces frescas extraídas por leve estimulación anal de los animales. La primera muestra se tomó después de la etapa de adaptación y anterior al inicio del tratamiento (Heces-Inicial), una segunda muestra fecal es posterior a los 16 días de experimentación (Heces-Final). El peso de los animales fue medido y registrado en el momento de la recepción de las ratas en el animalario, e inmediatamente después de la

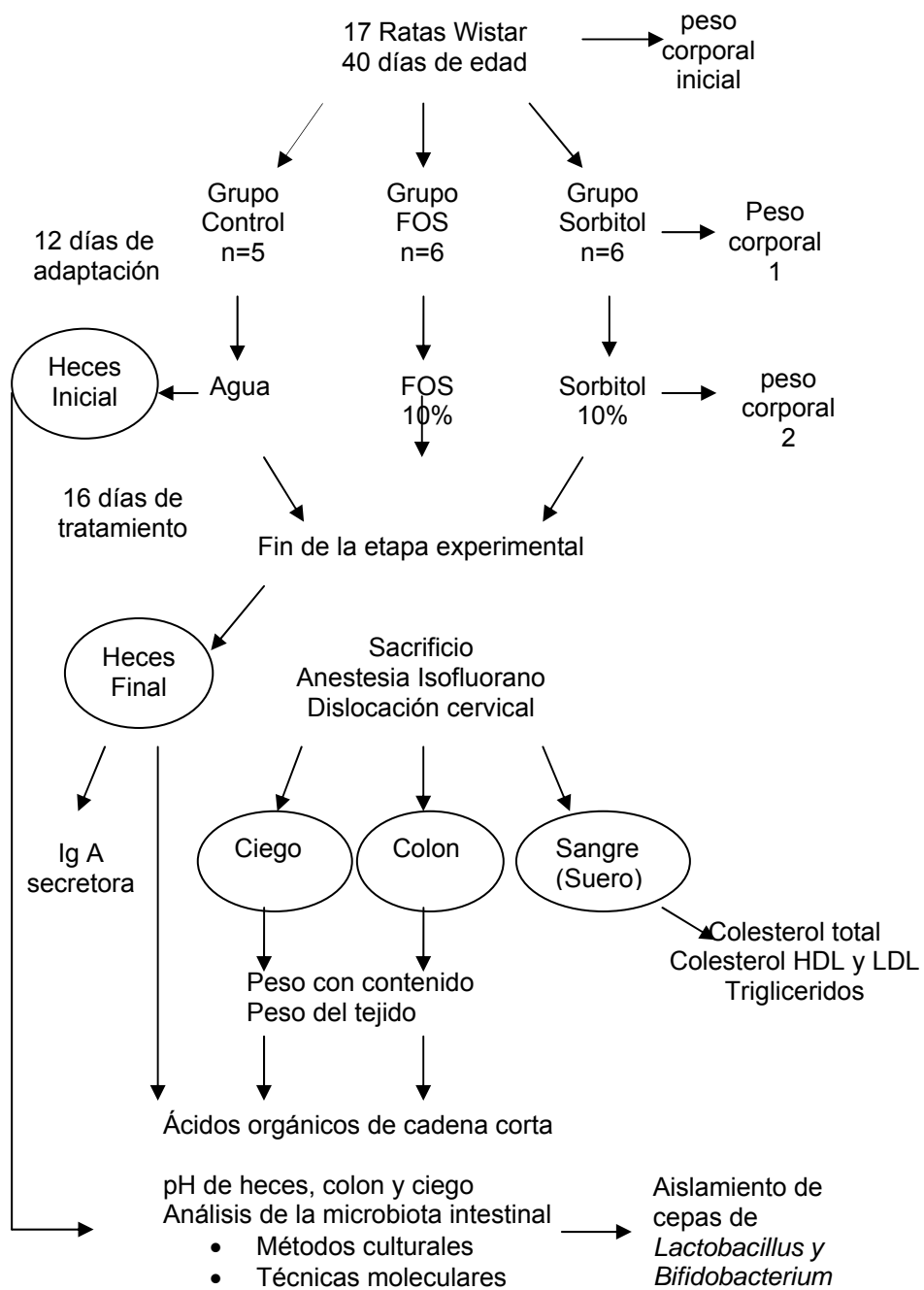


Figura 4. Diagrama del diseño experimental para el estudio del posible efecto prebiótico del sorbitol en un modelo animal.

obtención de la muestra de Heces-Inicial y Heces-Final. El último día de la etapa experimental los animales fueron anestesiados por inhalación en una cámara saturada de isofluorano, luego se extrajo por punción cardiaca, cerca de 5 ml de sangre e inmediatamente los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó una incisión ventral y el ciego y el colon fueron extraídos, se pesaron con sus contenidos y se extrajeron alícuotas de 200 mg de contenido intestinal. Una de las alícuotas se utilizó para los recuentos bacterianos en placa y el resto fueron almacenadas a -80°C para futuros análisis. En el colon y el ciego se extrajo la totalidad del contenido intestinal, el tejido se lavó con solución salina estéril, se secó sobre papel adsorbente y se pesó nuevamente para determinar el peso del tejido sin contenido. Una pequeña alícuota de muestra de Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y ciego, fue pesada y colocada en un horno de secado al vacío a 90°C durante 18 horas, al cabo de las cuales se determinó el peso seco de cada muestra y su respectivo porcentaje de humedad. Para determinar el pH, una de las alícuotas de 200 mg de cada muestra de Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de cada animal, fue homogenizada en un volumen final de 2 ml de solución salina al 0.9%, e inmediatamente el pH fue medido en el Micro pH 2000 (Crison). La sangre total fue centrifugada durante 5 min a 4000 rpm y el suero extraído inmediatamente refrigerado para ser analizados colesterol total, colesterol de alta densidad HDL, colesterol de baja densidad LDL y triglicéridos (Sagunto 99, Laboratorio de Análisis Clínicos, Valencia)

1.3. Recuentos bacterianos utilizando cultivo en placa

Para el recuento y cultivo bacterianos, 200 mg de muestra de Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de cada rata, fueron diluidos y completamente homogenizados en solución salina 0,9% a un volumen final de 2 ml, posteriormente fueron centrifugados a 100 rpm durante 5 min para eliminar residuos groseros. A partir de 1 ml de sobrenadante se realizaron diluciones 10^1 a 10^7 y fueron inoculadas en: Agar Nutritivo (Oxoid) para recuento de aerobios y anaerobios totales, Agar MRS (Difco) para bacterias productoras de ácido láctico

(BAL), Agar Schaedler (Cultimed) para Bacteroides, Agar Violeta Rojo Bilis (Difco) para Enterobacterias y Agar Base con Azida (Pronadisa) para Cocos Gram positivos. Estos medios fueron incubados a 37°C por 48 a 72 horas, las placas de agar destinadas al recuento de Bacteroides, Anaerobios totales y BAL se colocaron en jarras de anaerobiosis (Anaero-gen de Oxoid).

1.4. Estudio de la microbiota por métodos moleculares

1.4.1. Extracción de DNA y amplificación de los genes que codifican para el 16S rRNA por PCR

Para la extracción de DNA bacteriano de las muestras de Heces-Inicial, Heces-final y contenido del colon y del ciego, se utilizaron 200 mg de muestra perfectamente homogenizados en un volumen final de 2 ml de (tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 68 mM), la mezcla se centrifugó a 100 rpm durante 5 min y a partir de 1 ml de sobrenadante se recuperó la masa bacteriana con un centrifugado adicional a 13000 rpm durante 5 min. El sedimento celular se lavó con PBS más 50mM EDTA y el DNA bacteriano se extrajo con un kit para extracción de DNA en muestras de heces (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Quiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para el análisis por PCR-DGGE de la población bacteriana total en las muestras de Heces-Inicial, Heces-Final y contenido de colon y ciego, se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores universales HDA1-GC y HDA2 (tabla 3) que amplifican fragmentos de DNA de 200 pb en la posición 339-539 del gen que codifica para el 16S rRNA de *Escherichia. coli* (Walter *et al.*, 2000). Para detectar específicamente bacterias del género *Lactobacillus* se utilizaron en las reacciones de PCR los cebadores específicos lac1 y lac2-GC (tabla 3). Estos cebadores amplifican un fragmento de 327 pb en la posición 352-679 de los genes que codifican para el 16S rRNA de *E. coli* (Walter *et al.*, 2001). Para el género

Bifidobacterium se utilizaron los cebadores específicos Bif164F y Bif662R-GC (tabla 3) que amplifican un fragmento de 523 bp posiciones 164-679 de los genes que codifican para el 16S rRNA de *E. coli* (Montesi *et al.*, 2005). La reacción de PCR en los tres casos consiste en 5 µl de tampón de reacción 10X (Ecogén), 2 µl de Cl₂Mg (50 mM), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 20 pmol de cada cebador, 1 U de Ecotaq Polimerasa (Ecogén), 2 µl de DNA (0,25 µg/µl) y agua para un volumen final de 50 µl en un eppendorf de 0,2 ml. El programa de amplificación con los cebadores lac1 y lac2-GC y HDA1-GC y HDA 2 fue el siguiente: un ciclo a 94°C/2 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 56°C/30 s y 72°C/30 s, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7 min. Con los cebadores Bif164F y Bif662R-GC el programa de amplificación fue 94°C/ 2 min, 35 ciclos de tres segmentos a: 94°C/ 30 s, 52°C/ 30 s, 72°C/45 s y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/ 7 min. Las muestras de DNA utilizadas en todos los casos corresponden a una mezcla del DNA extraído de cada una de las ratas de cada grupo. 30 µl del producto de cada PCR fueron utilizados para el análisis por DGGE.

1.4.2. Análisis de los productos de PCR por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La DGGE fue realizada en el equipo DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), el gel de dimensiones 16 x 16 cm x 1 mm, contenía 8% (v/v) de poliacrilamida (37,5:1 acrilamida/bisacrilamida) y un gradiente desnaturalizante de urea y formamida de 30 a 55% creciente en dirección a la electroforesis (100% de desnaturalización corresponde a 7M de Urea y 40% de formamida). La electroforesis se realizó durante 4 horas y 30 min a 130 Voltios constantes y una temperatura de 60°C, los geles fueron mantenidos durante 5 minutos en una solución de Bromuro de Etidio (1µg/ml), lavados con abundante agua destilada durante 10 minutos y la fluorescencia producida fue detectada con el equipo Fujifilm LAS 1000. imaging system (Fuji Photo Film Co.Ltd.).

Procedencia	Cebador	Secuencia	
Walter <i>et al.</i> , 2000	HDA1*	(5'-GACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3')	
	HDA1-GC*	(5'-GCCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3')	
	HDA2*	(5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3')	
Walter <i>et al.</i> , 2001	lac1*	(5'-AGCAGTAGGGAATCTTCA-3')	
	lac2*	(5'-ATTYCACCGCTACACATGCGCC-3').	
	lac2-GC*	(5'-ATTYCACCGCTACACATGCGCCCCGGGGCGCGC CCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGG-3').	
Montesi <i>et al.</i> , 2005	Bif164F*	(5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3')	
	Bif662R*	(5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3')	
	Bif662R-GC*	(5'-CGCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCCACCGTACACCGGGAA-3')	
Acedo-Felix and Pérez- Martínez, 2003	27f*	(5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')	
	1100r*	(5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3')	
Diseñados en este Trabajo	1552 R*	(5'-GAAGGAGGTGWTCARCCGCA-3')	
	IreuFOR**	(5'-GATACCTTTGTTTCAGGGTGAAG-3')	
	IreREV**	(5'-CCGGCAATATAGTTAAGGG-3')	
	IgasFOR**	(5'-GATACCTTTGTTTCAGGGTGAAG-3')	
	L102b**	(5'-TCAAGGGTAC TGTCATCG ATTG-3')	
	CT23for**	(5'-ATGTGACGAGTGAGATTA CC-3')	
	CT23rev**	(5'-AG TAAGTCCCCACCTGAAACG-3')	
	CT102for**	(5'-CACCAAATGCTCGCTGAAAAGC-3')	
	CT102rev**	(5'-TCCCCATGCAAACCG AGAGAC-3')	
	RecAfor***	(5'-GAAAARRAYTTYGGWAARGGYKCDRTBATGCG-3')	
	RecArev***	(5'-TACATRATRCDACTTCWSMNMSYTTAATGG-3')	
	Messing, 1983	Reverse****	(5'-CAGGAAACAGTCATGAC-3')
		Forward****	(5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3')
	Berger <i>et al.</i> , 2007	ERIC-1*****	(5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTAC-3')
		ERIC-2*****	(5'-AAG TAAGTGAAGTGGGTGAGCG-3')

Tabla 3. Cebadores utilizados durante este trabajo. Los asteriscos indican el gen diana que es amplificado por los cebadores: * gen que codifica para el 16S rRNA; ** gen *dnaA*; *** gen *recA*; **** Vector pMOSblue; ***** Secuencias ERIC.

1.4.3. Aislamiento y secuenciación de DNA de bandas del gel de DGGE.

Bandas representativas observadas en cada gel de DGGE, amplificadas con los cebadores universales o con los cebadores específicos para especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, fueron extraídas del gel de poliácridamida, colocadas en 100 µl de agua bidestilada estéril y almacenadas por 48 horas a 4°C.

Para extraer el DNA del gel, las bandas en agua se calentaron a 95°C/15 min se centrifugaron a 13000 rpm/5 min y al sobrenadante se adicionó 50 mg de glucógeno grado biológico, 0,3 M de acetato de sodio pH 4,5 y 2,5 volúmenes de etanol al 96%. La mezcla se colocó a -20°C/24 horas y posteriormente se centrifugó a 15000 rpm /15 min a 4°C, el sedimento fue lavado con etanol al 70%, secado y el DNA resuspendido en 25 µl de agua bidestilada estéril. El DNA extraído de cada banda fue reamplificado con los cebadores correspondientes a cada caso, HDA1 y HDA2, Lac1 y Lac2, y Bif164F y Bif662R, utilizando las reacciones de PCR y los programas de amplificación descritos previamente para los tres casos. Posteriormente las dos cadenas de DNA de los productos de PCR fueron secuenciadas (la secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, utilizando el método de terminación de la cadena de DNA por dideoxinucleótidos), y las secuencias comparadas con la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST de alineamiento de secuencias.

1.5. Aislamiento y caracterización de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de intestino de rata.

1.5.1. Obtención de cultivos puros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y comprobación por PCR-DGGE.

Aleatoriamente muestras de aproximadamente 200 mg del contenido del ciego y del colon y Heces-Final de ratas alimentadas con sorbitol, fueron suspendidas y homogenizadas en 1ml de agua peptonada y finalmente centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. 1µl del sobrenadante fue colocado en varias placas de Agar Rogosa (Pronadisa) y repartido por toda la superficie del agar. Las placas fueron incubadas a 37°C en anaerobiosis (Anaero-gen de Oxoid) durante 48 horas para el aislamiento de *Lactobacillus* y 4 días para aislamiento de *Bifidobacterium* de acuerdo al protocolo previamente utilizado para aislamiento de

estas especies en muestras fecales (Requena *et al.*, 2002; Tannock *et al.*, 2000). 100 colonias de las crecidas en las primeras 48 horas de incubación y otras 100 crecidas después de 4 días, fueron utilizadas para reacciones de PCR con los cebadores específicos del género *Lactobacillus*, lac1 y lac2-GC y del género *Bifidobacterium* Bif164F y Bif662R-GC respectivamente. La reacción de PCR y el programa de amplificación fueron similares a los descritos anteriormente para cada caso, pero la muestra de DNA se reemplazo por una pequeña alícuota de cada colonia crecida en agar Rogosa y la temperatura de desnaturalización inicial en el programa de amplificación fue: 97°C/ 6 min con los cebadores específicos del género *Lactobacillus* y 97°C/ 8 min con los cebadores específicos para el género *Bifidobacterium*. El producto de los PCR fue analizado por DGGE y cada una de las colonias representadas por una banda de diferente migración en PCR-DGGE fue cultivadas en caldo MRS, incubada en anaerobiosis a 37°C durante 48 o 72 horas y almacenadas a -80°C en 20% de glicerol.

1.5.2. Extracción de DNA e identificación de *Lactobacillus*.

Para extraer el DNA de las cepas de *Lactobacillus* aisladas, 10 ml de cultivos en MRS fueron centrifugados y las células obtenidas lavadas con EDTA 50 mM y congeladas durante 1 hora a -20°C. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito (Posno *et al.*, 1991; Veyrat *et al.*, 1999). La identificación definitiva de las especies de *Lactobacillus* aisladas, se realizó mediante una amplificación por PCR de 1124 pb del gen que codifica para el 16S rRNA utilizando los cebadores universales 27f y 1100r (tabla 3) (Acedo-Felix and Pérez-Martínez, 2003). Para la reacción de PCR se utilizó *taq* DNA polimerasa (BIOTOOLS) y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a 94°C/2 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 50°C/30 s y 72°C/1 min, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7 min. Las dos cadenas de DNA de los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciadas (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia), alineados en el programa Chromas-Pro (Technelysium Pty Ltd) Las secuencias fueron

48

alineadas en la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST y la identificación de los *Lactobacillus* se realizó a través de un análisis filogenético.

1.5.3. Análisis filogenético de las secuencias de DNA.

La secuencia que codifica el 16S rRNA de varias cepas de lactobacilos fue seleccionada a partir de la base de datos del Ribosomal Database Project II, publicación 9.44 (Cole *et al.*, 2005). Múltiples alineamientos fueron obtenidos por el uso del programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y las secuencias de dudosa homología fueron eliminadas por el uso de bloques G (Castresana, 2000). La reconstrucción filogenética fue formada implementando la máxima probabilidad en PHYML (Guindon and Gascuel, 2003) con el modelo de sustitución HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985). Los valores de “*Bootstrap*” han sido obtenidos por el análisis de 500 pseudo replicas.

1.6. Enumeración de dos especies de *Lactobacillus* por PCR cuantitativa.

1.6.1. Elaboración de patrones para la curva de calibración.

El gen *dnaA* se encuentra en copia única dentro del genoma bacteriano, lo que permite relacionar directamente el número de moléculas presentes de *dnaA* en una determinada muestra con el número de bacterias presentes en la misma. Las curvas de calibración para PCR cuantitativa, fueron elaboradas a partir de un patrón que contenía un número conocido de moléculas de un fragmento de *dnaA* de *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* ps AD102 aislados de rata. Para amplificar el gen *dnaA* de *L. reuteri* AD23 se utilizaron los cebadores IreuFOR y IreREV (tabla 3) que amplifican un fragmento de 564 pb del gen *dnaA*, con tamaño molecular de 348,78 KDa. Para *Lactobacillus* sp. AD102 los cebadores utilizados fueron IgasFOR y L102b (tabla 3) que amplifican un fragmento de 554 pb del gen *dnaA*

con tamaño molecular de 342,82 KDa. Para la reacción de PCR se utilizó *taq* DNA polimerasa (BIOTOOLS) y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a 94°C/2 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 50°C/30 s y 72°C/1 min 30 s, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7 min. La cantidad de DNA presente en el producto de cada amplificación, fue cuantificada utilizando Fluorescent DNA quantitation Kit (BIO_RAD 170-2480) con el fluorímetro Versa Fluor (BIO-RAD). Con este resultado y conociendo el peso molecular de cada fragmento amplificado, se calculó el número de moléculas presentes del gen *dnaA* en cada uno de los patrones y se elaboro una curva de calibración para PCR cuantitativa con diluciones de los patrones en concentraciones 10^{-5} hasta 10^{-10} .

1.6.2. Cuantificación de *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp. AD102.

Para cuantificar el número de bacterias presentes de *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* ps AD102 en las muestras de Heces-Inicial, Heces-Final, contenido del colon, y del ciego de las ratas, se utilizaron las muestras de DNA extraídas con el kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Quiagen) de cada muestra por rata descritas para el estudio de la microbiota. Los cebadores utilizados para PCR cuantitativa fueron, para *L. reuteri* AD23 CT23for y CT23rev (tabla 3), y para *Lactobacillus* sp. AD102 CT102for y CT102rev (tabla 3), que amplifican fragmentos de 275 pb y 309 pb respectivamente. Los fragmentos amplificados mediante PCR cuantitativa están contenidos en las secuencias de los respectivos fragmentos de *dnaA* amplificados para la elaboración del patrón para cada uno de los *Lactobacillus* a cuantificar. El equipo utilizado para PCR cuantitativa fue el Light Cycler de ROCHE y el reactivo utilizado Light Cycler Fast Start DNA Master plus SYBR Green I (ROCHE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por duplicado, sin diluir y diluidas 1/10 en agua grado PCR y el resultado final por muestra corresponde al promedio de las dos mediciones. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 10 minutos a 95°C para la desnaturalización del DNA y la activación de la FastStart Taq DNA polimerasa, seguida de 35 ciclos de 95°C/ 10s 62°C 10 s y 72°C 15 s. La detección de la fluorescencia producida fue registrada a 50

530 mM en la etapa final de cada ciclo. La curva de temperatura de fusión fue obtenida por calentamiento de los productos amplificados hasta 65°C durante 20 s y un posterior incremento de temperatura de 0,2°C por segundo hasta 98°C, con medición continua de la fluorescencia, finalmente se realizó un enfriado de la muestra a 40°C 20 s. La especificidad de la reacción fue verificada mediante el análisis de la curva de temperatura de fusión, y por electroforesis en geles de agarosa al 1% de los productos de PCR cuantitativa, para verificar la existencia de una sola banda amplificada del tamaño correspondiente a cada caso. Algunas de las amplificaciones por PCR cuantitativa fueron secuenciadas para confirmar la especificidad de la reacción.

Para calcular el rendimiento en la extracción de DNA de *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp AD102 a partir de las muestras del contenido intestinal y heces de rata, alícuotas de 100 µl de una suspensión bacteriana que contenía un número conocido de ufc/ml de cada lactobacilo, fueron adicionadas a 200 mg de muestras al azar de heces y de contenido intestinal. El DNA fue extraído de estas muestras de acuerdo al procedimiento del kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Quiagen), empleado en la extracción de DNA en la totalidad de las muestras experimentales. Se calculó el rendimiento del método al comparar el número de bacterias presentes en las muestras con y sin adición de la suspensión bacteriana, determinado por PCR cuantitativa y expresado como porcentaje. Este resultado fue tenido en cuenta para el cálculo de los resultados finales de PCR cuantitativa en las muestras experimentales.

1.7. Determinación de ácidos orgánicos en las Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de ratas

Muestras almacenadas a –80°C de Heces-Inicial, Heces-Final y contenido del colon y del ciego de ratas, fueron descongeladas y mantenidas en hielo, 100 mg de cada muestra fueron suspendidos en un volumen final de 1 ml de ácido fosfórico 0,1% (pH 2,4), homogenizados en agitador, y centrifugadas a 9000 rpm/

20 min a 2°C. El sobrenadante fue filtrado (Millipore Non-Sterile 25mm Millex 0,45 µm) y los ácidos orgánicos determinados por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). El equipo utilizado fue el HPLC de JASCO CORPORATION con una columna de 300 x 7.8 mm (Phenomenex Rezex-ROA Organic Acid H+) a 30°C de temperatura. La fase móvil utilizada fue ácido fosfórico 0,1% con flujo isocrático de 0,5 ml por minuto, se inyectaron 20 µl del filtrado de cada muestra y la detección fue a 210 nm con el UV-2075 plus de JASCO.

1.8. Determinación de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en heces de rata.

Muestras de Heces-Final de rata almacenadas a -80°C fueron descongeladas y mantenidas en hielo. 100 mg de cada muestra fueron diluidos en un volumen final de 1 ml con tampón para la extracción de inmunoglobulinas (0,01 M de tampón fosfato salino pH 7,4; 0,5% de Tween 20 y 0,05% de azida de sodio) homogenizados en agitador y centrifugados a 1,500 rpm/ 20 min a 4°C. En 500 µl de sobrenadante se adicionaron 5 µl de "Cocktail" inhibidor de proteasas (SIGMA), se mezcló en agitador y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. 400 µl del nuevo sobrenadante fueron almacenados a -20 °C hasta su uso. La determinación de la IgAs en las muestras de heces se realizó mediante la técnica de ELISA, de acuerdo al kit comercial para cuantificación de IgA (Bethyl Montgomery, TX,USA) utilizado previamente por otros autores para la determinación de IgA en muestras fecales (Inoue *et al.*, 2005).

1.9. Actividad HSB en las cepas de *Lactobacillus* aislados de intestino de rata.

1.9.1. Ensayo en placa de la actividad HSB.

De acuerdo al procedimiento descrito por (Pereira *et al.*, 2003), cajas de Petri con 15 ml de agar MRS adicionado con 0,37 g/L de CaCl₂ y 0,5% de una sal biliar

conjugada, taurodeoxicolato ó glicodeoxicolato (SIGMA) fueron inoculadas con 20 µl de cultivo puro ($D.O_{550}=1$) de cada una de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de rata. El inóculo fue colocado sobre un disco estéril de papel absorbente de 1 cm de diámetro colocado sobre el agar y las placas incubadas a 37°C en jarras de anaerobiosis (Anaero-gen de Oxoid) durante 72 horas. La formación de un halo de precipitado alrededor del disco de papel, corresponde a la sal biliar desconjugada y precipitada en presencia de calcio. Las pruebas se hicieron por duplicado y el resultado corresponde al valor de la media de los diámetros en centímetros de los halos formados.

1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC de la actividad HSB.

50 ml de caldo MRS (Difco) estéril, que contenían 1mM de taurocolato de sodio o glicocolato de sodio (SIGMA), fueron inoculados con 1ml de un cultivo de 24 horas ($D.O_{550}= 1$) de cada una de las cinco cepas de *Lactobacillus* aisladas de rata, e incubados a 37°C durante 24 horas. Asépticamente fueron extraídas dos alícuotas de 2 ml a diferentes tiempos durante el periodo de incubación, una para medir el crecimiento bacteriano determinando la D.O a 550 nm y la otra para determinar la actividad de HSB mediante HPLC. Para extraer las sales biliares conjugadas se utilizó el método previamente descrito (Pereira *et al.*, 2003). En el momento de ser inyectados al cromatógrafo, los extractos de la sal biliar fueron reconstituidos con 240 µl de metanol al 70% más acetato de sodio 0,03 M pH 5,6, homogenizados en agitador y filtrados (Millipore Non-Sterile 25mm Millex 0,45µm). 20 µl del filtrado de cada muestra fueron inyectados en el equipo HPLC de JASCO CORPORATION con una columna de 15 cm x 4,6 mm (SUPELCOSIL 5 µm LC-18-DB fase reversa) a temperatura ambiente. La fase móvil fue 70% de metanol más acetato sódico 0,03 M acidificado con ácido fosfórico a pH 5,6 en un flujo isocrático de 1 ml/min, la detección fue a 210 nm con el UV-2075 plus de JASCO. La actividad HSB se midió como la disminución progresiva de la concentración (mM) de la sal biliar conjugada en el medio de cultivo durante la curva de crecimiento bacteriano.

1.10. Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias entre los grupos control, FOS y sorbitol, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el programa Statgraphics plus (Statistical graphics corp.) que permite comparar las medias y desviaciones estándar entre más de dos grupos. En los recuentos bacterianos de heces, además de la comparación entre grupos, se realizó una comparación por animal en el tiempo, ya que se disponía de una muestra inicial de heces previa al tratamiento. Para analizar las bandas obtenidas en PCR-DGGE con los cebadores universales HDA1-GC y HDA2 se realizó un análisis estadístico basado en el coeficiente de similitud de Dice (Dcs) utilizando el programa LaneManager (TDI, S.A., Madrid) El coeficiente de Dice se basa en la posición de las bandas, determinando su presencia o ausencia en cada una de las líneas de la electroforesis. Y es comúnmente utilizado para el análisis de patrones electroforéticos generados a partir de técnicas no cuantitativas como la PCR (Snart *et al.*, 2006;Tannock *et al.*, 2004).

2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA TAXONOMÍA DE LACTOBACILOS.

2.1. Obtención de nuevos aislamientos de *Lactobacillus* sp. AD102.

Nuevos aislamientos del *Lactobacillus* sp. AD102 fueron obtenidos cultivando contenido del ciego de diferentes ratas en placas de agar Rogosa (Pronadisa) a 37°C durante 48 horas en anaerobiosis, de las placas de agar, se extrajeron colonias aisladas cuya morfología fuera compatible con *Lactobacillus* sp. AD102. Para verificar la identidad de estas colonias, se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos CT102for y CT102rev empleados previamente en PCR cuantitativa, seguida por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La muestra utilizada en la PCR fue una pequeña alícuota de la colonia crecida en agar Rogosa y se utilizó *taq* DNA polimerasa (BIOTOOLS). El programa de

54

amplificación fue el siguiente: un ciclo a 97°C/6 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 60°C/30 s y 72°C/ 30s, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7 min. Un segundo método utilizado para confirmar la identidad de estos aislamientos fue PCR-DGGE utilizando los cebadores específicos para lactobacilos lac1 y lac2 G-C.

2.2. Cepas utilizadas y medios de cultivo.

Las cepas de *Lactobacillus* utilizadas en el estudio taxonómico presentado en este trabajo, incluyen los aislamientos realizados a partir de muestras intestinales de rata, los nuevos aislamientos de *Lactobacillus* sp.AD102 y otras cepas de las que se describe su procedencia en la tabla 4. Todos los *Lactobacillus* fueron cultivados en caldo MRS (Difco) a 37°C durante 48 horas y almacenados en glicerol al 20% a – 80°C para ser conservados.

2.3. Análisis fenotípicos.

A todas las cepas de *Lactobacillus* se les realizó una prueba de catalasa en placa. El estudio del metabolismo de los hidratos de carbono fue realizado con la prueba comercial API 50 CH (BioMerieux. S.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Otras pruebas incluidas en los análisis fenotípicos fueron: Crecimiento a 15 y 45°C en caldo MRS (Difco); Crecimiento a pH 4,5 y 7,0 en caldo MRS ajustado el pH con ácido acético o NaOH respectivamente.; y crecimiento en caldo MRS con una concentración de cloruro de sodio de 4,5% y 7,0%. En todos los casos se considero como positivo un crecimiento mayor a 0,2 de DO a 550 nm después de 48 horas de incubación.

El análisis estadístico de los resultados de las pruebas fenotípicas fue un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa XLSTAT para Microsoft Excel (Addinsoft.) para lo cual se otorgo un valor numérico de 100 para los resultados positivos, 50 para las reacciones débiles y 0 para las reacciones

negativas, descartando para el análisis las pruebas fenotípicas en las cuales no se observó ninguna variación entre las 26 cepas analizadas. Un segundo análisis estadístico a partir de los mismos datos fenotípicos fue un dendrograma de similitud basado en el coeficiente de correlación de Pearson, con el método de clasificación enlace medio que mide la proximidad entre grupos calculando la media de las similitudes entre objetos de todos los grupos.

Cepa	Especie	Origen y referencia
BL17	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT903 ^T aislada de humano
BL221	<i>Lactobacillus crispatus</i>	M247* aislada de heces humanas
BL223	<i>Lactobacillus gasseri</i>	4B2* aislada de heces humanas
BL277	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ20243 ^T aislada de humano
BL278	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ20584 ^T origen desconocido
BL279	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT4529 aislada de intestino de pollo
BL280	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT4179 aislado de heces de rata
BL281	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CECT289 origen desconocido
BL287	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSMZ10533 ^T aislada de sangre humana
BL288	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	DSMZ6629 ^T aislada de intestino de rata.
BL292	<i>Lactobacillus gasseri</i>	NCC2858 origen desconocido
BL294	<i>Lactobacillus gasseri</i>	NCC2856 origen desconocido
BL295	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC2822 aislada de heces de perro.
BL296	<i>Lactobacillus gasseri</i>	NCC2857 origen desconocido
BL297	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC1741 origen desconocido
BL298	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC533 aislada de heces humanas
BL299	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC2767 aislada de heces de perro

TABLA 4. Lista de cepas de *Lactobacillus* utilizadas en la clasificación taxonómica de *Lactobacillus* sp. AD102. BL221 y BL223 pertenecen a la colección del Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos de IATA-CSIC. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo. DSMZ: Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares. NCC: Colección de Cultivos de Nestlé (Nestlé Research Center-Zuisa). *Cepas donadas por el Instituto de Microbiología de la universidad Católica del Sagrado Corazón (Piacenza-Italia)

2.4. Análisis filogenéticos mediante secuencias de DNA.

2.4.1. Amplificación y secuenciación de los genes que codifican el 16S rRNA y gen *recA*

DNA fue extraído de todas las cepas de *Lactobacillus* de acuerdo al protocolo descrito previamente (Posno *et al.*, 1991; Veyrat *et al.*, 1999). Con el fin de limpiar posibles impurezas en el DNA destinado a los análisis taxonómicos, se ha realizado adicional al protocolo de extracción de DNA, una segunda fase de extracción con fenol, fenol-cloroformo isoamílico y cloroformo isoamílico después del tratamiento con RNAsa. El DNA finalmente fue diluido en agua bidestilada estéril y cuantificado utilizando Fluorescent DNA quantitation Kit (BIO_RAD 170-2480) con el fluorímetro Versa Fluor (BIO-RAD) y almacenado a -20°C .

Para los análisis filogenéticos se amplificaron 1500 pb del gen que codifica para el 16S rRNA utilizando los cebadores 27F y 1552R (tabla 3) que amplifican 1552 pb. La reacción de PCR se realizó utilizando *taq* DNA polimerasa (BIOTOOLS) y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a $94^{\circ}\text{C}/2$ min, 35 ciclos de tres segmentos a $94^{\circ}\text{C}/30$ s, $50^{\circ}\text{C}/30$ s y $72^{\circ}\text{C}/2$ min, y finalmente un ciclo de extensión a $72^{\circ}\text{C}/7$ min. El producto de PCR fue purificado utilizando el Kit GFX PCR and Gel Band (Amersham-Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las dos cadenas de los fragmentos obtenidos fueron secuenciadas (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia). Las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA de las cepas *L. acidophilus* CECT903^T (BL17), *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277), *L. crispustus* DSMZ20584^T (BL278), *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287) y *L. intestinalis* DSMZ6629^T (BL288) fueron tomadas directamente de la base de datos del GenBank.

