

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÓMICA I DEL MEDI NATURAL-AINIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ainia
centro tecnológico

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE CONSERVACIÓN DE MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA PARA USO EN ENSAYOS DE FERMENTACIÓN COLÓNICA.

ALUMNA: M^ª del Mar Folgado Pérez

TUTORAS: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Patricia Almudéver Folch

COTUTORAS EXTERNAS: Sonia Porta Banderas

Blanca Viadel Crespo

Curso académico: 2017-2018

VALENCIA, JULIO DE 2018

Tipo Licencia: Licencia *Creative Commons* "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



Diseño de un protocolo de conservación de microbiota intestinal humana para uso en ensayos de fermentación colónica.

La microbiota intestinal, en su correcta homeostasis, lleva a cabo numerosas funciones que son esenciales para el individuo y que contribuyen en el metabolismo de este. Esta microbiota varía enormemente entre individuos, y en caso de desequilibrio pueden llegar a producirse diferentes patologías. Los estudios *in vitro* de la fermentación de las heces humanas pueden ayudar a determinar cómo afectan diferentes sustancias en la modulación de la microbiota intestinal y en los últimos años, han cobrado especial importancia los estudios para el trasplante de heces como tratamiento para diferentes patologías. En los estudios *in vitro* de fermentación colónica, en la actualidad, el principal problema radica en que dichos estudios se llevan a cabo con heces humanas frescas, habiendo gran variabilidad entre muestras, lo que hace que la reproducibilidad de los resultados en diferentes ensayos no sea posible. Es por esto que, en el presente proyecto, se tuvo como objetivo principal, el diseño y desarrollo de un protocolo para la conservación de los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal humana. Para ello, se preparó una muestra de heces previamente diluida en medio tioglicolato, con cuatro tratamientos de conservación diferentes: sin ningún tratamiento, DMSO 8%, DMSO 10% y Glicerol 10%. Posteriormente, se hicieron estudios de viabilidad microbiana respecto al tiempo de crioconservación y en función de cada una de las cuatro condiciones ensayadas, para poder elegir el tratamiento con mejores resultados. Se obtuvo como resultado que había una diferencia significativa en la viabilidad de los microorganismos ($p\text{-value}<0,05$) entre la muestra no tratada y las que tenían añadido un crioprotector, siendo el Glicerol al 10% el tratamiento que mejor resultado obtuvo. Una vez se eligió el tratamiento que mejor mantuvo la viabilidad a lo largo el tiempo, se volvió a preparar una solución fecal con el crioprotector y concentración elegidos y se realizó el ensayo de incubación en el Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica, para establecer la reproducibilidad de los ensayos, obteniendo unos resultados prometedores.

Palabras clave: microbiota; fermentación colónica; crioconservación; DMSO; glicerol; tioglicolato; trasplante fecal.

Alumna: Dña. M^a del Mar Folgado Pérez.

Tutoras: Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer y Patricia Almudéver Folch.

Tutoras externas: Dña. Sonia Porta Banderas y Dña. Blanca ViadelCrespo.

Valencia, Julio de 2018.

Disseny d'un protocol de conservació de microbiota intestinal humana per a ús en assajos de fermentació colónica.

La microbiota intestinal, en la seua correcta homeostasis, du a terme nombroses funcions que són essencials per a l'individu i que contribuïxen en el metabolisme d'este. Esta microbiota varia enormement entre individus, i en cas de desequilibri poden arribar a produir-se diferents patologies. Els estudis *in vitro* de la fermentació de les excrements humanes poden ajudar a determinar com afecten diferents substàncies en la modulació de la microbiota intestinal i en els últims anys, han cobrat especial importància els estudis per al trasplantament d'excrements com a tractament per a diferents patologies. En els estudis *in vitro* de fermentació colónica, en l'actualitat, el principal problema radica en que els dits estudis es duen a terme amb excrements humanes fresques, havent-hi gran variabilitat entre mostres, la qual cosa fa que la reproducibilitat dels resultats en diferents assajos no siga possible. És per açò que, en el present projecte, es va tindre com a objectiu principal, el disseny i desenrotllament d'un protocol per a la conservació dels microorganismes que formen part de la microbiota intestinal humana. Per a això, es va preparar una mostra d'excrements prèviament diluïda al mig tioglicolato, amb quatre tractaments de conservació diferents: sense cap tractament, DMSO 8%, DMSO 10% i Glicerol 10%. Posteriorment, es van fer estudis de viabilitat microbiana respecte al temps de crioconservació i en funció de cada una de les quatre condicions assajades, per a poder triar el tractament amb millors resultats. Es va obtindre com resultat que hi havia una diferència significativa en la viabilitat dels microorganismes ($p\text{-value}<0,05$) entre la mostra no tractada i les que tenien afegit un crioprotector, sent el Glicerol al 10% el tractament que millor resultat va obtindre. Una vegada es va triar el tractament que millor va mantindre la viabilitat al llarg el temps, es va tornar a preparar una solució fecal amb el crioprotector i concentració triats i es va realitzar l'assaig d'incubació en el Digester *in vitro* de Fermentació Colónica, per a establir la reproducibilitat dels assajos, obtenint uns resultats prometedors.

Paraules clau: microbiota; fermentació colónica; crioconservació; DMSO; glicerol; tioglicolato; trasplantament fecal.

Design of a human intestinal microbiota conservation protocol for use in colonic fermentation assays.

Intestinal microbiota, in its correct homeostasis, carries out numerous functions that are essential for the individual and contributing to its metabolism. This microbiota varies enormously among individuals, and in case of imbalance different pathologies can occur. *In vitro* studies of the fermentation of human feces can help to determine how different substances affect the modulation of intestinal microbiota and in recent years, studies for the transplant of feces as a treatment for different pathologies have been particularly important. In *In vitro* studies of colonic fermentation, the main problem today is that these studies are carried out with fresh human feces, having great variability between samples, which makes the reproducibility of the results in different assays not possible. This is why, in the present project, the main objective was to design and develop a protocol for the conservation of microorganisms that belongs to the human intestinal microbiota. To this end, a sample of previously diluted feces was prepared in thioglycolate medium, with four different conservation treatments: without any treatment, DMSO 8%, DMSO 10% and Glycerol 10%. Subsequently, microbial viability studies were made regarding to the time of cryopreservation and according to each one of the four conditions tested, in order to be able to choose the treatment with better results. Results demonstrate that there was a significant difference in the viability of the microorganisms ($p\text{-value} < 0.05$) between the untreated sample and those that had added a cryoprotectant, being Glycerol at 10% the treatment that best result obtained. Once the best maintained viability over time treatment was chosen, a fecal solution was re-prepared with the cryoprotectant and concentration selected and the incubation test was carried out in the *in vitro* Digester of Colonic Fermentation, in order to establish the reproducibility of the tests, obtaining promising results.

Keywords: microbiota; colonic fermentation; cryopreservation; DMSO; glycerol; thioglycollate; fecal transplant.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo con todas las ganas posibles, mostrándome su apoyo y su ilusión:

En primer lugar, a mis tutoras, Ana Isabel Jiménez Belenguer y Patricia Almudéver Folch, que depositaron en mí su total confianza a la hora de elegirme para realizar este trabajo, permitiéndome participar en un proyecto que me ha permitido conocer un campo de la microbiología hasta entonces desconocido para mí. Agradecerles también toda la entrega y esfuerzo que han puesto para hacérmelo todo un poco más fácil, ayudándome en todo lo que era posible y más.

En segundo lugar, quiero agradecerles a mis tutoras externas que me dieran la oportunidad de conocer un laboratorio como es el de AINIA. Agradecerles también su total colaboración con el proyecto, aportándome información y ayuda para poder entender al completo la necesidad de un proyecto de este tipo.

A mis amigos, que me han escuchado cuando les hablaba del proyecto hora tras hora, mostrando su interés y su apoyo.

Y, por último, a mis padres, mi hermana y mi novio. Vosotros habéis hecho de apoyo moral, mostrándome vuestro cariño incondicional cuando el estrés y el agobio se han apoderado de mí a lo largo de la realización del trabajo y a lo largo de estos cuatro años de carrera, sin vosotros no sería quién soy hoy, definitivamente, vosotros también sois un poco biotecnólogos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Microbiota intestinal.	1
1.1.1. Factores que determinan la microbiota intestinal.	1
1.1.2. Importancia y caracterización de la microbiota intestinal.	2
1.1.2.1. Importancia fisiológica. Prebióticos y probióticos.	2
1.1.2.2. Técnicas de cultivo y caracterización. Limitaciones y ventajas de lastécnicas.	5
1.2. Microorganismos indicadores de la microbiota intestinal.	7
1.2.1. Género Lactobacillus.	7
1.2.2. Microorganismos anaerobios estrictos.	8
1.2.3. Enterobacterias.	9
1.3. Aplicaciones de la microbiota intestinal.	9
1.3.1. Uso de la microbiota intestinal en clínica.	9
1.3.2. Uso de microbiota intestinal en modelos in vitro de fermentación colónica: evaluación de la capacidad de compuestos bioactivos de modular la microbiota intestinal.	10
1.3.3. Crioconservación de heces humanas para su aplicación a estudios in vitro de fermentación colónica.	13
2. OBJETIVOS.	15
2.1. Objetivo general.	15
2.2. Objetivos específicos.	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	16
3.2. Protocolo de preparación y conservación de la solución fecal.	16
3.2.1. Preparación de la solución fecal.	16
3.2.2. Tratamiento de la solución fecal con los crioconservantes para su estudio a diferentes tiempos de conservación.	17
3.2.3. Preparación y conservación de la solución fecal para la inoculación de los reactores del Digestor in vitro de Fermentación Colónica.	18
3.2.4. Calendario del experimento.	18
3.2.5. Procedimiento para los ensayos de recuento microbiológico.	18
3.2.5.1. Transporte de las muestras.	18
3.2.5.2. Método de recuento de microorganismos.	19
3.2.6. Aislamiento y conservación de cepas para posteriores estudios.	20

3.2.7. Extracción de ADN para posteriores estudios.	20
3.2.8. Estudio de fermentación colónica en los reactores del Digestor <i>in vitro</i> de Fermentación Colónica.	20
3.2.8.1. Descripción del Digestor <i>in vitro</i> de Fermentación Colónica y de la metodología de ensayo.	20
3.2.8.2. Procedimiento de inoculación de solución fecal.	22
3.2.8.3. Duración del proceso.	22
3.2.8.4. Método de recuento de microorganismos.	22
3.2.9. Análisis estadístico de los datos.	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
4.1. Estudio bibliográfico.	24
4.2. Estudios de viabilidad de los microorganismos indicadores.	25
4.2.1. Estudio de viabilidad a lo largo del tiempo de crioconservación.	25
4.2.3. Estudio de viabilidad según tratamiento.	29
4.3. Ensayo de inoculación en el Digestor <i>in vitro</i> de Fermentación colónica.	34
5. CONCLUSIONES.	37
6. BIBLIOGRAFÍA.	38

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius.

ADN GC: Contenido en guanina y citosina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

EII: Enfermedad intestinal inflamatoria.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

G: Fuerza centrífuga relativa.

g: Gramos.

ml: Mililitro.

PCR: "Polimerase chain reaction".

s: Segundos.

SSU: "Small subunit".

UFC: Unidades formadoras de colonia.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Microbiota intestinal.

1.1.1. Factores que determinan la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal forma parte del extenso grupo de microorganismos que viven en asociación con los seres humanos, siendo el tracto gastrointestinal el que presenta las concentraciones más abundantes de estos, llegando a representar una biomasa metabólicamente activa de hasta 2 kg en individuos en edad adulta. El tracto gastrointestinal forma la segunda superficie más amplia del cuerpo humano, con un área que se aproxima a los 400 m² de superficie, además de albergar una gran variedad de microorganismos bacterianos, con más de quinientas especies bacterianas distintas, que presentan una densidad de colonización *in crescendo* desde el estómago hasta el colon distal (Turroni et al., 2008; Claesson et al., 2012). Cada individuo presenta más de 1000 *phylum* a nivel de especie aproximadamente, pertenecientes solo a algunos *phyla*. En personas en edad adulta, suelen dominar Bacteroidetes y Firmicutes mientras que, otros como Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia están en proporciones menores (Lozupone et al., 2012).

La colonización intestinal, tiene lugar en las primeras horas después del nacimiento y su composición normal, es decir, la que presenta una persona sana, es compleja y específica para cada individuo. En el proceso, una gran diversidad de factores como son la edad gestacional, el tipo de alumbramiento, la nutrición neonatal, la inmunidad innata o la genética determinarán la composición de la microbiota intestinal. Se ha observado que hay una comunidad central de microorganismos colonizadores persistentes y que los cambios que se producen a lo largo de la edad adulta afectan principalmente a la abundancia, pero no a la presencia de ellos (Sousa et al., 2008; Rajilić-Stojanović et al., 2013).

Un primer factor que influye en el microbioma intestinal es el genético. Se ha observado que dos gemelos tienen una microbiota más parecida entre sí que la que presentan dos hermanos. A su vez, dos individuos emparentados, tienen una microbiota más semejante a la que hay entre dos individuos que no presentan relación alguna.

La edad del individuo también afecta en la composición de la microbiota intestinal. Un niño y un adolescente la tienen más parecida que la que presenta un individuo adulto que, a su vez, seguirá desarrollándose y sufriendo modificaciones hasta la senectud (O'Toole and Claesson, 2010; Claesson et al., 2012). *Escherichia coli*, diversas especies de *Enterococcus* y anaerobios estrictos, forman el primer conjunto de microorganismos que van a colonizar el colon del neonato y el microbioma gastrointestinal irá aumentando en estabilidad y diversidad durante los primeros tres años. La microbiota intestinal de un niño es parcialmente volátil, no obstante, se ha observado que presenta propiedades características entre individuos y poblaciones tanto a nivel funcional como de composición. No será hasta la edad adulta donde se alcanzará cierta estabilidad (Lozupone et al., 2012).