El segundo gen amplificado y secuenciado con el fin de realizar análisis filogenéticos fue el gen *recA*. Para la amplificación del gen *recA* de los

Lactobacillus, se utilizaron los cebadores degenerados RecAfor y RecArev (tabla 3) que amplifican 740 pb. La reacción de PCR se realizó con Ecotaq DNA polimerasa (Ecogén) y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a 94°C/4 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 47°C/30 s y 72°C/ 1min, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7min. Los fragmentos amplificados y purificados (Kit GFX PCR and Gel Band de Amersham-Biosciences) fueron clonados en *E. coli* utilizando el vector pMOS blue del *pMOSblu blunt ended cloning kit* (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos del gen *recA* insertados en *E. coli* fueron amplificados con los cebadores Reverse y Forward (tabla 3) que hibridan en zonas contiguas al sitio de clonaje multiple (polilinker) del vector en donde se han insertado los fragmentos del gen *recA*. La reacción de PCR se realizó utilizando *taq* DNA polimerasa (BIOTOOLS), y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a 94°C/6 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 50°C/30 s y 72°C/ 1min y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7min. Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia). El gen *recA* fue amplificado y secuenciado en las cepas *L. johnsonii* AD99; *Lactobacillus* sp. AD102, AD104 y AD105; BL17 *L. acidophilus* CECT903^T; *L. gasseri* NCC2856 (BL294); *L. johnsonii* NCC1741 (BL297); *L. johnsonii* NCC2767 (BL299). Las secuencias *recA* de las cepas *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *L.gasseri* DSMZ20243^T (BL277) fueron obtenidas en el banco de datos del GenBank junto con otras nueve secuencias del gen *recA* de *Lactobacillus*, para un total de 19 secuencias con las cuales se realizó el análisis filogenético.

2.4.2. Análisis filogenéticos.

Los resultados de la secuenciación de las dos cadenas del gen que codifica para el 16S rRNA de las 26 cepas de *Lactobacillus* incluidas en este estudio, fueron verificadas por alineamiento en el programa Chromas-PRO (Technelysium Pty Ltd). Para el análisis filogenético fueron incluidas además otras secuencias del

58

gen que codifica para el 16S rRNA de *Lactobacillus* publicadas en el Ribosomal Database Project II (RDP) (Cole *et al.*, 2003;Gavini *et al.*, 2006) y en el GenBank, para un total de 80 secuencias. Todas las secuencias fueron alineadas en el programa Clustal X (Aiyar, 2000;Gavini *et al.*, 2006) y las posiciones de dudosa homología y que presentaban divergencias, fueron eliminadas en el programa Gblocks (Castresana, 2000;Gavini *et al.*, 2006). La reconstrucción filogenética fue formada por Máxima verosimilitud en el programa PHYML (Guindon *et al.*, 2005) utilizando el modelo de sustitución GTR+G (Método general reversible en el tiempo más la aplicación de distribución gamma) y el valor de “*bootstrap*” fue obtenido por el análisis de 500 seudo réplicas. Para el análisis filogenético con las secuencias del gen *recA* se utilizó el mismo procedimiento en un total de 19 secuencias.

2.5. Hibridación DNA-DNA

2.5.1. Preparación del DNA.

En un tubo eppendorf de 0,2 ml, se prepararon 100 µl de una solución que contenía 80 ng/µl de DNA en solución 2x de tampón SSC (SSC 20X contiene 175,3 g NaCl, 88,2 g citrato sódico en 1 litro de agua bidestilada pH 7,0). La cantidad de DNA presente en la solución, fue confirmada por cuantificación utilizando Fluorescent DNA quantitation Kit (BIO_RAD 170-2480) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con el fluorímetro Versa Fluor (BIO-RAD). El DNA en solución de las 26 cepas de *Lactobacillus* se desnaturalizó colocando 10 minutos a 99°C y transfiriendo los tubos inmediatamente a hielo. Diluciones del DNA de 40 y 20 ng/µl fueron realizadas en solución 2X SSC. La hibridación DNA-DNA se llevo a cabo inmovilizando el DNA en membranas de nylon de acuerdo al protocolo previamente utilizado por Ezaki *et al.* (1988) y por Hanninen *et al.* (1996) con algunas modificaciones.

2.5.2. Marcaje de sondas.

Sondas de DNA marcadas con digoxigenina de las cepas tipo *L. intestinales*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* y *Lactobacillus* sp. AD102, fueron elaboradas utilizando el kit comercial DIG DNA Labeling Mix (ROCHE) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción para el marcaje del DNA se realizó en un volumen final de 40 µl utilizando el enzima Large Fragment of DNA polymerase I (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con un tiempo de incubación de 20 horas a 37°C. Para la hibridación, los 40 µl de DNA marcado fueron desnaturalizados por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, colocados inmediatamente en hielo durante 5 minutos, y posteriormente mezclados con 10 ml de solución de hibridación (5X tampón SSC, 0,1% N-Laurylsarcosina, 0,02% SDS y 1% de solución de bloqueo de ROCHE).

2.5.3. Preparación de las membranas.

Seis membranas de nylon (Hybond-N Amersham Biosciences) de 19 x 6 cm fueron marcadas suavemente con un lápiz cada 0,7 cm formando cuadrículas, en cada una de las cuadrículas se colocaron con pipeta automática 2 µl de solución de DNA desnaturalizado a concentraciones de 80, 40 y 20 ng/µl, se colocaron 2 puntos por cada dilución para un total de 6 puntos por cada cepa en forma vertical, de las 26 cepas distribuidas horizontalmente en la membrana. Las membranas se secaron en una estufa a 50°C durante 15 minutos y posteriormente las muestras de DNA se fijaron a la membrana por exposición a luz UV durante 5 minutos.

2.5.4. Prehibridación, hibridación y detección inmunológica.

La membrana fue prehibridada a 65°C en solución de prehibridación (5X tampón SSC, 0,1% N-Laurylsarcosina, 0,02% SDS, 1% de solución de bloqueo de ROCHE) y posteriormente hibridada durante toda la noche a 65°C en una solución igual que contenía la sonda marcada. Después de sucesivos lavados para retirar el exceso de sonda, se realizó la detección inmunológica utilizando el anticuerpo

antidigoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP ROCHE) y el sustrato quimioluminiscente (CDP-Star ROCHE). Finalmente la quimioluminiscencia producida fue inmediatamente detectada en el fujifilm LAS 1000 imaging system (Fuji Photo Film Co.Ltd.).

2.5.5. Cuantificación.

Utilizando el programa Image Gauge Versión 4.0 (Fuji Photo Film Co.Ltd.) se cuantificó la señal quimioluminiscente en unidades arbitrarias, en un área de igual tamaño para cada uno de los puntos de hibridación en las membranas. A este valor se descuenta previamente el valor en unidades arbitrarias correspondiente al fondo de la membrana. Para calcular el porcentaje de hibridación DNA-DNA, se considera el 100% de hibridación el valor en unidades arbitrarias obtenido cuando el DNA de la cepa que dio origen a la sonda, hibridó consigo mismo en la membrana. Los porcentajes de hibridación DNA-DNA se calculan para cada cepa teniendo como referencia el 100% de hibridación obtenido para cada dilución de la muestra (líneas horizontales en la membrana). Es así como para cada una de las 26 cepas se obtienen seis valores de porcentaje de hibridación por membrana, dos por cada una de las tres diluciones de DNA colocadas, el promedio de mínimo cuatro de estos valores fue calculado permitiendo una desviación estándar máxima del 25%, el valor resultante corresponde al porcentaje de hibridación de cada una de las cepas estudiadas con la cepa que dio origen a la sonda. Los ensayos se realizaron por triplicado (tres membranas por cada sonda y en cada membrana seis puntos de DNA de cada cepa) y el resultado descrito corresponde a la media aritmética del porcentaje de hibridación resultante de cada membrana.

Para calcular el porcentaje de hibridación DNA-DNA entre las cepas tipo de cada una de las especies de *Lactobacillus* analizadas se tuvo en cuenta el valor del porcentaje de hibridación AxB y BxA (resultado obtenido cuando un determinado DNA actúa como sonda o está en la membrana y viceversa) y se multiplicó el valor más bajo por la raíz cuadrada de la división entre el valor medio

más alto por el valor medio más bajo, obteniendo un valor muy cercano a la media aritmética.

2.6. Electroforesis de proteína total.

2.6.1. Preparación de la muestra.

12 cepas de *Lactobacillus* pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*, fueron cultivadas en 10 ml de caldo MRS a 37°C hasta una $DO_{550nm}=1,0$. Las células fueron lavadas dos veces con tampón Tris-HCl 100mM pH 7,5 y resuspendidas en 1 ml del mismo tampón con 0,5 M de sacarosa y 2,5 mg/ml de lisozima, después de una hora de incubación a 37°C, las células fueron lavadas nuevamente con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5 para eliminar la lisozima. El sedimento obtenido fue resuspendido suavemente en 50 μ l del mismo tampón más 50 μ l de tampón de carga para proteínas 2X (tampón 1X contiene: 50 mM de Tris-HCl pH 6,8, 100mM ditriitol, 2% SDS, 0,1% bromofenol azul y 10% de glicerol). Las células en suspensión se colocaron durante 5 minutos a 100°C y posteriormente en hielo hasta el momento de la electroforesis.

2.6.2. Preparación del gel, electroforesis de proteína y análisis de resultados

En un gel de acrilamida de 16 x 16 cm x 1mm con 12% y 5% de concentración de acrilamida en los geles de separación y carga respectivamente, fueron cargados 20 μ l de cada muestra, como patrón de pesos moleculares en las posiciones 1 y 15 del gel, se utilizó el marcador LMW Calibration Kit for SDS (Amersham) que genera seis bandas entre 97 y 10 KDa. Las condiciones utilizadas para la electroforesis fueron: intensidad de corriente constante de 30 mA hasta que las muestras penetren en el gel de separación, y 50 mA para la

separación de las proteínas. Tiempo estimado 5 horas. El equipo de electroforesis utilizado fue DCODE-System de Bio-Rad.

Terminada la electroforesis, los geles fueron teñidos y los perfiles de bandas obtenidos registrados mediante fotografía. Los patrones electroforéticos resultantes, fueron analizados utilizando los coeficientes de Dice (relación entre los patrones electroforéticos basado en la presencia o ausencia de bandas) y de Pearson (estimación cuantitativa de la intensidad de las bandas obtenidas) de forma independiente (programa BioNumerics 4.6 Applied Maths Kortrijk, Belgium) y los dos dendrogramas obtenidos fueron comparados. En ambos casos, los elementos de la matriz fueron sometidos a análisis de agrupamiento empleando la técnica del algoritmo de emparejamiento de bandas con base en promedios aritméticos (UPGMA- unweighted pair-group metered using arithmetic average).

2.7. Genotipado mediante ERIC-PCR.

Para la amplificación de las secuencias ERIC (secuencias consenso repetitivas intergénicas de Enterobacterias) mediante PCR, se utilizaron los cebadores ERIC-1 y ERIC-2 (tabla 3) de acuerdo al procedimiento utilizado previamente para la tipificación de cepas de especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus* (Berger *et al* 2007). La reacción de PCR se realizó utilizando Ecotaq DNA polimerasa y el programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo a 94°C/4 min, 35 ciclos de tres segmentos a 94°C/30 s, 47°C/30 s y 72°C/ 4 min y finalmente un ciclo de extensión a 72°C/7 min. El termociclador utilizado fue Techne Genius (techne Cambridge Limited). Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (1µg/ml) para electroforesis, como marcador de pesos moleculares se utilizaron 5 µl de Hyperladder I (BIOLINE) con el cual se obtiene un patrón de 14 bandas en un rango entre 200 y 10.000 pb. Las imágenes de los geles fueron fotografiadas y analizadas utilizando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA (Lane Manager TDI, S.A., Madrid. La amplificación de las secuencias ERIC-PCR se

realizó en las cepas pertenecientes al grupo de *L. acidophilus* dentro del grupo de 26 cepas de este estudio.

2.8. Comparación de cepas del grupo de *L. acidophilus* mediante “microarrays”.

El genoma de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) ha sido comparado con los genomas de *L. johnsonii* AD99, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *Lactobacillus* sp. AD102 mediante la técnica de “Microarrays”. El procedimiento ha sido realizado por el Dr. Bernard Berger del Centro de Investigaciones de Nestlé en Suiza.

L. johnsonii NCC533 (BL298) es una cepa de *Lactobacillus* utilizada comercialmente en la elaboración de alimentos lácteos fermentados y que tiene un reconocido efecto probiótico (Fukushima *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2007b; Inoue *et al.*, 2007a) y es la cepa de referencia generalmente utilizada por el Centro de Investigaciones de Nestlé. La secuencia del genoma completo de esta cepa ha sido publicada en el año 2004 (Pridmore *et al.*, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I. ESTUDIO DEL EFECTO PREBIÓTICO DEL SORBITOL EN RATA.

1. RESULTADOS

1.1. Efecto sobre el peso corporal, peso del tejido intestinal y pH del contenido intestinal y heces.

Para determinar la cantidad de sorbitol o de FOS ingerido por el correspondiente grupo de ratas estudiado, se midió, durante los 16 días experimentales y con una periodicidad de 36-48 horas, el agua o solución azucarada consumida por los animales. El grupo-control bebió una media de 26,4 ml de agua por rata y día (ml/rata día), el grupo-FOS 22,4 ml/rata día equivalente a 2,24 g de FOS (aproximadamente 9,9 g/Kg peso) y el grupo-sorbitol 20,7 ml/rata día, equivalente a 2,07 g de sorbitol (aproximadamente 9,29 g/kg peso). Estos resultados muestran que la presencia de sorbitol y FOS en el agua disminuye ligeramente el consumo de ésta, siendo importante destacar que ninguno de los animales presentó signos aparentes de deshidratación. Aunque el excesivo consumo de azúcares alcohol se ha descrito que tiene efecto laxante (Islam *et al.*, 2004) la consistencia de las heces en los tres grupos es aparentemente igual y el porcentaje de humedad presente en las Heces-Final y el contenido del ciego de los animales de los tres grupos no muestra diferencias significativas, solo el contenido del colon de las ratas alimentadas con sorbitol y FOS tiene un porcentaje de hidratación significativamente mayor en relación al grupo-control (Tabla 4).

El crecimiento de los animales se calculó mediante la relación entre el peso final y el peso inicial, para eliminar así factores individuales de crecimiento. El grupo-sorbitol y grupo-FOS mostraron una tendencia a disminuir el peso corporal con respecto al grupo-control (Tabla 5). Curiosamente en el momento de la extracción del ciego, en las ratas de los grupos FOS y sorbitol, se observó un

aumento considerable en el tamaño de este órgano. Esta apreciación fue confirmada al determinar los pesos del ciego con contenido y del tejido sin contenido. Las ratas alimentadas con FOS y principalmente las alimentadas con sorbitol presentan un incremento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en el peso del tejido y del contenido intestinal del ciego con relación al grupo control (Tabla 5). Este efecto se había observado anteriormente en ratas alimentadas con sorbitol, lactitol (Islam *et al.*, 2004), FOS y otros oligosacáridos como los xilooligosacáridos (Campbell *et al.*, 1997).

Los valores de pH obtenidos en las Heces-Final, contenido del ciego y del colon de los tres grupos de ratas estudiados no muestran cambios estadísticamente significativos (Tabla 5). Únicamente existe una tendencia a la acidez en Heces-Final de los animales alimentados con FOS y sorbitol. En el contenido del colon y en el ciego esa tendencia se observa solo en el grupo-FOS.

1.2. Efecto sobre la concentración de lípidos en sangre.

Los resultados obtenidos en el perfil lipídico (colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos) muestran una tendencia estadísticamente no significativa a disminuir en las ratas que han consumido sorbitol (Tabla 6). Aunque en este estudio la disminución de los lípidos en el suero de las ratas aparece estadísticamente solo como una tendencia, es importante destacar que los animales nacidos en cautividad y alimentados con dietas normales, tienen muy posiblemente unos niveles basales de lípidos normales y por esta razón los cambios post tratamiento no son de gran magnitud. Una disminución de los lípidos en sangre por el consumo de prebióticos ha sido observado previamente por otros autores, así experimentos *in vivo* en los que se ha suministrado un prebiótico como la inulina a humanos adultos con niveles sanguíneos elevados de colesterol y triglicéridos ha resultado en la disminución del colesterol total, LDL, VLDL (colesterol de muy baja densidad) y triglicéridos (Balcazar-Muñoz *et al.*, 2003). Experimentos *in vitro* en medios de cultivo con *Lactobacillus casei* en presencia de prebióticos y colesterol

han demostrado la influencia de los prebióticos en la capacidad de remoción de colesterol por esa bacteria (Liong and Shah, 2005).

	Grupo-control	Grupo-FOS	Grupo-sorbitol
Porcentaje de humedad			
Contenido del ciego	77,82± 3,186	79,25± 1,696	78,12± 3,501
Contenido del colon	77,84 ^a ± 3,175	82,98 ^b ± 2,503	82,74 ^b ± 2,475
Heces-Final	64,24± 6,012	65,24± 6,096	66,09± 3,084
Incremento de peso			
Corporal (PF/PI)	1,78± 0,04	1,69± 0,11	1,67± 0,07
Colon con contenido (% PC)	1,29 ^a ± 0,169	1,32 ^a ± 0,173	1,91 ^b ± 0,442
Tejido del colon	1,55± 0,144	1,4± 0,12	1,58± 0,20
Ciego con contenido (% PC)	1,90 ^a ± 0,109	2,61 ^b ± 0,217	3,21 ^c ± 0,26
Tejido del ciego	0,77 ^a ± 0,098	1,02 ^b ± 0,102	1,03 ^b ± 0,12
Determinación de pH			
Heces-Final	6,41± 0,262	5,92± 0,487	6,05± 0,386
Contenido del colon	6,39± 0,082	6,24± 0,153	6,48± 0,315
Contenido del ciego	6,3± 0,068	6,17± 0,202	6,51± 0,319

Tabla 5. Efecto del sorbitol y FOS en el incremento de peso corporal, colon y ciego de las ratas y en el pH de heces y contenido intestinal. PF: peso final. PI: peso inicial. PC: peso corporal. Las medidas de peso del tejido y contenido intestinal están expresadas en gramos. Valores son la media por grupo n=5 control, n=6 sorbitol y FOS. ^{abc} Las medias del grupo que no comparten la letra del superíndice en la misma muestra son estadísticamente diferentes (P≤ 0,05).

	Grupo-control	Grupo-FOS	Grupo-sorbitol	P ³
Colesterol Total	66,2 ± 10,70	66,8 ± 8,75	59 ± 6,98	0,272
Colesterol HDL	32,8 ± 3,11	33,2 ± 2,20	30,8 ± 2,31	0,591
Colesterol LDL	33,4 ± 7,89	33,7 ± 7,86	28,2 ± 5,41	0,284
Triglicéridos	181,8 ± 28,11	171,5 ± 38,52	154,1 ± 58,6	0,355

Tabla 6. Concentración sanguínea de lípidos (mg/dl) en los tres grupos de ratas: control, FOS y sorbitol. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad. Los valores son la media por grupo n=5 control, n=6 sorbitol y FOS.

1.3. Concentración de lactato y ácidos grasos de cadena corta en heces y contenido intestinal de rata

La concentración total de ácidos orgánicos (AO) aumentó en todas las muestras obtenidas de las ratas alimentadas con FOS o sorbitol comparadas con las del grupo-control (Tabla 7). En las muestras de contenido del ciego y del colon existe un aumento importante de propionato y butirato en las ratas que consumieron los carbohidratos, siendo las diferencias estadísticamente significativas para el propionato en el contenido del ciego del grupo-FOS y para el butirato en el contenido del ciego y el colon del grupo-sorbitol. En las Heces-Final se siguen las mismas tendencias, a excepción que, en el grupo-FOS no aumenta el propionato y se observa un aumento significativo en la producción de acetato (Tabla 7). Curiosamente en las muestras de contenido del colon del grupo-FOS hay una disminución de lactato que se observa también como una tendencia en las Heces-Final, estos resultados pueden explicarse por la posible presencia de bacterias consumidoras de ácido láctico que lo transforman en otros metabolitos.

El acetato y el propionato producido en el intestino alcanzan el hígado vía porta y afectan la síntesis hepática de colesterol, el acetato se incorpora a la

lipogénesis, mientras el propionato actúa como inhibidor competitivo impidiendo la entrada del acetato. El cociente acetato/propionato puede ser entonces un marcador de la capacidad hipolipemiante de un determinado prebiótico. Los valores resultantes del cociente acetato/propionato en cada una de las muestras de rata analizadas (Tabla 7) muestran que en el contenido del ciego y del colon de las ratas alimentadas con FOS y sorbitol el cociente acetato/propionato es menor que en el grupo control, siendo estadísticamente representativo ($P \leq 0,05$) en el contenido del ciego. Curiosamente en las Heces-Final los valores del cociente acetato/propionato son mayores en las ratas que consumieron carbohidratos que en el grupo control. Es posible que el cambio en las condiciones ambientales, más aerobias en el recto y las heces sean las responsables de estas variaciones.

1.4. Determinación de inmunoglobulina A en heces de rata.

La inmunoglobulina A secretora (IgAs) fue cuantificada en heces de rata después del tratamiento con FOS o sorbitol mediante la técnica de ELISA (Figura 5). Los resultados obtenidos muestran un aumento no significativo de las IgAs en las ratas alimentadas con carbohidratos (FOS $1,250 \pm 0,510$ y sorbitol $1,406 \pm 0,865$ mg IgAs/g peso seco), respecto al grupo control $1,179 \pm 0,349$ mg IgAs/g peso seco. Aumentos significativos de IgAs en heces han sido observados previamente por otros autores en ratones cuando son alimentados con prebióticos como los FOS ó isomalto-oligosacáridos (Hosono *et al.*, 2003; Mizubuchi *et al.*, 2005). La cuantificación de la IgAs en las muestras de colon y ciego de los animales no fue posible por la falta de reproducibilidad de los resultados, debido probablemente a la existencia de proteasas en las muestras, resistentes a los inhibidores utilizados en el ensayo.

	Grupo-control	Grupo-FOS	Grupo-sorbitol
Contenido del ciego			
Lactato	0,99±0,28	1,05±0,39	0,93±0,43
Acetato	15,30±3,80	18,36±3,10	15,28±3,13
Propionato	2,87 ^a ±1,13	3,92 ^b ±0,54	3,39 ^{ab} ±0,51
Butirato	25,70 ^a ±4,79	32,00 ^{ab} ±4,78	34,88 ^b ±8,56
AO Total	47,88 ^a ±9,99	60,20 ^b ±8,06	59,25 ^{ab} ±9,48
Acet/ prop	5,59 ^a ±0,89	4,68 ^b ±0,32	4,50 ^b ±0,60
Contenido del colon			
Lactato	1,59 ^a ±0,42	0,90 ^b ±0,43	1,26 ^{ab} ±0,66
Acetato	12,98±2,84	13,40±1,66	12,39±3,19
Propionato	2,68±0,52	3,51±0,83	3,17±0,54
Butirato	23,09 ^a ±2,45	30,91 ^{ab} ±5,15	35,65 ^b ±12,24
AO Total	43,40±5,29	53,49±6,24	57,46±16,96
Acet/ prop	4,97±1,34	3,95±0,83	3,89±0,58
Heces-Final			
Lactato	9,91±1,89	8,05±1,72	11,87±4,69
Acetato	12,60 ^a ±3,42	19,58 ^b ±5,26	16,57 ^{ab} ±2,21
Propionato	2,12±0,80	2,03±0,56	2,32±0,94
Butirato	56,72±5,35	67,05±30,08	78,66±31,86
AO Total	85,12 ±7,43	103,34±37,14	118,30±40,92
Acet/ prop	6,23±1,39	10,29±3,98	8,11±3,21

Tabla 7. Concentración de lactato y ácidos grasos de cadena corta en las diferentes muestras intestinales de rata. Los valores están expresados en $\mu\text{mol/g}$ de materia seca. Los valores corresponden a la media por grupo $n=5$ grupo control y $n=6$ para FOS y sorbitol. AO Total: ácidos orgánicos total, corresponde a la suma de los valores obtenidos de ácido málico, láctico, acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico e isovalérico. ^{ab} Las medias del grupo que no comparten la letra del superíndice en la misma línea son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$). Acet/prop corresponde al cociente del valor obtenido para el acetato dividido el valor obtenido para el propionato.

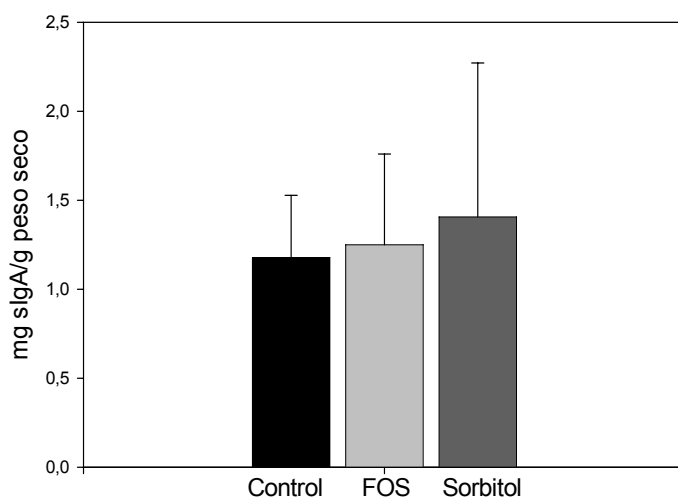


Figura 5. Inmunoglobulina A secretora (IgAs) en las muestras de heces de rata alimentadas con FOS o sorbitol. Cada muestra fue analizada por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar por grupo. n=5 grupo control y n=6 para FOS y sorbitol.

1.5. Análisis bacteriológico en las muestras de heces y contenido del colon y del ciego por métodos culturales.

Con el objeto de que la retención de agua en el intestino no interfiriera en el peso de las muestras y por tanto en el recuento bacteriano, los resultados de los recuentos bacterianos en todas las muestras fueron calculados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de materia seca (Log ufc/g ms) (Tabla 8). Aunque los grupos de ratas fueron formados aleatoriamente, el número de anaerobios totales y bacterias ácido lácticas en Heces-Inicial (tomadas antes del inicio de la ingesta de carbohidratos) presentan diferencias significativas entre grupos. Los bacteroides aumentan significativamente ($p \leq 0,05$) en las Heces-Final como consecuencia del consumo de FOS o sorbitol. Igualmente hay un aumento significativo en el número de cocos Gram-positivos en las Heces-Final de ambos grupos de carbohidratos.

La composición microbiana del contenido del colon y del ciego es estadísticamente diferente entre los tres grupos de ratas sometidos a las dietas control, FOS y sorbitol (Tabla 8). Únicamente no hay diferencias estadísticamente significativas para las enterobacterias en el contenido del colon y los cocos Gram-positivos en el contenido del ciego. Por otra parte, los anaerobios totales en el contenido de colon y en el contenido de ciego mostraron un incremento representativo en el grupo-FOS con respecto al grupo-control y grupo-sorbitol y las BAL aumentaron en el grupo-FOS y grupo-sorbitol (tabla 8). Para el grupo-FOS el aumento podría deberse a un incremento en el número de bífidobacterias como ha sido demostrado para ese prebiótico en estudios previos (Campbell, *et al.*, 1997). El número de *Bacteroides* también está aumentado respecto al grupo-control, siendo estadísticamente significativo en el contenido del colon para las ratas alimentadas con FOS, y en el contenido del ciego para las alimentadas con sorbitol. El número de aerobios totales fue significativamente mayor en el contenido del colon para el grupo-sorbitol y en el contenido del ciego aumentó de forma similar para los grupos FOS y sorbitol respecto al grupo-control. Los recuentos de enterobacterias disminuyen significativamente en el contenido del ciego de los animales tratados con sorbitol, Los cocos Gram-positivos tienen un aumento significativo en el contenido del colon para los grupos FOS y sorbitol, y en el ciego para las ratas que han consumido FOS.

	Heces-Inicial			Heces-Final			Heces- Inicial – Heces-Final		
	Control	FOS	Sorbitol	Control	FOS	Sorbitol	Control	FOS	Sorbitol
Total Anaerobios	9,24 ^a ±0,31	9,66 ^b ±0,07	9,66 ^b ±0,11	9,5 ^a ±0,13	9,78 ^b ±0,14	9,9 ^b ±0,11	0,26±0,23	0,14±0,17	0,24±0,13
BAL	9,52 ^a ±0,28	9,89 ^b ±0,10	9,95 ^b ±0,13	9,67 ^a ±0,14	9,98 ^b ±0,25	10,09 ^b ±0,11	0,15±0,26	0,09±0,32	0,15±0,21
Bacteroides	8,81±0,27	8,91±0,17	8,98±0,15	8,95 ^a ±0,06	9,29 ^b ±0,14	9,53 ^c ±0,14	0,14 ^a ±0,22	0,37 ^{ab} ±0,20	0,55 ^b ±0,23
Total Aerobios	9,09±0,43	9,29±0,22	9±0,31	9,04±0,04	9,21±0,30	9,35±0,11	-0,04±0,43	-0,07±0,37	0,34±0,38
Enterobacterias	7,44±0,37	7,17±0,60	7,01±0,28	6,97±0,30	6,81±0,51	6,69±0,39	-0,47±0,50	-0,35±0,90	-0,31±0,54
Cocos Gram +	8,8±0,29	8,92±0,23	8,8±0,15	9,03 ^a ±0,08	9,35 ^b ±0,27	9,38 ^b ±0,11	0,23±0,28	0,43±0,44	0,58±0,25

	Colon			Ciego		
	Control	FOS	Sorbitol	Control	FOS	Sorbitol
Total Anaerobios	9,20 ^a ±0,24	9,67 ^b ±0,38	9,11 ^a ±0,26	8,77 ^a ±0,34	9,70 ^b ±0,14	8,96 ^a ±0,36
BAL	9,37 ^a ±0,18	9,89 ^b ±0,15	9,96 ^b ±0,10	9,50 ^a ±0,17	9,94 ^b ±0,22	10,01 ^b ±0,13
Bacteroides	8,74 ^a ±0,32	9,26 ^b ±0,21	8,95 ^{ab} ±0,24	8,92 ^a ±0,33	9,12 ^{ab} ±0,16	9,30 ^b ±0,12
Total Aerobios	8,92 ^a ±0,12	9,07 ^a ±0,24	9,31 ^b ±0,12	8,81 ^a ±0,25	9,10 ^b ±0,11	9,20 ^b ±0,09
Enterobacterias	7,35±0,14	7,67±0,38	7,39±0,57	7,73 ^a ±0,28	7,86 ^a ±0,16	7,18 ^b ±0,37
Cocos Gram +	8,99 ^a ±0,16	9,40 ^b ±0,22	9,23 ^b ±0,08	9,08 ^a ±0,20	9,37 ^b ±0,27	9,27 ^{ab} ±0,12

Tabla 8. Recuentos bacterianos en Heces, Colon y Ciego BAL (Bacterias productoras de ácido láctico). Los valores son la media de n=5 en control y n=6 en FOS y sorbitol y representan el Log ufc/g de materia seca. ^{abc} Los valores en la misma línea que no comparten letra del superíndice entre los grupos son estadísticamente diferentes (P≤ 0,05)

1.6. Análisis de las muestras de Heces-Final y contenido del colon y del ciego por PCR-DGGE.

1.6.1. Microbiota total.

Se ha realizado un análisis de la microbiota total por PCR-DGGE con los cebadores universales HDA1-GC y HDA2 (Walter *et al.*, 2000) y una mezcla de DNA bacteriano aislado de las cinco ratas (grupo-control) o de las seis ratas (grupos sorbitol y FOS) (Figura 6). Los resultados mostraron que algunas de las bandas de DNA aisladas de los geles y secuenciadas eran heteroduplex, sin embargo, se encontró un buen grado de reproducibilidad entre los geles de DGGE. En la Tabla 9 se pueden observar los valores del coeficiente de similitud de Dice (D_{sc}) al comparar los perfiles de bandas obtenidos entre los diferentes grupos. Se observa que en Heces-Inicial la similitud entre los grupos es mayor que la encontrada en Heces-Final. Cabe destacar una similitud muy baja (79,1%) cuando se comparan los grupos control y sorbitol. En el contenido del colon y el ciego la similitud entre grupos es también baja, principalmente al comparar el grupo-sorbitol con los grupos control y FOS. Esto demuestra por un lado que el consumo de sorbitol y FOS por las ratas ha modificado la microbiota intestinal y por otro lado, que esa modificación es diferente entre ambos carbohidratos.

En la Figura 6 se puede observar que las diferencias entre las bandas de DNA de una determinada bacteria, en los tres grupos experimentales, han sido valoradas de acuerdo a la intensidad de la tinción. Así mismo, las bandas que tienen la misma intensidad de tinción en los tres grupos (indicadas con una flecha) fueron consideradas como control interno. Se observan bandas que sólo están presentes o con mayor intensidad de tinción en el grupo-sorbitol (Fig 6A. S1 a S6), igualmente algunas bandas solo se observan o son más intensas en el grupo-FOS (Fig 6A. F1 a F4), y otras bandas se observan con mayor intensidad en los grupos FOS y sorbitol respecto al control (Fig 6A. FS1 a FS10). Estos resultados

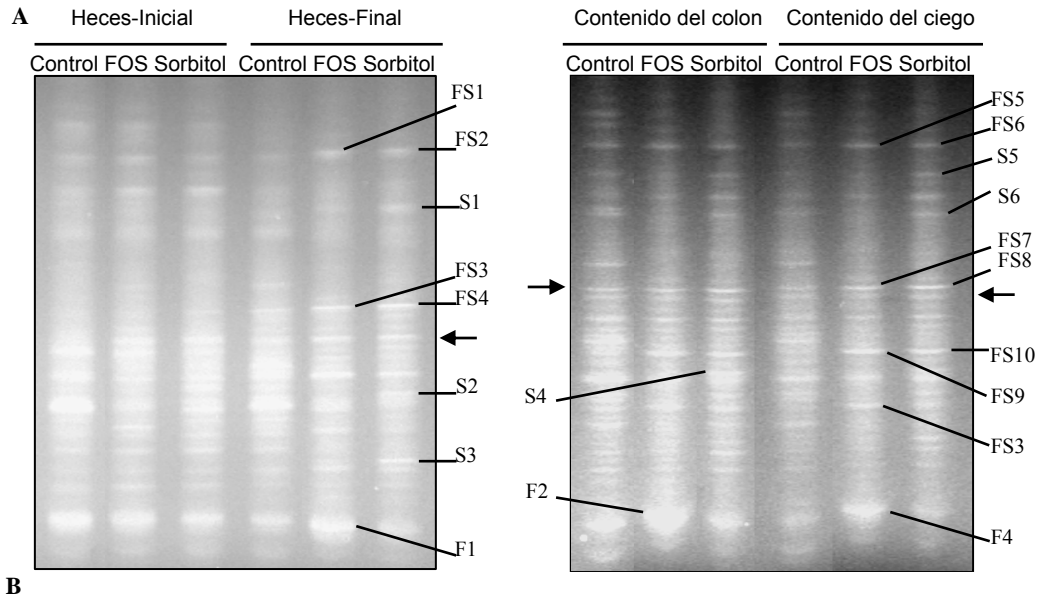
muestran que la presencia de algunas bacterias intestinales es afectada de forma similar por ambos carbohidratos, sin embargo existen otras bacterias afectadas específicamente por el consumo de FOS o de sorbitol. Las bandas de DNA del grupo-sorbitol, en las que se observó mayor intensidad en la tinción, fueron extraídas del gel de acrilamida, reamplificadas con los cebadores HDA1 y HDA2 y ambas cadenas fueron secuenciadas. El análisis de las secuencias mostró alta similitud con secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA de bacterias pertenecientes al orden Clostridiales. Además, se encontró también una secuencia que pertenece a *Lactobacillus* en muestras fecales de ambos tratamientos (Figura 6B).

	Heces-inicial	Heces-Final	Contenido del colon	Contenido del ciego
Control vs FOS	87,8	82,0	84,5	83,0
Control vs sorbitol	87,8	79,1	84,2	80,5
FOS vs sorbitol	86,9	82,7	83,3	80,7

Tabla 9. Valores del coeficiente de Dice (Dcs) de comparación entre grupos de los perfiles de bandas de DNA amplificadas con los cebadores universales HDA y separadas por DGGE. Dos muestras son similares entre si cuando el valor de D_{cs} es muy cercano a uno, lo que corresponde a un valor mayor del 95%. Los valores están expresados en porcentaje y corresponden a la comparación entre grupos de las bandas obtenidas de mezclas de DNA de las ratas por grupo. n=5 en control, n=6 en FOS y sorbitol.

1.6.2. Especies de *Lactobacillus*.

Utilizando los cebadores específicos para especies de *Lactobacillus lac1* y *lac2-GC* (Walter *et al.*, 2000), se analizó el efecto del consumo de FOS y de sorbitol en la población de *Lactobacillus* presentes en las heces y en los compartimentos intestinales de las ratas. Los perfiles de bandas en PCR-DGGE para cada grupo de ratas en las muestras de heces y contenido intestinal, muestran claramente la existencia de cinco bandas representativas de cinco



B

Banda DNA	Identificación (Origen)	Acceso N°	% identidad	Orden
S1	Bacteria no cultivable clon C22-a01 (Ciego de ratón)	AY992764	100	Desconocido
S2	Bacteria no cultivable clon abc55c08.x1 (Ciego de ratón)	AY667730	100	Desconocido
S3	<i>Clostridium</i> sp. AP 81 (Metano de lodo fermentado)	AB273730	96	Clostridiales
S4	<i>Catonella</i> sp. Clon BL045B64 (Fluido alveolar humano)	DQ188294	100	Clostridiales
S6	<i>Lachnospira pectinoschiza</i> aislado M56 (Colon de camello)	AY699283	98	Clostridiales
FS1,FS2	<i>Clostridium</i> sp. Iso-A2 (Sedimento de estuario)	DQ677006	94	Clostridiales
FS3,FS4	<i>Lactobacillus</i> sp Clon BR14AG05 (Intestino de rata)	DQ857099	98	Lactobacillares
FS5,FS6	Bacteria no cultivable clon C10-A01 (Ciego de ratón)	AY991321	100	Clostridiales
FS7,FS8	Bacteria no cultivable clon R-1240 (Intestino de ratón)	DQ777908	95	Clostridiales
FS8,FS10	Bacteria no cultivable clon C670 (Heces humanas)	DQ326528	100	Clostridiales

Figura 6. PCR-DGGE de las mezclas de DNA de los grupos Control (n=5) y FOS o Sorbitol (n=6). (A): perfil de bandas generado con los cebadores universales HDA1-GC y HDA2. S, bandas de DNA que incrementan su tinción en el grupo sorbitol; F, bandas de DNA que incrementan su tinción en el grupo FOS; FS, bandas de DNA con mayor intensidad en los grupos FOS y sorbitol; La flecha indica bandas de DNA que se tiñen con la misma intensidad en los tres grupos (B): Identificación de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA al ser comparadas con la base de datos del GenBank (programa BLAST).

especies de lactobacilos presentes a lo largo de todo el intestino (Figura 7). Una banda representativa de cada lactobacilo fue extraída del gel, secuenciada y comparada en la base de datos del GenBank (programa BLAST). Los resultados de los alineamientos con los respectivos porcentajes de identidad son: Banda 1L: *Lactobacillus johnsonii* (96%); Banda 3L: *Lactobacillus intestinalis*, (98%); banda 4L *Lactobacillus murinus* (96%); Banda 5L: *Lactobacillus. reuteri* (99%). La banda 2L *Lactobacillus* sp (100%). Para la especie de *L. murinus* aparecen siempre dos bandas de DNA en los análisis de DGGE con los cebadores Lac1 y Lac2-GC (Figura 8). Este fenómeno ha sido observado anteriormente en análisis de DGGE en cepas de *Microcystis* (Janse *et al.*, 2004) y podría explicarse por la presencia de dos diferentes genes que codifican para el 16S rRNA en una misma cepa por la inserción, delección o sustitución de una simple base en uno de los operones.

En los perfiles de bandas obtenidos se observó que la banda de DNA 2L, identificada como *Lactobacillus* sp., estaba presente con mayor intensidad en las muestras de Heces-Inicial, disminuye marcadamente su intensidad en Heces-Final y en las muestras del contenido del ciego y el colon de los grupos control y FOS, pero conserva su intensidad en el contenido del ciego y el colon de los animales alimentados con sorbitol. La banda de DNA 5L identificada como *L. reuteri*, aumenta su intensidad en los grupos de ratas que se alimentaron con FOS o sorbitol. Las bandas que se presentan con una intensidad constante en todas las líneas de un gel como es el caso de la banda 1L, pueden ser tomadas como un control interno, que demuestra que en todos los casos se utilizó una cantidad constante de DNA y que las diferencias encontradas en las demás bandas son significativas (Schultz, *et al.* 2004). Es importante resaltar que aunque el DGGE no es un método cuantitativo, la intensidad de las bandas refleja en cierta medida el número de amplificaciones específicas (Heilig, *et al.* 2002).

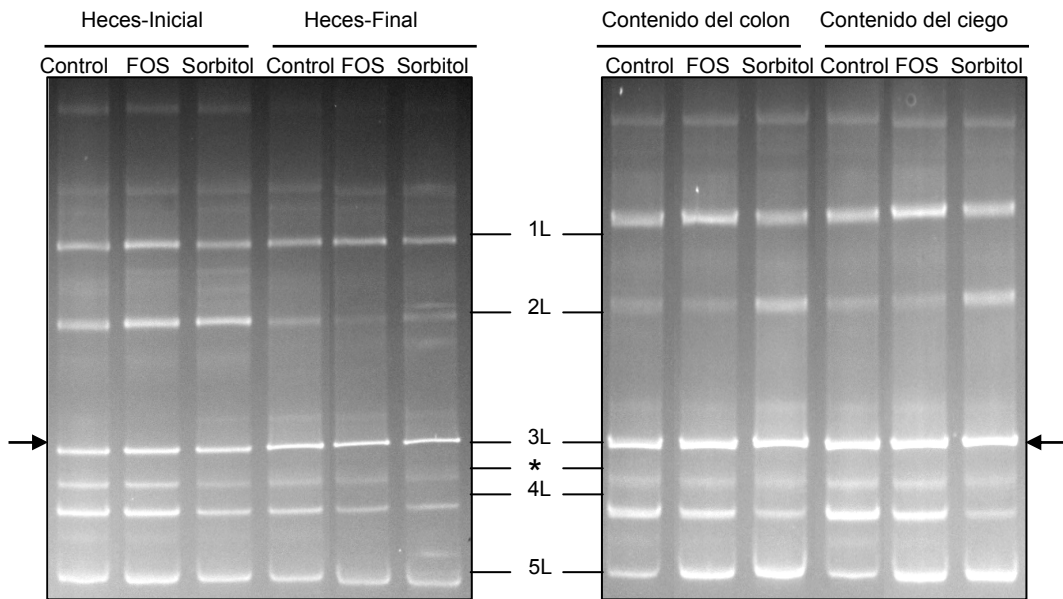


Figura 7. Análisis por PCR-DGGE mostrando el perfil de bandas generado por la mezcla de las muestras de DNA de los grupos Control (n=5) y FOS o Sorbitol (n=6) con los cebadores específicos para lactobacilos Lac1 y Lac2-GC. La flecha indica bandas de DNA que se tiñen con la misma intensidad en los tres grupos. El asterisco muestra una banda de DNA correspondiente a la misma cepa de la banda 4.

L. johnsonii *L. murinus* *Lactobacillus* sp. *L. reuteri* *L. intestinalis*

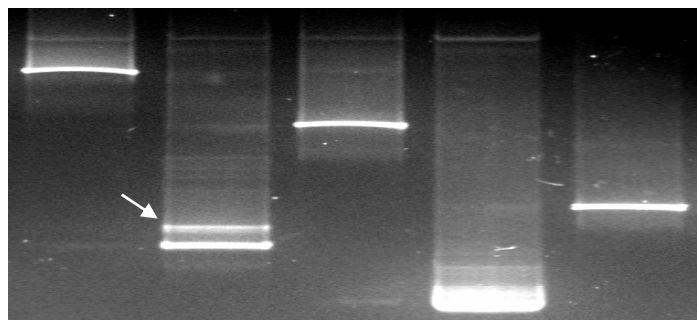


Figura 8. PCR-DGGE con cebadores específicos para *Lactobacillus* de las cinco cepas presentes en intestino de rata utilizando los cebadores Lac1 y Lac2 G-C a partir de DNA extraído de cultivos puros (Ver apartado 1.5). La flecha muestra la presencia de dos bandas en *L. murinus*.

1.6.3. Especies de *Bifidobacterium*.

En el patrón de bandas obtenido en PCR-DGGE con los cebadores específicos para especies de *Bifidobacterium* Bif164F y Bif662R-GC (Montesi *et al.*, 2005) (Figura 9), se observa que la banda número 2B que está presente en las muestras de heces inicial de los tres grupos (control, FOS y sorbitol) aumenta su intensidad en los grupos FOS y sorbitol después de la etapa experimental, siendo este aumento de intensidad de la banda más evidente en las muestras de Heces-Final y contenido del colon que en las muestras de contenido del ciego. En el grupo control la banda 2B mantiene la misma intensidad después del tratamiento que en las heces inicial, o tiende a desaparecer como en el caso de la muestra de contenido del ciego. La banda número 1B aparece con poca intensidad solo en las muestras post tratamiento del grupo-control y en el contenido del colon del grupo-sorbitol. La secuenciación de las dos cadenas del DNA de las bandas extraídas del gel de acrilamida, permitió establecer la identidad de la banda 2B como *Bifidobacterium pseudolongum* con un 99% de homología, mientras que la banda 1B no presentó homología con ninguna de las secuencias del GenBank ni del Ribosomal Database Project II, por lo cual podría pensarse que se trate de una secuencia inespecífica presente en algunas de las muestras de DNA y que amplifica con los cebadores empleados. El aislamiento del *B. pseudolongum* de las muestras intestinales de rata no se consiguió en las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos.

1.7. Aislamiento e identificación de especies de *Lactobacillus*.

Varias muestras del contenido intestinal de rata fueron cultivadas en agar Rogosa con el objeto de aislar las diferentes especies de *Lactobacillus* presentes. Cien colonias fueron seleccionadas y sujetas a análisis por PCR-DGGE utilizando los cebadores específicos Lac1 y Lac2-GC. Una representante de cada una de las colonias cuya banda en PCR-DGGE correspondía con una de las cinco bandas identificadas anteriormente en el PCR-DGGE con las muestras de DNA extraídas

de intestino, fue aislada, recultivada en agar MRS y conservada en glicerol al 20% a -80°C . Para las cinco especies de *Lactobacillus* aisladas, 1124 pares de bases del gen que codifica para el 16S rRNA fueron amplificadas, y secuenciadas. A cada una de las especies aisladas le fue asignado un nombre de cepa y se realizó un alineamiento de las secuencias en la base de datos de GenBank (programa BLAST) (Tabla 10). Para confirmar la identidad de las cepas aisladas, las secuencias fueron comparadas con algunos microorganismos de referencia a través de un análisis filogenético (Figura 10). Las cepas AD99, AD38, AD23 y AD100 fueron identificadas como *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus murinus* respectivamente. La cepa AD102 aparece en un grupo aislado, cercano a *L. johnsonii* y *L. gasseri*, pero no pudo ser asignada a ninguna especie descrita y nos referiremos a ella como *Lactobacillus* sp.102.

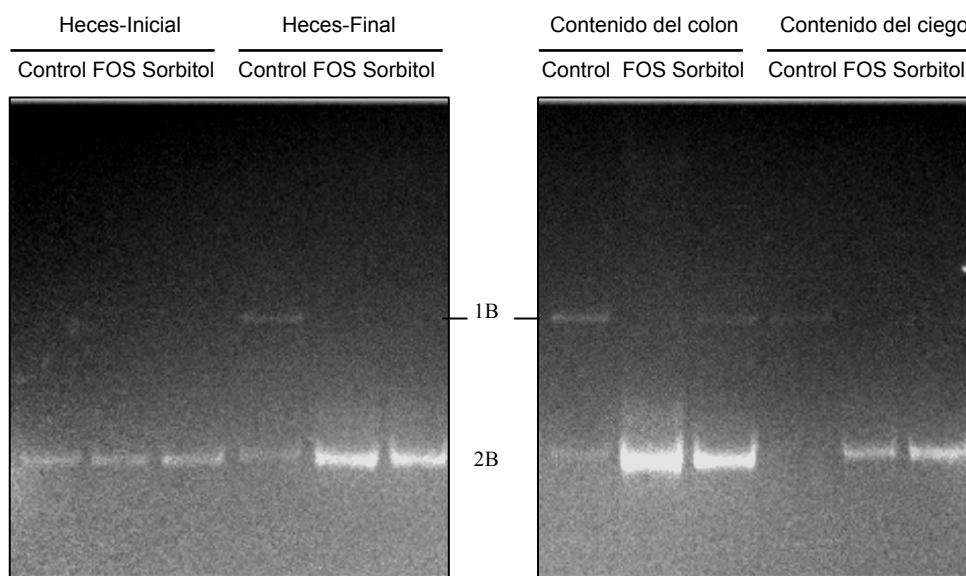


Figura 9. Análisis por PCR-DGGE mostrando el perfil de bandas generado por la mezcla de las muestras de DNA de los grupos Control (n=5) y FOS o Sorbitol (n=6) amplificadas por PCR con los cebadores específicos para bifidobacterias Bif164F y Bif662R-GC. 1B: banda identificada por secuenciación como *B. pseudolongum* 2B: Banda no identificada.

Banda en DGGE	Nombre de cepa	Acceso N°	Identificación	% identidad
1L	AD99	EF187257	<i>Lactobacillus johnsonii</i> 16S rRNA, secuencia parcial (AB295648.1)	99
2L	AD102	EF187258	<i>Lactobacillus</i> sp. BCRC 17755 16S rRNA, secuencia parcial (EU487512.1)	99
3L	AD38	EF187259	<i>Lactobacillus intestinalis</i> DSM6629 ^T (AJ306299)	99
4L	AD100	EF187260	<i>Lactobacillus murinus</i> NBRC4221 16S rRNA, secuencia parcial (AB326349.1)	99
5L	AD23	EF187261	<i>Lactobacillus reuteri</i> Is40 16S rRNA, secuencia parcial (EU381124.1)	99

Tabla 10. Identificación de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA al ser comparadas con la base de datos del GenBank (programa BLAST) de las especies de *Lactobacillus* encontradas en el tracto intestinal de rata correspondientes a las bandas de DNA obtenidas por PCR-DGGE utilizando los cebadores específicos Lac1 y Lac2-GC.

Las secuencias de las bandas extraídas de los geles de DGGE originadas del estudio de la microbiota intestinal de ratas por métodos moleculares incluidas en este trabajo han sido depositadas en el GenBank con los números de acceso EF187262 hasta EF187271. La secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA de *B. pseudolongum* no ha sido incluida en el GenBank debido a que su hallazgo no ha sido aún publicado (anexo 3).

1.8. PCR cuantitativa de *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. reuteri* AD23 en heces, y contenido del colon y del ciego de rata.

En los resultados obtenidos en PCR cuantitativa, la curva de temperatura de fusión permitió valorar la especificidad de la reacción de amplificación para cada una de las cepas, confirmando que los fragmentos amplificados en cada caso

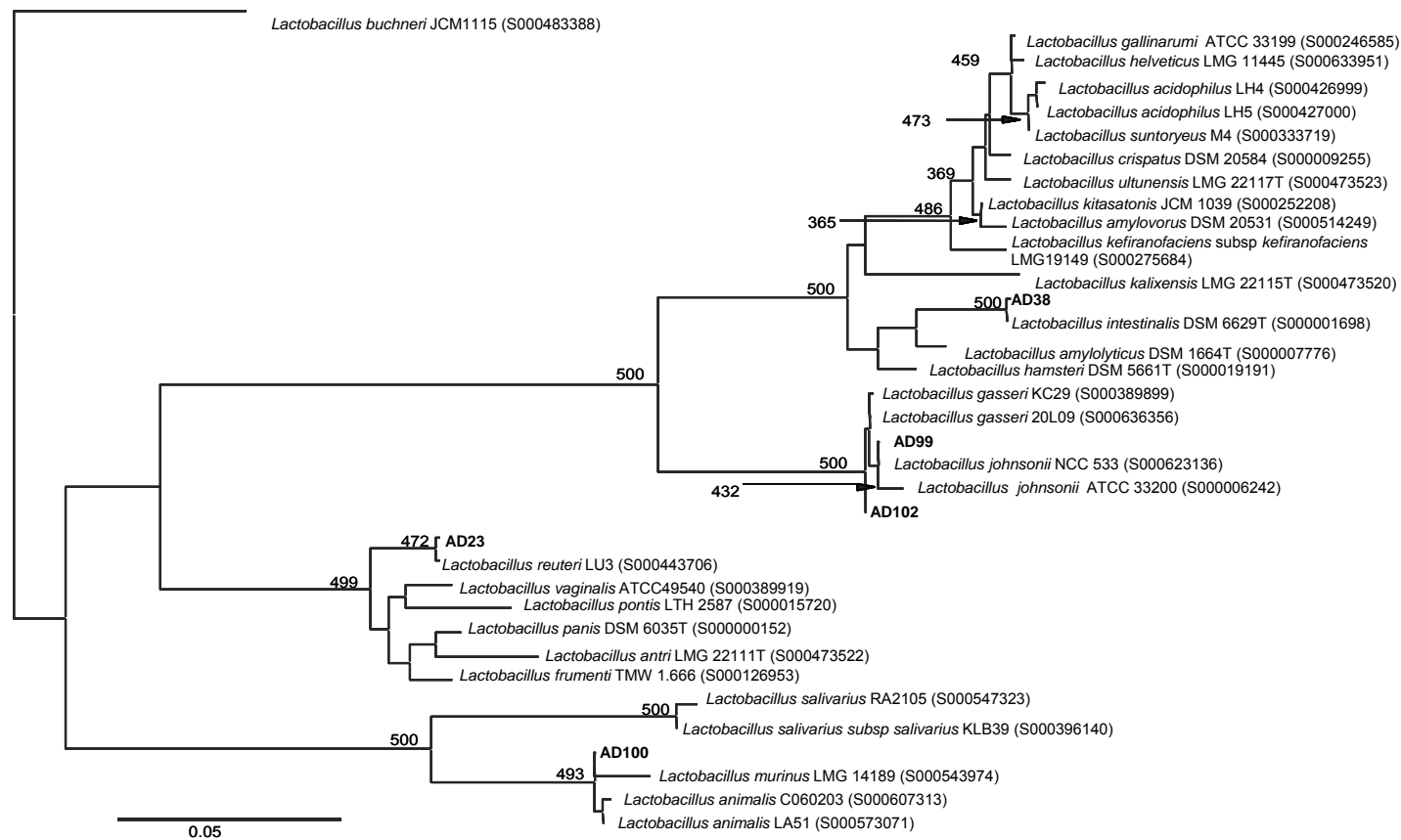


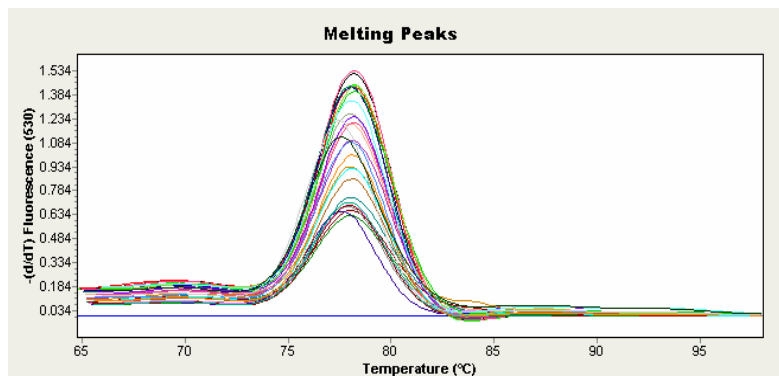
Figura 10. Análisis filogenético de las cinco especies de *Lactobacillus* aisladas de intestino de rata (AD23, AD38, AD99, AD100 y AD102). Secuencias parciales del gen que codifica para el 16S rRNA de estas cepas, fueron comparadas con otros organismos de referencia. Este árbol ha sido arbitrariamente formado basado en la secuencia de *Lactobacillus buchneri*. Base de datos proyecto II con números de acceso colocados en paréntesis

tienen la misma temperatura de fusión, siendo 78,1°C para *Lactobacillus* sp. AD102 y 80,6°C para *L. reuteri* AD23 (Figura 11). Los productos de PCR cuantitativa fueron además examinados en gel de agarosa para verificar la amplificación de una sola banda correspondiente al tamaño esperado para cada caso, algunas de estas amplificaciones fueron secuenciadas para confirmar que la amplificación es específica para la especie analizada. Las curvas de calibración fueron construidas con diluciones de un patrón con número de células conocido correspondiente a un rango de concentración entre $9,83 \times 10^3$ y $9,83 \times 10^8$ células/ml para *Lactobacillus* sp. AD102 y entre $9,66 \times 10^3$ y $9,66 \times 10^8$ células/ml para *L. reuteri* AD23. Los altos valores de eficiencia obtenidos en las curvas de calibración, $E = 1.954$ para *Lactobacillus* sp. AD102 y $E = 1.974$ para *L. reuteri* AD23 confirman que la cuantificación es lineal para ese rango de concentraciones. La secuencia amplificada fue un fragmento del gen *dnaA*, que se encuentra en copia única dentro del genoma, lo que permite relacionar directamente el número de copias amplificadas con el número de células bacterianas presentes en la muestra.

Los resultados de PCR cuantitativa muestran que el número de células de *Lactobacillus* sp. AD102, disminuye en las heces después de los tratamientos y este efecto es independiente de la dieta suministrada, ya que se observa también en el grupo-control (Figura 12). En las muestras de Heces-Inicial, las diferencias en el número de células de *Lactobacillus* sp. AD102 no son estadísticamente significativas entre los tres grupos de ratas, sin embargo, en las Heces-Final, contenido del colon y del ciego el número de células de esa cepa fue significativamente más alto en las ratas alimentadas con sorbitol. Además, el número de células de *Lactobacillus* sp. AD102 decrece significativamente después del tratamiento en los grupos control y FOS, pero no en el grupo del sorbitol (Heces-Inicial respecto a Heces-Final, $P = 0,0015$ (control); $P = 0,0002$ (FOS); y $P = 0,2895$ (sorbitol)). Respecto a la cuantificación de *L. reuteri* AD23, se observa que el número de células de esta cepa en las Heces-Inicial no difiere significativamente entre los tres grupos. Sin embargo, hay un aumento estadísticamente significativo de *L. reuteri* AD23 en las Heces-Final y el contenido del colon del grupo-sorbitol y en el contenido del ciego del grupo-FOS (Figura 12).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en PCR-DGGE cuando se analiza la intensidad de las bandas, demostrando que el consumo de sorbitol da lugar en el ecosistema intestinal de las ratas, a una persistencia de *Lactobacillus* sp. AD102 y un aumento en la población de *L. reuteri* AD23, además esta segunda especie también aumenta su población cuando las ratas son alimentadas con FOS.

***Lactobacillus* sp. AD102**



***Lactobacillus reuteri* AD23**

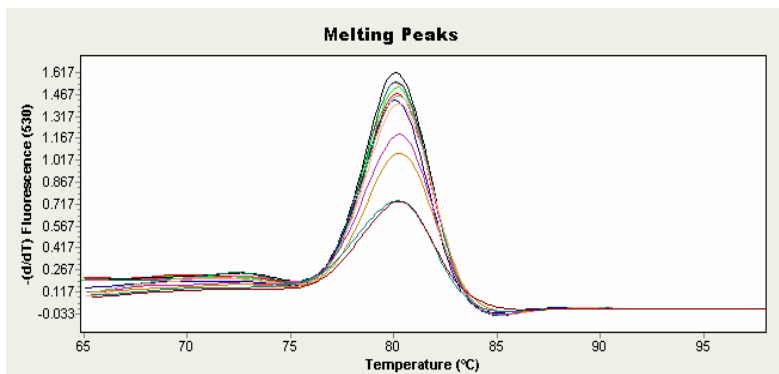
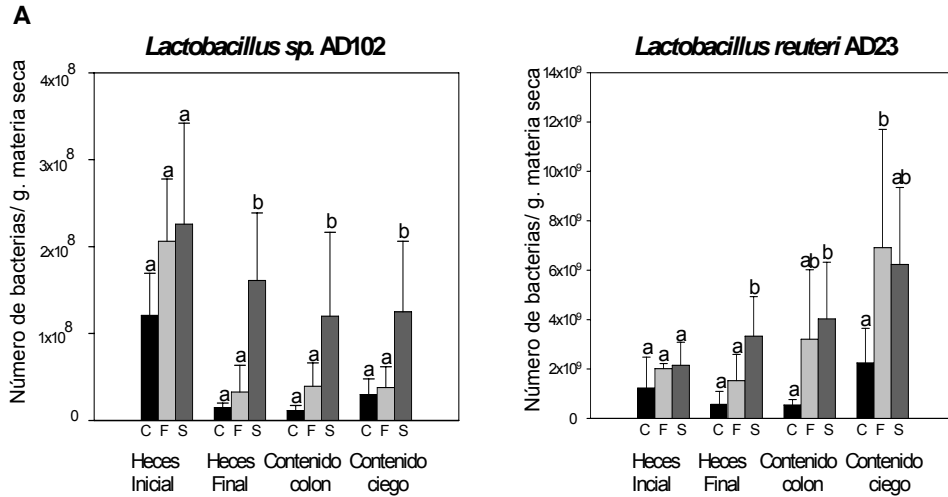


Figura 11. Curvas de temperatura de fusión en PCR-Cuantitativa, que demuestran la especificidad de la amplificación con los cebadores seleccionados para cada cepa., siendo 78,1°C y 80,6°C para *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. reuteri* AD23 respectivamente



B

	grupo-control	grupo-FOS	Grupo-sorbitol
<i>Lactobacillus sp. AD102</i>			
Heces-Inicial	$1,21 \times 10^8 \pm 4,84 \times 10^7$	$2,06 \times 10^8 \pm 7,18 \times 10^7$	$2,26 \times 10^8 \pm 1,16 \times 10^8$
Heces-Final	$1,49 \times 10^7 \pm 4,99 \times 10^6$	$3,28 \times 10^7 \pm 3,07 \times 10^7$	$1,61 \times 10^8 \pm 7,77 \times 10^7$
Contenido colon	$1,14 \times 10^7 \pm 5,81 \times 10^6$	$3,93 \times 10^7 \pm 2,69 \times 10^7$	$1,20 \times 10^8 \pm 9,65 \times 10^7$
Contenido ciego	$2,98 \times 10^7 \pm 1,80 \times 10^7$	$3,78 \times 10^7 \pm 2,40 \times 10^7$	$1,25 \times 10^8 \pm 8,10 \times 10^7$
<i>Lactobacillus reuteri AD23</i>			
Heces-Inicial	$1,23 \times 10^9 \pm 1,25 \times 10^9$	$2,02 \times 10^9 \pm 1,98 \times 10^8$	$2,15 \times 10^9 \pm 9,36 \times 10^8$
Heces-Final	$5,68 \times 10^8 \pm 5,27 \times 10^8$	$1,53 \times 10^9 \pm 1,06 \times 10^9$	$3,33 \times 10^9 \pm 1,60 \times 10^9$
Contenido colon	$5,45 \times 10^8 \pm 2,16 \times 10^8$	$3,20 \times 10^9 \pm 2,82 \times 10^9$	$4,03 \times 10^9 \pm 2,29 \times 10^9$
Contenido ciego	$2,25 \times 10^9 \pm 1,40 \times 10^9$	$6,91 \times 10^9 \pm 4,79 \times 10^9$	$6,23 \times 10^9 \pm 3,12 \times 10^9$

Figura 12. PCR cuantitativa de *Lactobacillus sp. AD102* y *L. reuteri AD23* en las muestras intestinales de rata. Los valores y las barras representan el número de bacterias por gramo de materia seca. **A:** representación grafica de barras. **B:** Datos numéricos. Cada muestra fue analizada por duplicado y promediada para obtener el valor por muestra. Las barras de error indican la desviación estándar por grupo, n=5 grupo control y n=6 para FOS y sorbitol. ^{ab} Las medias del grupo que no comparten la letra del superíndice en la misma muestra son estadísticamente diferentes (P≤ 0,05). C: Grupo control. F: Grupo FOS. S: Grupo sorbitol.

1.9. Producción de HSB en las cepas de *Lactobacillus* aislados de intestino de rata.

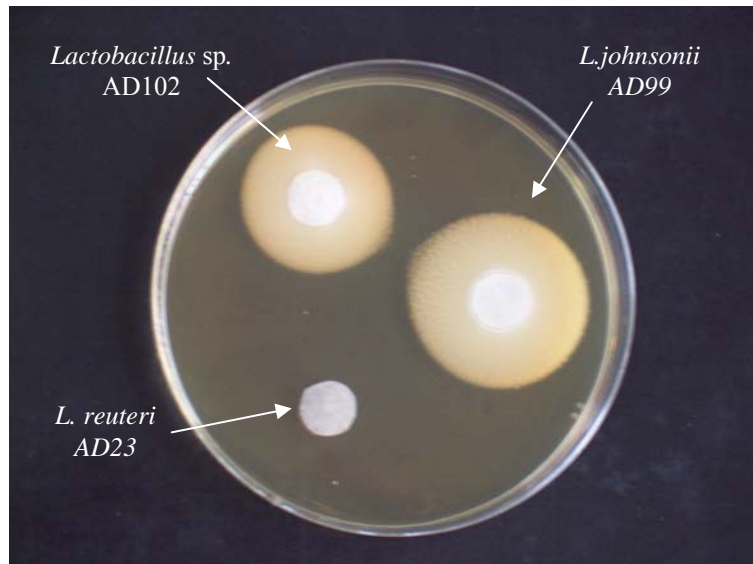
1.9.1. Ensayo en placa de HSB.

La producción de hidrolasas de sales biliares (HSB) en los *Lactobacillus* aislados de rata, se analizó en placas de agar MRS con taurodeoxicolato o glicodeoxicolato en presencia de CaCl_2 . La aparición de un halo de precipitado alrededor del inóculo, que corresponde a la sal biliar desconjugada y precipitada por acción del calcio, indica la presencia de HSB en el microorganismo estudiado. Los resultados obtenidos al medir el diámetro de las zonas de precipitación (Figura 13) muestran que *L. intestinalis* AD38, *L. johnsonii* AD99 y *L. murinus* AD100 producen HSB capaces de desconjugar el taurodeoxicolato y el glicodeoxicolato. *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp. AD102 poseen HSB para desconjugar solo una de las dos sales biliares.