La alimentación es otro factor muy importante desde las primeras horas de vida. Los bebés que son amamantados con leche materna son colonizados de forma predominante por

diversas especies de *Bifidobacterium*, en cambio, en los que son alimentados con fórmula, predominan las especies de *Bacteroides* y solo unos pocos *Bifidobacterium sp.* (Moschen et al., 2012). Hay alimentos, como son los lácteos o los vegetales, que fomentan una microbiota en óptimas condiciones. Las dietas basadas en grasas saturadas y en grandes cantidades de proteínas animales, en cambio, provocan desequilibrios en el microbioma y favorecen enfermedades como la obesidad (Moschen et al., 2012; Heiman and Greenway, 2016). Se ha observado que las personas obesas presentan un número de ordenes menor en la microbiota intestinal que las personas delgadas, y entre ellas difieren significativamente en la abundancia de taxones específicos y genes funcionales (Lozupone et al., 2012). Algunos estudios, dividen la microbiota en cuatro tipos diferentes según los hábitos alimenticios. Un primer tipo sería el ligado a una dieta omnívora, habitual en las regiones de Europa noroccidental. El segundo tipo se encuentra en parte de la población occidental pero también en regiones como en el África rural, y está vinculado a una dieta rica en fibra (vegetariana) con pocos o ningún producto de origen animal. El tercer tipo, se encuentra en dietas de tipo occidental en las que se abusa de la proteína y la grasa animal. El cuarto y último tipo, está relacionado con enfermedades inflamatorias y diarreas, y presenta una microbiota desequilibrada. Se observa pues que, los dos primeros tipos, podrían relacionarse con una microbiota considerada sana. El tercer tipo, sugiere una microbiota de riesgo y el último tipo, es una microbiota que se presenta temporalmente cuando un individuo enferma, aunque puede llegar a volverse crónica (Schwiertz, 2016).

La zona geográfica en la que el individuo reside, los hábitos culturales o el ambiente que rodean al individuo también determinarán en cierta medida la composición de la microbiota intestinal (O'Toole and Claesson, 2010; Lozupone et al., 2012). Así las condiciones de higiene, un estilo de vida en urbe o en campo, el número de hermanos, ir a guarderías o escuelas, la presencia de mascotas en el hogar, etc., favorecerán el encuentro con diferentes microorganismos (Schwiertz, 2016).

Otros factores como son el estrés, la falta de sueño, el abuso de sustancias como el alcohol, el tabaco o los antibióticos, una vida sedentaria o una enfermedad, también determinan la composición de la microbiota humana (Lozupone et al., 2012; Vida Lúcida, 2018).

1.1.2. Importancia y caracterización de la microbiota intestinal.

1.1.2.1. Importancia fisiológica. Prebióticos y probióticos.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el tracto gastrointestinal es un órgano complejo cuya principal función es la de extraer y asimilar los nutrientes que entran en nuestro organismo a través de la alimentación. La microbiota intestinal, en su correcta homeostasis, lleva a cabo numerosas funciones que son esenciales para el individuo y que contribuyen en el metabolismo de este (Sousa et al., 2008; Schwiertz, 2016).

Los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal generan metabolitos que, posteriormente, serán absorbidos y utilizados por el individuo huésped. La producción de vitaminas o la regulación del metabolismo de los lípidos son funciones que estos microorganismos llevan a cabo. Además, también producen ácidos grasos de cadena corta que serán utilizados como combustible para la diferenciación de las células epiteliales y la regulación de la expresión génica. Otra función relevante que llevan a cabo es la de actuar como barrera ante la posible colonización de microorganismos patógenos, produciendo bacteriocinas y metabolitos tóxicos (Thompson-Chagoyán et al., 2005; O'Hara and Shanahan, 2007; Schwartz, 2016).

El tracto gastrointestinal es el punto principal de interacción entre el sistema inmune del huésped y los microorganismos, derivando en la evolución de un sistema inmune intestinal característico y diferente (Round and Mazmanian, 2009; Schwartz, 2016).

La microbiota intestinal juega un papel importante en el buen funcionamiento del sistema inmune, por tanto, la alteración en la composición normal de esta da como resultado la desregulación de las células inmunes adaptativas, dando lugar a enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como por ejemplo la colitis ulcerosa o la enfermedad de *Crohn*. Una microbiota alterada también está relacionada con enfermedades autoinmunes como la diabetes *mellitus* tipo 1 o la celiaquía (Round and Mazmanian, 2009; Schwartz, 2016).

Una reducción de la fermentación de carbohidratos complejos, el deterioro del metabolismo de ácidos biliares o la creación de nichos para microorganismos patógenos exógenos, son procesos que también están relacionados con una microbiota desequilibrada (Wlodarska and Finlay, 2009).

Por tanto, una microbiota en buenas condiciones es fundamental para la buena salud del individuo, existiendo prebióticos y probióticos que pueden ayudar a un correcto mantenimiento de la misma, pudiendo llegar a prevenir o a mejorar enfermedades asociadas a un desequilibrio de la microbiota intestinal (Thompson-Chagoyán et al., 2005; Sousa et al., 2008).

Los probióticos son microorganismos vivos que, si son ingeridos en dosis correctas, proporcionan beneficios fisiológicos y terapéuticos para la salud del individuo, ya sea en la evolución o en la prevención de ciertas enfermedades del tracto gastrointestinal, de enfermedades con base en el sistema inmune o alteraciones metabólicas. Son originarios del colon y del tracto vaginal, pero también pueden encontrarse microorganismos con estas características en el medio ambiente. Los microorganismos que se usan generalmente como probióticos son las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y la cantidad de alimentos probióticos a disposición de los consumidores ha ido en aumento en los últimos años (Fuller and Perdigon, 2003; Sartor, 2004; FAO, 2006). No se conocen con exactitud los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos, pero se han sugerido diversos mecanismos posibles como son: producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de la fijación de patógenos, competencia por los nutrientes, modulación del

sistema inmunitario, disminución de la permeabilidad y aumento de la resistencia del epitelio para que haga un efecto barrera o actividades inmunorreguladoras (Sartor, 2004; FAO, 2006).

Para que los probióticos sean efectivos, deben poder elaborarse a gran escala, y durante su almacenamiento y posterior uso, deben mantenerse viables y estables, debiendo ser capaces de sobrevivir en el ecosistema intestinal del individuo huésped, llegando a este en cantidades suficientemente elevadas como para poder llevar a cabo su función de probiótico.

Actualmente, los microorganismos que se utilizan en las preparaciones probióticas son aquellos que han sido utilizados ya de forma prolongada en productos alimenticios sin haber causado ningún tipo de efecto secundario sobre los individuos que los han ingerido o son organismos a los que no se les conoce ningún potencial patógeno, generalmente conocidos como GRAS (Fuller and Perdigon, 2003).

Las pruebas *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos incluyen: a) resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, ya que son condiciones de estrés que constituyen una barrera limitante para su supervivencia en este ecosistema; b) adherencia al mucus y las células epiteliales, ya que se consideran propiedades que los probióticos deben poseer para ejercer efectos inmunomoduladores y excluir la adhesión de patógenos; c) habilidad para reducir la adhesión de la flora competitiva y actividad antimicrobiana que favorezca el desplazamiento de patógenos, y d) capacidad para hidrolizar las sales biliares.

Por otra parte, encontramos el grupo de las sustancias prebióticas, que son oligosacáridos no digeribles que permiten la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o varias bacterias autóctonas del tracto intestinal del huésped, variando así tanto la composición como la actividad de la microbiota, lo que otorga beneficios sobre la salud y el bienestar del individuo. Presentan un mecanismo de acción distinto al de los probióticos y, en determinados casos, pueden ser beneficiosos para ellos (FAO, 2006). El factor prebiótico clásico y original es la leche materna humana, que puede afectar la composición de la microbiota bifidobacteriana en el tracto gastrointestinal de los bebés que son amamantados (Sartor, 2004; Viladomiu et al., 2013; Schwartz, 2016).

Para que un oligosacárido sea considerado como prebiótico, debe cumplir cinco requisitos básicos: resistencia a la acidez gástrica, hidrólisis por enzimas de mamíferos y que no se produzca su absorción en la parte superior del tracto gastrointestinal, fermentación por bacterias beneficiosas en el intestino y estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de la microbiota colónica hacia una composición más beneficiosa. Actualmente solo dos oligosacáridos cumplen estos tres requisitos: oligofruktosa e inulina. Otro aspecto a destacar es que las fibras dietéticas también pueden actuar como prebióticos eficientes en la reducción de la colitis, alterando la composición de la microbiota al aumentar la cantidad de bacterias beneficiosas (Viladomiu et al., 2013).

Finalmente, es importante señalar que la consideración ecológica también tiene significación en la eficiencia y seguridad de los pre y probióticos, debiéndose considerar en su evaluación de seguridad las propiedades innatas del compuesto prebiótico o cepa probiótica, así como sus

posibles efectos sobre la microbiota intestinal en conjunto, haciendo especial énfasis en la transparencia del proceso de toma de decisiones sobre la inocuidad de los alimentos. (Hammes and Hertel, 2002; FAO, 2006).

1.1.2.2. Técnicas de cultivo y caracterización. Limitaciones y ventajas de lastécnicas.

El conjunto de bacterias detectadas en las heces refleja la presencia de bacterias en el colon distal, por lo que los estudios de la microbiota intestinal humana, por lo general implican el análisis de la comunidad bacteriana de muestras de heces. Esta microbiota puede ser estudiada y caracterizada utilizando métodos de cultivo y métodos moleculares. La diferencia fundamental entre ambos métodos reside en la forma en la que se caracterizan e identifican los diferentes microorganismos presentes en la microbiota. Los métodos de cultivo se basan en la recreación de las condiciones de vida naturales de los microorganismos, facilitando así su crecimiento *in vitro* y, de esta manera, poder estudiar su fenotipo. Los métodos moleculares, en cambio, se basan en la identificación de los microorganismos según sus similitudes genéticas, más frecuentemente en el gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (Schwiertz, 2016).

Métodos de cultivo y caracterización.

Hasta la fecha, únicamente se han podido cultivar y aislar una pequeña parte de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal. El hecho de que solamente se haya podido cultivar un reducido número de microorganismos *in vitro*, radica en la incapacidad de imitar con precisión las condiciones de vida de estos en su hábitat natural (Schwiertz, 2016).

La forma de cultivo más sencilla consiste en la incubación de muestras o cepas en cultivo discontinuo en medios de crecimiento nutritivos o selectivos. La gran parte de los microorganismos presentes en la microbiota son anaerobios estrictos, lo que dificulta enormemente su cultivo, debiéndose llevar a cabo en condiciones totalmente anaerobias (Schwiertz, 2016). Por esto, el desarrollo de cabinas y cámaras de anaerobiosis, ha mejorado el cultivo de la microbiota intestinal (Gaci et al., 2017). En el cultivo de microorganismos intestinales exigentes, pueden utilizarse medios que contienen fluido ruminal, extractos de heces filtrados o mezclas de ácidos grasos de cadena corta puesto que, al ser utilizados por algunos microorganismos como sustratos de crecimiento, mejorará el resultado del cultivo (Duncan et al., 2002).

Otro método de cultivo es el uso de sistemas modelo de cultivo continuo como fermentadores. En este caso, el cultivo se lleva a cabo en un sistema abierto al que se le van proporcionando de manera continua medio de cultivo y nutrientes frescos. Este tipo de cultivos permiten un mayor nivel de control sobre las condiciones de cultivo y pueden funcionar durante periodos de tiempo prolongados. A pesar de los avances que se han conseguido con estos tipos de cultivo, presentan ciertas limitaciones.

Entre las ventajas de los métodos de cultivo, están mayor control y reproducibilidad y un coste económico (McDonald et al., 2013). Una de las desventajas principales de las técnicas de

cultivo, es la imposibilidad de asegurar que el comportamiento fenotípico de un microorganismo sea igual *in vitro* e *in vivo*. Esto se debe a que, *in vivo*, existen procesos de sinergia entre los diversos microorganismos que *in vitro* no se dan (Schwiertz, 2016). Otras desventajas de los métodos de cultivo son la lentitud y la dificultad de cultivo (Gaci et al., 2017). Como desventajas añadidas podemos destacar la gran cantidad de mano de obra que se requiere para llevar a cabo el cultivo, así como la gama de medios de cultivo complejos que se necesitan para el crecimiento de los microorganismos (Schwiertz, 2016).

Actualmente, se ha intentado caracterizar a los microorganismos de la microbiota intestinal empleando las técnicas tradicionales de cultivo a gran escala, lo que recibe el nombre de “culturómica”. Sin embargo, a pesar del afán de estudiar y caracterizar a los microorganismos desde un punto de vista fenotípico, la aparición de técnicas moleculares ha permitido caracterizar de manera más comprensiva los microorganismos del tracto gastrointestinal (Fuller and Perdigon, 2003; Schwiertz, 2016).

Métodos moleculares

En la actualidad, el estudio y caracterización de la microbiota intestinal ha mejorado considerablemente gracias a las técnicas moleculares. El costo de las tecnologías de secuenciación es cada vez menor y su rendimiento ha ido en aumento (Schwiertz, 2016; Gaci et al., 2017). La ventaja fundamental de estas técnicas es que presentan una visión más completa de los microorganismos que se encuentran presentes en una muestra. Además, requieren una mano de obra menor lo que permite llevar a cabo ensayos a una escala mayor de la que se podría con los métodos tradicionales de cultivo. Para el estudio de la microbiota intestinal utilizando las técnicas de secuenciación se pueden utilizar diferentes métodos, que serán descritos a continuación (Nelson, 2011; Schwiertz, 2016).

Un método común basado en secuencias es el uso de genes marcadores universales, los cuales ofrecen un amplio censo de los microorganismos que hay en una muestra. Los genes marcadores universales usados con más frecuencia son el gen 16s ARNr para bacterias y el gen 18s ARNr para eucariotas. Estos genes presentan regiones de secuencia de ADN que están altamente conservadas, pero también hay regiones que son exclusivas de determinados grupos o géneros microbianos y que tienen mayor variabilidad (Guillen et al., 2016; Johnson et al., 2018). El objetivo principal de esta técnica es obtener un conjunto de amplicones de PCR que provengan del máximo número de especies bacterianas que estén presentes en la muestra para, posteriormente, secuenciarlos en masa. La desventaja de esta técnica es que los *primers* utilizados no amplifiquen de manera eficaz todos los genes funcionales de interés que se encuentren en la muestra. Este problema se ve solucionado en los enfoques no orientados como la metagenómica, pero a costa de tener que producir un número de datos mayor, lo que encarece el ensayo (Nelson, 2011; Schwiertz, 2016).

La metagenómica nos proporciona una idea del potencial genético de las comunidades microbianas complejas, incluyendo especies microbianas que no han conseguido cultivarse con anterioridad. Además, los datos obtenidos en un ensayo metagenómico pueden utilizarse para el “aislamiento inverso” de nuevas especies de referencia, pudiendo revelar características

fundamentales de la estructura de la comunidad microbiana, favoreciendo el enriquecimiento y aislamiento de nuevos microorganismos (Petrosino et al., 2009; Singh et al., 2009; Nelson, 2011). La metagenómica, es el único método que permite el monitoreo efectivo y en profundidad de las comunidades virales que están presentes en el cuerpo humano y que no tienen genes marcadores equivalentes al ARNr de SSU. Esta técnica, no obstante, presenta algunas limitaciones, entre las que encontramos su mayor coste, la necesidad de una infraestructura computacional adecuada y el hecho de que sea necesario que los microorganismos crezcan previamente en cultivo para que la extracción de DNA sea suficiente (Nelson, 2011; Schwiertz, 2016).