1.9.2. Análisis cuantitativo por HPLC.

La actividad HSB fue cuantificada midiendo por HPLC la desaparición progresiva de taurocolato de sodio o glicocolato de sodio contenidos en un medio de cultivo, a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano. Los resultados muestran que en *L. murinus* AD100 la fase de crecimiento exponencial comienza rápidamente alcanzado una DO_{550} de 1 en aproximadamente 5 horas de incubación, independientemente de la sal biliar presente en el medio. La actividad HSB en esa cepa es mayor para el glicocolato de sodio que para el taurocolato de sodio (Figura 14). *L. intestinalis* AD38 y *L. johnsonii* AD99 muestran un ligero retardo en el comienzo de la fase exponencial de crecimiento, cuyo comienzo coincide con la disminución de la sal biliar presente en el medio, es posible que estas cepas sean más sensibles al efecto bactericida de las sales biliares y solo cuando disminuye la concentración de sal biliar en el medio por acción de las HSB

88

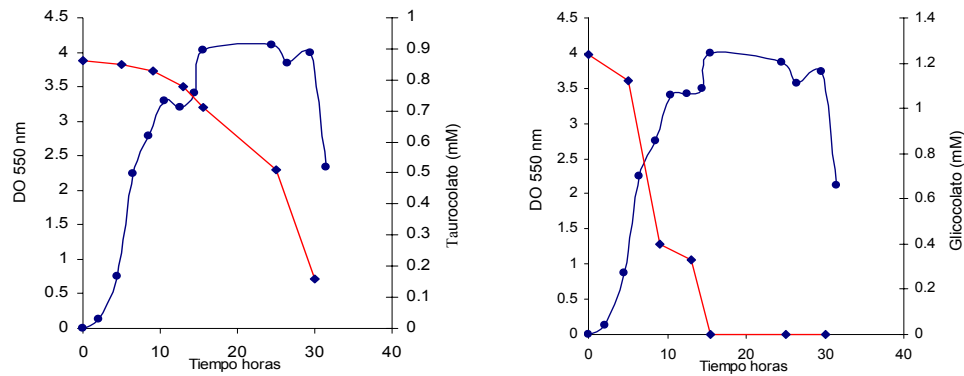
A**B**

Microorganismo	Formación de halo de precipitado en cm	
	Taurodeoxicolato	Glicodeoxicolato
<i>Lactobacillus reuteri</i> AD23	Negativo	2,1
<i>Lactobacillus intestinalis</i> AD38	2,9	1,6
<i>Lactobacillus johnsonii</i> AD99	2,8	2,4
<i>Lactobacillus murinus</i> AD100	2,4	3,1
<i>Lactobacillus sp.</i> AD102	2,2	Negativo

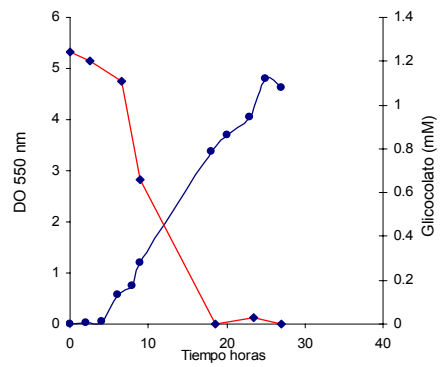
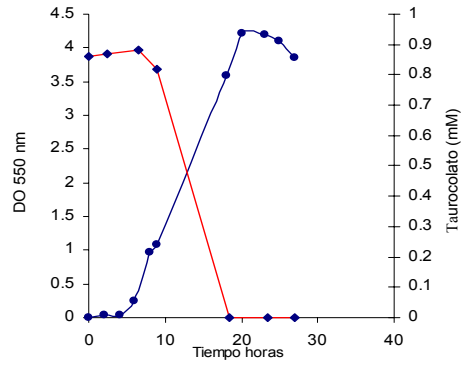
Figura 13. Ensayo en placa de la actividad de HSB de las cepas de *Lactobacillus* aislados de rata. **A:** La fotografía muestra los resultados del ensayo de la actividad de hidrolasas de sales biliares en placas. de agar MRS con taurodeoxicolato de *L.reuteri* AD23, *L.johnsonii* AD99 y *Lactobacillus sp.* AD102. **B:** Actividad HSB en placa de los *Lactobacillus* aislados de rata, los resultados muestran el promedio de dos análisis y corresponden al diámetro de los halos formados.

mejoran su crecimiento. *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp. AD102 solo tienen actividad HSB para una de las sales biliares analizadas, glicocolato y taurocolato respectivamente, pero la presencia en el medio de la sal biliar que no pueden desconjugar parece no afectar el crecimiento de estas dos cepas. *L. reuteri* AD23 en un medio con taurocolato alcanza en la curva de crecimiento una DO mayor, que en presencia de glicocolato, sal biliar que es capaz de desconjugar, igualmente, *Lactobacillus* sp. AD102 alcanza una DO mayor en el medio que contiene glicocolato, sal biliar que no es capaz de desconjugar, que en el medio con taurocolato. Es importante también destacar que a las 10 horas de incubación el crecimiento de *Lactobacillus* sp. AD102 era igual en los dos medios de cultivo, pero en el medio con taurocolato la aparición de la sal biliar desconjugada coincide con una drástica disminución del crecimiento. Este efecto de inhibición del crecimiento podría ser debido a una mayor toxicidad de las sales biliares desconjugadas para esas cepas.

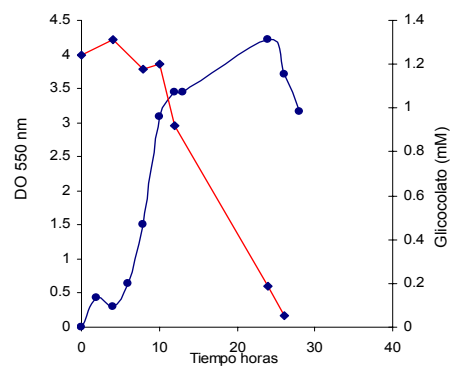
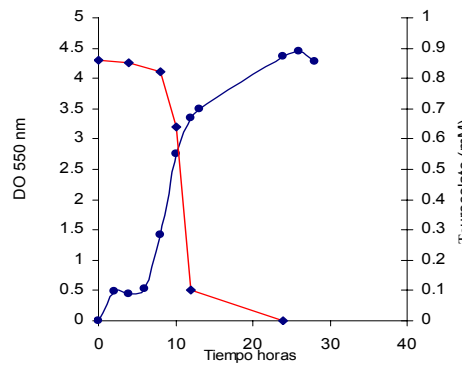
***Lactobacillus murinus* AD100**



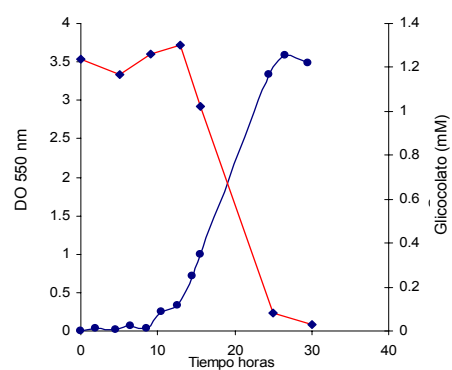
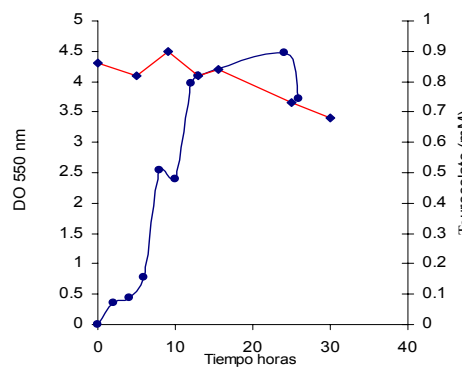
***Lactobacillus johnsonii* AD99**



***Lactobacillus intestinalis* AD38**



***Lactobacillus reuteri* AD23**



Lactobacillus sp. AD102

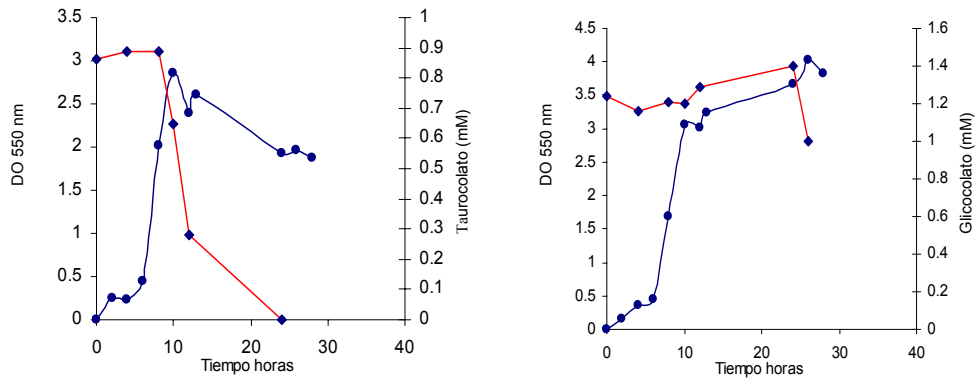


Figura 14. Crecimiento y actividad HSB en cepas de *Lactobacillus* aislados de rata. Las gráficas muestran para cada cepa de *Lactobacillus* aislada de rata: azul: curva de crecimiento bacteriano (DO a 550 nm); rojo: sales biliares conjugadas (mM) cuantificadas por HPLC.

2. DISCUSIÓN.

La influencia de la ingestión de sorbitol en el ecosistema intestinal, fue evaluada y comparada con el efecto de un prebiótico reconocido como los FOS en un modelo animal sencillo como la rata. El consumo aproximado de estos azúcares fue de 9 a 10 g/Kg peso por día. Se evaluó especialmente la microbiota intestinal con énfasis en el grupo de lactobacilos y bifidobacterias, la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, y algunos aspectos fisiológicos en el modelo animal utilizado, como los niveles de lípidos en sangre, las variaciones en el peso corporal y de algunos órganos del tracto gastrointestinal. La inmunoglobulina A secretora en heces fue analizada como indicador de posibles cambios en el sistema inmune intestinal de las ratas.

El efecto selectivo de los prebióticos en el crecimiento bacteriano es variable y la extensión de los cambios que cualifican a una sustancia como prebiótico no

han sido todavía bien establecidos (Macfarlane *et al.*, 2006). Para el análisis de la microbiota intestinal en las ratas de los tres grupos experimentales con métodos culturales tradicionales, se estudiaron seis grupos de microorganismos: anaerobios totales, bacterias ácido lácticas (BAL), bacteroides, aerobios totales, cocos Gram positivos y enterobacterias. Los resultados obtenidos nos han permitido valorar de forma global que el consumo de sorbitol durante 16 días, logra modificar la microbiota intestinal de las ratas y para algunos grupos bacterianos lo hace de forma similar a los FOS, siendo el cambio más representativo en los contenidos de los compartimentos intestinales como el ciego y el colon que en las heces. El uso de métodos culturales tradicionales para tratar de explicar los cambios de la microbiota en un medio tan complejo como el tracto gastrointestinal, en el que existen posiblemente más de 400 especies diferentes de las cuales muchas no son cultivables, no es tarea sencilla, es por ello que estos métodos solo pueden proporcionar una información global, pero fundamental para sustentar que una determinada sustancia al ser ingerida logra modificar la microbiota.

El análisis de la microbiota por técnicas moleculares como PCR-DGGE con los cebadores universales HDA, muestra que la ingestión de FOS y sorbitol genera un cambio significativo en los perfiles de bandas obtenidos por la amplificación del gen que codifica para el 16S rRNA. La secuenciación de algunas de las bandas representativas de estos cambios, tienen una alta similitud con secuencias de microorganismos del Orden *Clostridiales*. Este análisis con cebadores universales nos permite confirmar que el consumo de sorbitol genera cambios en la microbiota intestinal. Los perfiles de bandas obtenidos con el uso de los cebadores específicos para el género *Lactobacillus*, muestran que dos de las cinco bandas representativas de las especies de este género presentes en el intestino de rata, persisten o aumentan su intensidad por el consumo de sorbitol. Una de las bandas corresponde a *Lactobacillus* sp. AD102, una posible nueva especie (ver Capítulo II) perteneciente al un grupo de reconocidos probióticos como es el grupo de *L. acidophilus*. La otra banda corresponde a *L. reuteri* AD23, cepa perteneciente a una especie en la cual muchos de sus miembros han sido estudiados reconociendo su potencial probiótico y los beneficios para la salud que implica su

permanencia en el tracto gastrointestinal (Liu *et al.*, 2007; Mukai *et al.*, 2002; Tubelius *et al.*, 2005). Debido a que PCR-DGGE no es una prueba cuantitativa y solo nos permite una apreciación de cambios en la intensidad o permanencia de las bandas en un perfil determinado para cada grupo, se han realizado análisis por PCR cuantitativa, que nos han permitido conocer el número exacto de células de *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. reuteri* AD23 presentes en las muestras intestinales y las heces de los tres grupos experimentales. Los resultados de PCR cuantitativa muestran que: *Lactobacillus* sp. AD102 presente en las Heces-Inicial disminuye su población después de los 16 días de tratamiento, siendo esta disminución significativa en los grupos control y FOS pero no en el grupo sorbitol. La población de *L. reuteri* AD23 es significativamente mayor en las Heces-Final y contenido del colon del grupo sorbitol y en el contenido del ciego del grupo-FOS. Esos resultados indican que la administración oral de sorbitol incrementa la población de *L. reuteri* AD23 y la permanencia de *Lactobacillus* sp. AD102 en el tracto gastrointestinal de las ratas. Sin embargo estas dos cepas de *Lactobacillus* son incapaces de crecer en un medio de cultivo con sorbitol como única fuente de carbono (resultados no mostrados), lo que sugiere que el sorbitol afecta el ecosistema intestinal generando indirectamente unas condiciones que benefician la población de estos dos microorganismos. El análisis de la microbiota con los cebadores específicos para el género *Bifidobacterium* muestra la existencia de una sola especie de bifidobacteria en el tracto intestinal de las ratas analizadas, identificada como *B. pseudolongum* por homología de secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA. Este microorganismo ha sido aislado por otros autores de muestras fecales de animales (Gavini *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2003), pero no se han descrito hasta la fecha aislamientos de esta especie en humanos. Las bandas en PCR-DGGE de esta bifidobacteria presentes en las Heces-Inicial de los tres grupos experimentales aumentan su intensidad en las muestras post tratamiento de las ratas alimentadas con FOS y sorbitol, siendo más evidente en las muestras de Heces-Final y contenido del colon. Los cambios en la intensidad de las bandas son indicativos de que ha habido un probable aumento en la población de estas bifidobacterias después de la ingesta de sorbitol, bien debido a la utilización de metabolitos generados por otros grupos bacterianos o a

una metabolización directa del sorbitol. En este sentido, se han descrito varias especies de *Bifidobacterium* aisladas de humanos o cerdos con capacidad de fermentar sorbitol (Mara and Oragui, 1983; Rhodes and Kator, 1999).

Los ácidos grasos de cadena corta son metabolitos producidos por la microbiota en procesos fermentativos y son capaces de acidificar el medio ambiente intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como lactobacilos y bífidobacterias e inhibiendo potenciales especies patógenas (Wong *et al.*, 2006). Todos los ácidos orgánicos de cadena corta se incorporan rápidamente a través de la mucosa colónica, pero el butirato permanece en la luz intestinal y es la principal fuente energética de los colonocitos, regulando también su diferenciación (Guarner and Malagelada, 2003). Así, se ha demostrado que el butirato tiene un efecto proliferativo sobre los colonocitos sanos pero antiproliferativo en células tumorales de ratas, por lo que se cree que el butirato inhibe el crecimiento de células tumorales intestinales (Medina *et al.*, 1998). Los resultados de este estudio muestran que la ingestión de sorbitol y FOS eleva los niveles de butirato en el medio ambiente intestinal, aunque este incremento fue estadísticamente significativo solo en las ratas que consumieron sorbitol. Este resultado coincide con observaciones previas en las que ratas alimentadas con sorbitol presentaron un aumento en la producción de butirato (Islam *et al.*, 2004). Un aumento en la producción total de ácidos orgánicos por el consumo de sorbitol puede suponer una alternativa más para el aumento específico del butirato, ya que está demostrado que algunas bacterias intestinales son capaces de convertir el acetato y el lactato en butirato (Bourriaud *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006). Investigaciones en microbiota intestinal humana han demostrado que los principales productores de butirato son especies pertenecientes al orden *Clostridiales*, dentro de los cuales están las especies *Clostridium*, *Coprococcus* y *Eubacterium* (Barcenilla *et al.*, 2000). El aumento de la producción de butirato en las ratas alimentadas con sorbitol puede relacionarse con nuestros hallazgos al secuenciar las bandas que en PCR-DGGE con los cebadores universales HDA, ya que algunas de las bandas que aumentan su intensidad en los grupos sorbitol y FOS corresponden a microorganismos del orden *Clostridiales*. Un incremento en la

producción de butirato favorece la proliferación de los colonocitos aumentando posiblemente el tamaño y el peso de la pared intestinal, lo que puede relacionarse con el aumento en el tamaño del ciego observado en las ratas alimentadas con FOS y principalmente en las alimentadas con sorbitol. Otro factor que favorece el aumento del tamaño del ciego es un aumento en el contenido intestinal por mayor tiempo de retención del alimento (Perrin *et al.*, 2001). El mayor tamaño observado en el ciego de las ratas que consumieron sorbitol y FOS pudo haber generado sensación de saciedad, por tanto pérdida de apetito, y esto podría explicar la tendencia a la disminución del peso corporal de los animales del grupo-sorbitol y más moderadamente del grupo-FOS.

Los niveles de acetato y propionato juegan un papel importante en la síntesis hepática de colesterol, así se ha demostrado que el acetato aumenta la síntesis de colesterol, mientras que el propionato inhibe su producción (Wong *et al.*, 2006). Por esta razón algunos autores consideran que el consumo de prebióticos que logran reducir la proporción acetato/propionato pueden reducir los niveles séricos de colesterol. Nuestros resultados muestran que la proporción acetato/propionato fue menor en el contenido del colon y del ciego de las ratas alimentadas con FOS y sorbitol que en el grupo-control, lo cual puede explicar la reducción en los niveles de colesterol sérico observados en el grupo de ratas alimentadas con sorbitol. Sin embargo, los datos que disponemos son insuficientes para descartar otras hipótesis. En este sentido, los mecanismos por los cuales el consumo de prebióticos genera una reducción de los lípidos en sangre no están completamente esclarecidos, pero se han realizado varios estudios que apuntan a diferentes procesos. Los prebióticos podrían reducir el colesterol al disminuir la actividad enzimática lipogénica en el hígado (Delzenne and Kok, 2001). Además, también es posible que disminuya el colesterol absorbido por el animal si una parte del ingerido, es metabolizado por los microorganismos del intestino o si lo integran en su pared celular. Finalmente, otros autores han propuesto que la disminución del colesterol por el consumo de prebióticos se debe a la proliferación en el intestino de bacterias productoras de Hidrolasas de Sales Biliares (HSB), que rompen el ciclo enterohepático de los precursores comunes de sales biliares y

colesterol, obligando un gasto adicional de colesterol endógeno (Taranto *et al.*, 1998). Nosotros hemos estudiado la producción de HSB en las cinco cepas de *Lactobacillus* aislados de rata por métodos cualitativos y cuantitativos. Los resultados obtenidos muestran que *L. intestinalis* AD38, *L. johnsonii* AD99 y *L. murinus* AD100 poseen HSB con afinidad por las sales biliares del ácido taurocólico y del ácido glicocólico, mientras que *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. reuteri* AD23 tienen HSB para solo una de estas sales biliares. Los beneficios que la presencia de HSB generan para la bacteria no están aun bien esclarecidos, algunos autores sostienen que la presencia de HSB en las bacterias intestinales les confiere una selectiva ventaja competitiva para sobrevivir en el ambiente intestinal (Begley *et al.*, 2006; Moser and Savage, 2001). Otros autores, sin embargo, no comparten esta teoría al considerar que la sal biliar desconjugada resulta más tóxica para la bacteria que la sal conjugada (Tannock *et al.*, 1989). También es posible que las bacterias desconjuguen la sal biliar para utilizar el aminoácido resultante (Van Eldere *et al.*, 1988) o para tener una fuente adicional de colesterol que pueda ser incorporado a la membrana celular (Dambekodi and Gilliland, 1998). En los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de cinco cepas de *Lactobacillus* analizadas en este estudio, se observó que la presencia de sales biliares conjugadas o desconjugadas en el medio de cultivo afecta de forma diferente a cada una de las cepas. En el caso de *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. reuteri* AD23 el crecimiento en presencia de las sales biliares que no desconjugan alcanzó densidades ópticas mayores que en presencia de las sales biliares que son capaces de desconjugar, lo que podría deberse a la mayor toxicidad para la bacteria de la sal biliar desconjugada. En resultados anteriores con la cepa de *L. reuteri* CR1098, otros autores demostraron que el ácido biliar deoxicolato es más tóxico que la sal taurodeoxicolato (Taranto *et al.*, 2006). Aunque en este estudio la disminución de los lípidos en el suero de las ratas aparece estadísticamente solo como una tendencia, es importante destacar que los animales nacidos en cautividad y alimentados con dietas normales tienen muy posiblemente unos niveles basales de lípidos normales y por esta razón los cambios post tratamiento no son de gran magnitud. Se hace necesario nuevos estudios con animales

hipercolesterolémicos para evaluar una posible disminución del colesterol sanguíneo debida al consumo de sorbitol.

Se ha demostrado experimentalmente que los prebióticos son capaces de generar un efecto positivo en el sistema inmune gastrointestinal atribuible a su capacidad de modificar la microbiota y aumentar la producción de ácidos orgánicos, principalmente el butirato (Cherbut *et al.*, 2003; Roller *et al.*, 2004). Para valorar los cambios en el sistema inmune intestinal derivados del consumo de prebióticos se pueden tener en cuenta diversos parámetros como la inmunoglobulina A secretora (IgAs), la producción de interferón, el análisis de diferentes líneas de células linfoides o macrófagos (Mizubuchi *et al.*, 2005). Nosotros hemos cuantificado mediante la técnica de ELISA la IgAs presente en las muestras fecales de las ratas después de la ingestión de FOS y sorbitol, los resultados muestran un leve aumento de la IgAs en las heces de las ratas alimentadas con sorbitol comparado con el grupo control, aunque este aumento no fue estadísticamente representativo. Para valorar más ampliamente el efecto del consumo del sorbitol en el sistema inmune intestinal serían necesarios nuevos estudios, aumentando el número de parámetros analizados. Los cambios que el consumo de prebióticos genera en el sistema inmune son diferentes para cada tipo de prebiótico en particular (Kudoh *et al.*, 1999)

Los resultados de este trabajo demuestran claramente que la ingestión de sorbitol favorece selectivamente el crecimiento de dos especies de *Lactobacillus* presentes en el tracto intestinal de ratas *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp. AD102 y probablemente también el de la única bifidobacteria, *B. pseudolongum*, encontrada en el intestino de las ratas analizadas. El sorbitol afectó positivamente el balance metabólico total del ecosistema intestinal, aumentando la producción de butirato con los consecuentes efectos beneficiosos en la proliferación de la mucosa intestinal. La tendencia a disminuir el peso corporal de los animales alimentados con sorbitol en los que se conservó un aspecto saludable comparable con los otros grupos experimentales, puede considerarse un beneficio adicional dependiendo del posible grupo poblacional en el que se quiera emplear el sorbitol

como prebiótico, siendo ideal para la elaboración de alimentos para personas obesas, hipercolesterolémicas o diabéticas. Basados en este trabajo, nuevos experimentos pueden ser elaborados para valorar los beneficios del consumo de este poliol.

CAPITULO II. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Lactobacillus* sp. AD102 AISLADO DE INTESTINO DE RATA.

1. RESULTADOS.

1.1. Obtención de nuevos aislamientos de *Lactobacillus* sp. AD102.

En placas de Agar Rogosa (Pronadisa) cultivadas con muestras de ciego de rata, se seleccionaron colonias de tamaño entre 0,4 a 0,8 mm de diámetro, planas, de forma circular y color grisáceo, algunas de las cuales fueron confirmadas como nuevos aislamientos de *Lactobacillus* sp. AD102. Para confirmar la identidad de estas cepas se realizó una PCR con los cebadores específicos CT102for y CT102rev, observándose en posterior electroforesis en gel de agarosa la amplificación de un fragmento de 309 pb. Un segundo método para confirmar la identidad de estas cepas fue mediante PCR-DGGE con los cebadores específicos para *Lactobacillus* Lac1 y Lac2-GC, en donde se observó una banda de igual migración a la correspondiente a *Lactobacillus* sp. AD102. En placas de agar MRS incubados durante 48 horas a 37°C, las colonias de *Lactobacillus* sp. AD102 tienen un tamaño ligeramente mayor a las obtenidas en agar Rogosa, 0,5 a 1 mm de diámetro aproximadamente de apariencia plana, opaca y color grisáceo. La morfología microscópica es la de un bacilo corto pleomórfico Gram positivo que se encuentra solo, en pares o en pequeñas cadenas, con un tamaño entre 0,8-1,1 por 3-7µm. Para la clasificación taxonómica de *Lactobacillus* sp. AD102 se realizó un estudio comparativo con 26 cepas de *Lactobacillus*, la mayoría pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*, principalmente de las especies *L. johnsonii* y *L. gasseri* por considerarlas las más próximas a la posible nueva especie (Ver apartado 1.7, Figura 10 capítulo 1). Se incluyeron dentro de este grupo de 26 cepas los aislamientos de *Lactobacillus* realizados a partir de intestino de rata en la primera parte de este trabajo.

1.2. Características fenotípicas de las 26 cepas de *Lactobacillus* estudiadas.

Las 26 cepas estudiadas fueron cultivadas en medio MRS caldo y agar en anaerobiosis a 37 °C durante 48 horas y en diferentes condiciones, descritas en materiales y métodos. En la tabla 11 se pueden observar los resultados, destacando que las 26 cepas son negativas a la reacción de catalasa, únicamente *L. gasseri* NCC2856 (BL294) y *L. johnsonii* NCC2767 (BL299) crecen a 15 °C y la mayoría crecen a pH 4,5. Los resultados obtenidos con el sistema API CH 50 para fermentación de azúcares muestran que no hay ningún carbohidrato cuya fermentación permita diferenciar claramente a las cepas de *Lactobacillus* sp. AD102 del resto de cepas de las especies del grupo de *L. acidophilus* analizadas. En contraste, la reacción positiva del glucógeno permite la identificación de *L. crispatus*. La amigdalina fue fermentada por todas las cepas de *L. acidophilus* examinadas y por la mayoría de las cepas de *L. gasseri* más no por las cepas de otras especies. *L. reuteri* AD23 y *L. murinus* AD100 se diferencian claramente de las otras cepas analizadas por la fermentación de melibiosa y una reacción débil de L-arabinosa y ribosa, *L. reuteri* AD23 fue la única cepa incapaz de fermentar D-fructosa (Tabla 11).

Los resultados de las pruebas fenotípicas en las cuales se encontraron diferencias entre las cepas estudiadas fueron analizados por dos métodos estadísticos con el programa XLSTAT para Microsoft Excel (Addinsoft). El primero, un dendrograma que muestra la similitud entre las diferentes cepas de acuerdo al coeficiente de correlación de Pearson (Figura 15). En el dendrograma se observa que los *Lactobacillus* se agrupan en dos grandes grupos, uno incluye cepas de especies pertenecientes al complejo de *L. acidophilus* (sin establecerse una clara diferencia entre ellas), *Lactobacillus* sp. AD102, y los nuevos aislamientos de esta misma especie denominados *Lactobacillus* sp. AD103, AD104, AD105 y AD106,

	AD 23	AD 38	AD 99	AD 100	AD 102	AD 103	AD 104	AD 105	AD 106	BL 17	BL 221	BL 223	BL 277	BL 278	BL 279	BL 280	BL 281	BL 287	BL 288	BL 292	BL 294	BL 295	BL 296	BL 297	BL 298	BL 299		
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-Arabinosa	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ribosa	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-Xilosa	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-metil-Xilósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Galactosa	+	-	d	+	-	-	-	-	d	-	+	+	+	-	+	+	d	+	+	-	+	d	-	-	-	-	d	
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+
D-Manosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	d	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	d	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-Manósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-Glucósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Ac.Glucosamina	-	+	d	+	-	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Esculina	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	d	+	+	+	+	d	-	-	-	d	+	d	+	d	+	d	-	-
Celobiosa	-	-	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	d	-	+	+	d	-	+	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+
D-Lactosa	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	d	-	-	+	d	-	+	+	+	-	-
Melibiosa	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	AD 23	AD 38	AD 99	AD 100	AD 102	AD 103	AD 104	AD 105	AD 106	BL 17	BL 221	BL 223	BL 277	BL 278	BL 279	BL 280	BL 281	BL 287	BL 288	BL 292	BL 294	BL 295	BL 296	BL 297	BL 298	BL 299
D-Rafinosa	+	-	-	+	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	-	-	+
Almidón	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	d	d	-	-	-	d	-	d	-	-
Glucógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentibiosa	-	-	+	+	d	-	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanosa	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	d	d	-	d	+	-	-	d	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Ceto-Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Ceto-Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento 15°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento 45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Crec. 4,5% NaCl	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Crec. 7,0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. pH 4,5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crec. pH 7.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 11. Resultados de los análisis fenotípicos de las cepas de *Lactobacillus* estudiadas. (+) resultado positivo: fermentación completa del azúcar, (-) resultado negativo, no hay fermentación, (d) fermentación débil. Las pruebas correspondientes a las líneas sombreadas muestran los resultados en los que existen diferencias en las cepas analizadas, las pruebas no sombreadas tienen el mismo resultado en todas las cepas. En la tabla, las cepas están identificadas de acuerdo a la denominación dada en la colección interna del laboratorio, siendo: *L. reuteri* AD23; *L. intestinalis* AD38; *L. johnsonii* AD99; *L. murinus* AD100; *Lactobacillus* sp. AD102; *Lactobacillus* sp. AD103; *Lactobacillus* sp. AD104; *Lactobacillus* sp. AD105; *Lactobacillus* sp. AD106; *L. acidophilus* CECT903^T (BL17); *L. crispatus* BL221; *L. gasseri* BL223, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277); *L. crispatus* DSMZ20584^T (BL278); *L. acidophilus* CECT4529 (BL279); *L. acidophilus* CECT4179 (BL280); *L. johnsonii* CECT289 (BL281); *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287); *L. intestinalis* DSMZ6629^T (BL288); *L. gasseri* NCC2858 (BL292); *L. gasseri* NCC2856 (BL294); *L. johnsonii* NCC2822 (BL295); *L. gasseri* NCC2857 (BL296); *L. johnsonii* NCC1741 (BL297); *L. johnsonii* NCC533 (BL298); *L. johnsonii* NCC2767 (BL299).

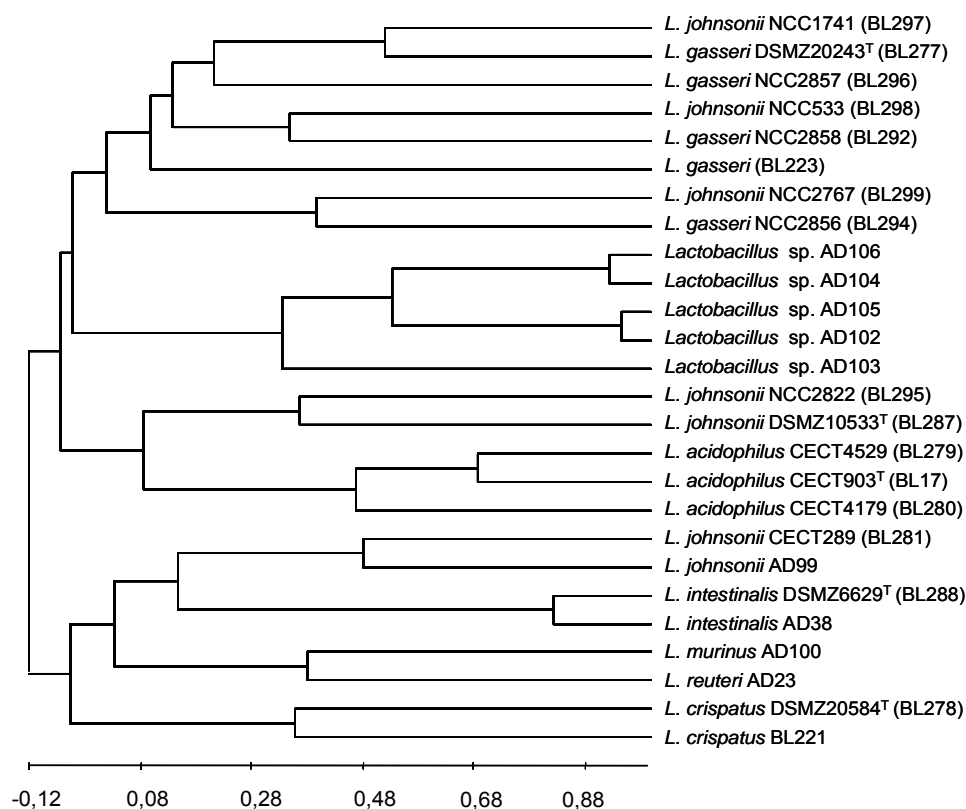


Figura 15. Dendrograma de similitud de acuerdo con el coeficiente de correlación de Pearson de los resultados obtenidos en las pruebas fenotípicas de 26 cepas de *Lactobacillus*.

que se ubican como un subgrupo en este mismo grupo. En el segundo grupo aparecen bien diferenciados *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. murinus* y *L. intestinalis*, sin embargo también aparecen en este grupo dos cepas de *L. johnsonii*.