Otra técnica utilizada es la metatranscriptómica. Esta técnica permite un estudio dinámico de los microorganismos presentes en una comunidad microbiana, puesto que está basada en la obtención y posterior estudio de las transcripciones combinadas de una comunidad microbiana al completo, permitiendo así obtener información sobre la actividad funcional de esa comunidad en un momento concreto. Las limitaciones que presenta esta técnica de secuenciación son una corta vida media de las moléculas de ARNm, lo que hace que no siempre sean totalmente representativos los datos obtenidos y que, al igual que en metagenómica, muchos de los genes transcritos obtenidos, serán de función desconocida, puesto que no estarán todavía en las bases de datos de referencia (Nelson, 2011; Schwiertz, 2016; Yang et al., 2018).

En definitiva, estas nuevas técnicas han permitido conocer los cambios producidos en la composición de la microbiota intestinal y han permitido relacionarlos diversas enfermedades. Asimismo, se ha sugerido que estos avances en el estudio de la microbiota intestinal pueden emplearse no solo para un diagnóstico de la enfermedad, sino que también pueden emplearse para llevar a cabo un tratamiento personalizado de enfermedades causadas por microorganismos (Egert et al., 2006; Lim et al., 2018). Igualmente, al establecer estos métodos, en los que se preserva la actividad funcional de la microbiota fecal humana, se permite la preservación de grandes muestras para ensayos clínicos en humanos y su posible intercambio entre diversos laboratorios por centros de recolección de referencia (Gaci et al., 2017).

1.2. Microorganismos indicadores de la microbiota intestinal.

1.2.1. Género *Lactobacillus*.

Es el género más abundante dentro de la familia Lactobacillaceae, habiéndose descrito más de cien especies distintas. Gracias a las técnicas moleculares de caracterización, se ha encontrado que los lactobacilos son el grupo dentro de las bacterias ácido lácticas que presentan una mayor heterogeneidad taxonómica, debido a la variación en su contenido de DNA GC, el cual, en general, es bajo. Son bacterias gram-positivas, con un contenido de GC bajo, aerotolerantes anaerobias o microaerofílicas, con un metabolismo de fermentación obligatoria y que presentan una morfología pleomórfica pero sin ramificaciones y suelen aparecer asociados en parejas, cadenas o de forma aislada. Según parece, la evolución que han sufrido los miembros de este grupo ha sido de manera principal hacia su nicho específico de entornos ricos en

nutrientes, mediante una descomposición del genoma y no mediante la ganancia de genes especializados que permitan la adaptación (Ljungh and Wadström, 2009).

Este tipo de bacterias ácido lácticas se encuentran en la cavidad oral, la vagina de humanos y otros animales y el tracto gastrointestinal, así mismo, se pueden encontrar en el ambiente en productos como la leche, carnes, plantas en descomposición o comida fermentada como el yogur o el queso, usándose generalmente como probióticos. Los lactobacilos proporcionan ciertos efectos beneficiosos que están relacionados con la colonización de la mucosa epitelial y la inhibición de microorganismos patógenos mediante la producción de sustancias como el ácido láctico o el H₂O₂. Además, expresan diversas proteínas de superficie adhesivas, participando también en procesos fisiológicos diversos (Ljungh and Wadström, 2009).

Como se ha indicado con anterioridad, forman parte de la composición de la microbiota gastrointestinal de un individuo sano, no obstante, en el tracto gastrointestinal maduro de los individuos adultos solo un reducido número de las especies de *Lactobacillus* son habitantes autóctonos de la microbiota (entre el 1% y el 2% de la microbiota intestinal total), la gran parte de *Lactobacillus* son alóctonos, derivados de alimentos fermentados (Ljungh and Wadström, 2009).

1.2.2. Microorganismos anaerobios estrictos.

Son microorganismos que solo pueden crecer en ausencia de oxígeno, puesto que este es tóxico para ellos. Estos microorganismos utilizan principalmente la fermentación láctica, no obstante, se pueden dar otro tipo de fermentaciones en las levaduras y las arqueas. Para propagarse por entornos donde hay oxígeno, utilizan formas de resistencia como por ejemplo formando endosporas. Sus requerimientos nutricionales son complicados y presentan un crecimiento lento, lo que hace que su aislamiento sea difícil. Dentro del grupo de los microorganismos anaerobios estrictos podemos citar algunos géneros pertenecientes a este grupo como por ejemplo el género *Prevotella*, *Bifidobacterium* o *Clostridium* (Higiene.edu.uy, 2018).

El género *Clostridium* pertenece a la familia *Clostridiaceae*. Son microorganismos gram-positivos, anaerobios, móviles y formadores de esporas. No obstante, las características que definen a este género, no se encuentran en todas las especies, siendo un género muy heterogéneo (Fundacionio.org, 2018). Presentan un hábitat muy diverso, encontrándose en suelos, aguas dulces y saladas y tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Es un género importante para la ecología, puesto que son los responsables de la putrefacción (Diversidadmicrobiana.com, 2018).

Por otro lado, el género *Bifidobacterium* está englobado en la familia *Bifidobacteriaceae*. Son bacilos pleomórficos con una morfología variable, y pueden encontrarse en grupos, en cadenas, de forma individual o en forma de V, Y, T. Las células no tienen cápsula, son microorganismos inmóviles, no presentan filamentos y no son esporulados. Son bacterias gram-positivas y anaerobias estrictas, no obstante, el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de crecimiento. Las bifidobacterias son habitantes autóctonos del

tracto gastrointestinal humano y de diversos animales, siendo una de las especies predominantes, y están presentes durante toda la vida, pero en concentraciones variables, colonizando el intestino a los pocos días de vida del individuo. Es, junto al género *Lactobacillus*, el género que usualmente se utiliza como probiótico y se diferencian del resto de bacterias acidolácticas en que también producen ácido acético como uno de sus principales productos de fermentación, y no solo ácido láctico (Collado Amores, 2004).

1.2.3. Enterobacterias.

Las enterobacterias son un grupo de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que forman un gran grupo heterogéneo de bacterias gram-negativas. Su nombre viene dado por su ubicación común como saprófitas en el tracto gastrointestinal, no obstante, también se pueden encontrar de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación. Dentro de esta familia, el microorganismo tipo es *Escherichia coli* (Bd.com, 2018).

Las características propias y representativas de las enterobacterias son las siguientes: la mayoría son anaerobias facultativas, no son productoras de esporas, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa a ácido, son oxidasa-negativas, producen catalasa y en su mayoría presentan flagelos peritricos, lo que las hace móviles. Presentan una morfología en forma de bastón, con un tamaño por lo general de entre 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, con una envoltura celular en forma multilaminar (Puerta-García and Mateos-Rodríguez, 2010).

1.3. Aplicaciones de la microbiota intestinal.

1.3.1. Uso de la microbiota intestinal en clínica.

El trasplante de heces es un procedimiento basado en la introducción de una solución de materia fecal correctamente procesada proveniente de un individuo donante sano, en el tracto gastrointestinal de otro individuo receptor con el objetivo de manipular las características de la microbiota intestinal de este último y, de esta manera, poder tratar una enfermedad específica (Rodríguez de Santiago et al., 2015; Schwiertz, 2016;). Todavía sigue sin conocerse el mecanismo de acción de los trasplantes fecales, pero algunos estudios sugieren que ayuda tanto a restaurar la composición normal de la microbiota intestinal como otros aspectos de la microbiota como, por ejemplo, la actividad metabólica (Hamilton et al., 2012). Los donantes de las heces para el trasplante pueden ser tanto familiares del receptor como voluntarios sin ningún tipo de relación con este y aunque todavía no se conocen las características del donante ideal, estos deben cumplir un conjunto de requisitos previamente establecidos (Rodríguez de Santiago et al., 2015).

La infección por *Clostridium difficile* es una patología que afecta la morbilidad y la calidad de vida de los individuos que la padecen (Burke and Lamont, 2013). En la actualidad, la principal indicación para el uso del trasplante fecal es la infección por este microorganismo cuando no hay respuesta al tratamiento con antibiótico y en tres circunstancias diferentes: la infección recurrente, la infección grave y la infección en pacientes que ya presentaban con anterioridad

enfermedades intestinales inflamatorias (Hamilton et al., 2012; Rodríguez de Santiago et al., 2015).

También se está estudiando el trasplante de heces para otras enfermedades como son el estreñimiento crónico y el síndrome del intestino irritable. Además de en enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal, diversas investigaciones han demostrado su eficacia en patologías extradigestivas como la diabetes *mellitus* tipo 2 y la obesidad (Rodríguez de Santiago et al., 2015). La base biológica de estas líneas de investigación se encuentra en las diferencias existentes en la composición de la microbiota intestinal de personas delgadas y personas obesas. Se han obtenido resultados prometedores en el trasplante de heces de individuos delgados a individuos obesos, en los que se observó que, tras el trasplante, los individuos receptores habían aumentado de manera significativa su sensibilidad a la insulina (Vrieze et al., 2012; Rodríguez de Santiago et al., 2015). También se han recogido casos aislados con resultados prometedores en el autismo, Parkinson, encefalopatía hepática, síndrome de fatiga crónica, esclerosis múltiple, supresión de bacterias multirresistentes, sensibilidad a los antirretrovirales frente al VIH y pancreatitis aguda (Rodríguez de Santiago et al., 2015).

Podemos concluir, por tanto, que el trasplante de heces es un tratamiento prometedor, seguro, de bajo coste y que ha demostrado su efectividad en cuanto a la modificación de la microbiota del individuo receptor, sobretodo en el tratamiento para la infección *Clostridium difficile*. Si bien en otras enfermedades todavía queda mucho por estudiar, los primeros ensayos han demostrado que puede llegar a ser un tratamiento alternativo para muchas patologías intra y extradigestivas, pudiendo llegar a ofertarse en los hospitales como un tratamiento rutinario (Rodríguez de Santiago et al., 2015).

1.3.2. Uso de microbiota intestinal en modelos *in vitro* de fermentación colónica: evaluación de la capacidad de compuestos bioactivos de modular la microbiota intestinal.

Un gran número de los estudios realizados sobre microbiota intestinal, han tenido como objetivo principal la identificación y catalogación de especies microbianas, pero, a causa de la dificultad de cultivo de la mayoría de los microorganismos de la microbiota intestinal, ha sido un proceso complicado y con numerosos obstáculos. Es por esto que, la mayoría de las especies fueron conocidas por su secuencia ARNr 16S y gracias al avance de las tecnologías de secuenciación, no obstante, esta forma de caracterización no proporciona información acerca de la funcionalidad de cualquier especie identificada (Payne et al., 2012).

Una técnica innovadora que permite el estudio tanto de especies microbianas intestinales como de su funcionalidad son los modelos de fermentación intestinal *in vitro*. Estos, son caracterizados por la inoculación de uno o varios quimiostatos con microbiota fecal y son estudiados bajo ciertas condiciones determinadas de temperatura y pH y en condiciones anaeróbicas. Son múltiples los posibles ensayos que se pueden realizar en estos modelos, pudiéndose evaluar determinados componentes dietéticos para observar su posible impacto en la composición de la microbiota intestinal, el impacto de cepas probióticas o el estudio de

las interacciones huésped-patógeno. También son modelos útiles en ensayos en los que la posible letalidad restringe las pruebas *in vivo*, como es en el caso de los estudios de biotransformación de fármacos o compuestos tóxicos, así como el impacto de la radioactividad en la microbiota intestinal (Payne et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que el gas que producen los microorganismos como subproductos de su actividad metabólica, afecta directa e indirectamente en la salud del individuo. Estos gases producidos, pueden ser utilizados como marcadores de la función y el estado gastrointestinal y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con estas. Para detectar correctamente estos gases producidos durante la fermentación de muestras fecales, es requisito indispensable que haya una atmósfera anaeróbica. Por ello, los modelos de fermentación *in vitro* permiten el estudio de estos gases de forma correcta (Ou et al., 2015; Rotbart et al., 2017).

Existen diferentes modelos de fermentación *in vitro*, y la selección del modelo idóneo para cada ensayo requiere una evaluación en profundidad de los objetivos y de las ventajas y desventajas de cada modelo. Los diferentes modelos que podemos encontrar son los siguientes:

Cultivos en batch.

Este modelo, describe el crecimiento de una combinación pura o mixta de una suspensión bacteriana en un medio seleccionado cuidadosamente y sin la adición de ningún tipo de nutriente. Son sistemas generalmente cerrados que usan botellas selladas o reactores que se mantienen en condiciones anaerobias. Algunas de las ventajas que podemos destacar de este tipo de modelos es que son fáciles de configurar y son útiles para la evaluación de la digestión de determinadas sustancias. Como inconvenientes podemos citar que son estudios de fermentación a corto plazo y que tienen un peor control microbiológico (Payne et al., 2012).

Cultivos en continuo.

Los modelos de fermentación continua pueden ser sistemas de una o más etapas y son útiles para estudios de reposición de sustratos o eliminación de productos tóxicos. Encontramos dos tipos de modelos de fermentación continua; por una parte, el cultivo continuo multietapa, que consiste en un flujo continuo en varios recipientes que imitan las condiciones encontradas en diferentes partes del tracto digestivo y, por otra parte, el cultivo continuo inmovilizado, que presenta una elevada densidad celular y estabilidad a largo plazo en un sistema de fermentación con microbiota fecal inmovilizada. Un avance importante en los modelos de fermentación continua fue el desarrollo de múltiples etapas de fermentación, lo que permitió la simulación de procesos horizontales del colon. Este diseño, mediante la combinación de tres quimiostatos en serie, posibilita un control de las propiedades espaciales, temporales, nutricionales y fisicoquímicas de la microbiota. Estos quimiostatos imitan el colon proximal, el transversal y el distal. La ventaja de este tipo de modelos de fermentación radica en el buen control de los parámetros ambientales que permiten imitar las condiciones encontradas *in vivo*. Por otra parte, los inconvenientes que presentan son que los experimentos tienen un tiempo limitado de días o semanas y que no proporcionan funcionalidad del huésped (Payne et al., 2012).

Simulador del ecosistema intestinal microbiano humano (SHIME).