El segundo análisis estadístico consiste en un Análisis de Componentes Principales (ACP), que nos permite establecer relaciones entre las variables y agrupa los individuos de acuerdo a sus semejanzas. En la figura 16 se observa la representación gráfica de los factores 1 y 2 que acumulan el 36,86% de la varianza. Teniendo en cuenta una correlación positiva de las variables con los

factores superior a 0,6, los principales componentes del factor 1 son: L-arabinosa, ribosa, D-xilosa y melibiosa y los principales componentes del factor 2: galactosa, arbutina, salicina, D-lactosa, D-rafinosa y D-turanosa. Una varianza acumulada de 56,39% se alcanza en el factor 4. El factor 3 incluye almidón, glucógeno y crecimiento en 7% de NaCl y el factor 4, fructosa, manitol, α -metil-D-glucósido y maltosa. Estos resultados indican que con solo 17 de los 29 datos de pruebas fenotípicas se logra acumular una variabilidad mayor del 50%, permitiendo desestimar aquellos datos que no aportan ninguna explicación a la variabilidad observada. La representación gráfica de las cepas analizadas y su separación en grupos de acuerdo a su relación con los factores F1-F2 se puede observar en la Figura 17. *L. reuteri* y *L. murinus* aparecen aislados, mientras que el resto de las cepas aparecen inmersas en un gran grupo que no permite una clara discriminación de las especies. El ideal en un ACP es que exista tal correlación entre las variables que con sólo los dos primeros factores se alcanzase una variabilidad mayor a la obtenida en este caso, y que los individuos pudiesen ser agrupados más eficientemente. Los resultados de los dos análisis estadísticos realizados nos indican que las pruebas fenotípicas no aportan la suficiente información para la clasificación de las cepas analizadas. El escaso valor discriminativo que tienen en taxonomía las pruebas fenotípicas para el complejo de *L. acidophilus* ha sido observado anteriormente por otros autores (Berger *et al.*, 2007)

1.3. Análisis filogenético de cepas de *Lactobacillus*.

1.3.1. Análisis filogenético de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA

Para la reconstrucción filogenética basada en la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA se analizaron 80 secuencias, entre las que se incluyen

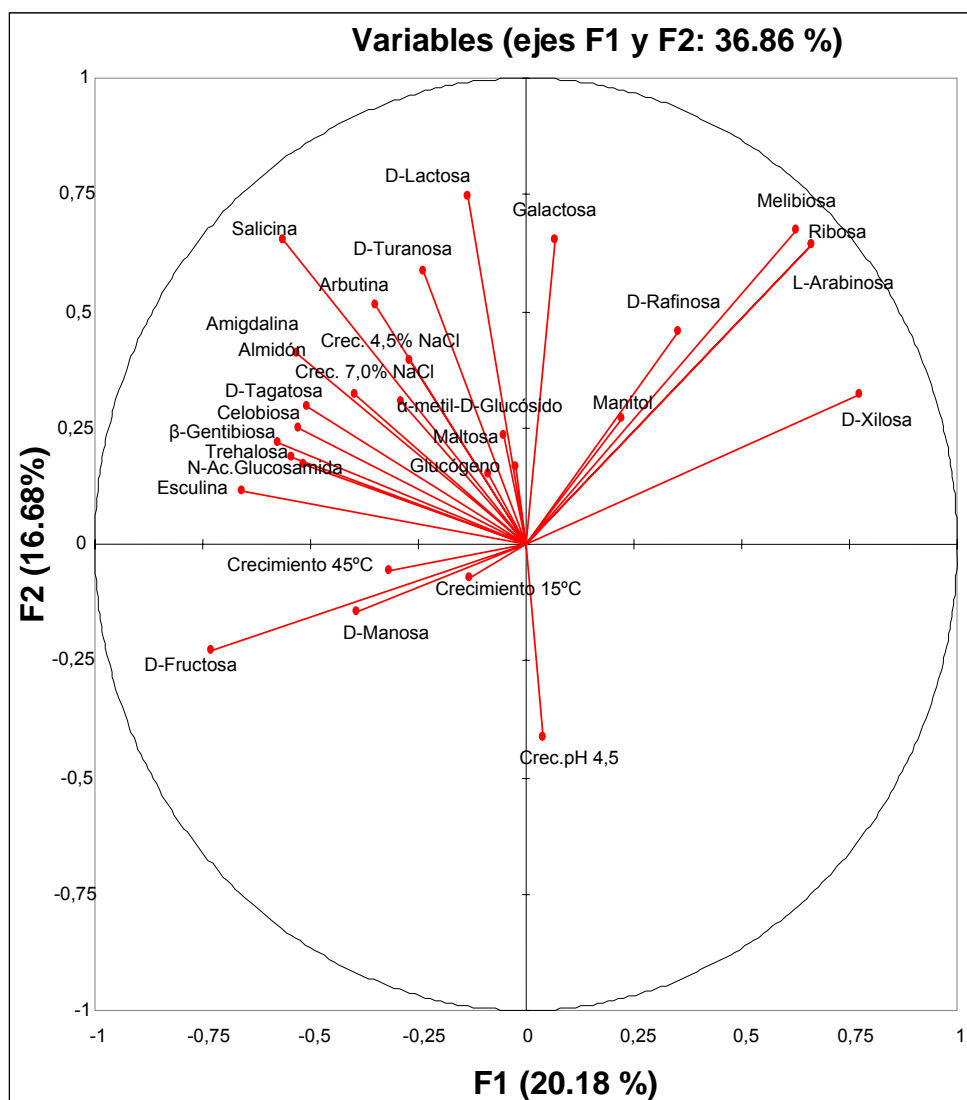


Figura 16. Correlaciones entre las variables y los factores en el análisis de componentes principales. Representación gráfica de los factores 1 y 2 que acumulan el 36,86% de la varianza.

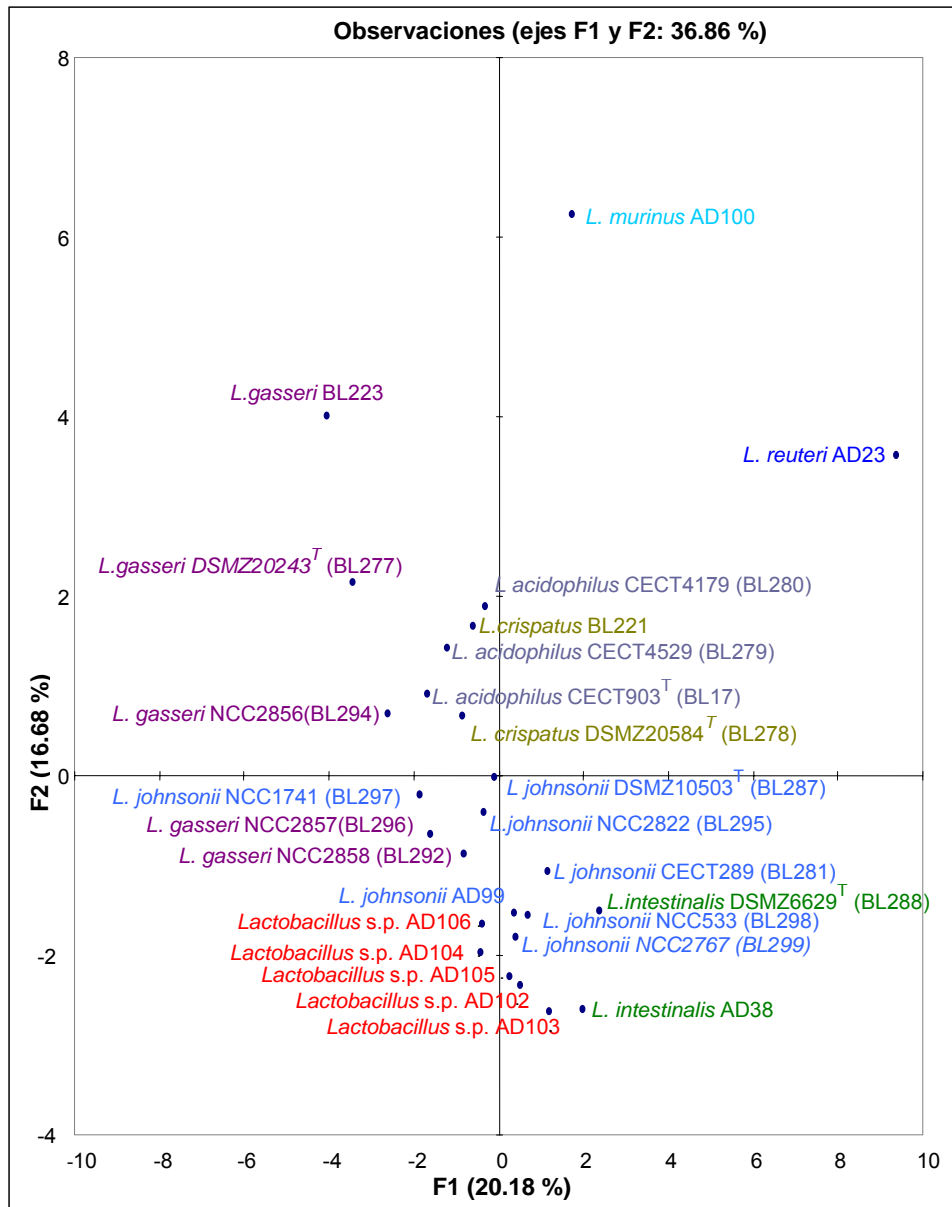


Figura 17. Agrupación de las cepas estudiadas de acuerdo al análisis de componentes principales. Las cepas pertenecientes a una misma especie comparten el color de letra.

las de las 26 cepas de este estudio, además de las obtenidas de bancos de datos como el GenBank y el Ribosomal Database Project II (RDP) (Cole *et al.*, 2003;Gavini *et al.*, 2006). De las 80 secuencias se descartaron 36 por presentar caracteres atípicos o aparecer como secuencias idénticas después del alineamiento en el programa ClustalX (Aiyar, 2000;Gavini *et al.*, 2006). A las cuarenta y cuatro restantes se les eliminaron las zonas de homología cuestionable en el programa Gblocks (Castresana, 2000;Gavini *et al.*, 2006) y se realizó una reconstrucción filogenética utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo GTR+G con un total de 500 seudoréplicas. En el árbol resultante (Figura 18) se observa claramente una topología que separa a *Lactobacillus* sp. AD102 y *Lactobacillus* sp. AD103 del taxón en el que se encuentran las cepas de *L. gasseri* y *L. johnsonii*, estos resultados están sustentados con un valor de “bootstrap” del 99,6% (498 de las 500 seudoréplicas realizadas mostraron esta topología). En los alineamientos de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA de las cepas analizadas de *L. johnsonii*, *L. gasseri* y *Lactobacillus* sp. AD102 se observó que no existe en ningún caso una variación mayor a 10 nucleótidos en las secuencias ínter especie.

Basados en la región variable V1 del gen que codifica para el 16S rRNA, Kullen y col. encontraron un fragmento de 62 pares de bases en el cual se puede hacer una discriminación adecuada de las especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*, que concuerda con la observada por Johnson y col. y por Lauer y col. de forma independiente en 1980 (Kullen *et al.*, 2000). En este estudio hemos alineado la misma secuencia de 62 pares de bases analizada por Kullen para 28 cepas de especies pertenecientes al complejo de *L. acidophilus* incluidos los *Lactobacillus* sp. AD102, AD103, AD104, AD105 y AD106, *L. gasseri* NCC2858 (BL292), *L. gasseri* NCC2856 (BL294), *L. gasseri* NCC2857 (BL296), *L.gasseri* (BL223), *L.johnsonii* DSMZ10533^T (BL287), *L. johnsonii* NCC533 (BL298), *L. johnsonii* NCC2767 (BL299), *L. johnsonii* (AD99), *L.johnsonii* CECT289 (BL281), *L. acidophilus* CECT4529 (BL279), *L acidophilus* CECT4179 (BL280), *L. acidophilus* NCFM (PUBMED CP000033), *L. acidophilus* BCRC (PUBMED AY773947), *L. gallinarum* I26 (PUBMED EF412985), *L. gallinarum* I16 (PUBMED EF412984), *L.*

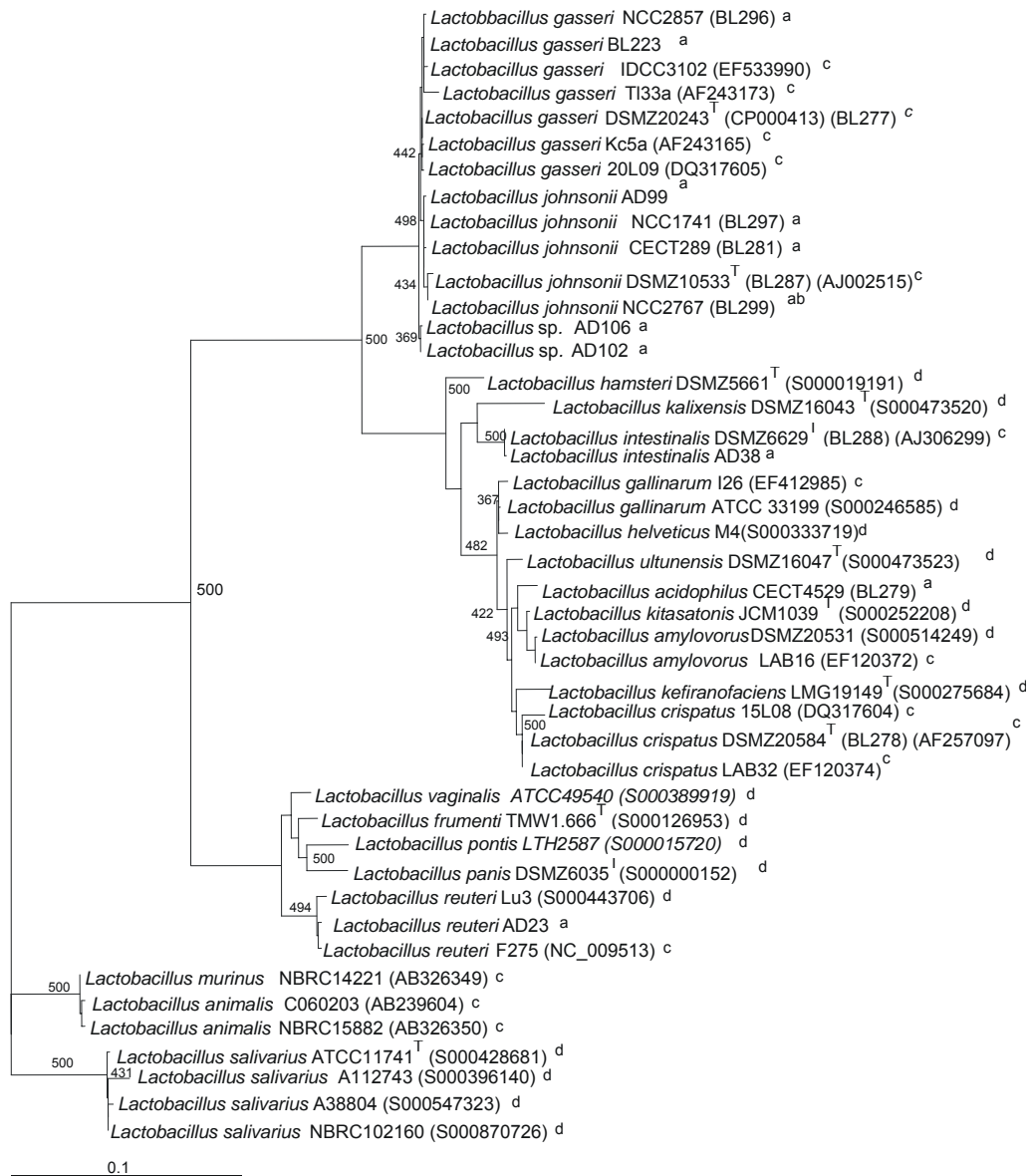


Figura 18. Árbol filogenético formado a partir de las secuencias del gen que codifican para el 16S rRNA de cepas perteneciente al género *Lactobacillus*. El árbol fue creado usando el método de máxima verosimilitud, los números indican para cada nodo el valor de “bootstrap” de 500 seudorélicas. a: secuencias determinadas en este trabajo; b: Secuencias aportadas por Nestlé Research Center; c: Secuencias obtenidas del GenBank; d: Secuencias obtenidas del ribosomal database project II.

gallinarum ZL12-1 (PUBMED EF536361), *L. gallinarum* ATCC33199 (Ribosomal database S000246585), *L. amylovorus* LAB16 (PUBMED EF120372), *L. amylovorus* DSM20531 (Ribosomal database S000514249), *L. amylovorus* LAB8 (PUBMED EF120370), *L. amylovorus* LAB52 (PUBMED EF120375), *L. crispatus* LAB32 (PUBMED EF120374), y *L. crispatus* 3L10 (PUBMED DQ333457). Los resultados obtenidos muestran secuencias idénticas para las cepas de la misma especie “*secuencias signatura*”, por lo que en la Figura 19 se presenta sólo un representante de cada especie. Los resultados coinciden con la separación del grupo de *L. acidophilus* en dos subgrupos propuesta por Johnson y Lauer de manera independiente en 1980, en el primero *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus* y *L. gallinarum*, en el segundo *L. gasseri*, *L. johnsonii* y *Lactobacillus* sp. AD102. Este último sólo se diferencia de *L. johnsonii* por el cambio de G por T en la posición 57 de la secuencia. En la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA de 1552 pares de bases que fue amplificada en este estudio, no se observa una región con la variabilidad suficiente, que permita el diseño de cebadores para una clara discriminación entre las cepas analizadas de *L. johnsonii* y *Lactobacillus* sp. AD102, aunque no se descarta la posibilidad de encontrar dichas secuencias en otros genes de rRNA.

<i>L. acidophilus</i> CECT4529	GAGCGAGCTGAACCA-ACAGATTCA---CTTCGGT--GATGACGTTGGGAA--CGCGAGCGG
<i>L. amylovorus</i> LAB16	GAGCGAGCGGAACCA-ACAGATTTA---CTTCGGT--AATGACGTTGGGAA--AGCGAGCGG
<i>L. crispatus</i> LAB32	GAGCGAGCGGAACTA-ACAGATTTA---CTTCGGT--AATGACGTTAGGAA--AGCGAGCGG
<i>L. gallinarum</i> 126	GAGCGAGCAGAACCA-GCAGATTTA---CTTCGGT--AATGACGCTGGGAA--CGCGAGCGG
<i>L. gasseri</i> NCC2858	GAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTGCTTGCAACCAATGAACTAGATACAAGCGAGCGG
<i>L. johnsonii</i> DSM10533	GAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTGTGCTTGCACTAATGAACTAGATACAAGCGAGCGG
<i>Lactobacillus</i> sp. AD102	GAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTGTGCTTGCACTAATGAACTAGATACAAGCTAGCGG

Figura 19. Alineamiento de la región V1 del gen que codifica para el 16S rRNA de las especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*. En total fueron alineadas 28 cepas de las cuales en la figura solo aparece una representante de cada especie.

1.3.3. Análisis de secuencias del gen *recA*.

Para la reconstrucción filogenética basada en la secuencia del gen *recA* fueron analizadas 19 secuencias, nueve correspondientes a cepas incluidas en este estudio y diez obtenidas de GenBank. La reconstrucción filogenética se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo GTR+G con un total de 500 pseudo réplicas. En el árbol resultante (Figura 20) se observa claramente una topología que separa a *Lactobacillus* sp. AD102, AD104 y AD105 de las cepas analizadas de *L. gasseri* y *L. johnsonii*, lográndose una discriminación muy buena de estas tres especies. Cuando alineamos la secuencia del gen *recA* de *Lactobacillus* sp. AD102, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) observamos que las diferencias entre estas secuencias son de 67 nucleótidos entre las cepas *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *Lactobacillus* sp. AD102, 71 nucleótidos entre las cepas *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y 72 nucleótidos entre las cepas *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) (Figura 21). Estos resultados muestran una variabilidad en la secuencia mucho mayor que la observada en las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA.

1.4. Hibridación DNA-DNA.

La relación DNA-DNA entre las cepas tipo de *L. intestinalis*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* y *Lactobacillus* sp. AD102 con cada una de las 26 cepas de *Lactobacillus* analizadas en este estudio, se realizó mediante una hibridación DNA-DNA, utilizando sondas marcadas con digoxigenina de las cepas tipo y DNA de todas las cepas estudiadas inmovilizado sobre una membrana de nylon a una temperatura de 65°C (Figura 22). Cada uno de los puntos ubicados verticalmente corresponde a tres diluciones diferentes (160, 80 y 40 ng, respectivamente) de cada muestra de DNA por duplicado, y horizontalmente se corresponden con las 26 cepas de *Lactobacillus*. El promedio de los valores obtenidos para cada cepa en cada una de las membranas fue calculado teniendo

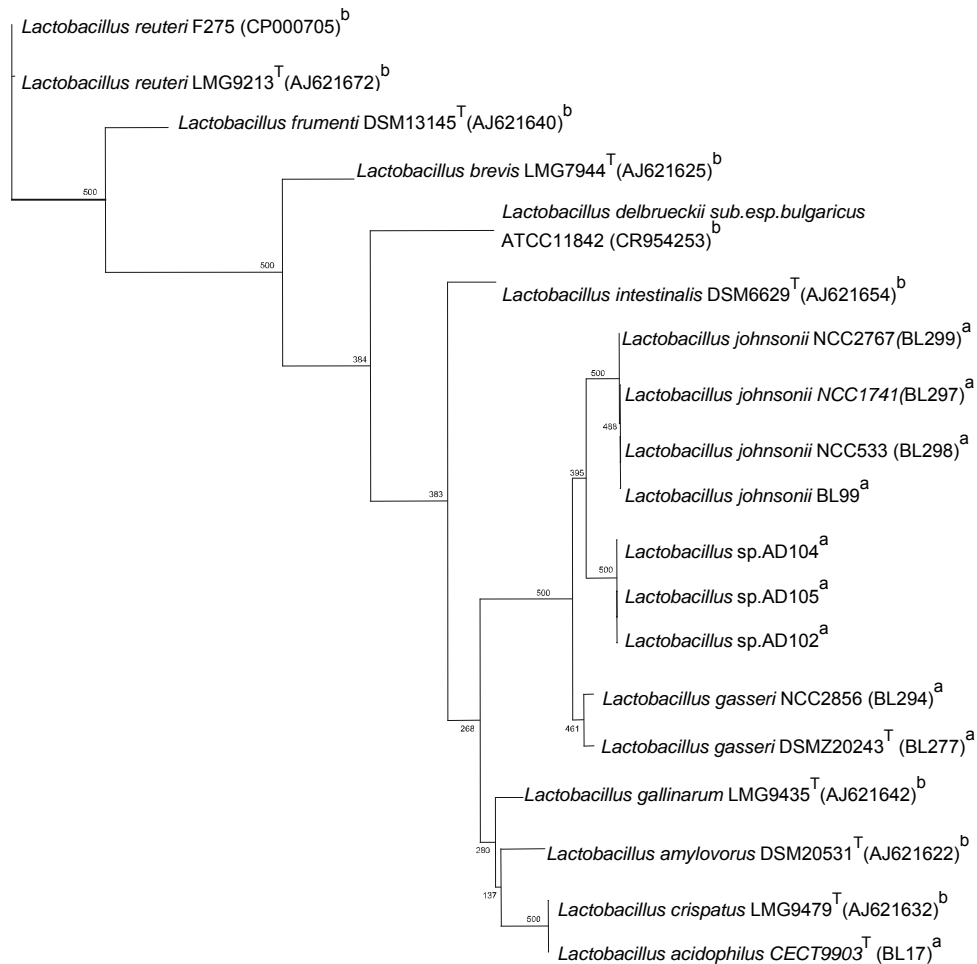


Figura 20. Análisis filogenético de las secuencias del gen *recA* de cepas de *Lactobacillus*. El árbol fue creado usando el método de máxima verosimilitud, los números indican para cada nodo el valor de “bootstrap” de 500 pseudo réplicas. a: secuencias realizadas durante este trabajo; b: Secuencias obtenidas del GenBank.

```

BL298 : CAAATTTCCACTATTCCCTTCGGTTCACTAGCTTTAGATGCGCTCTTGGAGTTGGTGGC : 60
AD102 : CAAATTTCCACTATTCCCTTCGGTTCACTAGCTTTAGATGCGCTCTTGGAGTTGGTGGG : 60
BL277 : CAAATTTCCACTATTCCCTTCGGTTCACTAGCTTTAGATGCGCTCTTGGAGTTGGTGGT : 60

BL298 : TATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCTGGTAAAAACAACCTGTG : 120
AD102 : TATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCTGGTAAAAACAACCTGTG : 120
BL277 : TATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCTGGTAAAAACAACCTGTA : 120

BL298 : GCTCTCAGTGTGTGCAGAAGTTCACAAAGCGTGGAGGAACGCGAGCTTATATCGATGGG : 180
AD102 : GCTCTCAGTGTGTGCAGAAGTTCACAAAGCGTGGAGGAACGCGAGCTTATATCGATGGT : 180
BL277 : GCACTCAGCTGTGTGCAGAAGTTCACAAAACGTGGAGGAACGCTGCAATACATTCATGATGCT : 180

BL298 : GAAAATGCCATGGATCCCTGCTTAAGCCGAAGCAATTAGGTGTTGATATTGATTCCCTTAATT : 240
AD102 : GAAAATGCCATGGATCCAGCTTACGCGGAAGCTTTAGGCCGTAGATATTGATTCAATTCATT : 240
BL277 : GAAAATGCTATGGATCCAGCTTATGCTGAGGCGTTAGGGGTAAGATATTGATTCAATTAATT : 240

BL298 : TTATCTCAACCAAACTCTGGTGAAGAAGGTTCTGCAAATTGCCAGATACGCTTATTGCGCAGT : 300
AD102 : TTATCTCAACCAAACTCTGGTGAAGAAGGTTTACAAATTGCCAGATACATTAATTGCGCAGT : 300
BL277 : TTATCTCAACCAAACTCTGGTGAAGAAGGTTCTGCAAATTGCCAGATACATTTGATTGCGCAGT : 300

BL298 : GGTGCAATTGATATCTTAGTTGTGGATTCCTGCTGCTGCTGCTTGTAGTACCAAGAGCGGAAATT : 360
AD102 : GGTGCAATTGATATTTTAGTTGTGCACTCAGTAGCTGCTTGTAGTCCAAAGAGCTGAAATT : 360
BL277 : GGTGCAATTGATATTTTGGTTGTGGATTCAGTTGCTGCTTGTAGTACCACGGGCTGAAATT : 360

BL298 : GACGGTGCATGGGAGATTCACATGTTGGTITTAACAAGCCAGATTAATGAGTCAGGCCCTTAA : 420
AD102 : GATGGTGCATATGGGAGACTCTCATGTTGGGTTTGAAGCAAGATTAATGAGTCAAGCTCTT : 420
BL277 : GATGGAGATATGGGAGACTCTCATGTTGGTITTAACAGGCAAGATTAATGAGTCAGGCCCTTG : 420

BL298 : CGTAAACTCTCAGGAAATATCTCTAAAACATAAACTATTGCTGTTTTTCATTAAACCAAATT : 480
AD102 : CGTAAACTTCTGGAAATATTTCTAAAACATAAACTATTGCTGTTTTTCATTAAACCAAATT : 480
BL277 : CGTAAACTTCTGGAAATATTTCTAAAACGAAACACAATTGCTGTTTTTCATTAAACCAAATT : 480

BL298 : CGTGAAAAGTTGGGTTATGTTTGGAAATCCAGAACTACCTCTGGTGGACGTGCTTTG : 540
AD102 : CGTGAAAAGTTGGGTTATGTTTGGAAATCTTGAGACAACCTCGGGTGGTTCGTGCTTTG : 540
BL277 : CGTGAAAAGTTGGTGTATGTTTGGAAATCCAGAACTACCTCTGGTGGTTCGTGCTTTA : 540

BL298 : AAGTTTACTCTACGATTAGATTAGAAGTACGTAGAGCAAGAACAAATTAACAAGGATCA : 600
AD102 : AAGTTTACTCTACCATCCGACTAGAAGTACGTGCTGCGGAACAAATTAACAAGGTTCA : 600
BL277 : AAGTTCTATTCTACTATTTCGATTAGAAGTTCGTGCTGCGGAACAGATCAAGCAAGGATCT : 600

```

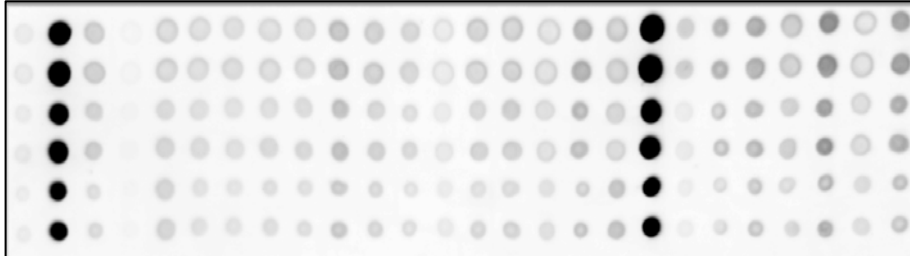
Figura 21. Alineamiento de las secuencias del gen *recA* de *L. johnsonii* NCC533 (BL298), *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *Lactobacillus* sp. AD102

en cuenta mínimo cuatro de los seis valores por cepa, siempre que la desviación estándar no excediera el 25%, este procedimiento se realizó por triplicado y los resultados obtenidos (Tabla 12A) corresponden al promedio de los valores de las tres membranas y su respectiva desviación estándar. En cada columna de la tabla se muestran los valores obtenidos con cada sonda frente a las 26 cepas estudiadas. Los resultados muestran que las relaciones intra especie de *L. intestinalis* y *L. acidophilus* son siempre mayores al 90%, en *L. crispatus* la relación de la cepa *L. crispatus* DSMZ20584^T (BL278), con *L. crispatus* BL221 fue

de $82,06 \pm 10,06\%$ y para estas tres especies las relaciones inter especie son siempre inferiores al 25%. Las relaciones intra especie de *Lactobacillus* sp. AD102, *L. johnsonii* y *L. gasseri* son un poco más variadas, aunque hay que tener en cuenta que el número de cepas analizadas por especie es mayor. En el caso de *L. johnsonii* la relación de la cepa *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287) con la cepa *L. johnsonii* AD99 (extraída de intestino de rata y clasificada como *L. johnsonii* por secuenciación del gen que codifica para el 16S rRNA) fue de $56,49 \pm 8,70\%$, en *L. gasseri* entre la cepa *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y la cepa *L. gasseri* BL223 el porcentaje de hibridación fue de $62,11 \pm 9,8\%$, el resto de las relaciones de las cepas de estas especies con su respectiva cepa tipo fue mayor del 70%, siendo por lo general más altos los valores de hibridación entre las cepas de *L. johnsonii* que entre las cepas de *Lactobacillus* sp. AD102, y *L. gasseri*. Cuando analizamos los valores de hibridación DNA-DNA de estas tres especies entre si, observamos que las cepas de *L. gasseri* con la sonda de *L. johnsonii* y viceversa, muestran relaciones menores del 50%, pero por lo general mayores que las observadas frente a otras especies como *L. intestinalis*, *L. crispatus* o *L. acidophilus*, al igual que pasa cuando comparamos las relaciones de *Lactobacillus* sp. AD102 con *L. gasseri* y principalmente con *L. johnsonii*.

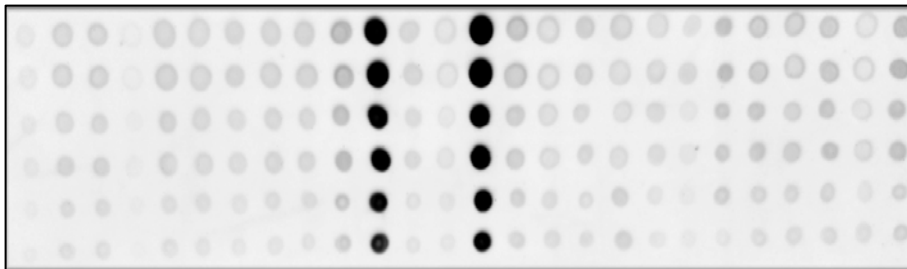
Utilizando el valor de hibridación AxB y BxA (resultado obtenido cuando un determinado DNA actúa como sonda o está en la membrana y viceversa) se puede establecer una relación de homología cercana a la media matemática entre los dos valores. En la tabla 12B se encuentra expresado este valor para las cepas tipo de las especies analizadas. Se observa que la relación entre *Lactobacillus* sp. AD102 con *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287) y *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) es de 25,55% y 14,77% respectivamente y la relación entre las cepas *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287) y *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277), es de 17,37%. Los resultados obtenidos con el resto de las cepas están siempre por debajo del 10%

L.intestinalis DSMZ6629^T (BL288)



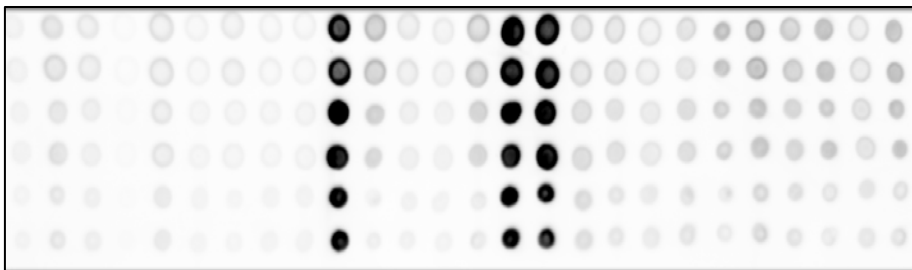
23 38 99 100 102 103 104 105 106 17 221 223 277 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

L. crispatus DSMZ20584^T (BL278)



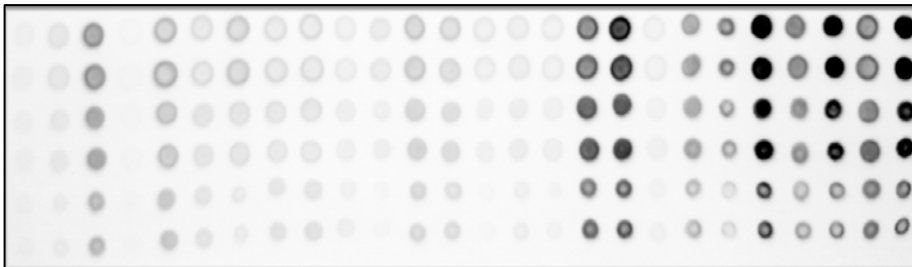
23 38 99 100 102 103 104 105 106 17 221 223 277 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

L. acidophilus CECT903^T (BL17)



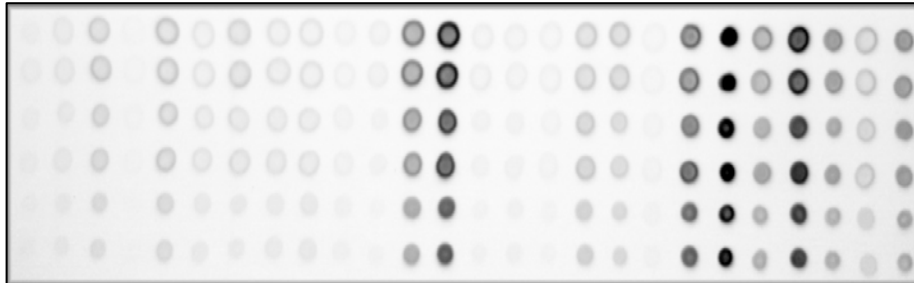
23 38 99 100 102 103 104 105 106 17 221 223 277 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

L.johnsonii DSMZ10533^T (BL287)



23 38 99 100 102 103 104 105 106 17 221 223 277 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

***L.gasseri* DSMZ20243^T (BL277)**



23 38 99 100 102 103 104 105 106 17 221 223 **277** 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

***Lactobacillus* sp. AD102**



23 38 99 100 **102** 103 104 105 106 17 221 223 277 278 279 280 281 287 288 292 294 295 296 297 298 299

Figura 22. Membranas de hibridación DNA-DNA. En la parte inferior de cada membrana aparece un número correspondiente a cada cepa y resaltado en negrita el DNA de la misma cepa de la sonda, que corresponde al 100% de hibridación relativa. En la figura, las cepas están identificadas de acuerdo a la denominación dada en la colección interna del laboratorio, siendo: *L. reuteri* AD23; *L. intestinalis* AD38; *L. johnsonii* AD99; *L. murinus* AD100; *Lactobacillus* sp. AD102; *Lactobacillus* sp. AD103; *Lactobacillus* sp. AD104; *Lactobacillus* sp. AD105; *Lactobacillus* sp AD106; *L. acidophilus* CECT903^T (BL17); *L. crispatus* BL221; *L. gasseri* BL223, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277); *L. crispatus* DSMZ20584^T (BL278); *L. acidophilus* CECT4529 (BL279); *L. acidophilus* CECT4179 (BL280); *L. johnsonii* CECT289 (BL281); *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287); *L. intestinalis* DSMZ6629^T (BL288); *L. gasseri* NCC2858 (BL292); *L. gasseri* NCC2856 (BL294); *L. johnsonii* NCC2822 (BL295); *L. gasseri* NCC2857 (BL296); *L. johnsonii* NCC1741 (BL297); *L. johnsonii* NCC533 (BL298); *L. johnsonii* NCC2767 (BL299).

A

	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. AD102
<i>L. reuteri</i> AD23	4,33±4,16	6,04±4,61	3,87±4,17	8,12±4,71	5,93±2,16	4,78±2,07
<i>L. intestinalis</i> AD38	107,55±4,18	9,90±3,70	7,75±4,33	9,93±4,83	9,77±0,23	7,27±1,86
<i>L. johnsonii</i> AD99	7,07±3,58	56,49±8,70	6,04±2,44	19,74±3,73	12,02±10,84	24,15±2,27
<i>L. murinus</i> AD100	1,95±1,39	3,68±2,29	2,41±0,83	4,82±2,47	1,23±0,07	15,22±4,65
<i>Lactobacillus</i> sp. AD102	7,50±1,18	31,43±6,28	6,98±2,42	22,05±3,10	6,19±1,73	100,00
<i>Lactobacillus</i> sp. AD103	3,55±0,51	18,20±5,85	3,82±0,34	12,61±2,42	3,26±0,66	72,61±10,45
<i>Lactobacillus</i> sp. AD104	3,57±1,55	19,56±4,20	3,94±0,88	13,18±0,71	2,56±0,89	94,95±5,69
<i>Lactobacillus</i> sp. AD105.	3,55±0,29	17,65±6,63	3,74±1,00	12,96±2,37	3,23±0,05	86,54±8,38
<i>Lactobacillus</i> sp. AD106	3,40±0,25	17,31±6,16	3,47±0,75	12,73±2,10	3,57±0,64	75,04±8,82
<i>L. acidophilus</i> CECT903 ^T (BL17)	8,28±2,65	7,06±0,08	9,84±3,14	6,18±2,42	100,00	4,74±0,80
<i>L. crispatus</i> BL221	7,14±2,66	6,84±0,86	82,06±10,06	4,88±2,97	8,40±2,87	4,21±1,34
<i>L. gasseri</i> BL223	5,06±2,07	21,28±1,75	4,21±1,38	62,11±9,80	3,29±0,88	14,13±2,67
<i>L. gasseri</i> DSMZ20243 ^T (BL277)	3,99±1,88	15,62±2,19	3,63±1,61	100,00	3,25±0,77	9,89±2,56
<i>L. crispatus</i> DSMZ20584 ^T (BL278)	7,34±2,86	6,22±1,06	100,00	4,28±2,06	11,70±5,35	4,20±1,90
<i>L. acidophilus</i> CECT4529 (BL279)	8,59±3,38	6,79±1,73	9,08±3,40	3,68±0,61	98,60±6,52	3,96±1,23
<i>L. acidophilus</i> CECT4179 (BL280)	7,10±3,61	5,12±1,50	6,72±2,72	3,39±1,61	101,10±2,45	3,96±0,64
<i>L. johnsonii</i> CECT289 (BL281)	10,44±3,74	81,91±8,39	5,45±2,02	23,12±7,98	8,61±3,24	28,28±6,53
<i>L. johnsonii</i> DSMZ10533 ^T (BL287)	7,74±1,49	100,00	5,15±0,70	19,32±1,51	7,57±1,73	20,76±1,32
<i>L. intestinalis</i> DSMZ6629 ^T (BL288)	100,00	6,00±1,26	3,66±1,10	4,08±0,86	6,79±2,11	3,52±1,05
<i>L. gasseri</i> NCC2858 (BL292)	8,07±3,82	29,36±9,15	5,98±3,43	71,09±5,46	8,92±4,47	19,56±5,14

	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. AD102
<i>L. gasseri</i> NCC2856 (BL294)	10,56±5,92	31,63±9,46	7,73±3,08	76,31±6,36	6,57±2,36	21,74±6,62
<i>L. johnsonii</i> NCC2822 (BL295)	15,39±8,09	94,25±12,15	11,39±6,29	45,64±4,48	13,81±6,55	35,37±11,93
<i>L. gasseri</i> NCC2857 (BL296)	11,54±6,36	41,76±12,27	11,11±6,48	79,66±15,14	8,73±3,21	25,55±8,95
<i>L. johnsonii</i> NCC1741 (BL297)	17,57±7,53	91,82±8,88	10,48±6,32	38,06±8,11	10,39±3,73	35,18±9,31
<i>L. johnsonii</i> NCC533 (BL298)	9,70±5,52	76,78±8,09	9,73±7,20	24,53±8,96	8,31±3,82	24,94±8,71
<i>L. johnsonii</i> NCC2767 (BL299)	16,00±7,28	106,05±7,91	13,33±8,54	45,02±14,95	11,35±3,62	39,75±11,45

B

	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. AD102
<i>Lactobacillus</i> sp. AD102	5,14	25,55	5,41	14,77	5,42	100,00
<i>L. acidophilus</i> CECT903 ^T (BL17)	7,50	7,31	10,73	4,48	100,00	
<i>L. gasseri</i> DSMZ20243 ^T (BL277)	4,04	17,37	3,94	100,00		
<i>L. crispatus</i> DSMZ20584 ^T (BL278)	5,18	5,66	100,00			
<i>L. johnsonii</i> DSMZ10533 ^T (BL287)	6,82	100,00				
<i>L. intestinalis</i> DSMZ6629 ^T (BL288)	100,00					

Tabla 12. Hibridación DNA-DNA de las cepas tipo de algunas especies de *Lactobacillus* con las 26 cepas incluidas en este estudio. Los valores representan el porcentaje de hibridación relativa considerando que el 100% de hibridación es la del DNA de una cepa consigo misma **A**: promedio ± la desviación estándar de tres ensayos de hibridación DNA-DNA entre las cepas tipo de seis especies de *Lactobacillus* frente a las 26 cepas de *Lactobacillus* estudiadas. Sombreado en cada columna las cepas pertenecientes a la misma especie del *Lactobacillus* que dio origen a la sonda. **B**: Relación DNA-DNA entre las cepas tipo de especies de *Lactobacillus* obtenida del cálculo de la hibridación AXB y BXA.

a excepción de *L. crispatus* con *L. acidophilus* cuya relación de homología es del 10,73%. Los resultados obtenidos de los experimentos de hibridación DNA-DNA para la cepa de *Lactobacillus* sp. AD102 y los posteriores aislamientos *Lactobacillus* sp. AD103, AD104, AD105 y AD106 nos permiten proponerla como una nueva especie del complejo de *L. acidophilus*, cercana a *L. johnsonii* y *L. gasseri*.

1.5. Análisis comparativo de perfiles de proteína de cepas de *Lactobacillus* del grupo de *L. acidophilus*.

El análisis de las proteínas solubles totales en gel de acrilamida se realizó mediante dos dendrogramas que muestra la similitud entre las 12 cepas estudiadas. En el primero de acuerdo al coeficiente de Dice utilizando el método UPGMA, se observan que *L. acidophilus* aparece separado del resto de las cepas con una relación de similitud inferior al 60%. Las cepas de *L. johnsonii* y *Lactobacillus* sp. AD102, forman un grupo en el que se diferencian claramente las dos especies con una relación de similitud entre ellas de 61%. *L. gasseri* y *L. crispatus* aparecen en otro grupo en el que igualmente se logra una discriminación de las especies. En el segundo análisis utilizando el coeficiente de Pearson (método UPGMA), al igual que con el coeficiente de Dice, se observa que *L. acidophilus* aparece separado con una relación de similitud inferior al 50% con las otras cepas analizadas. El resto de las cepas, aparecen en un grupo que se divide en dos subgrupos con una relación entre ellos de 59%. En el primer subgrupo se encuentran las cepas *Lactobacillus* sp. AD103, AD104, AD105 y AD106 con una relación de similitud entre ellas superior al 80%, y separadas de las anteriores aparecen también *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. johnsonii* NCC2767 (BL299) con una relación entre ellas de 75%. En el segundo subgrupo y no discriminadas aparecen las demás cepas de *L. johnsonii* y las cepas de *L. gasseri* y *L. crispatus*.

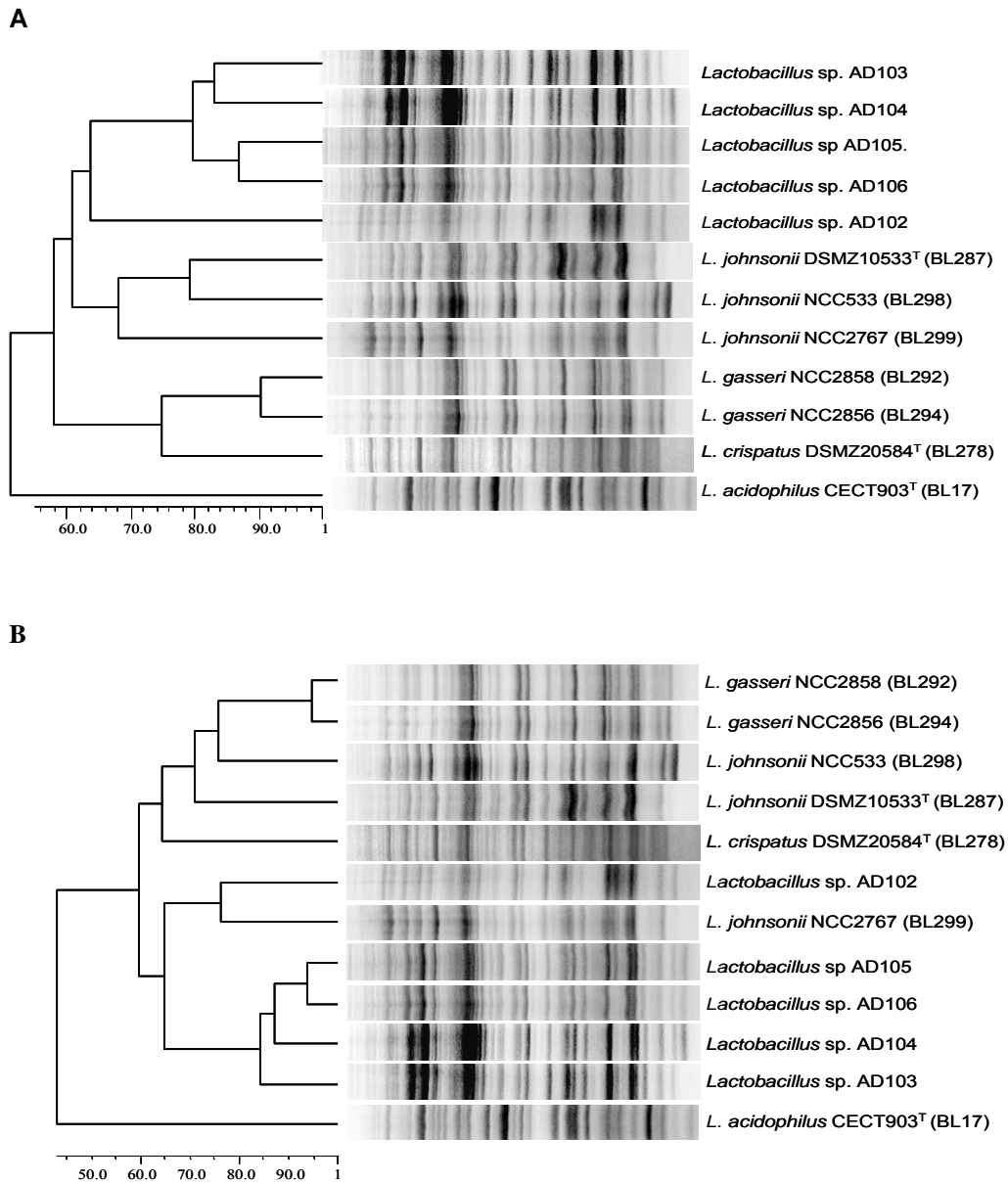


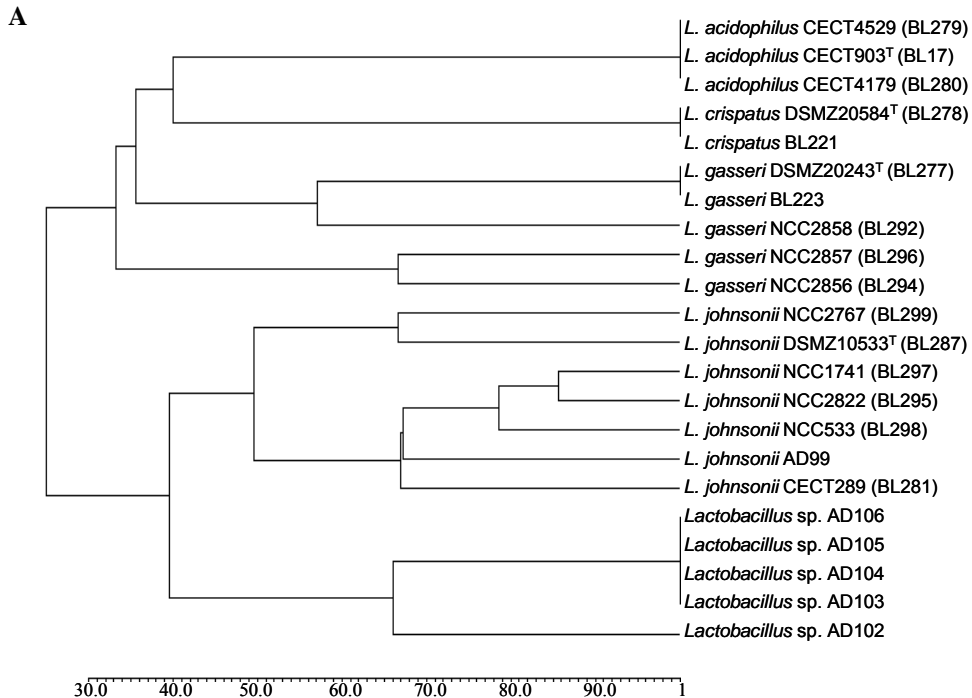
Figura 23. Análisis comparativo de perfiles de proteína de cepas de *Lactobacillus* del grupo de *L. acidophilus*. **A:** Dendrograma de similitud de acuerdo al coeficiente de Dice. **B:** Dendrograma de similitud de acuerdo al coeficiente de Pearson. En los dos casos se utilizó el método UPGMA (programa BioNumerics 4.6 Applied Maths Kortrijk, Belgium).

1.6. Genotipado de cepas del grupo de *L. acidophilus* mediante ERIC-PCR.

El análisis del perfil de bandas obtenido por la amplificación por PCR de las secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC)(Berger *et al.*, 2007;Gavini *et al.*, 2006) de 22 cepas de *Lactobacillus*, pertenecientes a especies del grupo de *L. acidophilus*, se realizó mediante un dendrograma que muestra la similitud entre las 22 cepas estudiadas de acuerdo al coeficiente de Jaccard utilizando el método UPGMA (Figura 24). En el dendrograma se observan dos grupos entre las cuales existe una similitud inferior al 30%, en uno de ellos se encuentran todas las cepas de *L. johnsonii* analizadas, formando un subgrupo con relaciones de similitud entre ellas superiores o iguales al 50%. Se observa también otro subgrupo que incluye el *Lactobacillus* sp. AD102 y los otros cuatro aislamientos de esta misma especie con una relación de similitud entre ellos superior al 65%. En el segundo grupo aparecen discriminadas las cepas de las especies *L. crispatus* y *L. acidophilus*, pero no se logra una clara diferenciación de las cepas de *L. gasseri*. En general se observa que la tipificación de cepas por ERIC-PCR no permite la discriminación de todas las especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*, siendo esto más evidente para las cepas de *L. gasseri* incluidas en este análisis.

1.7. Comparación del genoma de la cepa *L. johnsonii* NCC533 (BL298) con otros *Lactobacillus* mediante "microarrays".

El genoma de *Lactobacillus* sp. AD102, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* AD99 fue comparado con el genoma de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) utilizando la técnica de "microarrays". Se realizaron tres hibridaciones: *L. johnsonii* AD99/ *L. johnsonii* NCC533 (BL298), *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) / *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *Lactobacillus* sp. AD102/ *L. johnsonii* NCC533 (BL298) en el Centro de Investigación de Nestlé en Suiza. Los resultados obtenidos por el Dr. Bernard Berger (Anexo1) están incluidos en esta tesis por



24.9

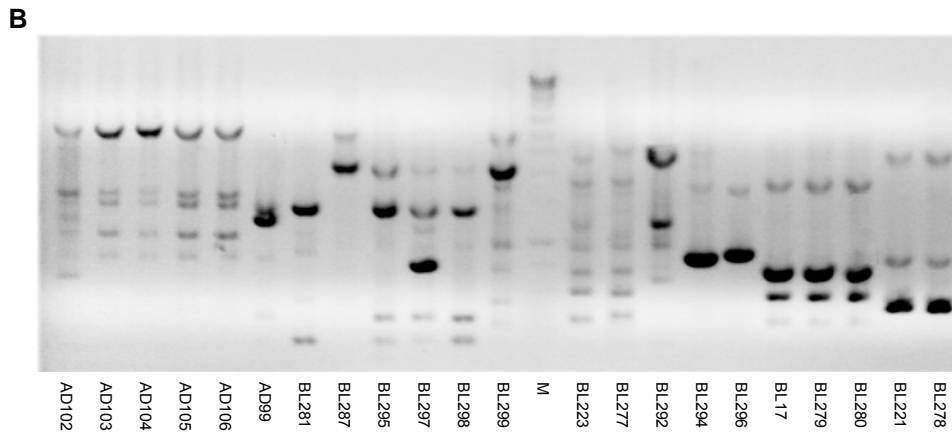


Figura 24. Análisis del patrón de bandas obtenido mediante ERIC-PCR. **A:** Dendrograma de similitud de acuerdo al coeficiente de Jaccard del perfil de bandas obtenido por ERIC-PCR en 22 cepas de *Lactobacillus* de especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*. **B:** Perfil de bandas obtenido por ERIC-PCR para 22 cepas de *Lactobacillus*. M: Marcador de pesos moleculares Hyperladder I con 14 bandas en un rango entre 10.000 y 200 pb.

aportar valiosa información respecto a la propuesta de *Lactobacillus* sp. AD102 como una posible nueva especie.

1.8. Características fenotípicas de las especies del grupo de *L. acidophilus*.

Para la propuesta de una posible nueva especie, resulta de interés reunir las características fenotípicas que describan a la mayoría de las cepas pertenecientes a dicha especie. En la tabla 13 se describen las características propias de cada una de las especies del grupo de *L. acidophilus* de acuerdo a su descripción original junto con *Lactobacillus* sp. AD102 como posible nueva especie.

.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. AD 102
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	-
Lactosa	+	+	-	d	d	d	-
Maltosa	+	+	+	+	d	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	d	-	-	+	d	d	-
D-Rafinosa	d	-	-	+	d	d	-
Salicina	+	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	D	-	+	-	d	d	+
Crecimiento 15/45 °C	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-
% G+C	34-37	35-38	40-41	36-37	33-35	33-35	ND

Tabla 13. Características fenotípicas de las especies del grupo de *L. acidophilus* de acuerdo a su descripción original junto con el *Lactobacillus* sp. AD102. Los símbolos +, el 90% o más de las cepas son positivas; -, el 90% o más de las cepas son negativas; d, del 11 al 89% de las cepas son positivas; ND, No determinado. Tomado de Hammes y Vogel (1995).

2. DISCUSIÓN.

Se ha aislado un lactobacilo de las muestras intestinales de rata, para el cual se demostró por PCR-Cuantitativa que el consumo de sorbitol favorece selectivamente su permanencia en el tracto gastrointestinal de rata. Este lactobacilo ha sido identificado como *Lactobacillus* sp. AD102, en un análisis filogenético basado en una secuencia de 1100 pb del gen que codifica para el 16S rRNA (figura 10 capítulo I). En el árbol obtenido, *Lactobacillus* sp. AD102 aparece en un taxón separado de *L. gasseri* y *L. johnsonii*, indicando que podría tratarse de una nueva especie perteneciente al grupo de *L. acidophilus*. Este hallazgo motivó la realización de un estudio para la clasificación taxonómica de este microorganismo y su denominación como posible nueva especie. Para tal estudio *Lactobacillus* sp. AD102 y cuatro nuevos aislamientos de este mismo microorganismo a partir de intestino de rata, son comparados con otras 21 cepas de *Lactobacillus*, la mayoría de las cuales pertenecen a especies del grupo de *L. acidophilus*.

En 1980 Lauer y Johnson de forma independiente clasificaron el grupo de *L. acidophilus* basados en la hibridación DNA-DNA en seis especies difícilmente diferenciables por los métodos fenotípicos tradicionales (Jonson *et al.*, 1980;Lauer and Kandler, 1980). Nosotros hemos realizado análisis fenotípicos a las 26 cepas incluidas en este estudio como la fermentación de azúcares con el método comercial API 50 CH y el crecimiento a diferentes temperaturas, condiciones de pH y concentraciones de NaCl. Los resultados obtenidos fueron analizados por dos métodos estadísticos diferentes, el primero un dendrograma de similitud basado en el coeficiente de correlación de Pearson y el segundo un análisis de componentes principales (ACP). Estos análisis muestran que no se logra una adecuada diferenciación de especies por métodos fenotípicos para las especies del grupo de *L. acidophilus*, este resultado coincide plenamente con las observaciones hechas por Lauer y Johnson en 1980 y con otros investigadores que más recientemente han realizado estudios taxonómicos con las especies del grupo de *L. acidophilus* (Berger *et al.*, 2007;Felten *et al.*, 1999).

Algunos autores consideran que pruebas de tipado de cepas como la electroforesis de proteínas solubles totales o la electroforesis de campo pulsado (PFGE) permiten una clara discriminación de especie entre cepas de *Lactobacillus* (Du Plessis and Dicks, 1995; Roussel *et al.*, 1993). Para el grupo de *L. acidophilus* algunos investigadores han logrado una discriminación entre especies mediante un análisis de proteínas solubles totales (Pot *et al.*, 1993), pero los resultados varían dependiendo del número de cepas analizadas y el origen de las mismas. En un estudio que incluía 98 cepas de especies del grupo de *L. acidophilus* y otras especies cercanas se realizó una diferenciación de especies por electroforesis de proteína, observando especial dificultad en la discriminación de especies cercanas como *L. gasseri* y *L. johnsonii* (Gancheva *et al.*, 1999). En este trabajo se ha realizado una electroforesis de proteínas solubles totales con la cepa *Lactobacillus* sp. AD102, los cuatro nuevos aislamientos de esta misma especie y otras cepas pertenecientes a especies del grupo de *L. acidophilus*. En un dendrograma de similitud con el coeficiente de Dice de los perfiles de bandas obtenidos, observamos que se logra una discriminación de las cepas de acuerdo a la especie. Un segundo análisis de los perfiles electroforéticos de proteína fue realizado utilizando el coeficiente de Pearson, en este caso, en el dendrograma resultante no se logró una discriminación de las especies. Scheirlinck *et al* (2007) observo que cuatro cepas de *Lactobacillus crustorum* sp. nov. provenientes de un mismo origen, mostraban en un perfil proteico notables diferencias en la posición e intensidad de las bandas en un determinado rango de KDa (Scheirlinck *et al.*, 2007). En nuestro caso observamos que existen importantes diferencias en la intensidad de algunas bandas en el perfil proteico de miembros de una misma especie, razón por la cual se obtiene una mejor discriminación cuando se realiza el análisis utilizando un coeficiente cualitativo como el de Dice. En general la electroforesis de proteínas es un método cuyo valor taxonómico dependerá de la naturaleza y el número de las cepas analizadas. Diferentes técnicas moleculares han sido también empleadas en el intento de algunos taxónomos por hacer una fácil y rápida discriminación de las especies de *Lactobacillus* (Rodtong and Tannock, 1993; Roy *et al.*, 2001). Para el grupo de *L. acidophilus* algunos autores

han logrado la diferenciación de especies mediante el uso de ARDRA (de las siglas en inglés Amplified ribosomal DNA restricción análisis) y el uso de una o más enzimas de restricción (Guan *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2000). La tipificación de cepas mediante ERIC-PCR (amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas intergénicas) es otra de las técnicas de genotipificación utilizada para la identificación y clasificación de cepas de especies del grupo de *L. acidophilus* (Berger *et al.*, 2007). Nosotros hemos amplificado las secuencias ERIC del *Lactobacillus* sp. AD102, los cuatro nuevos aislamientos de esta especie y otras 17 cepas pertenecientes a especies del grupo de *L. acidophilus*, los resultados obtenidos no permiten una discriminación adecuada de todas las especies del grupo mostrando especial dificultad en la discriminación de las cepas de *L. gasseri* analizadas. De nuestro trabajo podemos concluir que los análisis fenotípicos y pruebas de tipado como ERIC-PCR y la electroforesis de proteína no tienen un aporte significativo en la clasificación taxonómica de las especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*. La influencia que el medio ambiente ejerce sobre las características fenotípicas y genotípicas de un determinado organismo son de importante magnitud, es por ello que dentro de una misma especie pueden existir diferentes ecotipos dependiendo de su nicho ecológico (Cohan, 2002). Es posible que la dificultad para la adecuada discriminación de especies de *Lactobacillus* mediante pruebas fenotípicas y métodos de tipado de cepas, se deba a que miembros de una misma especie de *Lactobacillus* son habitantes normales de muy diversos ambientes.

De acuerdo al informe del comité internacional de sistemática en procariotas, el parámetro para determinar los límites entre especies es la similitud de su DNA establecido mediante el uso de una técnica cuantitativa de reasociación DNA-DNA (Stackebrandt *et al.*, 2002). Se han determinado el porcentaje de hibridación DNA-DNA de las cepas tipo de *L. intestinalis*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* y *Lactobacillus* sp. AD102 como cepa tipo de la posible nueva especie, con las 26 cepas utilizadas en este estudio. Los resultados muestran que la especie más cercana a *Lactobacillus* sp. AD102 es *L. johnsonii* y que el porcentaje de hibridación entre las cepas tipo de estas dos especies es

25,55%. El mayor porcentaje de hibridación entre cepas de estas dos especies, 39,75%, se observó entre la cepa *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. johnsonii* NCC2767 (BL299). Los mayores porcentajes de hibridación entre cepas de las especies *L. johnsonii* y *L. gasseri* fueron, 41,76% entre *L. johnsonii* DSMZ10533^T (BL287) y *L. gasseri* NCC2857 (BL296) y 45,64% entre *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* NCC2822 (BL295), lo que hace evidente la cercanía entre estas dos especies. Por otra parte las relaciones de hibridación DNA-DNA Inter especie de *L. intestinalis*, *L. crispatus* y *L. acidophilus* son siempre inferiores al 25%. Berger *et al* (2007) en un estudio de hibridación genómica comparada, utilizando un “microarray” basado en el genoma de *L. johnsonii* NCC533, observaron que las relaciones entre el genoma de *L. gasseri* y *L. johnsonii* son mucho más estrechas que entre *L. acidophilus* y *L. johnsonii*, demostrando una disminución gradual de la similitud entre las especies del grupo de *L. acidophilus*. Según los parámetros aceptados por el comité internacional de sistemática en procariotas de acuerdo con la publicación de Rossello-Mora y Amann (2001), para considerar dos cepas de la misma especie debe existir entre ellas un porcentaje de hibridación superior al 70%. Basados en los resultados obtenidos podemos concluir que *Lactobacillus* sp. AD102 es una especie diferente de *L. johnsonii* y de *L. gasseri* (especies más cercanas) y podría proponerse como una posible nueva especie. Las cepas *L. johnsonii* AD99 y *L. gasseri* BL223 que muestran porcentajes de hibridación con las cepas tipo de su especie inferiores al 70% pero superiores al 50% podrían ser propuestas como posibles subespecies de su respectivo taxón de acuerdo al planteamiento de Rossello-Mora y Amann (2001), siendo esta información de especial interés para futuras investigaciones.

La comparación de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA es una poderosa herramienta para establecer relaciones filogenéticas en procariotas. El alto grado de conservación en su estructura y función hacen que la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA sea comúnmente utilizada como marcador evolutivo, sin embargo existen otras secuencias que pueden aportar mayor información a nivel filogenético, como es el caso de la secuencia del gen *recA* que da origen a la proteína recombinasa A del sistema SOS de *E. coli*. Esta secuencia

ha mostrado un alto poder discriminatorio al establecer relaciones filogenéticas en la familia *Vibrionaceae* (Thompson *et al.*, 2004), en especies de *Mycobacterium* (Blackwood *et al.*, 2000) y en especies de *Lactobacillus* (Torriani *et al.*, 2001) entre otras. Nosotros hemos realizado análisis filogenéticos con 1500 pb de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA y con 600 pb de la secuencia del gen *recA* de cepas de especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, dentro de las cuales se incluye el *Lactobacillus* sp. AD102 y otras especies pertenecientes al grupo de *L. acidophilus*. Los resultados obtenidos muestran que ambas secuencias la del gen que codifica para el 16S rRNA y la del gen *recA* logran discriminar perfectamente las especies *L. gasseri*, *L. johnsonii* y la posible nueva especie con representante *Lactobacillus* sp. AD102. Sin embargo, la variabilidad observada en la secuencia del gen *recA* (aproximadamente 70 pb de 600 pb varían entre secuencias de diferentes especies) es mucho mayor que la de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA (menos de 10 pb de 1500 pb varían entre secuencias de diferentes especies), lo que le permite a la secuencia del gen *recA* una mejor discriminación. Algunos autores consideran que para un análisis filogenético con marcadores alternativos como el gen *recA* sería preferible tener en cuenta la secuencia de aminoácidos que la secuencia de nucleótidos (Wolfgang and Klenk, 2005), en nuestro caso al analizar las secuencias de 200 aminoácidos de la proteína recombinasa A de las cepas *L. johnsonii* NCC533 (BL298), *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *Lactobacillus* sp. AD102 observamos que son idénticas, por lo que resulta inadecuado realizar con ellas un análisis filogenético. Una de las ventajas de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA sobre la secuencia del gen *recA* en análisis filogenéticos, resulta en la abundante cantidad de secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA encontradas en los bancos de datos en relación a la mínima cantidad de secuencias publicadas del gen *recA*. Los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos del gen que codifica para el 16S rRNA y del gen *recA* durante este estudio, sugieren que *Lactobacillus* sp. AD102 puede proponerse como una posible nueva especie.

Dentro de las zonas variables de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA hay secuencias específicas para determinada especie o grupo de

bacterias, esto ha permitido el diseño de cebadores específicos para la rápida identificación de algunas especies. En el caso de *L. johnsonii*, Marco Ventura y colaboradores diseñaron el cebador LJ1 (5'-GATGATTTTAGTTCTTGCACTAA-3') basado en una secuencia de la región variable V1 del gen que codifica para el 16S rRNA (Ventura and Zink, 2002). La secuencia de este cebador (con un cambio de T por G en la posición 13) ha sido encontrada en el gen que codifica para el 16S rRNA de las cepas de *L. johnsonii* incluidas en este estudio y también en las cepas de *Lactobacillus* sp. AD102, AD103, AD104, AD105 y AD106, por lo que ese cebador deja de ser exclusivo para la identificación de *L. johnsonii*, aunque todavía puede ser utilizado para diferenciar estas dos especies de otras especies muy próximas como por ejemplo *L. gasseri*.

Mediante la técnica de “*microarrays*” el Dr Bernard Berger del Laboratorio de investigaciones de Nestlé, ha realizado un análisis genómico comparado de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) con los genomas de *L. johnsonii* AD99, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *Lactobacillus* sp. AD102. Los resultados muestran una mayor similitud entre los genomas de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *Lactobacillus* sp. AD102 que entre *L. johnsonii* NCC533 (BL298) con *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) respecto a las secuencias de genes analizadas, sin embargo, dicha similitud es mucho menor a la observada entre dos cepas de la misma especie como son *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *L. johnsonii* AD99. En el “*microarray*” utilizado se encuentra representado el 96% de los genes de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) (1760 pautas de lectura abierta), el conocimiento de cada uno de los genes y su posición en el “*microarray*” nos podrá permitir en futuros estudios establecer diferencias mucho más detalladas entre los genomas de las cepas analizadas. La información obtenida mediante un análisis genómico comparado permite evaluar el número de secuencias de genes conservados entre dos cepas bacterianas. Conociendo de antemano la función de cada gen, podemos analizar diferentes aspectos como la presencia de genes involucrados en rutas metabólicas, síntesis de bacteriocinas, producción de exopolisacáridos y diferentes ontogenias.