Un sistema más complejo con el objetivo de estudiar el ecosistema presente en el tracto gastrointestinal fue desarrollado por Molly et al. (1993) que consiste en un reactor de cinco etapas con nombre SHIME. El intestino delgado es simulado mediante el "llenado y drenaje" del sistema (300 ml de volumen de trabajo en cada reactor), el intestino grueso por un reactor de tres recipientes (1000 ml, 1600 ml y 1200 ml de volumen de trabajo, respectivamente). Cada reactor tiene ocho puertos: para entrada y salida de medio; toma de muestras de la fase líquida y de gases; electrodo de pH, control de pH (ácido y base), y para el lavado de espacio de cabeza. Los recipientes 1 y 2 se inoculan más de ocho días consecutivos con 10 ml de una suspensión de la dieta y los recipientes de 3, 4 y 5 son inoculados con 50 ml de 20% de suspensión fecal (De Boever et al., 2000). Este reactor puede evaluar la dinámica de la ecología microbiana del tracto gastrointestinal y puede ser utilizado para estudios de metabolismo de los fármacos (Molly et al., 1994). Una de las principales desventajas del simulador SHIME es que requiere un mínimo de dos semanas de plazo para estabilizar la comunidad microbiana antes de que pueda ser utilizado en las investigaciones *invitro*.

Sistema de control computarizado y con la absorción de agua, los movimientos peristálticos, y la absorción de productos de la fermentación.

Minekus et al. (1999) introdujo un nuevo tipo de sistema que combina la eliminación de los metabolitos y el agua. Este sistema consta de cuatro unidades de vidrio, cada una con una membrana flexible dentro, conectados entre sí. Se mantiene a 37°C con una secuencia controlada por ordenador, presionando a su vez las paredes de la membrana flexible causando una onda peristáltica, que obliga al quimo para circular a través del sistema del circuito. El inóculo puede ser muestras frescas fecales o de cultivos microbianos tomado de fermentadores anteriores. El pH es controlado por la adición de 5 M NaOH, un líquido de diálisis se utiliza para mantener las concentraciones de electrolitos adecuados y se bombea de una botella a través de membranas de fibra hueca colocada en la luz del reactor.

La cantidad de quimo en el reactor se controla con un sensor de presión y se mantiene a un nivel establecido por la absorción de agua, con una bomba en el circuito de diálisis. El medio de alimentación fue mixto y se mantiene anaeróbico con nitrógeno, y fue introducida en el reactor con el sistema de válvulas y una bomba peristáltica.

La ventaja principal de los sistemas digestivos artificiales es que, gracias al flujo continuo con metabolitos e intercambio de agua, se consiguen imitar las condiciones encontradas *in vivo*. Un inconveniente importante está relacionado con la duración del ensayo, que está limitado a unos pocos días, por otra parte, no se puede valorar la posible respuesta inmune que se produciría *in vivo* además de no haber respuesta neuroendocrina (Payne et al., 2012).

Como conclusión, podemos indicar que los modelos de fermentación *in vitro* son una tecnología innovadora que permite ensayos prácticamente ilimitados y libres de los problemas éticos que surgen en los modelos *in vivo*. Es por esto que los ensayos realizados con los modelos de fermentación tendrán importancia en el campo de la gastroenterología y en el

diagnóstico de enfermedades extra e intragastrointestinales, además de facilitar potenciales tratamientos a través del estudio de alimentos o fármacos y del impacto que estos tienen sobre la composición de la microbiota gastrointestinal. No obstante, los resultados que se obtienen con modelos *in vivo* siguen siendo muy deseados, por lo que los ensayos se debería combinar estudios *in vivo* e *in vitro* para obtener resultados que se complementen entre sí (Payne et al., 2012; Ou et al., 2015). Para la ejecución del presente proyecto se ha utilizado el Digestor *in vitro* de fermentación colónica disponible en AINIA, tal y como se describe en el apartado de “Material y métodos”.

1.3.3. Crioconservación de heces humanas para su aplicación a estudios *in vitro* de fermentación colónica.

La crioconservación de heces humanas presenta un futuro prometedor ya que al existir una gran variabilidad entre muestras de distintos individuos es difícil conseguir en los estudios de fermentación *in vitro* la reproducibilidad de distintos ensayos. Es por ello que, desarrollar y estandarizar un protocolo de crioconservación será útil para el estudio de la microbiota fecal, ya que, podrá llevarse a cabo de manera más fidedigna el estudio de cómo diferentes sustancias como antibióticos, probióticos o prebióticos pueden afectar a la microbiota intestinal. Adicionalmente, la tecnología de crioconservación de heces permite disponer de un banco de heces del que poder extraer la muestra necesaria cuando se tenga que llevar a cabo tanto ensayos *in vitro* de fermentación como un trasplante fecal (Egert et al., 2006; Lozupone et al., 2012; Rodríguez de Santiago et al., 2015).

Para la crioconservación de las heces humanas, los crioprotectores son potenciales soluciones ya que actúan sinérgicamente en la deshidratación de la célula, protegiéndola así del frío en los procesos de exposición del material biológico a bajas temperaturas. El objetivo de las soluciones crioprotectoras consiste en desplazar o extraer el agua del citoplasma y, de esta manera, evitar la formación de cristales de hielo en el interior de las células durante el proceso de congelación (Bioterios.com, 2018).

Una forma de clasificar a los diferentes crioprotectores es basándose en su capacidad de atravesar la membrana celular, obteniendo así soluciones crioprotectoras permeables y no permeables. Dentro del primer grupo están los polialcoholes y los glicoles como el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol o el etilenglicol. Por otra parte, los más comunes del segundo grupo son los azúcares, así como otras moléculas de gran tamaño como la albúmina bovina y diversos polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona (PVP) o polivinilalcohol (PVA). Las características que debe presentar idealmente un protector son las siguientes: debe difundir a través de las membranas plasmáticas, tener un peso molecular reducido, ser altamente soluble y no presentar toxicidad (Bioterios.com, 2018).

El glicerol y el DMSO son, como se ha dicho con anterioridad, crioprotectores permeables. Este tipo de crioprotectores son sustancias de bajo peso molecular que pueden difundir a través de la membrana celular y que remplazan el volumen de agua intercelular para evitar daños a causa de la formación de cristales de hielo y que, además, mantienen el volumen celular para impedir el colapso celular a causa de una deshidratación excesiva. Cabe destacar que el glicerol

presenta una difusión más lenta que el DMSO (Medeiros et al., 2002; Rota et al., 2006; Terreros C. et al., 2015).

El glicerol ha sido usado en la criopreservación de material biológico de forma extensa, y es conocido por causar una reorganización molecular de las membranas plasmáticas durante la congelación. Se ha sugerido que el glicerol no se debe agregar más de unos minutos antes de la congelación, un requisito técnicamente difícil cuando se trabaja en una cámara anaeróbica, como es necesario para el procesamiento de microbiota fecal (Aguirre et al., 2015; Ávila-Portillo et al., 2006; Garci et al., 2017).

Por otra parte, el DMSO presenta una penetración celular que hace que presente propiedades coligativas que reducen la concentración de sal y los efectos osmóticos, además de prevenir la nucleación y el crecimiento de cristales de hielo que conducen a la rotura de la membrana. Es un crioprotector prometedor puesto que atraviesa rápidamente la membrana celular, ya que tiene un elevado poder de penetración, el inconveniente que presenta es su leve toxicidad (Kerckhof et al., 2014; Garci et al., 2017; Schneider et al., 2017).

En resumen, el empleo de crioconservantes mejora de manera relevante los procesos de congelación de material biológico puesto que mantienen su viabilidad a largo plazo, no obstante, al presentar cierta toxicidad en mayor o menor medida, las concentraciones empleadas deben ser las más bajas posibles en cada caso (Terreros et al., 2015; Bioterios.com, 2018).

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

Diseño y desarrollo de un protocolo para la conservación de los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal humana, utilizada en los ensayos de fermentación colónica con el Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica, con el fin de evitar la variabilidad de las muestras de heces procedentes de voluntarios sanos y conseguir la reproducibilidad de los resultados en diferentes ensayos.

2.2 Objetivos específicos.

- a) Analizar la bibliografía existente sobre crioprotectores de heces para su conservación y seleccionar aquellos tratamientos con crioprotectores que más se ajusten a su uso en el digestor.
- b) Seleccionar en base a la bibliografía los microorganismos cultivables que se van a utilizar como indicadores de mantenimiento de las propiedades idóneas para su uso en el digestor colónico.
- c) Diseñar un protocolo de preparación de la muestra para su congelación y posterior recuperación con los distintos crioprotectores seleccionados con el fin de minimizar la pérdida de viabilidad de ésta.
- d) Realizar la enumeración de los microorganismos seleccionados: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, anaerobios estrictos y enterobacterias a los distintos tiempos de crioprotección.
- e) Seleccionar en base a los resultados el tratamiento que minimice la pérdida de viabilidad a lo largo del tiempo de conservación y hacer un estudio *in vitro* en un Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica para comprobar su eficacia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Origen y recogida de la muestra.

Las muestras de heces utilizadas para el ensayo pertenecían a un grupo de voluntarios de hombres y mujeres sanos de entre 35 y 45 años. Los voluntarios debían cumplir los siguientes criterios de inclusión: ser no fumador y no haber tomado prebióticos, probióticos, laxantes ni antibióticos en los últimos 3 meses. Las muestras de heces fueron recogidas el mismo día de la preparación de la solución fecal, siendo recolectadas en recipientes estériles en condiciones de asepsia.

3.2. Protocolo de preparación y conservación de la solución fecal.

3.2.1. Preparación de la solución fecal.

Para la preparación de la solución fecal se preparó un *pool* de heces con un total de 160 gr de muestra procedente de 5 voluntarios sanos.

Inicialmente, con ayuda de un *stomacher* (Seward™ Stomacher™ Model 3500 Jumbo Lab Blender) el *pool* de heces se disolvió muy bien en 240 g de tioglicolato (Liofichem, Rosetodegli Abruzzi, Teramo, Italia) (De Boever et al., 2000) preparado y regenerado en baño para la eliminación de O₂ previamente, obteniendo una solución fecal inicial al 40%. Una vez homogeneizadas las heces, se centrifugó la solución fecal dividida en dos tubos de centrífuga de 250 ml a 500 G durante un minuto (Figura 1) (De Boever et al., 2000). Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se desechó el *pellet*.



Figura1. Tubos de centrífuga con la solución fecal tras la centrifugación.

3.2.2. Tratamiento de la solución fecal con los criopreservantes para su estudio a diferentes tiempos de conservación.

En la solución fecal se aplicaron 4 condiciones de tratamiento diferentes. Para ello inicialmente se prepararon cuatro tubos con 50 g de sobrenadante de la solución fecal. Cada tubo fue tratado con un criopreservante diferente, obteniendo así las cuatro condiciones diferentes a ensayar:

- Condición 1: Sin tratamiento. 50 g íntegros de solución fecal.
- Condición 2: DMSO 8%. 4 g de DMSO y 46 g de solución fecal.
- Condición 3: DMSO 10%. 5 g de DMSO y 45 g de solución fecal
- Condición 4: Glicerol 10%. 5 g de DMSO y 45 g de solución fecal.

Posteriormente, una vez preparadas las diferentes condiciones del estudio, la solución fecal se separó en 9 alícuotas de 4 g de cada una de ellas.

- Una alícuota para el recuento a tiempo=0.
- Dos alícuotas para el recuento a tiempo=1 (Réplica A y B).
- Dos alícuotas para el recuento a tiempo=2 (Réplica A y B).
- Dos alícuotas para el recuento a tiempo=3 (Réplica A y B).
- Dos alícuotas para el recuento a tiempo=4 (Réplica A y B).

A continuación, se presenta una tabla con las referencias de las muestras (Tabla 1).

Tiempo (MESES)	Sin tratamiento (1)		DMSO 8% (2)		DMSO 10% (3)		Glicerol 10% (4)	
0	1t=0		2t=0		3t=0		4t=0	
1	1t=1A	1t=1B	2t=1A	2t=1B	3t=1A	3t=1B	4t=1A	4t=1B
2	1t=2A	1t=2B	2t=2A	2t=2B	3t=2A	3t=2B	4t=2A	4t=2B
3	1t=3A	1t=3B	2t=3A	2t=3B	3t=3A	3t=3B	4t=3A	4t=3B
4	1t=4A	1t=4B	2t=4A	2t=4B	3t=4A	3t=4B	4t=4A	4t=4B

Tabla 1. Referencias de las muestras de solución fecal empleadas en los recuentos.

Con el objetivo de realizar el recuento de la solución fecal a tiempo 0, en las distintas condiciones estudiadas las alícuotas fueron diluidas al 20% añadiendo 4 ml de tioglicolato en cada una de ellas. El resto de alícuotas fueron congeladas a -80 °C para los próximos recuentos, manteniendo la dilución al 40% para disminuir los posibles efectos negativos de los crioprotectores y la dilución al 20% tras descongelación y justo antes del ensayo microbiológico.

3.2.3. Preparación y conservación de la solución fecal para la inoculación de los reactores del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica.

Para la inoculación de los reactores del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica se volvió a preparar la solución fecal. Para ello se llevó a cabo la recogida de 60g de muestras de heces tal y como está indicado en el punto 1.1. del apartado de “Material y métodos”.

Previamente a la preparación de la solución fecal, se prepararon 200 ml de medio tioglicolato (regenerado en baño para la eliminación del O₂). Los 60 g de heces fueron diluidos en 150 ml de tioglicolato regenerado para obtener la solución fecal al 40%. La suspensión fue homogeneizada y posteriormente centrifugada durante 1 minuto a 500 G (De Boever et al., 2000). Tras la centrifugación se desechó el *pellet* y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante recuperado se dividió en dos frascos estériles con 72 ml de solución fecal cada uno. Cada una de las dos muestras obtenidas fue tratada con 10% de glicerol (crioprotector, elegido como el óptimo de las cuatro condiciones ensayadas).

Con el objetivo de realizar el recuento de la solución fecal a tiempo 0, se cogió una alícuota de cada muestra y se diluyeron al 20% con tioglicolato. El resto de muestras de solución fecal al 40% fueron congeladas a -80 °C durante 15 días para la posterior inoculación en los reactores del digestor *in vitro* de fermentación colónica.