Basados en los resultados del estudio taxonómico realizado y principalmente en los resultados de la hibridación DNA-DNA y en el análisis filogenético de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA y del gen *recA*, podemos proponer el *Lactobacillus* sp. AD102 como una nueva especie perteneciente al grupo de *L. acidophilus*, cercana a *L. gasseri* y *L. johnsonii* de acuerdo con la clasificación de Johnson y Lauer propuesta en 1980. Esta posible nueva especie la hemos denominado *Lactobacillus iatae* sp. nov., de acuerdo a las normas internacionales de nomenclatura en procariotas (Truper, 1996; Truper, 2007) y después de verificar que este nombre no estuviese asignado para otra bacteria en la lista de nombres aprobados por el Comité Internacional de Sistemática en Bacteriología (Euzéby J.P., 2007). En la figura 25 se observa la imagen microscópica de *L. iatae* sp. nov.

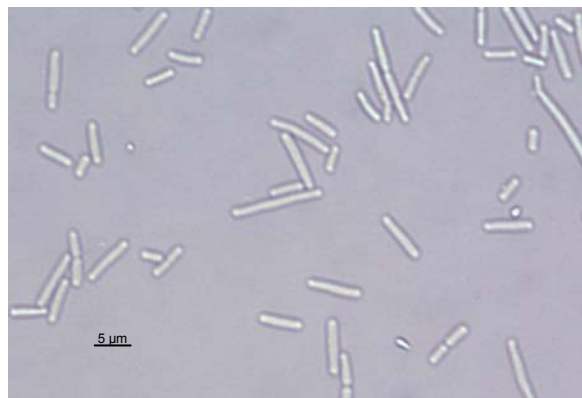


Figura 25. Células de *L. iatae* sp. nov. Crecidas en caldo MRS durante 36 horas a 37°C

DESCRIPCIÓN DE *Lactobacillus iatae* sp. nov.

L. iatae (ia.ta'e. L. gen. n. iata, hace referencia a IATA, abreviatura de Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos).

Bacilo Gram positivo, no móvil, que no forma esporas, heterofermentativo obligado, catalasa negativo, que no crece a 15 o 45°C ni en concentraciones de NaCl de 4,5 o 7,0%, crece a pH 4,5 y 7.0. En placas de agar MRS incubados durante 48 horas a 37°C, las colonias tienen un tamaño entre 0,5 a 1 mm de diámetro aproximadamente, son planas de forma circular con bordes regulares y de color grisáceo. Las células crecidas en caldo MRS tienen un tamaño entre 0,8-1,1 por 3-7 μm . y se encuentran solas, en pares o en pequeñas cadenas. Todas las cepas fermentan glucosa, manosa, fructosa, celobiosa, maltosa y sacarosa e hidrolizan la esculina. Algunas cepas fermentan trehalosa, β -gentibiosa y N-acetilglucosamina. No fermentan la amigdalina, galactosa, lactosa, manitol, melibiosa, rafinosa y salicina. La cepa tipo *L. iatae* AD102^T tiene actividad hidrolasa de sales biliares específica para las sales del ácido glicocólico. La cepa tipo ha sido aislada de intestino de rata.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

1. Discusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que el consumo oral de sorbitol modifica la microbiota intestinal en el modelo animal utilizado (rata) y para algunas bacterias lo hace de forma similar a un prebiótico reconocido como los FOS. Cuando se analizaron grupos bacterianos específicos como los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se observó que el sorbitol benefició selectivamente la población de dos especies de lactobacilos, *L. reuteri* AD23 y *Lactobacillus* sp. AD102, de las cinco especies presentes en el intestino y heces de las ratas, y posiblemente una especie de bifidobacteria, *B. pseudolongum*. En las ratas alimentadas con sorbitol se observó un cambio en la actividad metabólica global del ecosistema intestinal, generando un aumento en la producción de butirato que podría contribuir a la proliferación y mantenimiento de una mucosa intestinal sana. Las ratas alimentadas con sorbitol mostraron también una tendencia a la disminución de los lípidos en sangre y una tendencia al aumento de la inmunoglobulina A secretora en heces. Estos resultados indican que el sorbitol tiene un efecto prebiótico potencial que deberá ser confirmado con el diseño nuevos experimentos en humanos.

Los resultados del análisis filogenético de los genes que codifican para el 16S rRNA y el gen *recA*, así como la hibridación DNA-DNA indican que *Lactobacillus* sp. AD102 es una posible nueva especie perteneciente al grupo de *L. acidophilus* y ha sido propuesta como *Lactobacillus iatae* sp. nov. En general, las especies del grupo de *L. acidophilus* son consideradas como potenciales probióticos y para muchas cepas de especies pertenecientes a este grupo se han demostrado sus efectos beneficiosos para la salud (Chen *et al.*, 2005; Sanders and Klaenhammer, 2001; Sashihara *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que las cepas *L. intestinalis* AD38, *L. johnsonii* AD99 y *L. murinus* AD100 aisladas de intestino de rata poseen actividad HSB con afinidad por las sales biliares del ácido taurocólico y del ácido glicocólico, mientras que *L. iatae* AD102 y *L. reuteri* AD23 tienen HSB para solo una de estas sales biliares. La

presencia en un medio de cultivo de una sal biliar conjugada o desconjugada afecta de forma diferente el crecimiento de cada una de las cepas analizadas. *L. iatae* AD102 y *L. reuteri* AD23 alcanzan densidades ópticas mayores en una curva de crecimiento en presencia de la sal biliar que no desconjugan. Se deben plantear nuevos experimentos para evaluar si las diferencias en la actividad HSB observadas en las cinco cepas de *Lactobacillus*, han contribuido al aumento de la población de *L. reuteri* AD23 y *L. iatae* AD102 en el intestino de las ratas cuando son alimentadas con sorbitol.

2. Conclusiones generales

1. En un modelo animal como la rata el consumo oral de sorbitol modifica la microbiota intestinal y para algunos grupos bacterianos lo hace de forma similar a un reconocido prebiótico como los fructooligosacáridos (FOS).
2. Se han aislado cinco especies de *Lactobacillus* del intestino de las ratas: *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus* sp. El consumo de sorbitol favorece de forma estadísticamente significativa la persistencia de las poblaciones de *Lactobacillus* sp. AD102 y el aumento del número de células de *L. reuteri* AD23.
3. La ingesta de sorbitol o FOS favorece posiblemente la presencia de la especie *Bifidobacterium pseudolongum* en el tracto gastrointestinal de las ratas, según se determinó por PCR-DGGE.
4. Se ha determinado un aumento estadísticamente significativo de la concentración de butirato en el ciego y colon de las ratas que han ingerido sorbitol, lo cual constituye una sólida base para considerar el sorbitol como un potencial prebiótico.

5. El estudio taxonómico de varios aislados de *Lactobacillus* de intestino de rata, nos permite proponer una nueva designación de especie, *Lactobacillus iatae* sp. nov. perteneciente al grupo de *Lactobacillus acidophilus*.

BIBLIOGRAFÍA

Affymetrix. (2007). Manufacturing quality control and validation studies of genechip@arrays.http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/manufacturing_quality_technote.pdf.

Abrams,S.A., Griffin,I.J., Hawthorne,K.M., Liang,L., Gunn,S.K., Darlington,G., and Ellis,K.J. (2005) A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr* **82**: 471-476.

Acedo-Felix,E., and Perez-Martinez,G. (2003) Significant differences between *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int J Syst Bacteriol* **53**: 67-75.

Affara,N.A. (2003) Resource and hardware options for microarray-based experimentation. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**: 7-20.

Aiyar,A. (2000) The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Methods Mol Biol* **132**: 221-241.

Ando,M., Kaneko,T., Watanabe,R., Kikuchi,S., Goto,T., Iida,T. *et al.* (2006) High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **40**: 1179-1186.

Arslanoglu,S., Moro,G.E., and Boehm,G. (2007) Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr* **137**: 2420-2424.

Balcazar-Muñoz,B.R., Martinez-Abundis,E., and Gonzalez-Ortiz,M. (2003) Effect of oral inulin administration on lipid profile and insulin sensitivity in subjects with obesity and dyslipidemia. *Rev Med Chil* **131**: 597-604.

Ball,R.D. (2001) Bayesian methods for quantitative trait loci mapping based on model selection: Approximate analysis using the Bayesian information criterion. *Genetics* **159**: 1351-1364.

Barcenilla,A., Pryde,S.E., Martin,J.C., Duncan,S.H., Stewart,C.S., Henderson,C., and Flint,H.J. (2000) Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1654-1661.

Barrangou,R., Zcarate-Peril,M.A., Duong,T., Connors,S.B., Kelly,R.M., and Klaenhammer,T.R. (2006) Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *PNAS* **103**: 3816-3821.

Barrett,M.T., Scheffer,A., Ben-Dor,A., Sampas,N., Lipson,D., Kincaid,R. *et al.* (2004) Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *PNAS* **101**: 17765-17770.

Begley,M., Hill,C., and Gahan,C.G.M. (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1729-1738.

Begley,M., Sleator,R.D., Gahan,C.G.M., and Hill,C. (2005) Contribution of three bile-associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **73**: 894-904.

Berger,B., Pridmore,R.D., Barretto,C., Delmas-Julien,F., Schreiber,K., Arigoni,F., and Brussow,H. (2007) Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **189**: 1311-1321.

Bibiloni,R., Simon,M.A., Albright,C., Sartor,B., and Tannock,G.W. (2005) Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Lett Appl Microbiol* **41**: 45-51.

Blackwood,K.S., He,C., Gunton,J., Turenne,C.Y., Wolfe,J., and Kabani,A.M. (2000) Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* **38**: 2846-2852.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, and Speed TP. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**: 185–193.

Bourriaud,C., Robins,R.J., Martin,L., Kozlowski,F., Tenailleau,E., Cherbut,C., and Michel,C. (2005) Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* **99**: 201-212.

Bowtell,D.D. (1999) Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet* **21**: 25-32.

Brady,L.J., Gallaher,D.D., and Busta,F.F. (2000) The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr* **130**: 410.

Brenner,D.J., Fanning,G.R., Rake,A.V., and Johnson,K.E. (1969) Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal Biochem* **28**: 447-459.

Calder,P.C., and Kew,S. (2002) The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S165-S177.

Campbell,J.M., Fahey,J., and Wolf,B.W. (1997) Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* **127**: 130-136.

Canchaya,C., Claesson,M.J., Fitzgerald,G.F., van Sinderen,D., and O'Toole,P.W. (2006) Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* **152**: 3185-3196.

Carlsson,J., and Gothefors,L. (1975) Transmission of *Lactobacillus jensenii* and *Lactobacillus acidophilus* from mother to child at time of delivery. *J Clin Microbiol* **1**: 124-128.

Castresana,J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552.

Chen,C.C., Louie,S., Shi,H.N., and Walker,W.A. (2005) Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res* **58**: 1185-1191.

Cherbut,C., Michel,C., and Lecannu,G. (2003) The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J Nutr* **133**: 21-27.

Cohan,F.M. (2002) What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* **56**: 457-487.

Cole,J.R., Chai,B., Farris,R.J., Wang,Q., Kulam,S.A., McGarrell,D.M. *et al.* (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res* **33**: D294-D296.

Cole,J.R., Chai,B., Marsh,T.L., Farris,R.J., Wang,Q., Kulam,S.A. *et al.* (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl Acids Res* **31**: 442-443.

Costas,M. (1990) Numerical analysis of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns for the classification, identification and typing of medically important bacteria. *Electrophoresis* **11**: 382-391.

Crosa,J.H., Brenner,D.J., and Falkow,S. (1973) Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J Bacteriol* **115**: 904-911.

Cummings,J.H., Macfarlane,G.T., and Englyst,H.N. (2001) Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* **73**: 415S-4420.

Dambekodi,P.C., and Gilliland,S.E. (1998) Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci* **81**: 1818-1824.

De Ley,J., Cattoir,H., and Reynaerts,A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**: 133-142.

De Smet,I., Van Hoorde,L., Vande Woestyne,M., Christiaens,H., and Verstraete,W. (1995) Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **79**: 292-301.

De Vaux,A., Morrison,M., and Hutkins,R.W. (2002) Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from rumen medium containing prebiotic sugars. *Appl Environ Microbiol* **68**: 519-524.

Dellaglio,F., Torriani,S., and Felis,G.E. (2004) Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa *et al.* 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *Int J Syst Bacteriol* **54**: 809-812.

Delzenne,N.M., and Kok,N. (2001) Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* **73**: 456S-458.

Demigne,C., Morand,C., Levrat,M.A., Besson,C., Moundras,C., and Remesy,C. (1995) Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr* **74**: 209-219.

Deng,Z.Y., Zhang,J.W., Li,J., Fan,Y.W., Cao,S.W., Huang,R.L. *et al.* (2007) Effect of polysaccharides of cassiae seeds on the intestinal microflora of piglets. *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 1**: 143-147.

Denou,E., Berger,B., Barretto,C., Panoff,J.M., Arigoni,F., and Brussow,H. (2007) Gene expression of commensal *Lactobacillus johnsonii* Strain NCC533 during *in vitro* growth and in the murine gut. *J Bacteriol* **189**: 8109-8119.

Diancourt,L., Passet,V., Chervaux,C., Garault,P., Smokvina,T., and Brisse,S. (2007) Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* (*L. paracasei*) reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination. *Appl Environ Microbiol*: AEM.

Dickson,E.M., Riggio,M.P., and Macpherson,L. (2005) A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *J Med Microbiol* **54**: 299-303.

Drummond,A., and Rodrigo,A.G. (2000) Reconstructing genealogies of serial samples under the assumption of a molecular clock using serial-sample UPGMA. *Mol Biol Evol* **17**: 1807-1815.

Du Plessis,E.M., and Dicks,L.M. (1995) Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr Microbiol* **31**: 114-118.

Dunne,C., O'Mahony,L., Murphy,L., Thornton,G., Morrissey,D., O'Halloran,S. *et al.* (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* **73**: 386S-392.

Edwards-Ingram,L., Gitsham,P., Burton,N., Warhurst,G., Clarke,I., Hoyle,D. *et al.* (2007) Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*,

the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2458-2467.

Ellwood,K.C. (1995) Methods available to estimate the energy values of sugar alcohols. *Am J Clin Nutr* **62**: 1169S-1174.

Euzéby.J.P. (2007). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47, 590-592. (List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update November 02, 2007. URL: <http://www.bacterio.net>).

Ezaki,T., Hashimoto,Y., Takeuchi,N., Yamamoto,H., Liu,S.L., Miura,H. *et al.* (1988) Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J Clin Microbiol* **26**: 1708-1713.

Faraji,H., and Lindsay,R.C. (2004) Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. *J Agric Food Chem* **52**: 7164-7171.

Felis,G.E., Dellaglio,F., Mizzi,L., and Torriani,S. (2001) Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int J Syst Bacteriol* **51**: 2113-2117.

Felten,A., Barreau,C., Bizet,C., Lagrange,P.H., and Philippon,A. (1999) *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol* **37**: 729-733.

Fernandes,J., Rao,A.V., and Wolever,T.M.S. (2000) Different substrates and methane producing status affect short-chain fatty acid profiles produced by *In vitro* fermentation of human feces. *J Nutr* **130**: 1932-1936.

Fernandez,M.F., Boris,S., and Barbes,C. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **94**: 449-455.

Fodor,S.P., Rava,R.P., Huang,X.C., Pease,A.C., Holmes,C.P., and Adams,C.L. (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* **364**: 555-556.

Fukushima,Y., Miyaguchi,S., Yamano,T., Kaburagi,T., Iino,H., Ushida,K., and Sato,K. (2007) Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *Br J Nutr* **98**: 969-977.

Gancheva,A., Pot,B., Vanhonacker,K., Hoste,B., and Kersters,K. (1999) A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst Appl Microbiol* **22**: 573-585.

Garcia-Albiach,R., Jose,M., de Felipe,P., Angulo,S., Morosini,M.I., Bravo,D. *et al.* (2008) Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* **87**: 91-96.

Gavini,F., Delcenserie,V., Kopeinig,K., Pollinger,S., Beerens,H., Bonaparte,C., and Upmann,M. (2006) *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *J Food Prot* **69**: 871-877.

Gill,H.S., and Guarner,F. (2004) Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* **80**: 516-526.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Robertfroid, M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, *Nutrition Res. Rev.* 17, 259-275.

Gomez Zavaglia,A., Kociubinski,G., Perez,P., and De Antoni,G. (1998) Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J Food Prot* **61**: 865-873.

Grimont,P.A. (1988) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol* **34**: 541-546.

Guan,L.L., Hagen,K.E., Tannock,G.W., Korver,D.R., Fasenko,G.M., and Allison,G.E. (2003) Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6750-6757.

Guarner,F., and Malagelada,J.R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**: 512-519.

Guarner,F. (2007) Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation. *J Nutr* **137**: 2568S-2571.

Guerrant,G.O., Lambert,M.A., and Moss,C.W. (1982) Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* **16**: 355-360.

Guindon,S., and Gascuel,O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.

Guindon,S., Lethiec,F., Duroux,P., and Gascuel,O. (2005) PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucl Acids Res* **33**: W557-W559.

Hammes W.P. and Vogel.(1995).The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria. B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (eds). Blackie Academic & Professional. Glasgow, NZ. Pp19-54.

Hamilton-Miller,J.M. (2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 360-366.

Hanninen,M.L., Happonen,I., Saari,S., and Jalava,K. (1996) Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp [published erratum appears in *Int J Syst Bacteriol* 1996 Jul;46(3):839]. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 160-166.

Hasegawa,M., Iida,Y., Yano,T., Takaiwa,F., and Iwabuchi,M. (1985) Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol* **22**: 32-38.

Heilig,H.G.H.J., Zoetendal,E.G., Vaughan,E.E., Marteau,P., Akkermans,A.D.L., and 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. *Appl Environ Microbiol* **68**: 114-123.

Hosono,A., Ozawa,A., Kato,R., Ohnishi,Y., Nakanishi,Y., Kimura,T., and Nakamura,R. (2003) Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 758-764.

Hughes,R., and Rowland,I.R. (2001) Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* **22**: 43-47.

Hujoel,P.P., Makinen,K.K., Bennett,C.A., Isotupa,K.P., Isokangas,P.J., Allen,P., and Makinen,P.L. (1999) The optimum time to initiate habitual xylitol gum-chewing for obtaining long-term caries prevention. *J Dent Res* **78**: 797-803.

Inoue,R., Nishio,A., Fukushima,Y., and Ushida,K. (2007) Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. *Br J Dermatol* **156**: 499-509.

Inoue,R., Otsuka,M., Nishio,A., and Ushida,K. (2007) Primary administration of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 in weaning period suppresses the elevation of proinflammatory cytokines and CD86 gene expressions in skin lesions in NC/Nga mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 67-76.

Inoue,R., Otsuka,M., and Ushida,K. (2005) Development of intestinal microbiota in mice and its possible interaction with the evolution of luminal IgA in the intestine. *Exp Anim* **54**: 437-445.

Islam,M.S., Sakaguchi,E., Kashima,N., and Hoshi,S. (2004) Effect of sugar alcohols on gut function and body composition in normal and cecectomized rats. *Exp Anim* **53**: 361-371.

Isolauri,E., Sutas,Y., Kankaanpaa,P., Arvilommi,H., and Salminen,S. (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* **73**: 444S-4450.

Ivancic-Bace,I., Vlastic,I., Salaj-Smic,E., and Brcic-Kostic,K. (2006) Genetic evidence for the requirement of *recA* loading activity in SOS induction after UV irradiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5024-5032.

Janse,I., Kardinaal,W.E., Meima,M., Fastner,J., Visser,P.M., and Zwart,G. (2004) Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3979-3987.

Johnson, J. L., C. F. Phelps, C. S. Cummins, J. London, and F. Gasser.(1980). Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:53–68.

Johnson, J. L. (1985). DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. *Methods Microbiol* 18,33±74.

Kameue,C., Tsukahara,T., Yamada,K., Koyama,H., Iwasaki,Y., Nakayama,K., and Ushida,K. (2004) Dietary sodium gluconate protects rats from large bowel cancer by stimulating butyrate production. *J Nutr* **134**: 940-944.

Kanazawa,H., Nagino,M., Kamiya,S., Komatsu,S., Mayumi,T., Takagi,K. *et al.* (2005) Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* **390**: 104-113.

Kerstens,K., and De Ley,J. (1975) Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J Gen Microbiol* **87**: 333-342.

Kerstens,K., and De Ley,J. (1980) Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **8**: 273-297.

Kiriyama, H.; Hariu, Y.; Sakata, T. (1992). Comparison of in vitro products of short-chain fatty acids and gases from aldoses and the corresponding alcohol by pig cecal bacteria. *J.Nutr.Biochem*; 3:447-451.

- Kien,C.L., Blauwiekel,R., Bunn,J.Y., Jetton,T.L., Frankel,W.L., and Holst,J.J. (2007) Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. *J Nutr* **137**: 916-922.
- Klein,G., Pack,A., Bonaparte,C., and Reuter,G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **41**: 103-125.
- Knuutila,M., Svanberg,M., and Hamalainen,M. (1989) Alterations in rat bone composition related to polyol supplementation of the diet. *Bone Miner* **6**: 25-31.
- Kolida,S., and Gibson,G.R. (2007) Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J Nutr* **137**: 2503S-2506.
- Konstantinidis,K.T., Ramette,A., and Tiedje,J.M. (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1929-1940.
- Kos,B., Suskovic,J., Vukovic,S., Simpraga,M., Frece,J., and Matosic,S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**: 981-987.
- Kudoh,K., Shimizu,J., Ishiyama,A., Wada,M., Takita,T., Kanke,Y., and Innami,S. (1999) Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **45**: 173-181.
- Kullen,M.J., Sanozky-Dawes,R.B., Crowell,D.C., and Klaenhammer,T.R. (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* **89**: 511-516.
- Kulp,W.L., and Rettger,L.F. (1924) Comparative study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Bacteriol* **9**: 357-395.
- Kwok,L., Stapleton,A.E., Stamm,W.E., Hillier,S.L., Wobbe,C.L., and Gupta,K. (2006) Adherence of *Lactobacillus crispatus* to vaginal epithelial cells from women with or without a history of recurrent urinary tract infection. *J Urol* **176**: 2050-2054.
- Lauer, E., and O. Kandler. (1980). *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. I Abt. Orig. Reihe C 1:75–78.
- Le Blay,G., Michel,C., Blottiere,H.M., and Cherbut,C. (1999) Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J Nutr* **129**: 2231-2235.

Le Leu,R.K., Hu,Y., and Young,G.P. (2002) Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis* **23**: 713-719.

Lesbros-Pantoflickova,D., Corthesy-Theulaz,I., and Blum,A.L. (2007) *Helicobacter pylori* and Probiotics. *J Nutr* **137**: 812S-8818.

Lida,K., and Nishimura,I. (2002) Gene expression profiling by DNA microarray technology. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**: 35-50.

Lindsay,J.O., Whelan,K., Stagg,A.J., Gobin,P., Al-Hassi,H.O., Rayment,N. *et al.* (2006) Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut* **55**: 348-355.

Liong,M.T., and Shah,N.P. (2005) Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1745-1753.

Little,J.W., Mount,D.W., and Yanisch-Perron,C.R. (1981) Purified *lexA* Protein is a Repressor of the *recA* and *lexA* Genes. *PNAS* **78**: 4199-4203.

Liu,J.R., Lai,S.F., and Yu,B. (2007) Evaluation of an intestinal *Lactobacillus reuteri* strain expressing rumen fungal xylanase as a probiotic for broiler chickens fed on a wheat-based diet. *Br Poult Sci* **48**: 507-514.

Livesey,G. (2001) Tolerance of low-digestible carbohydrates: a general view. *Br J Nutr* **85 Suppl 1**: S7-16.

Lopez,H.W., Levrat-Verny,M.A., Coudray,C., Besson,C., Krespine,V., Messenger,A. *et al.* (2001) Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *J Nutr* **131**: 1283-1289.

Lundeen,S.G., and Savage,D.C. (1992) Multiple forms of bile salt hydrolase from *Lactobacillus sp.* strain 100-100. *J Bacteriol* **174**: 7217-7220.

Lupton,J.R. (2004) Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* **134**: 479-482.

Macfarlane,S., MacFarlane,G.T., and Cummings,J.H. (2006) Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* **24**: 701-714.

Macgregor,P.F., and Squire,J.A. (2002) Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* **48**: 1170-1177.

Manderson,K., Pinart,M., Tuohy,K.M., Grace,W.E., Hotchkiss,A.T., Widmer,W. *et al.* (2005) *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived

from an orange juice manufacturing by-product stream. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8383-8389.

Mara,D.D., and Oragui,J.I. (1983) Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J Appl Bacteriol* **55**: 349-357.

Medina,V., Afonso,J.J., varez-Arguelles,H., Hernandez,C., and Gonzalez,F. (1998) Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **22**: 14-17.

Messing,J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* **101**: 20-78.

Mizubuchi,H., Yajima,T., Aoi,N., Tomita,T., and Yoshikai,Y. (2005) Isomalto-oligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice. *J Nutr* **135**: 2857-2861.

Molenaar,D., Bringel,F., Schuren,F.H., de Vos,W.M., Siezen,R.J., and Kleerebezem,M. (2005) Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J Bacteriol* **187**: 6119-6127.

Montesi,A., Garcia-Albiach,R., Pozuelo,M.J., Pintado,C., Goni,I., and Rotger,R. (2005) Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *Int J Food Microbiol* **98**: 281-289.

Morrison,D.J., Mackay,W.G., Edwards,C.A., Preston,T., Dodson,B., and Weaver,L.T. (2006) Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* **96**: 570-577.

Moser,S.A., and Savage,D.C. (2001) Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3476-3480.

Mukai,T., Asasaka,T., Sato,E., Mori,K., Matsumoto,M., and Ohori,H. (2002) Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**: 105-110.

Naser,S.M., Thompson,F.L., Hoste,B., Gevers,D., Dawyndt,P., Vancanneyt,M., and Swings,J. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* **151**: 2141-2150.

O'Sullivan,G.C., Kelly,P., O'Halloran,S., Collins,C., Collins,J.K., Dunne,C., and Shanahan,F. (2005) Probiotics: an emerging therapy. *Curr Pharm Des* **11**: 3-10.

Oh,S., Kim,S.H., and Worobo,R.W. (2000) Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J Dairy Sci* **83**: 2747-2752.

Olive,D.M., and Bean,P. (1999) Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* **37**: 1661-1669.

Oren,A. (2004) Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 623-638.

Payne,G.W., Vandamme,P., Morgan,S.H., LiPuma,J.J., Coenye,T., Weightman,A.J. *et al.* (2005) Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3917-3927.

Pereira,D.I., and Gibson,G.R. (2002) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**: 259-281.

Pereira,D.I.A., McCartney,A.L., and Gibson,G.R. (2003) An *In vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4743-4752.

Perrin,P., Pierre,F., Patry,Y., Champ,M., Berreur,M., Pradal,G. *et al.* (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* **48**: 53-61.

Posno,M., Leer,R.J., VAN Lwijk,N., VAN Giezen,M.J.F., Heuvelmans,P.T.H.M., Lokman,B.C., and Pouwels,P.H. (1991) Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1822-1828.

Pot,B., Hertel,C., Ludwig,W., Descheemaeker,P., Kersters,K., and Schleifer,K.H. (1993) Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J Gen Microbiol* **139**: 513-517.

Pridmore,R.D., Berger,B., Desiere,F., Vilanova,D., Barretto,C., Pittet,A.C. *et al.* (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *PNAS* **101**: 2512-2517.

Rafter,J.J. (2002) Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S219-S224.

Rafter,J., Bennett,M., Caderni,G., Clune,Y., Hughes,R., Karlsson,P.C. *et al.* (2007) Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* **85**: 488-496.

- Rastall,R.A., Gibson,G.R., Gill,H.S., Guarner,F., Klaenhammer,T.R., Pot,B. *et al.* (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 145-152.
- Reid,G., Jass,J., Sebulsky,M.T., and McCormick,J.K. (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* **16**: 658-672.
- Requena,T., Burton,J., Matsuki,T., Munro,K., Simon,M.A., Tanaka,R. *et al.* (2002) Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2420-2427.
- Rhodes,M.W., and Kator,H. (1999) Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J Appl Microbiol* **87**: 528-535.
- Roberfroid,M.B. (2002) Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S133-S138.
- Roberfroid,M.B. (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* **71**: 1660S-1664.
- Roberfroid,M.B., Cumps,J., and Devogelaer,J.P. (2002) Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. *J Nutr* **132**: 3599-3602.
- Rodtong,S., and Tannock,G.W. (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3480-3484.
- Roller,M., Rechkemmer,G., and Watzl,B. (2004) Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J Nutr* **134**: 153-156.
- Ross,S.E., Erickson,R.L., Gerin,I., DeRose,P.M., Bajnok,L., Longo,K.A. *et al.* (2002) Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor {alpha} in Adipocyte Metabolism. *Mol Cell Biol* **22**: 5989-5999.
- Ross,S. (2000) Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *Am J Clin Nutr* **71**: 1735S-1738.
- Rossello-Mora,R., and Amann,R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67.

Roussel,Y., Colmin,C., Simonet,J.M., and Decaris,B. (1993) Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocoquot). *J Appl Bacteriol* **74**: 549-556.

Roy,D., Sirois,S., and Vincent,D. (2001) Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr Microbiol* **42**: 282-289.

Saito,M. (2007) Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi* **127**: 407-416.

Saitou,N., and Nei,M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Sakamoto,I., Igarashi,M., Kimura,K., Takagi,A., Miwa,T., and Koga,Y. (2001) Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother* **47**: 709-710.

Salminen,S., Bouley,C., Boutron-Ruault,M.C., Cummings,J.H., Franck,A., Gibson,G.R. *et al.* (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* **80 Suppl 1**: S147-S171.

Sanders,M.E., and Klaenhammer,T.R. (2001) Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* **84**: 319-331.

Sashihara,T., Sueki,N., and Ikegami,S. (2006) An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J Dairy Sci* **89**: 2846-2855.

Scanlan,P.D., Shanahan,F., O'Mahony,C., and Marchesi,J.R. (2006) Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **44**: 3980-3988.

Scheirlinck,I., Van der Meulen,R., Van Schoor,A., Huys,G., Vandamme,P., De Vuyst,L., and Vancanneyt,M. (2007) *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *Int J Syst Bacteriol* **57**: 1461-1467.

Schneeman,B.O. (2002) Gastrointestinal physiology and functions. *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S159-S163.

Scholz-Ahrens,K.E., Ade,P., Marten,B., Weber,P., Timm,W., il,Y. *et al.* (2007) Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr* **137**: 838S-8846.

Scholz-Ahrens,K.E., Schaafsma,G., van den Heuvel,E.G., and Schrezenmeir,J. (2001) Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* **73**: 459S-464.

- Schultz,M., Munro,K., Tannock,G.W., Melchner,I., Gottl,C., Schwietz,H. *et al.* (2004) Effects of feeding a probiotic preparation (SIM) containing inulin on the severity of colitis and on the composition of the intestinal microflora in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 581-587.
- Schrezenmeir,J., and de Vrese,M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* **73**: 361S-364.
- Sgouras,D.N., Panayotopoulou,E.G., Martinez-Gonzalez,B., Petraki,K., Michopoulos,S., and Mentis,A. (2005) *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 Mice. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**: 1378-1386.
- Silveira,M.M., and Jonas,R. (2002) The biotechnological production of sorbitol. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 400-408.
- Simpson,P.J., Stanton,C., Fitzgerald,G.F., and Ross,R.P. (2003) Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J Bacteriol* **185**: 2571-2581.
- Sneath,P.H., and Sokal,R.R. (1962) Numerical taxonomy. *Nature* **193**: 855-860.
- Snart,J., Bibiloni,R., Grayson,T., Lay,C., Zhang,H., Allison,G.E. *et al.* (2006) Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1925-1931.
- Stackebrandt,E., Frederiksen,W., Garrity,G.M., Grimont,P.A.D., Kampfer,P., Maiden,M.C.J. *et al.* (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **52**: 1043-1047.
- Suau,A., Bonnet,R., Sutren,M., Godon,J.J., Gibson,G.R., Collins,M.D., and Dore,J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4799-4807.
- Tanaka,H., Hashiba,H., Kok,J., and Mierau,I. (2000) bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2502-2512.
- Tannock,G.W., Dashkevycz,M.P., and Feighner,S.D. (1989) Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1848-1851.
- Tannock,G.W., Munro,K., Harmsen,H.J.M., Welling,G.W., Smart,J., and Gopal,P.K. (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2578-2588.

Tannock,G.W., Munro,K., Bibiloni,R., Simon,M.A., Hargreaves,P., Gopal,P. *et al.* (2004) Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2129-2136.

Taranto,M.P., Medici,M., Perdigon,G., Ruiz Holgado,A.P., and Valdez,G.F. (1998) Evidence for hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci* **81**: 2336-2340.

Taranto,M.P., Medici,M., Perdigon,G., Ruiz Holgado,A.P., and Valdez,G.F. (2000) Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J Dairy Sci* **83**: 401-403.

Taranto,M.P., Perez-Martínez,G., and Font de Valdez,G. (2006) Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology* **157**: 720-725.

Thompson,C.C., Thompson,F.L., Vandemeulebroecke,K., Hoste,B., Dawyndt,P., and Swings,J. (2004) Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **54**: 919-924.

Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**: 4673-4680.

Torriani,S., Felis,G.E., and Dellaglio,F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3450-3454.

Truper,H.G. (1996) Help! Latin! how to avoid the most common mistakes while giving latin names to newly discovered prokaryotes. *Microbiologia* **12**: 473-475.

Truper,H.G. (2007) Neo-latinists worldwide willing to help microbiologists. *Int J Syst Bacteriol* **57**: 1164-1166.