3.2.4. Calendario del experimento.

Los recuentos de los diferentes microorganismos indicadores, para el ensayo de las diferentes condiciones y posterior selección del tratamiento óptimo para la crioprotección de la muestra fecal, fueron realizados en cinco tiempos diferentes, aproximadamente el mismo día en cada mes. El inicio del ensayo tuvo lugar en el mes de marzo y finalizó en el mes de Julio de 2018

3.2.5. Procedimiento para los ensayos de recuento microbiológico.

3.2.5.1. Transporte de las muestras.

Las muestras fueron transportadas desde los laboratorios de AINIA, situados en el Parque Tecnológico de Paterna (Valencia), a los laboratorios de la Universidad Politécnica de Valencia en nevera refrigerada, manteniéndose en frío durante el trayecto mediante el empleo de acumuladores de frío.

3.2.5.2. Método de recuento de microorganismos.

Como microorganismos indicadores se utilizaron las enterobacterias, las bifidobacterias, las enterobacterias, los lactobacilos y los clostridios.

Tras la descongelación, las muestras se diluyeron al 20% con tioglicolato, se diluyeron 1:10 (1 ml de solución fecal en 9 ml de agua de peptona), y posteriormente se prepararon diluciones decimales de cada muestra (Figura2). El cálculo del número de las unidades formadoras de colonias por mililitro de solución fecal (UFC/ml sol. fecal) de los distintos microorganismos estudiados se realizaron mediante cultivo en los distintos medios sólidos selectivos por duplicado. Las bacterias anaerobias totales se sembraron mediante siembra en profundidad en Agar Schaedler (Laboratorios Conda S.A., Pronisa, Madrid), las bifidobacterias en Agar TOS-Propionato (Laboratorios Conda S.A., Pronisa, Madrid, España) y posterior incubación en atmósfera anaeróbica a 37°C durante 72 h. Las enterobacterias se sembraron en Agar McConkey (Liofichem, Rosetodegli Abruzzi, Teramo, Italia) y posteriormente se incubaron en atmósfera aeróbica a 37°C durante 24 h. Los lactobacilos se cultivaron en Agar MRS (Liofilchem, Rosetodegli Abruzzi, Teramo, Italia) después de la siembra en superficie y posterior incubación a 37°C durante 48 h. Por último, los clostridios se cultivaron en Agar TSC (Scharlab S.L., Scharlau, Barcelona, España) tras siembra en profundidad y posterior incubación a 37°C durante 48 h. Los recuentos se realizaron inmediatamente después de retirar las placas de la incubadora (Figura 3).

Para la incubación anaerobia de los microorganismos estudiados se emplearon jarras (ThermoScientific™ Oxoid™) y cajas (BD GasPak™EZ). Para la generación del ambiente anaeróbico se emplearon sobres de anaerobiosis (ThermoScientific™ Sobre de 2.5 l Oxoid™ AnaeroGen™).

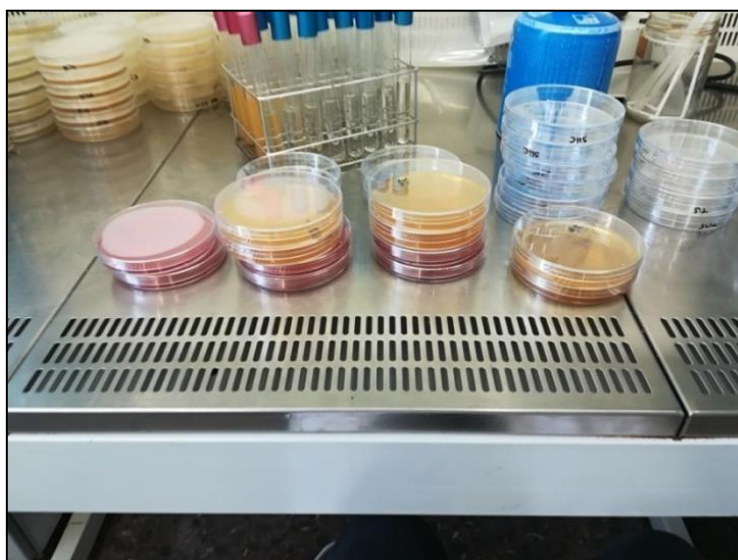


Figura 2. Parte del material necesario para el cultivo de microorganismos.

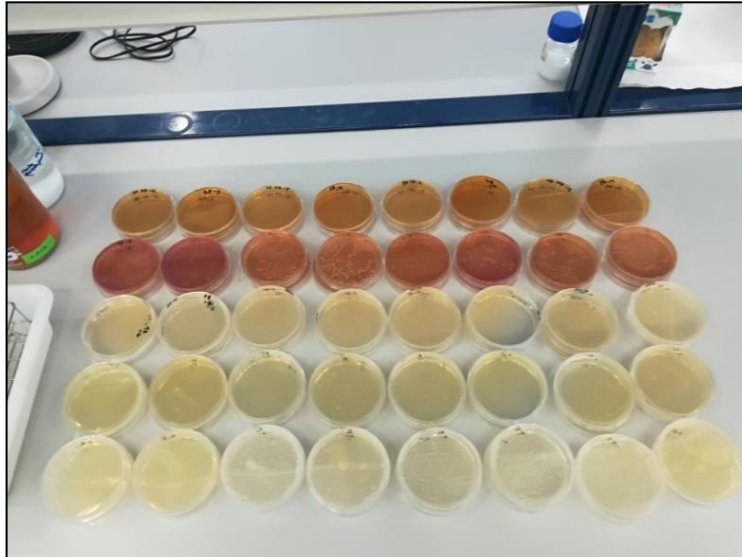


Figura 3. Placas seleccionadas para el recuento de microorganismos indicadores.

3.2.6. Aislamiento y conservación de cepas para posteriores estudios.

Una vez realizados los recuentos en los distintos medios se seleccionaron aleatoriamente entre 2 y 5 colonias de diferente aspecto y morfología para conservarlas a -20 °C en crioviales (Microbank™) para su posterior utilización en ensayos de filogenia.

3.2.7. Extracción de ADN para posteriores estudios.

Para posteriores ensayos metagenómicos, se aisló ADN en cada recuento de las réplicas A de cada una de las diferentes condiciones. Para el aislamiento del ADN se utilizó el Kit Spin FoodStool© de REALPURE.

El ADN extraído se guardó a -20°C para posteriores ensayos con el fin de comprobar si, a pesar de que la concentración de los microorganismos presentes en las muestras de solución crioconservadas se mantiene, también se mantienen las diferentes especies de los microorganismos o, por el contrario, hay unas más resistentes al tratamiento que otras.

3.2.8. Estudio de fermentación colónica en los reactores del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica.

3.2.8.1. Descripción del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica y de la metodología de ensayo.

El equipo destinado a la simulación del proceso de digestión del intestino grueso es el Digestor *in vitro* de fermentación colónica, disponible en AINIA. Dicho equipo está constituido por cinco reactores, estómago (R1), intestino delgado (R2), colon ascendente (R3), transversal (R4) y descendente (R5), conteniendo los últimos 3 reactores una alta densidad de microbiota activa de origen humano, tal y como se muestra en la figura 4.

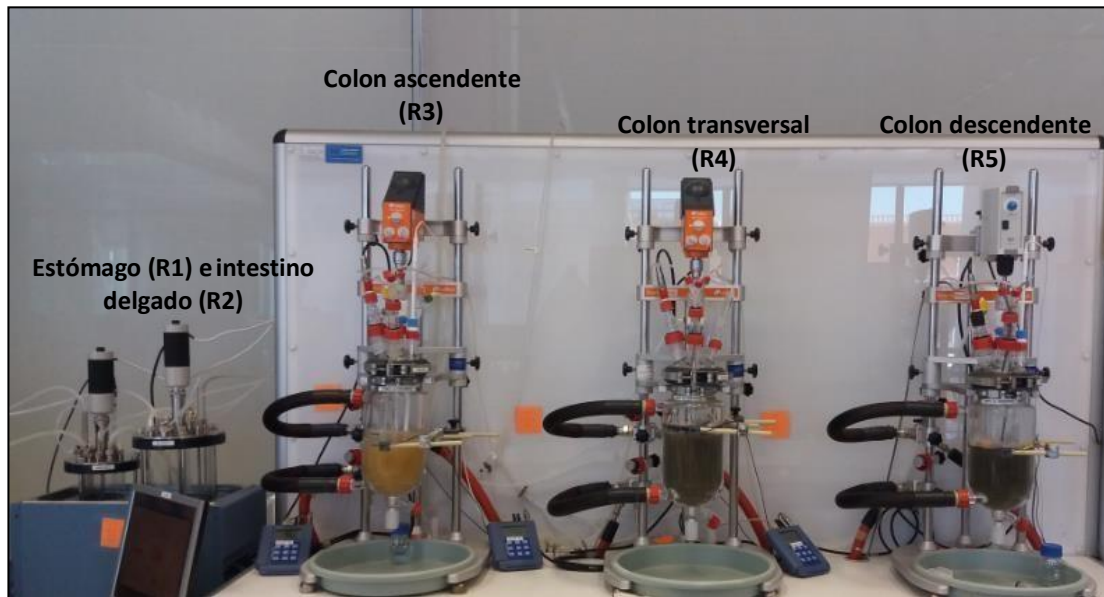


Figura 4. Imagen del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica.

La descripción del funcionamiento del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica y el diseño del crecimiento de la microbiota fecal es la siguiente:

La puesta a punto de los experimentos es la descrita por Van de Wiele et al. (2007) y Marzorati et al. (2010) ligeramente modificados. Los tres reactores del colon se inocularon con una solución fecal al 20% de bacterias de muestras fecales de voluntarios adultos sanos, población microbiana que se asemeja a la que se encuentra en el tracto gastrointestinal humano. Se preparó y esterilizó en autoclave el medio de cultivo necesario para llenar los reactores 3, 4 y 5, respectivamente). Previo a su inoculación en el sistema, se preparó y esterilizó en autoclave el medio de cultivo, tomando como referencia los trabajos de Molly et al. (1993, 1994), medio que incluye todos los componentes nutritivos necesarios para simular las condiciones del colon humano y permitir el crecimiento de la microbiota intestinal.

Las bacterias presentes en cada fase del colon tienen un pH óptimo de actuación siendo el pH en el colon ascendente de 5,5-6; en el colon transversal de 6-6,4 y en el colon descendente de 6,4-6,8. Con el fin de regular los cambios de pH que se producen durante la digestión y mantenerlos en los intervalos óptimos para cada fase, se incorporó ácido o base a cada uno de los reactores. Durante todo el proceso de digestión la temperatura se mantuvo controlada a 37°C en todas las etapas del proceso, ya que temperaturas diferentes pueden afectar al crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Las bombas conectadas al estómago y al intestino delgado trabajaron de forma semicontinua, mientras que el funcionamiento del sistema del colon ascendente, transversal y descendente se llevó a cabo en un modo continuo, simulando las condiciones reales del tracto digestivo. Todo el sistema de reacción se mantuvo en condiciones de anaerobiosis.

3.2.8.2. Procedimiento de inoculación de solución fecal.

Las muestras de heces utilizadas para el ensayo de fermentación colónica pertenecían a un grupo de voluntarios de hombres y mujeres sanos de entre 35 y 45 años (tal y como está indicado en el punto 1.1. del apartado de “Material y métodos”). La recolección de las muestras de heces se llevó a cabo en recipientes estériles, se preparó una solución fecal al 40% con tioglicolato, se homogeneizó en un *stomacher* durante 60 s y se centrifugó a 500G durante 1 minuto con el fin de retirar el material particulado (De Boever et al., 2000). Los sobrenadantes obtenidos se agruparon, se incorporó glicerol al 10% y se congeló la solución fecal a -80°C. Tras 15 días de congelación, se preparó la solución fecal al 20% a partir de la solución fecal al 40% y con 10% de glicerol congelada.

3.2.8.3. Duración del proceso.

Durante un periodo de 9 días, se llevó a cabo la estabilización de la microbiota fecal humana en el colon ascendente, transversal y descendente. Durante este periodo, la microbiota se tuvo que adaptar a las condiciones *in vitro* impuestas hasta alcanzar niveles estables de microorganismos presentes en cada región específica del colon.

3.2.8.4. Método de recuento de microorganismos.

Los recuentos se realizaron para los cinco grupos de microorganismos indicadores: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, anaerobios totales y enterobacterias. Con el fin de llevar a cabo el recuento de microorganismos durante el periodo de estabilización de la fermentación colónica, se ha llevado a cabo la toma de alícuotas de 5 ml (por duplicado) de forma aséptica en cada uno de los tres reactores del colon en los siguientes tiempos: tiempo 0 (solución fecal), tiempo 1 (tras 5 días de estabilización) y tiempo 2 (tras 9 días de estabilización) (Tabla 2). Para llevar a cabo el recuento de los microorganismos se utilizó el medio y el método de siembra indicado anteriormente en el punto 1.2.5.2 del apartado de “Material y métodos”.

Preparación solución fecal.	Réplica A t=0			Réplica B t=0		
Inoculación en fermentador.	Únicamente se ensayó una muestra, que era la solución fecal que se iba a introducir en el Digestor <i>in vitro</i> de Fermentación Colónica. Se referenció como: inocul. Ferm.					
5 días	R3(16/7/18) Réplica A	R3(16/7/18) Réplica B	R4(16/7/18) Réplica A	R4(16/7/18) Réplica B	R5(16/7/18) Réplica A	R5(16/7/18) Réplica B
9 días	R3(20/7/18) Réplica A	R3(20/7/18) Réplica B	R4(20/7/18) Réplica A	R4(20/7/18) Réplica B	R5(20/7/18) Réplica A	R5(20/7/18) Réplica B

Tabla 2. Referencias de las muestras de solución fecal empleadas y extraídas en el Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica.

3.2.9. Análisis estadístico de los datos.

Los datos experimentales obtenidos, se procesaron con la ayuda de los programas informáticos Microsoft Office Excel 2007, GraphPad Prism 5.03 y Statgraphics Centurion. Las diferencias de la viabilidad de los microorganismos analizada en los cinco tiempos, en las cuatro condiciones estudiadas, se analizaron mediante el análisis de varianzas ANOVA de dos o más variables, en función del estudio, con test de ajuste de corrección de Bonferroni. El valor establecido para el nivel de significación estadística fue de $p\text{-value} < 0,05$. Para comparar la viabilidad a cada tiempo en función del tratamiento se hizo una ANOVA multivariante y para comparar las diferencias de viabilidad entre tratamientos, se hizo un ANOVA simple. Se estudió cada microorganismo por separado y se identificó como diferencia significativa un $p\text{-value} < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente apartado se van a describir los resultados obtenidos en el trabajo. Estos resultados se presentan en tres apartados bien definidos: a) Estudio bibliográfico b) Estudio de viabilidad de los microorganismos indicadores y c) Estudio de la inoculación en Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica.