Tubelius,P., Stan,V., and Zachrisson,A. (2005) Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Environ Health* **4**: 25.

Tuffley,C., and Steel,M. (1997) Links between maximum likelihood and maximum parsimony under a simple model of site substitution. *Bull Math Biol* **59**: 581-607.

Uhari,M., Kontiokari,T., Koskela,M., and Niemela,M. (1996) Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. *BMJ* **313**: 1180-1183.

- Uhari,M., Kontiokari,T., and Niemela,M. (1998) A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics* **102**: 879-884.
- Usenko,D.V., Gorelov,A.V., and Bitieva,R.L. (2007) Use of new synbiotics in treatment of the intestinal infections among children. *Vopr Pitan* **76**: 70-75.
- van Belkum,A., Struelens,M., de Visser,A., Verbrugh,H., and Tibayrenc,M. (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* **14**: 547-560.
- Van den Driessche,M., and Veereman-Wauters,G. (2002) Functional foods in pediatrics. *Acta Gastroenterol Belg* **65**: 45-51.
- Van Eldere,J., Robben,J., De Pauw,G., Merckx,R., and Eyssen,H. (1988) Isolation and identification of intestinal steroid-desulfating bacteria from rats and humans. *Appl Environ Microbiol* **54**: 2112-2117.
- Vandamme,P., Pot,B., Gillis,M., de Vos,P., Kersters,K., and Swings,J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Mol Biol Rev* **60**: 407-438.
- Vanderhoof,J.A. (2001) Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr* **73**: 1152S-1155.
- Vanhoutte,T., De Preter,V., De Brandt,E., Verbeke,K., Swings,J., and Huys,G. (2006) Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5990-5997.
- Veereman,G. (2007) Pediatric applications of inulin and oligofructose. *J Nutr* **137**: 2585S-2589.
- Ventura,M., Casas,I.A., Morelli,L., and Callegari,M.L. (2000) Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Syst Appl Microbiol* **23**: 504-509.
- Ventura,M., and Zink,R. (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* **217**: 141-154.
- Verducci,J.S., Melfi,V.F., Lin,S., Wang,Z., Roy,S., and Sen,C.K. (2006) Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiol Genomics* **25**: 355-363.
- Verschuren,P.M. (2002) Functional foods: scientific and global perspectives. *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S125-S130.

Veyrat,A., Miralles,M.C., and Perez-Martinez,G. (1999) A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J Appl Microbiol* **87**: 49-61.

Vignaud,A., Cebrian,J., Martelly,I., Caruelle,J.P., and Ferry,A. (2005) Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle. *Exp Physiol* **90**: 487-495.

Walter,J., Tannock,G.W., Tilsala-Timisjarvi,A., Rodtong,S., Loach,D.M., Munro,K., and Alatosava,T. (2000) Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* **66**: 297-303.

Walter,J., Hertel,C., Tannock,G.W., Lis,C.M., Munro,K., and Hammes,W.P. (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR Primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2578-2585.

Weaver,C.M., and Liebman,M. (2002) Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S225-S232.

Woese,C.R., Kandler,O., and Wheelis,M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *PNAS* **87**: 4576-4579.

Wolfgang Ludwig and Hans-Peter Klenk. (2005). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic. Framework for procaryotic systematics. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second Edition. 49-66<http://www.springerlink.com/content/j6n2348301733618>.

Wong,J.M., de Souza,R., Kendall,C.W., Emam,A., and Jenkins,D.J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**: 235-243.

Wong,J.M.W., and Jenkins,D.J.A. (2007) Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J Nutr* **137**: 2539S-2546.

Wood, B.J.B. and Holzappel, W.H., (1995). The genera of lactic acid bacteria **vol. 2**, blackie academic & professional, Glasgow.

Yebra,M.J., and Perez-Martinez,G. (2002) Cross-talk between the L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* **148**: 2351-2359.

Zhao,J.R., and Yang,H. (2005) [Progress in the effect of probiotics on cholesterol and its mechanism]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **45**: 315-319.

Ziemke,F., Hofle,M.G., Lalucat,J., and Rossello-Mora,R. (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 179-186.

Zumbe,A., Lee,A., and Storey,D. (2001) Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. *Br J Nutr* **85 Suppl 1**: S31-S45.

ANEXO

ANEXO 1. Comparación del genoma de la cepa *L. johnsonii* NCC533 (BL298) con otros *Lactobacillus* mediante “*microarrays*”.

El genoma de *Lactobacillus* sp. AD102, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* AD99 fue comparado con el genoma de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) utilizando la técnica de “*microarrays*”. Se realizaron tres hibridaciones: *L. johnsonii* AD99/ *L. johnsonii* NCC533 (BL298), *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277)/ *L. johnsonii* NCC533 (BL298) y *Lactobacillus* sp. AD102/ *L. johnsonii* NCC533 (BL298) en el Centro de Investigación de Nestlé en Suiza. En los “*microarrays*” utilizados está representado el 96% (1756 pautas de lectura abierta) de los genes de *L. johnsonii* NCC533 (BL298), en 5 ó 6 oligonucleótidos de 60 pares de bases por cada gen. Los resultados obtenidos, cuando son proyectados en un mapa de Hibridación Genómica Comparada (CGH) (Figura 26), muestran que en la hibridación entre *L. johnsonii* AD99 y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) la mayoría de los genes están muy conservados, como por ejemplo las regiones comprendidas entre los elementos LJ0014 a LJ0215, LJ0752 a LJ1007 y LJ0673 a LJ1833 (Zonas oscuras, marcadas como A en la figura 26). Existen también unas pocas regiones de mayor diversidad génica representadas por zonas amarillas en el mapa de CHG, como la comprendida entre los elementos LJ1210 y LJ1267 (B en la figura 26), dentro de esta zona se encuentran los elementos LJ1229 a LJ1244 y LJ1257 a LJ1268 que corresponden a secuencias de proteínas hipotéticas y genes relacionados con el metabolismo de las transcetolasas, respectivamente. En la región entre los elementos LJ1408 y LJ1463 se observa también marcada diversidad génica (C en la figura 26), algunos de los genes ubicados dentro de esta zona corresponden al profago Lj 928. En general la mayoría de los genes entre estas dos cepas de la misma especie están muy bien conservados.

Los resultados de la hibridación en “*microarrays*” de *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) con *L. johnsonii* NCC533 (BL298) muestran una homología muy baja entre las dos cepas, representada en un mapa de Hibridación Genómica Comparada con la mayoría de las zonas amarillas, que indican una hibridación débil. La región comprendida entre los elementos LJ0325 y LJ0380 (D en la figura

26) fue la zona de mayor hibridación entre estas dos cepas, en esta zona entre los elementos LJ0358 y LJ0362 se encuentran secuencias de genes correspondientes a algunas proteínas ribosomales. Respecto a la hibridación de *Lactobacillus* sp. AD102 con *L. johnsonii* NCC533 (BL298) se observa claramente que esta cepa tiene una situación intermedia respecto a las otras dos. El mapa muestra una gran cantidad de genes divergentes distribuidos por todo el genoma, y algunas zonas de hibridación más alta, como por ejemplo la comprendida entre los elementos LJ0325 a LJ0408b (D y E en la figura 26), en esta zona además de secuencias de genes de algunas proteínas ribosomales conservadas también en *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277), se encuentran los elementos LJ0384 a LJ0389 de genes que codifican para proteínas de secreción. Dentro de las zonas con genes divergentes de la hibridación entre *Lactobacillus* sp. AD102 y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) vale la pena destacar las comprendidas entre los elementos LJ1418 a LJ1465 y LJ0288 a LJ0330 que contienen genes de los profagos Lj 928 y Lj 965 respectivamente y la sección LJ0230 a LJ0232 donde se encuentran genes de resistencia al arsénico. Estos resultados sugieren que estas secuencias en *L. johnsonii* NCC533 (BL298) podrían haber sido adquiridas posteriormente a la separación del ancestro común entre estas dos cepas mediante la inserción de fagos en el genoma y la adaptación a diferentes nichos ecológicos.

Las gráficas de la figura 27 muestran la distribución de los datos obtenidos para cada prueba en el “*microarray*”, expresados como \log_2 de la media de las relaciones de las señales de fluorescencia obtenidas entre la cepa problema y *L. johnsonii* NCC533 (BL298). Los valores están normalizados de tal manera que un cociente de 1 expresa la conservación perfecta de un gen. Se puede observar que en dos cepas de la misma especie como *L. johnsonii* AD99 y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) la distribución de la relación de la señal muestra un pico mayoritario en la misma posición y con valores positivos, lo que sugiere secuencias de DNA muy similares. Mientras que en la hibridación entre *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) las proporciones de las señales se ubican por debajo de -1, lo cual indica una homología muy baja de las secuencias. En el caso

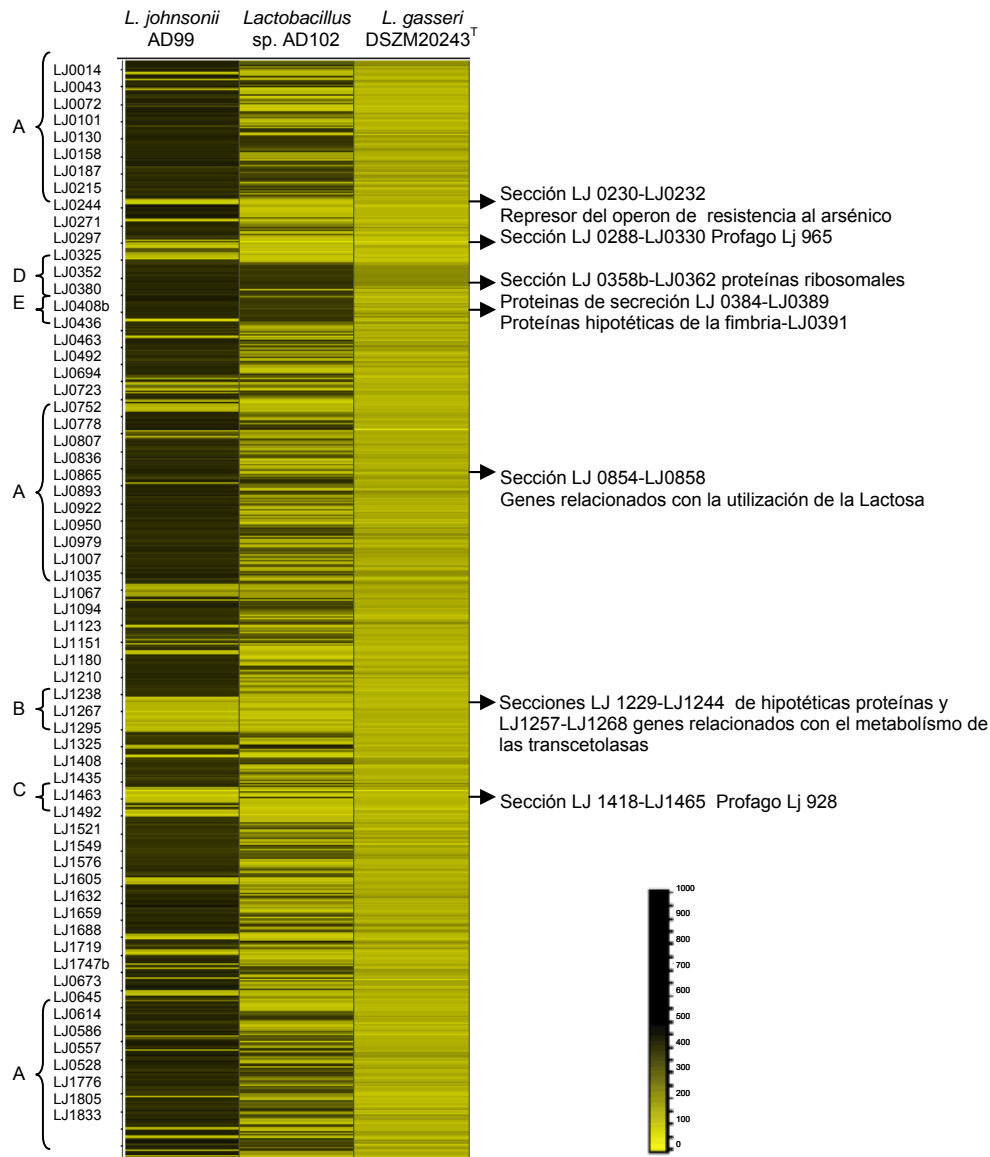


Figura 26. Mapa de HGC de *Lactobacillus* sp. AD102, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* AD99 frente a *L. johnsonii* NCC533 (BL298). Cada gen de *L. johnsonii* NCC533 (BL298) ordenado verticalmente de acuerdo a su posición en el genoma, está representado por 5 ó 6 oligonucleótidos en el “microarray” (líneas horizontales). El código de color representa la hibridación de secuencias complementarias (negro) en un gradiente hasta amarillo que representa la divergencia o ausencia de secuencias complementarias en la muestra. A,B,C,D y E señalan zonas de las cuales se hacen comentarios en el texto.

de la hibridación entre *Lactobacillus* sp.AD102 y *L. johnsonii* NCC533 (BL298) se observan dos picos de distribución intermedia que indican que *Lactobacillus* sp. AD102 es una especie diferente de *L. johnsonii* pero menos lejana a este que *L. gasseri*.

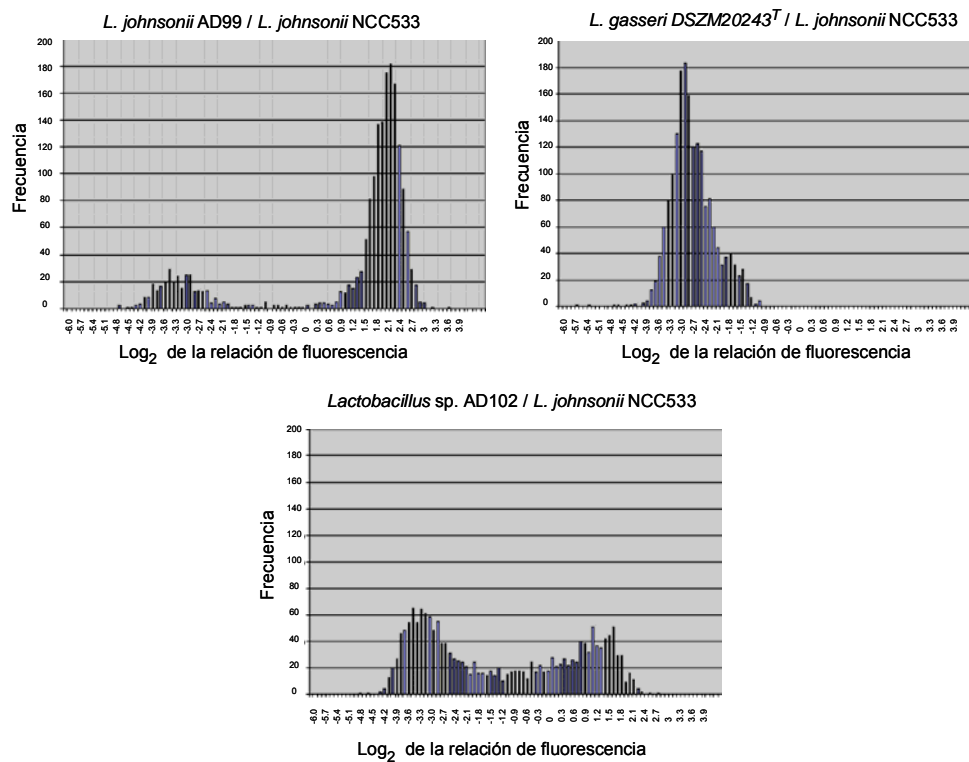


Figura 27. Resultados de la hibridación con “*microarrays*” de las cepas *Lactobacillus* sp. AD102, *L. gasseri* DSMZ20243^T (BL277) y *L. johnsonii* AD99 frente a *L. johnsonii* NCC533 (BL298). Las gráficas muestran la frecuencia de la relación de fluorescencia obtenida en todos los genes analizados expresados como log₂.

ANEXO 2. Secuencias realizadas durante este trabajo que aún no han sido publicadas total o parcialmente y están incluidas en los resultados finales.

Bifidobacterium pseudolongum 528 bp del gen que codifica para el 16S rRNA.

```
CCACCGTTAACACCGGGAATTCCAGTCTCCCTACCGCACTCAAGCCCGCCCGTACCCGGCGCGGATC
CACCGTTAAGCGATGGACTTTCCACCGGACGCGACGAACCGCTACGAGCCCTTTACGCCCAATAAAT
CCGGATAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTATTTCGAA
CAATCCACTCAACACGGCCAAAGACCGCGCCTTGCCCTTGAACAAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCC
TCCATCCCGCACGCGGCGTTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCGGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCA
ACGCCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACAAGCTGATAGGACGCGATCCCATCCCATGCCGCAAAAA
GCCTTTCCACACTCGCATGCGCTCATGTGGAACATCCGGCATTACCACCCA
```

Lactobacillus gasseri NCC2857 (BL296). 1515 pb del gen que codifica para el 16S rRNA.

```
TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTT
GGTGTCTGCACCAAATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTA
GAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTA
ACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGA
TGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT
CTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGTGACATCCAGTGCAAACC
TAAGAGATTAGGAGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCA
CTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCCTGCGAAGGCAAGCGGATC
TCTGAAAGCCGTTCTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCATCACACCATGAGA
GTCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGAT
TAGGGTGAAGTCGTAACAA
```

Lactobacillus gasseri BL233. 1452 bp del gen que codifica para el 16S rRNA.

```
GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATG
AATTTGGTGTCTGCACCAAATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCAT
GTCTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA
AGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGA
GACACGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGA
```

GCAACGCCCGTGAAGAAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGG
TAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
GCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGT
AGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGC
AAACCTAAGAGATTAGGAGTTCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAGTT
GGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATGCCCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCCAAGGCAAGC
GGATCTCTGAAAGCCGTTCTCAGTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCA
TGAGAGTCTGTAACACCCAAAGCC

Lactobacillus johnsonii AD99. 1487 pb del gen que codifica para el 16S rRNA.

TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAT
TTTAGTGCTTGCCTAAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGT
CTAGAGTTTGAAGATGGTCTGTCTACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAG
GTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGA
CACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGAAGAAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAAGATAGAGGTA
GTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTC
TGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAG
TCCATCGCCTGAGTGAAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAA
ACCTAAGAGATTAGGAGTTCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAGTTGG
GCACTTAATGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATGCCCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCCAAGGCAAGCGG
ATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATG
AGAGTCTGCAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGT

Lactobacillus johnsonii NCC1741 (BL297). 1508 pb. del gen que codifica para el 16S rRNA.

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTT
AGTGCTTGCCTAAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTA
GAGTTTGAAGATGGTCTGTCTACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTA
ACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACAC
GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC

GCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTA
ACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGA
TGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCT
CTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACC
TAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCAGCTCGTGTCCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCA
CTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATC
TCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGA
GTCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGAT
TAGGTTGAAGTC

Lactobacillus johnsonii CECT289 (BL281). 1440 pb. del gen que codifica para el
16S rRNA.

TCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTG
CTTGCACTAAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGGACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAACCTGCCCA
AGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAGT
TTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGG
CTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATGGGACTGAGACACGGCC
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTG
GCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTG
AAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG
TCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCAC
TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAG
AGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCT
AATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTT
AAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTCGC
GGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCATCACACCATGAGAGTCT
GTAACACCCAAA .

Lactobacillus johnsonii NCC 2767 (BL299). 1452 pb. del gen que codifica para el
16S rRNA.

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTA
GTGCTTGCACTAAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGGACGGGTGAGTAAACAGTGGGTAACCTG
CCAAGAGACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAG
AGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA

TGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAA
CTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGAT
GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCCGAGAATTCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTC
TGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
TGCCGTAAACGATGAGTGCATAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCAGTGCAAACCT
AAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC
TCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCT
CTTAAAGCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGTAGTAAT
CGCGGATCAGCACGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGTCACACCATGAGAG
TCTGTAACACCCAAAGCCGGTGGG

Lactobacillus sp. AD106. 1430 pb. del gen que codifica para el 16S rRNA.

CGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGCTTGCCTAA
ATGAAACTAGATACAAGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAAGAGACTGGG
ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTAGAGTTTAAAAGATG
GTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG
CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTT
GACGGTAATTACCTAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCG
GCTCAACCCGAGAATTCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGT
GTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTG
ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGTTAGTCCATGCCGTAACAGAT
GAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTG
TTCCCTTCGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTT
TCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCAC
GCCCGGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCCCGTCACACCATGAGAGTCTGTAACACCCA
AA

Lactobacillus intestinalis. AD38. 1516 pb. del gen que codifica para el 16S rRNA.

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCCGAACCAGTAGATTCACTT
CGGTGATGACGCTGGGAACCGGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTCT
GGGATACCACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAACAACAATAGCTGCATGGCTATTGCTTAAAG
GCGGCGTAAGCTGTGCTAAAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACC
AAGCGACGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGAG
TGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCCCT
ATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAAGATAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTTAACCGAGGAATTGCATCGGAAACTGTGTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCC
ATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTA
CGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCTAGTGCCATCCTAAGAGATTA
GGAGTTCCTTCCGGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGTCTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTAATGAG
ACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGGAGTACAACGAGAAGCGAGCCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCT
GTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGTACGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCA
GCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTCTGCAATG
CCCGAAGCCGGTGGCTTAACCACTTATGTGGAAGGAGCCGCTCTAAGGCAGGGCAGATGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGT

Lactobacillus acidophilus CECT4529 (BL 279). 1465 pb. del gen que codifica para el 16S rRNA.

GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAG
ATTCACCTTCGGTATGACGTTGGGAACCGGAGCGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCC
CATAGTCTGGGATACCCTTGGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCT
TATAAAAGCGGCGTAAGCTGTCTGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAC
GGCCTACCAAGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGC
CGCGTGAAGAAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAAC
TGGCCTTATTTGACGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGAAGAATAAGTCTGATG
TGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAACTGTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT
GGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAT
GCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCTAGTGAATCCGT
AGAGATACGGAGTTCCTTTCGGGGACACTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT
CTAATGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGTACAACGAGGAGCAAGCCTGCGAAGGCAAGCGAATCTC
TTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGTAGTAATC
GCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGT
CTGCAATGCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTCCGGAA

Lactobacillus reuteri AD23. 1481 pb. del gen que codifica para el 16S rRNA.

CTCAGGATGAACGCCGGGCTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTGATGG
TGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTG
CCCCGAGCGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACAAAGCCACATGGCTT
TTGTTTGAAGATGGCTTTAGCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGT

AACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGGAGACA
CGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAA
CACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGT
AACTGTTACGCGAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCAACTTGAGTGCAGAAGAGGAC
AGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
TCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CATGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTACGTGCCGGAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTAAATTGCAAGCTACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAAC
CTTAGAGATAAAGCGTTCCCTTCGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTGCCTGCTGAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGC
ACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAAT
CTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGG
AGTTTGTAAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAA

Lactobacillus sp. AD104. 660 pb. del gen *recA*

AAAGTAGACACCCAAATTTCCACTATTCCTTCTGGTTCAGTCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGATATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATACGGCCAGAAAGTTCTGGTAAAACACTGTGGCTC
TGCATGCTGTTGCAGAAGTACAAAAGCGTGGTGGAACTGCAGCGTATATTTGATGCTGAAAATGCCATG
GATCCAGCTTACGCGGAAGCTTTAGGCGTAGATATTTGATTCATTGATTTTATCTCAACCAAACTGG
AGAAGAAGGTTTACAAATTGCTGATACATTAATTGCAAGTGGTGCATTTGATATTTTAGTTGTGACT
CAGTAGCTGCCTTAGTGCCAAGAGCTGAAATTGATGGTATATGGGAGACTCTCATGTTGGGTTGCAA
GCAAGATTAATGAGTCAAGCTCTTCGTAAACTTTCTGAAAATATTTCTAAAACATAAACAATTGCTGT
TTTCATTAATCAAATTCGTGAAAAAGTTGGGGTTATGTTTGGAAATCCTGAGACAACCCGGGTGGTC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACCATCCGACTAGAAGTACGTGCTGCGGAACAAATTAAGACAAGGTTCA
AGATGTTATTGGTAACCGTGTAATAATTAAGGTTGTTAAGAACAAGTA

Lactobacillus sp. AD102. 660 pb del gen *recA*

AAAGTAGACACCCAAATTTCCACTATTCCTTCTGGTTCAGTCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGATATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATACGGCCAGAAAGTTCTGGTAAAACACTGTGGCTC
TGCATGCTGTTGCAGAAGTACAAAAGCGTGGTGGAACTGCAGCGTATATTTGATGCTGAAAATGCCATG
GATCCAGCTTACGCGGAAGCTTTAGGCGTAGATATTTGATTCATTGATTTTATCTCAACCAAACTGG
AGAAGAAGGTTTACAAATTGCTGATACATTAATTGCAAGTGGTGCATTTGATATTTTAGTTGTGACT
CAGTAGCTGCCTTAGTGCCAAGAGCTGAAATTGATGGTATATGGGAGACTCTCATGTTGGGTTGCAA
GCAAGATTAATGAGTCAAGCTCTTCGTAAACTTTCTGAAAATATTTCTAAAACATAAACAATTGCTGT
TTTCATTAATCAAATTCGTGAAAAAGTTGGGGTTATGTTTGGAAATCCTGAGACAACCCGGGTGGTC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACCATCCGACTAGAAGTACGTGCTGCGGAACAAATTAACAAGGTTCA
GATGTTATTGGTAACCGTGTAATAATTAAGGTTGTTAAGAACAAGTA

Lactobacillus sp. AD105. 660 pb. del gen *recA*

AAAGTAGACACCCAAATTTCCACTATTCCTTCTGGTTCAGTCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGATATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATACGGCCAGAAAGTTCTGGTAAAACACTGTGGCTC
TGCATGCTGTTGCAGAAGTACAAAAGCGTGGTGGAACTGCAGCGTATATTTGATGCTGAAAATGCCATG

GATCCAGCTTACGCGGAAGCTTTAGGCGTAGATATTGATTCATTGATTTTATCTCAACCAAACTGG
AGAAGAAGGTTTACAAATTGCTGATACATTAATTGCAAGTGGTGCAATTGATATTTTAGTTGTGCGACT
CAGTAGCTGCCTTAGTGCCAAGAGCTGAAATTGATGGTATATGGGAGACTCTCATGTTGGGTTGCAA
GCAAGATTAATGAGTCAAGCTCTTCGTAAACTTTCTGGAAATATTTCTAAAACTAAAACAATTGCTGT
TTTCATTAATCAAATTCGTGAAAAAGTTGGGGTTATGTTTGGAAATCCTGAGACAACCCGGGTGGTC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACCATCCGACTAGAAGTACGTTCGTGCGGAACAAATTAACAAGGTTCA
GATGTTATTGGTAACCGTGTAATAAATTAAGGTTGTTAAGAACAAAGTA

Lactobacillus johnsonii NCC1741. (BL297) 600 pb del gen *recA*

AAAGTAGACACTCAAATTTCCACTATTCCTTCCGGTTCCTAGCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGCTATCCTCGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCCTGGTAAAACAACCTGTGGCTC
TTCATGCTGTTGCAGAAGTTCAGAAGCGTGGAGGAACGGCAGCTTATATCGATGCGGAAAAATGCGACG
GATCCTGCTTATGCCGAAGCATTAGGTGTTGATATTGATTCCTTAATTTTATCTCAACCAAACTGG
TGAAGAAGGTCTGCAAAATTCAGATACGCTTATTGCGAGTGGTGCAATTGATATCTTAGTTGTGGATT
CCGTGGCTGCGTTAGTACCAAGAGCCGAAATTGACGGTGACATGGGAGATTCACATGTTGGTTTACAA
GCCAGATTAATGAGTCAAGGCTTTACGTAAACTCTCAGGAAATATCTCTAAAACTAAAACATTGCTGT
TTTCATTAACCAAAATTCGTGAAAAAGTTGGGGTTATGTTTGGAAATCCAGAACTACTCCTGGTGGAC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACGATTAGATTAGAAGTACGTAGAGCAGAACAATTAACAAGGATCA
GACGTAATTGGTAACCGAGTTAAATTAAGGTTGTAAAAAATAAAGTT

Lactobacillus johnsonii NCC2767 (BL299). 600 pb del gen *recA*

AAAGTAGATACTCAAATTTCCACTATTCCTTCCGGTTCCTAGCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGCTATCCTCGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCCTGGTAAAACAACCTGTGGCTC
TTCATGCTGTTGCAGAAGTTCAGAAGCGTGGAGGAACGGCAGCTTATATCGATGCGGAAAAATGCGATG
GATCCTGCTTATGCCGAAGCATTAGGTGTTGATATTGATTCCTTAATTTTATCTCAACCAAACTGG
TGAAGAAGGTTTGC AAAATTCAGATACGCTTATTGCGAGTGGTGCAATTGATATCTTGGTTGTGGATT
CCGTGGCTGCGTTAGTACCAAGAGCCGAAATTGACGGTGACATGGGAGATTCACATGTTGGTTTACAA
GCCAGATTAATGAGTCAAGGCTTTACGTAAACTCTCAGGAAATATCTCTAAAACTAAAACATTGCTGT
TTTCATTAACCAAAATTCGTGAAAAAGTTAGGGTTATGTTTGGAAATCCAGAACTACTCCTGGTGGAC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACGATTAGATTAGAAGTACGTAGAGCAGAACAATTAACAAGGATCA
GACGTAATTGGTAACCGAGTTAAATTAAGGTTGTAAAAAATAAAGTT

Lactobacillus johnsonii AD99. 600 pb del gen *recA*

AAAGTAGACACTCAAATTTCCACTATTCCTTCCGGTTCCTAGCTTTAGATGCAGCTCTTGGAGTTGG
TGGCTATCCTCGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAAGTTCCTGGTAAAACAACCTGTGGCTC
TTCATGCTGTTGCAGAAGTTCAGAAGCGTGGAGGAACGGCAGCTTATATCGATGCGGAAAAATGCGATG
GATCCTGCTTATGCCGAAGCATTAGGTGTTGATATTGATTCCTTAATTTTATCTCAACCAAACTGG
TGAAGAAGGTCTGCAAAATTCAGATACGCTTATTGCGAGTGGTGCAATTGATATCTTAGTTGTGGATT
CCGTGGCTGCGTTAGTACCAAGAGCCGAAATTGACGGTGACATGGGAGATTCACATGTTGGTTTACAA
GCCAGATTAATGAGTCAAGGCTTTACGTAAACTCTCAGGAAATATCTCTAAAACTAAAACATTGCTGT
TTTCATTAACCAAAATTCGTGAAAAAGTTGGGGTTATGTTTGGAAATCCAGAACTACTCCTGGTGGAC
GTGCTTTGAAGTTTTACTCTACGATTAGATTAGAAGTACGGAGAGCAGAACAATTAACAAGGATCA
GACGTAATTGGTAACCGAGTTAAATTAAGGTTGTAAAAAATAAAGTT

Lactobacillus gasseri NCC2856 (BL294). 600 pb del gen *recA*

AAAGTAGACACTCAAATTTCCACTATTCCTTCCGGTTCCTAGCCTTAGATGCTGCTCTTGGAGTTGG
TGGTTATCCACGTGGACGAATTATTGAAGTATATGGACCAGAAAGTTCTGGTAAAACCTACAGTAGCAC
TTCATGCTGTTGCAGAAGTTCAAAGCGTGGCGGAACCGCTGCATACATTGATGCTGAAAATGCTATG
GATCCGGCTTATGCTGAGGCATTAGGTGTAGATATTGATTCATTAATTTTATCTCAACCAAATACTGG
TGAAGAAGGATTACAAATTCAGATACTTTGATTGCCAGTGGTGCAATTGATATTTTGGTTGTGGATT
CAGTTGCTGCATTAGTACCACGAGCTGAAATTTGATGGTGATATGGGAGACTCTCACGTTGGTTTACAG
GCGAGATTAATGAGTCAGGCCTTGGCGAAAATTTCTGGAAAATTTCTAAGACGAAGACAATCGCCGT
TTTCATTAACCAAATTCGTGAAAAAGTTGGTGTGATGTTTGGAAAATCCAGAACTACTCCTGGTGGTC
GCGCTTTAAAGTTCTACTCTACTATTTCGATTAGAAGTTTCGTGCGCAGAACAGATCAAGCAAGGATCT
GATGTAATTGGTAACCGTGTAAAGCTAAAGGTTGTTAAGAACAAGGTT

Lactobacillus acidophilus CECT903^T (BL17). 600 pb del gen *recA*

AAAGCAGACACACAAATTTCTACAGTCCCACAGGTTCTCTTGCTTTAGATGCTGCTATTGGCGTTGG
TGGATACCTCGCGCCGAATTATCGAAGTTTATGGTCCCGAATCATCTGGTAAGACTACTGTAGCAC
TTCATGCTGTTGCTGAAGTACAAAAGCGTGGAGGCACCGCTGCGTATATTGATGCAGAAAATGCGATG
GATCCAGCTTATGCCGAGGCACTTGGAGTAGATATTGATTCACTTATCTTGTCTCAACCTAATACCGG
TGAAGAAGGTTTGCAAATTCCTGATACTTTAATTTCTAGTGGTGCTATTGATATTGTGGTAGTTGACT
CAGTTGCTGCGTTAGTACCACGTGCTGAAATTTGAAGGAGAAATGGGTGATGCTCATGTAGTCTTCAG
GCTAGACTTATGAGTCAAGCTTTACGTAAGCTTTCCGGTACCATTTCTAAGACTAAGACAATTGCGAT
TTTTATTAATCAGATTCGTGAAAAAGTCCGGTGTATGTTTGGTAATCCGGAACAACACCGGGTGGTC
GAGCACTTAAGTTCTATTCAACTGTTCTGCTTGAAGTAAGAAGAGCTGAACAAATTAAGCAATCAGGC
GATGTTTTAGGTAACCGAGTAAAAATTAAGTGGTAAAAACAAGGTT