4.1. Estudio bibliográfico.

Puesto que el objetivo principal de este ensayo era diseñar un protocolo de crioconservación de muestras fecales, la primera decisión tomada fue el tratamiento o tratamientos a los que se iba a someter la muestra de solución fecal en base a la bibliografía revisada. Finalmente, se decidió que la muestra fecal iba a estudiarse en cuatro condiciones diferentes: sin tratamiento, DMSO 8%, DMSO 10% y Glicerol 10%. Se eligieron estos crioconservantes puesto que eran los que habían dado mejores resultados en estudios anteriores y las concentraciones se decidieron en función a las concentraciones usadas con anterioridad y en función a la posible toxicidad del crioconservante (Tabla 3).

CONDICIONES CRIOCONSERVACIÓN		
Crioconservante	Porcentaje	Referencia
DMSO	5%	García et al., 2017; Kerckhof et al., 2014; Schneider et al., 2017.
	8%	
	10%	
Glicerol	10%	García et al., 2017; Aguirre et al., 2015.
	12.5%	
	15%	

Tabla 3. Crioprotectores y concentración elegidos en función a la bibliografía revisada.

También fue necesario seleccionar cuáles iban a ser los microorganismos indicadores. Para ello se seleccionaron los microorganismos predominantes de la microbiota intestinal para el cultivo en medios de crecimiento y posterior estudio de viabilidad. Los microorganismos elegidos fueron los siguientes: lactobacilos, bifidobacterias, clostridios, enterobacterias y anaerobios estrictos totales (Carroll et al., 2010; Jiang et al., 2016).

Por último, se estudió la forma de preparación de la solución fecal a partir de las muestras de heces. Tras la revisión bibliográfica, se seleccionaron tres posibles formas de preparación de la solución fecal, de entre las que, finalmente, se seleccionó el tioglicolato como diluyente (Tabla 4). La solución fecal se preparó al 40% puesto que, de esta forma, el efecto tóxico de los

criocorservantes se vería reducido durante la congelación a -80°C . Para el cultivo en placa, la solución fecal se volvió a diluir hasta el 20%.

CONDICIÓN	PREPARACIÓN	REFERENCIA
1	60 gr muestra + 300 ml tioglicolato → 360 ml aprox. solución fecal. (20%)	De Boever et al., 2000
2	60 g muestra + 60 ml sol. salina → 120 ml aprox. solución fecal. (50%).	Hamilton et al., 2012
3	60 g muestra + 24 ml diasylato → 84 ml aprox. solución fecal. (25%)	Aguirre et al., 2014

Tabla 4. Posibles condiciones de preparación de la solución fecal. Resaltada la condición seleccionada para el ensayo.

4.2. Estudios de viabilidad de los microorganismos indicadores.

4.2.1. Estudio de viabilidad a lo largo del tiempo de crioconservación.

En este proyecto se ha estudiado la viabilidad de cinco microorganismos indicadores como se ha explicado en el punto 4.1. del apartado “Resultados y discusión”. El estudio de viabilidad se ha llevado a cabo en cinco momentos diferentes en un intervalo de cuatro meses y los datos descriptivos de las variables estudiadas, se presentan como medias logarítmicas acompañadas de su error estándar (Tabla 5). Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se ha realizado una ANOVA multivariante (UFC, tiempo y tratamiento) para cada microorganismo, en el que se han obtenido las gráficas que se muestran a continuación (Figuras 5 a 9). Es importante indicar que, los puntos a tiempo 2, se deben tener en cuenta con cautela puesto que los valores obtenidos no concuerdan con los esperados, siendo más bajos que a tiempo 4 para todos los géneros, que fue el último tiempo en el que se hizo el recuento.

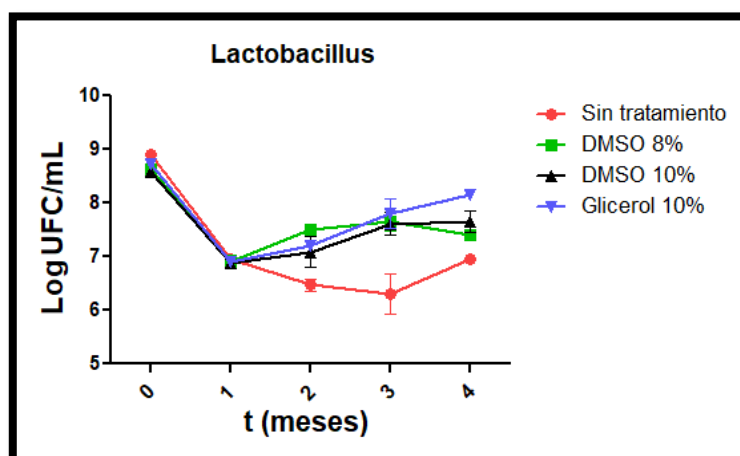


Figura 5. Evolución del género *Lactobacillus* a lo largo del tiempo en las cuatro condiciones diferentes ensayadas.

En la gráfica podemos observar que hay una clara disminución en las órdenes del género *Lactobacillus* (Tabla 5) del tiempo 0 al tiempo 1. Al tratarse de microorganismos anaerobios facultativos, se esperaba que la disminución entre el tiempo 0 y el tiempo 1 fuera menos drástica que para los microorganismos anaerobios estrictos, ya que no les afecta estar en aerobiosis durante la manipulación y preparación de la muestra. Una posible explicación es que los lactobacilos son más sensibles al efecto del crioprotector y al efecto del tioglicolato utilizado para la preparación de la solución fecal. Observamos que a partir del primer mes hay una estabilización en el número de órdenes (Tabla 5) y el tratamiento de la muestra con todos los conservantes aumenta el número de *Lactobacillus* con respecto a las muestras sin tratar de forma significativa (p valor <0.05) tras la congelación durante 1, 2, 3 o 4 mes, no siendo significativas las diferencias entre los distintos criopreservantes.

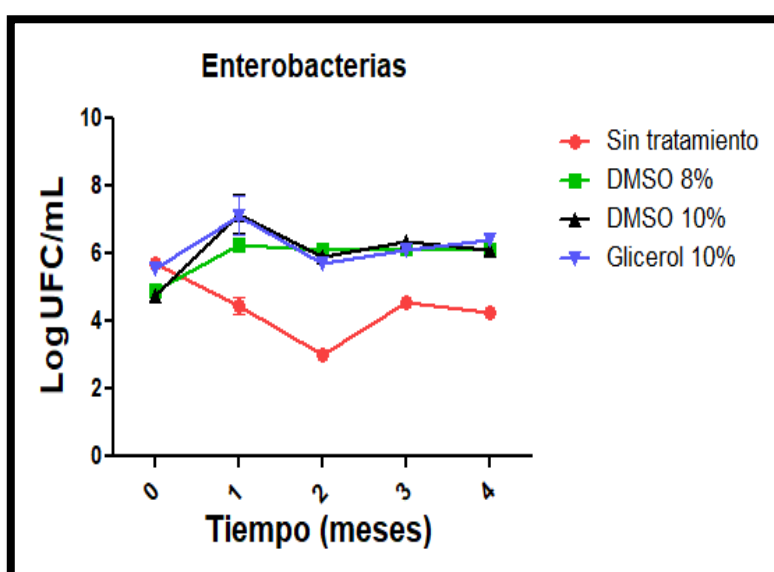


Figura 6. Evolución de las enterobacterias a lo largo del tiempo en las cuatro condiciones diferentes ensayadas.

En este caso, observamos que, a diferencia de los lactobacilos, los órdenes normales de enterobacterias en la composición de la microbiota intestinal en un individuo sano a tiempo 0 (Carroll et al., 2010; Jiang et al., 2016) no varían notablemente con los órdenes obtenidos en el tiempo 1 (Tabla 5). Esto se debe a que no les afecta estar en presencia de oxígeno durante la preparación de la solución fecal y que son más resistentes al efecto del crioprotector y el tioglicolato. También se observa un aumento de la población con criopreservante (p -value <0.05) tras la congelación durante 1, 2, 3 o 4 meses, no siendo significativas las diferencias entre los distintos criopreservantes.

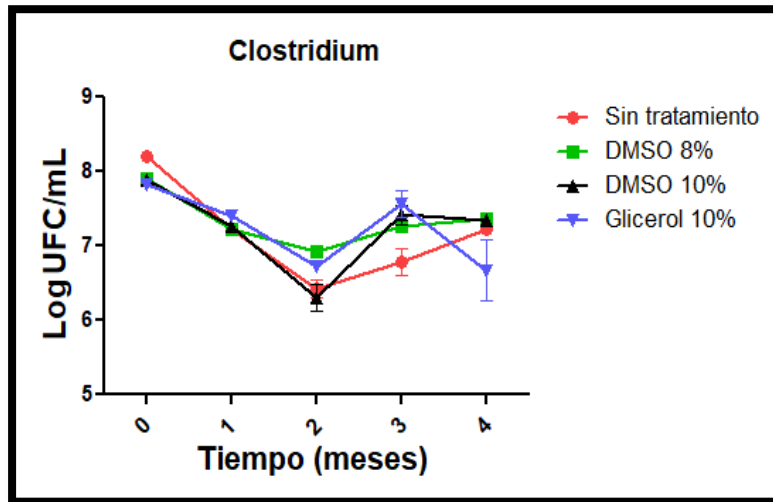


Figura 7. Evolución del género *Clostridium* lo largo del tiempo en las cuatro condiciones diferentes ensayadas.

En el género *Clostridium*, también vemos una disminución significativa ($p\text{-value} < 0,05$) de los valores de viabilidad de los microorganismos obtenidos a tiempo 0 y a tiempo 1 (Tabla 5). Observamos que a partir del primer mes ya hay cierta estabilización en la viabilidad de los microorganismos.

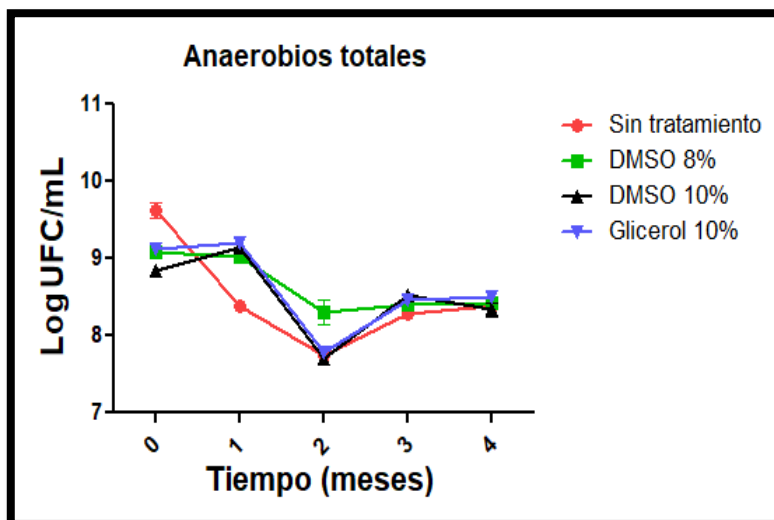


Figura 8. Evolución de los anaerobios totales a lo largo del tiempo en las cuatro condiciones diferentes ensayadas.

En esta gráfica podemos ver que el tiempo afecta de forma significativa ($p\text{-value} < 0,05$) a la viabilidad de los microorganismos anaerobios. Puesto que se trata de microorganismos anaerobios estrictos, se ven afectados durante la manipulación de las muestras, por lo que los valores se ven reducidos de manera notoria (Tabla 5). Además, las condiciones de cultivo los anaerobios estrictos son muy exigentes, lo que dificulta su cultivo y posterior crecimiento en

medios de cultivo. No obstante, podemos observar que, entre el primer mes de congelación y el segundo mes de congelación, los microorganismos se empiezan a estabilizar. Los criopreservantes no tienen efecto claro en mantener la viabilidad de anaerobios totales.

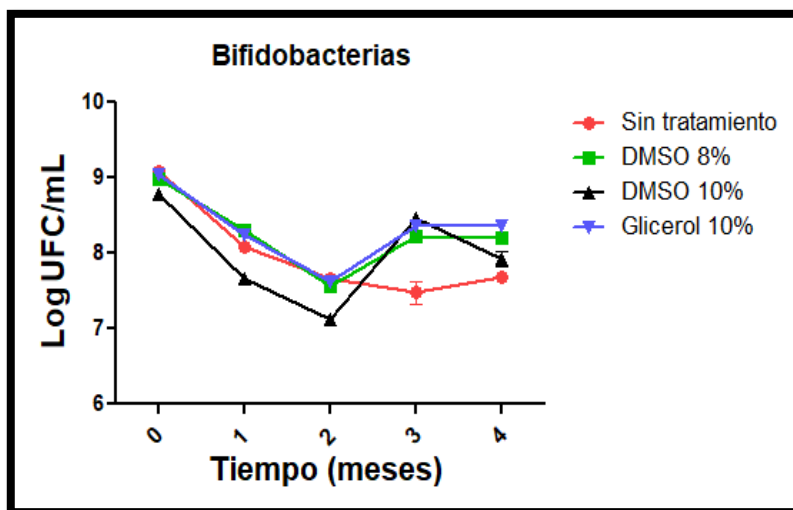


Figura 9. Evolución del género *Bifidobacterium* lo largo del tiempo en las cuatro condiciones diferentes ensayadas.

El género *Bifidobacterium* también presenta una reducción notable en los microorganismos contados a tiempo 0 respecto a los contados a tiempo 1 (Tabla 5), siendo esta reducción de viabilidad de los microorganismos a lo largo del primer mes de criopreservación significativa ($p\text{-value}<0,05$). Esto, puede deberse a que también son microorganismos anaerobios y disminuye drásticamente su viabilidad durante la preparación y manipulación de las muestras. Por otro lado, podemos observar que, a partir del primer mes, los recuentos de bifidobacterias tienden a estabilizarse.

Los resultados obtenidos respecto a la disminución o aumento de los microorganismos eran de esperar puesto que, en estudios realizados con anterioridad relacionados con la viabilidad de los microorganismos a largo plazo (Kerckhof et al., 2014; Jiang et al., 2016) obtuvieron unos resultados similares.

El tiempo de criopreservación, por tanto, afecta la viabilidad de los microorganismos indicadores, que empiezan a estabilizarse a partir del primer mes. Esto nos indica que es mejor no utilizar las muestras congeladas directamente, sino que, para un resultado relevante, es mejor congelar las muestras y una vez se hayan estabilizado los microorganismos a partir del mes de congelación, hacer uso de éstas. Podemos indicar por tanto que, los resultados serán reproducibles a partir del primer mes de criopreservación

En este apartado, se ha demostrado la influencia de los criopreservantes en algunos géneros, pero el efecto de un mismo criopreservante en función del tiempo no se ha podido apreciar claramente. En el próximo apartado se hace una valoración general del conservante en los principales géneros, dejando de lado la variable tiempo.

4.2.3. Estudio de viabilidad según tratamiento.

Puesto que el objetivo del proyecto es determinar cuál es el mejor tratamiento de las muestras fecales para su posterior crioconservación, se muestran a continuación los resultados obtenidos al comparar los distintos tratamientos ensayados, siendo la condición 1 sin tratamiento, la condición 2 con DMSO 8%, la condición 3: DMSO 10% y la condición 4 con Glicerol al 10% (Figuras 10 a 12). Es importante destacar que la comparación entre tratamientos se ha realizado en función de los lactobacilos, los anaerobios estrictos totales y las bifidobacterias puesto que son los microorganismos que se encuentran en mayor proporción en la microbiota gastrointestinal (Leiva Gea, 2014) (Tabla5).

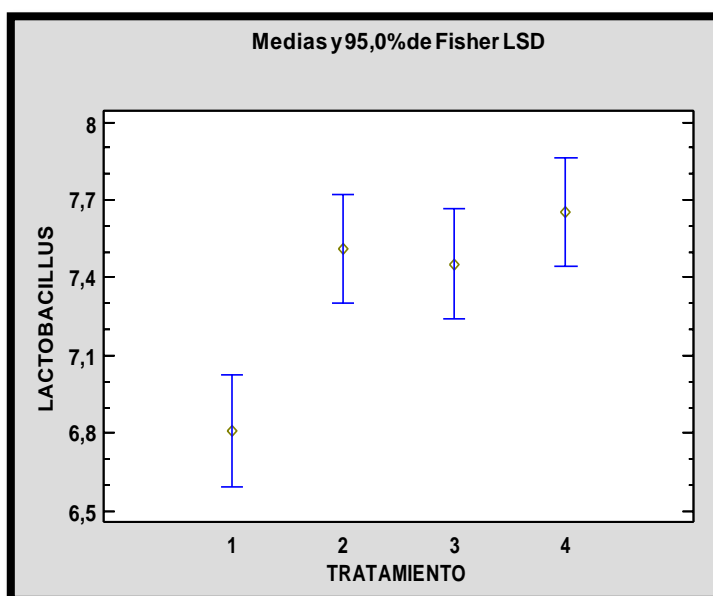


Figura 10. Viabilidad del género *Lactobacillus* según el tratamiento. (1: Sin tratamiento; 2: DMSO 8%; 3: DMSO 10%; 4: Glicerol 10%).

Observamos en la gráfica una diferencia significativa en la viabilidad del género *Lactobacillus* entre las muestras tratadas con algún crioconservante y la muestra no tratada ($p\text{-value} < 0,05$). Mientras que en las muestras tratadas con crioconservantes, no se observa una significación estadística entre ellas ($p\text{-value} > 0,05$), esto indica que el efecto del crioconservante, independientemente del usado, tiene efecto sobre la muestra manteniendo los valores de los recuentos más altos a lo largo del tiempo que en el caso de no utilizar crioconservante.

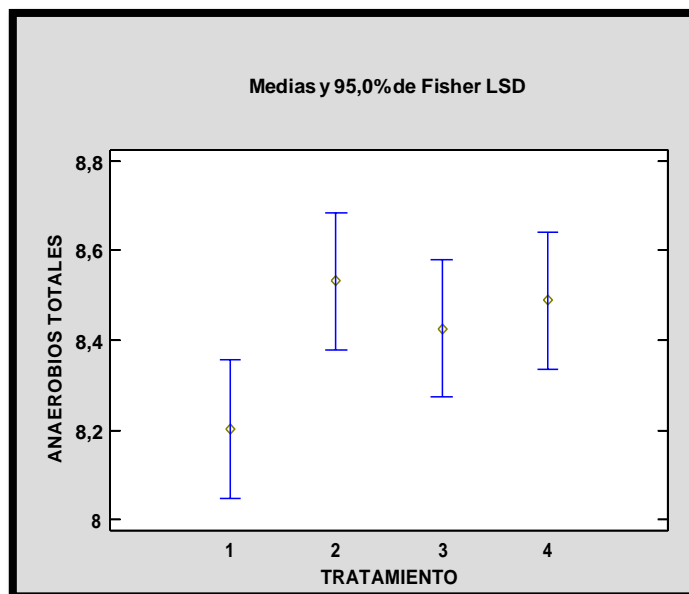


Figura 11. Viabilidad de los anaerobios estrictos totales según el tratamiento. (1: Sin tratamiento; 2: DMSO 8%; 3: DMSO 10%; 4: Glicerol 10%).

En cuanto a los microorganismos anaerobios estrictos, también podemos observar una diferencia significativa ($p\text{-value} < 0,05$) entre la muestra no tratada y las muestras tratadas con DMSO a diferente concentración (8% y 10%) y Glicerol al 10%. Al comparar tratamientos con crioprotectores, tampoco encontramos significación estadística ($p\text{-value} > 0,05$).

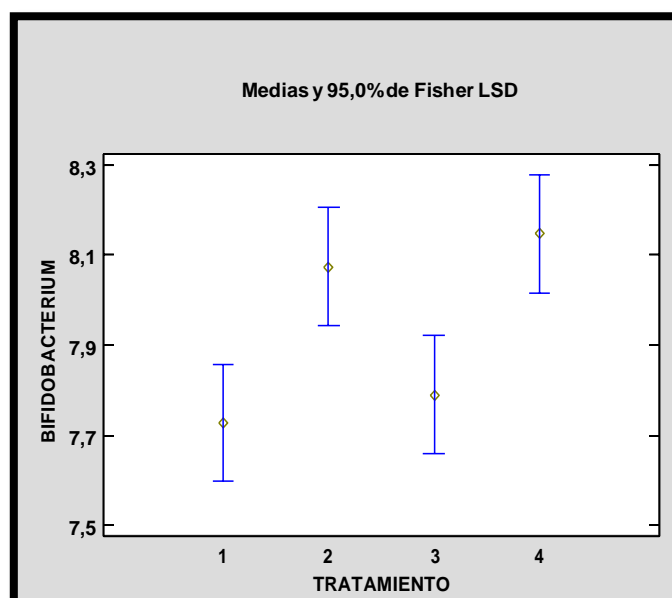


Figura 12. Viabilidad del género *Bifidobacterium* según el tratamiento. (1: Sin tratamiento; 2: DMSO 8%; 3: DMSO 10%; 4: Glicerol 10%).

Por último, en la evolución de la viabilidad del género *Bifidobacterium* también se encuentra una diferencia con significación estadística ($p\text{-value} < 0,05$) entre las muestras tratadas con crioprotectores y la muestra no tratada. Al comparar la viabilidad de las muestras tratadas observamos que, entre la muestra tratada con DMSO 8% y la muestra tratada con Glicerol 10% no hay significación estadística ($p\text{-value} > 0,05$). Por otro lado, al comparar la muestra tratada con DMSO 10% con las otras dos muestras tratadas, observamos una diferencia con significación estadística ($p\text{-value} < 0,05$), lo que nos indica que el DMSO al 10% ejerce un efecto sobre la viabilidad de las bifidobacterias disminuyéndola, no así al 8%.

Por tanto, como conclusión, podemos indicar que el tratamiento con alguna sustancia crioprotectora a la hora de preservar la microbiota fecal congelada a -80° es vital para mantener la viabilidad a largo plazo de los microorganismos que la componen. Por otra parte, también es importante destacar la importancia de la concentración del crioprotector, puesto que, en algunas ocasiones puede resultar tóxico y disminuir la viabilidad de los microorganismos, no cumpliendo con el objetivo de mantener en la medida de lo posible los órdenes de estos. Por esto, si el resultado entre una concentración mayor y una menor no tiene diferencia significativa ($p\text{-value} < 0,05$) será mejor utilizar el crioprotector a la concentración menor, puesto que de esta manera evitamos posibles efectos detoxicidad.

En cuanto a qué crioprotector resulta más adecuado, observamos que tanto el tratamiento con DMSO 8% como el tratamiento con Glicerol 10% presenta buenos resultados en cuanto a mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos indicadores (Aguirre et al., 2015; Garci et al., 2017; Schneider et al., 2017).

Finalmente, para el ensayo en el Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica, se eligió la condición 4 (Glicerol 10%) puesto que la media de viabilidad de los microorganismos utilizando este tratamiento, era ligeramente superior en comparación al tratamiento número 2 (DMSO 8%).

		MICROORGANISMOS (UFC/ml de solución fecal 20%)														
		Lactobacillus (MRS)			Enterobacterias (McConkey)			Clostridium (TSC)			Anaerobios totales (SCH)			Bifidobacterium (TOS)		
TRATAMIENTO	TIEMPO (MESES)	Media UFC	Media log.	Des. Est. log	Media UFC	Media log.	Des. Est. Log.	Media UFC	Media log.	Des. Est. Log.	Media UFC	Media log.	Des. Est. Log.	Media UFC	Media log.	Des. Est. Log.
Sin tratamiento (1)	0	8,25E+08	8,91	0,09	5,05E+05	5,69	0,13	1,57E+08	8,20	0,00	4,40E+09	9,63	0,14	1,21E+09	9,08	0,09
	1	9,30E+06	6,96	0,08	4,25E+04	4,44	0,51	1,73E+07	7,23	0,09	2,51E+08	8,39	0,13	1,24E+08	8,10	0,07
	2	3,28E+06	6,47	0,23	1,00E+03	6,42	0,24	2,97E+06	6,42	0,24	5,64E+07	7,75	0,01	4,70E+07	7,67	0,08
	3	4,68E+06	6,30	0,74	3,75E+04	4,54	0,22	7,58E+06	6,78	0,34	1,95E+08	8,29	0,07	3,50E+07	7,48	0,29
	4	9,20E+06	6,96	0,02	1,85E+04	4,25	0,13	1,72E+07	7,23	0,08	2,43E+08	8,39	0,02	4,76E+07	7,68	0,01
DMSO 8% (2)	0	4,35E+08	8,64	0,04	8,00E+04	4,90	0,08	8,10E+07	7,91	0,01	1,22E+09	9,09	0,01	9,70E+08	8,99	0,03
	1	9,05E+06	6,91	0,23	1,86E+06	6,26	0,08	1,73E+07	7,23	0,09	1,05E+09	9,02	0,05	2,10E+08	8,31	0,11
	2	3,27E+07	7,51	0,04	1,55E+06	6,91	0,06	8,30E+06	6,92	0,06	2,36E+08	8,30	0,33	3,65E+07	7,56	0,08
	3	5,71E+07	7,66	0,35	1,53E+06	6,18	0,03	1,82E+07	7,26	0,01	2,50E+08	8,39	0,06	1,72E+08	8,23	0,09
	4	2,63E+07	7,41	0,12	1,43E+06	6,13	0,18	2,32E+07	7,36	0,06	2,70E+08	8,42	0,14	1,60E+08	8,20	0,01
DMSO 10% (3)	0	3,85E+08	8,60	0,11	5,50E+04	4,74	0,06	7,70E+07	7,89	0,02	6,85E+08	8,84	0,01	6,25E+08	8,79	0,07
	1	7,80E+06	6,89	0,09	7,52E+07	7,17	1,16	3,93E+08	7,74	0,96	1,37E+09	9,14	0,03	4,65E+07	7,66	0,09
	2	2,11E+07	7,09	0,57	9,90E+05	6,30	0,36	2,57E+06	6,30	0,36	5,00E+07	7,70	0,01	1,35E+07	7,12	0,12
	3	5,80E+07	7,61	0,44	2,49E+06	6,37	0,17	3,02E+07	7,42	0,26	3,37E+08	8,53	0,01	2,93E+08	8,46	0,10
	4	6,06E+07	7,655	0,40	1,26E+06	6,10	0,02	2,22E+07	7,35	0,04	2,34E+08	8,34	0,18	8,93E+07	7,92	0,19
Glicerol 10% (4)	0	5,35E+08	8,72	0,11	3,65E+05	5,56	0,04	6,65E+07	7,83	0,02	1,34E+09	9,13	0,03	1,10E+09	9,04	0,05
	1	7,93E+06	6,90	0,04	6,37E+07	7,13	1,12	2,66E+07	7,40	0,15	1,63E+09	9,21	0,01	1,72E+08	8,23	0,05
	2	1,59E+07	7,20	0,04	5,75E+05	6,72	0,14	5,45E+06	6,72	0,14	5,97E+07	7,78	0,01	4,31E+07	7,62	0,12
	3	1,07E+08	7,81	0,55	1,36E+06	6,13	0,08	4,67E+07	7,57	0,35	2,94E+08	8,47	0,06	2,39E+08	8,37	0,08
	4	1,47E+08	8,17	0,02	2,55E+06	6,40	0,11	1,28E+07	6,67	0,83	3,18E+08	8,50	0,02	2,29E+08	8,36	0,04

Tabla 5. Resultados de los recuentos de los diferentes microorganismos indicadores en los cinco tiempos y condiciones diferentes ensayadas.

		MICROORGANISMOS REACTOR (LogUFC/ g heces)														
		<i>Lactobacillus</i>			Enterobacterias			<i>Bifidobacterium</i>			Anaerobios totales			<i>Clostridium</i>		
		Media	SD	n	Media	SD	n	Media	SD	n	Media	SD	n	Media	SD	n
REACTOR 3	CONTROL	10,11	0,09	4,00	7,07	0,02	4,00	9,23	0,02	4,00	9,23	0,05	4,00	9,60	0,07	4,00
	Inoculación	8,34	0,01	2,00	6,63	0,16	2,00	8,96	0,08	2,00	9,07	0,04	2,00	8,84	0,02	2,00
	5 días	8,76	0,07	4,00	6,69	0,08	4,00	6,01	0,14	4,00	8,90	0,06	4,00	9,01	0,09	4,00
	9 días	6,27	0,20	4,00	7,26	0,02	4,00	6,60	1,08	4,00	7,19	0,08	4,00	7,12	0,04	4,00
REACTOR 4	CONTROL	10,11	0,09	4,00	7,07	0,02	4,00	9,23	0,02	4,00	9,23	0,05	4,00	9,60	0,07	4,00
	Inoculación	8,34	0,01	2,00	6,63	0,13	2,00	8,96	0,08	2,00	9,07	0,04	2,00	8,84	0,02	2,00
	5 días	9,46	0,28	4,00	6,03	0,16	4,00	6,4	0,13	4,00	9,38	0,01	4,00	8,9	0,01	4,00
	9 días	8,01	0,08	4,00	7,11	0,02	4,00	6,43	0,65	4,00	8,46	0,06	4,00	7,29	0,02	4,00
REACTOR 5	CONTROL	10,11	0,05	4,00	7,07	0,01	4,00	9,23	0,01	4,00	9,23	0,03	4,00	9,60	0,04	4,00
	Inoculación	8,34	0,01	2,00	6,63	0,11	2,00	8,96	0,06	2,00	9,07	0,03	2,00	8,84	0,02	2,00
	5 días	9,08	0,01	4,00	6,03	0,07	4,00	6,17	0,01	4,00	9,43	0,05	4,00	9,12	0,04	4,00
	9 días	7,84	0,09	4,00	7,11	0,01	4,00	6,38	0,14	4,00	7,51	0,21	4,00	7,97	0,02	4,00

Tabla 6. Resultados de los recuentos de los diferentes microorganismos indicadores antes y después de la congelación de la solución fecal y durante el tiempo de estabilización en el sistema (expresa como log UFC/g heces).

4.3. Ensayo de inoculación en el Digestor *in vitro* de Fermentación colónica.

El recuento inicial de la microbiota fecal del ensayo de fermentación colónica antes de su congelación (solución fecal control), tras la descongelación (solución fecal tras descongelación para inoculación) y los recuentos obtenidos de microbiota fecal en los tres reactores durante el tiempo de estabilización de la microbiota en el sistema (9 días) en el ensayo de fermentación colónica es el indicado en la Tabla 6.

En las figuras 13 a 15, se indican los recuentos obtenidos de microbiota fecal en los tres reactores, durante el tiempo de estabilización de la microbiota en el sistema (9 días) en el ensayo de fermentación colónica llevado a cabo en el presente proyecto. Los resultados se expresan como el log UFC/g de heces).

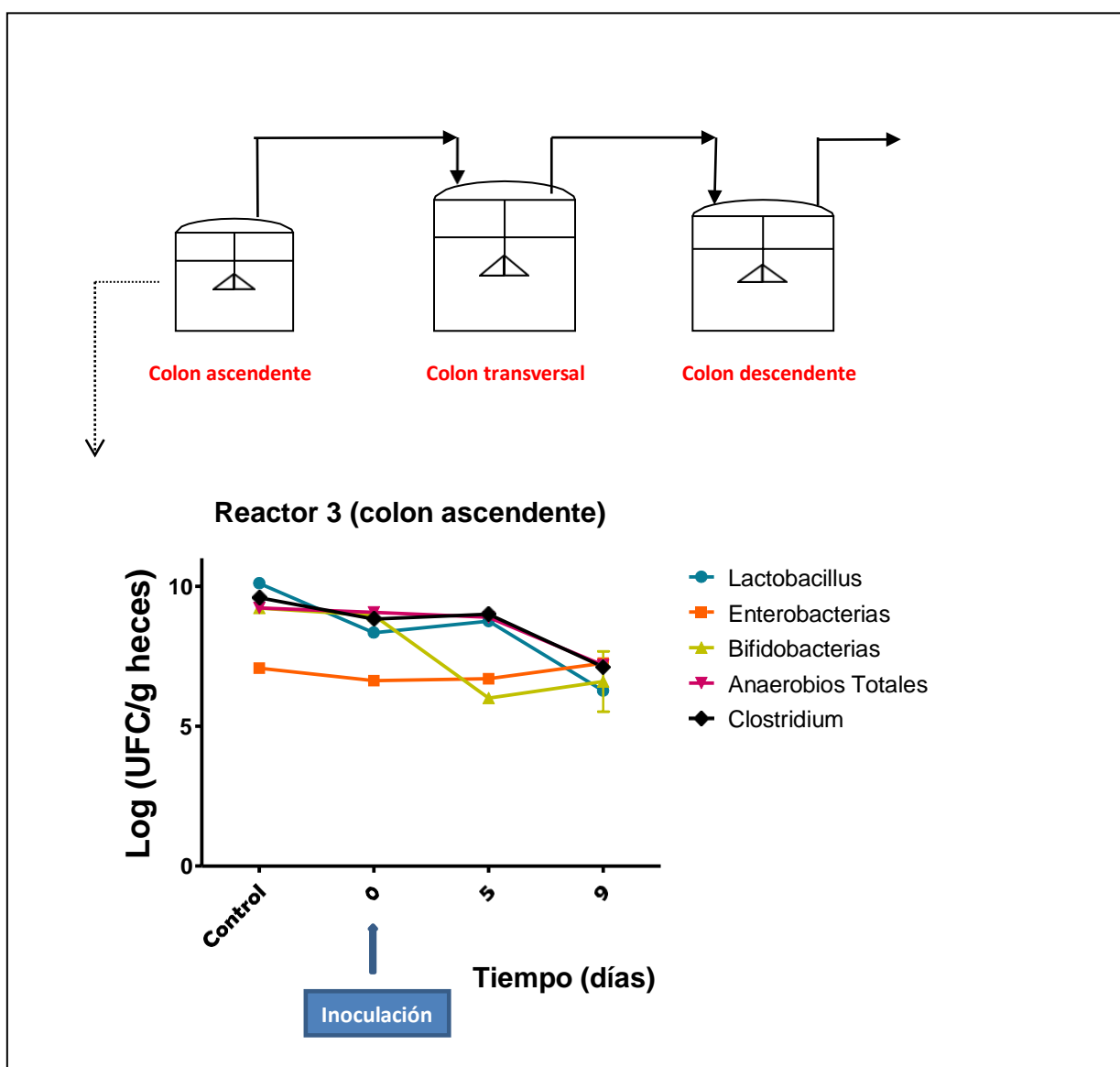


Figura 13. Evolución de la microbiota en el reactor 3 (colon ascendente) durante 9 días de estabilización

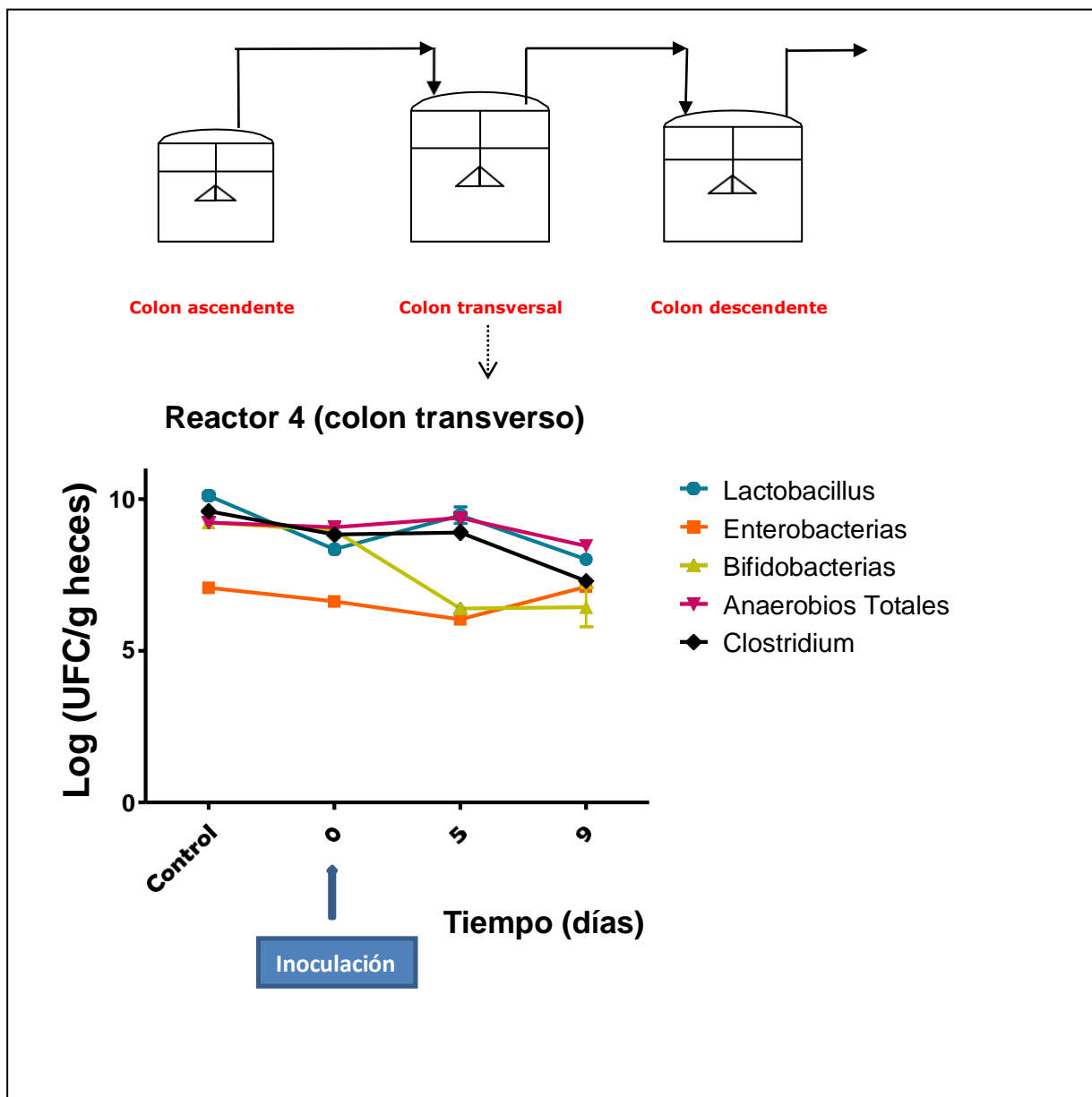


Figura 14. Evolución de la microbiota en el reactor 4 (colon trasversal) durante 9 días de estabilización

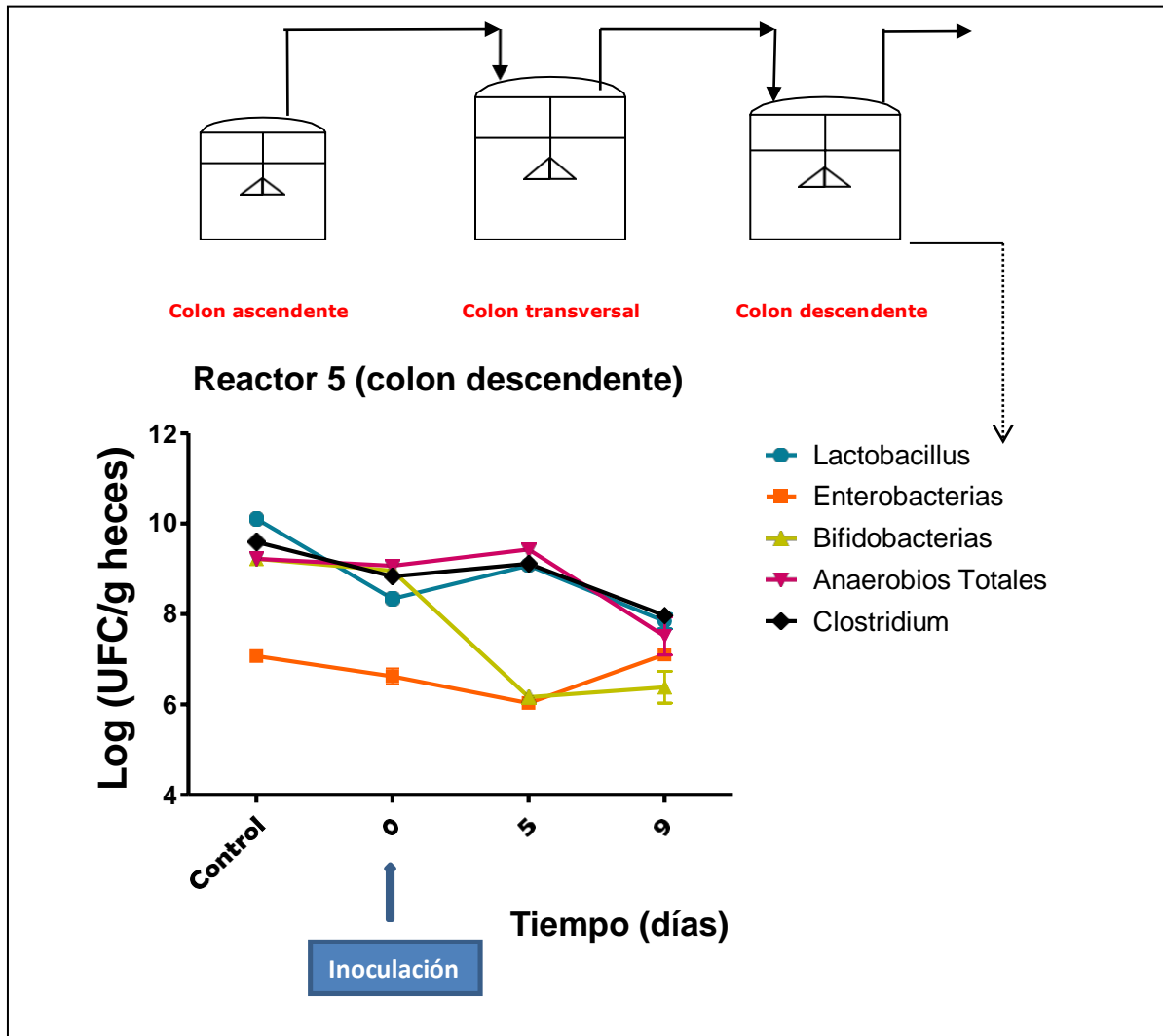


Figura 15. Evolución de la microbiota en el reactor 5 (colon descendente) durante 9 días de estabilización.

Los resultados obtenidos en los ensayos demuestran la supervivencia y evolución microbiana de los indicadores fecales durante el tiempo de estabilización en el digestor de fermentación colónica.

Los niveles microbianos obtenidos en este ensayo se sitúan en valores de recuento muy similares a los alcanzados en otros ensayos de fermentación colónica (información confidencial no disponible), tras el tiempo de estabilización en el sistema durante 9 días. Ello demuestra que el método de conservación utilizado como óptimo para la conservación de la microbiota fecal en este proyecto no supone una variabilidad significativa en los microorganismos indicadores de la muestra fecal, respecto a la utilización de muestras fecales frescas (no conservadas en congelación con crioprotectores) utilizadas habitualmente en otros proyectos de fermentación.

5. CONCLUSIONES.

- Para el estudio de la microbiota gastrointestinal, los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, enterobacterias y anaerobios totales, resultaron ser adecuados como microorganismos indicadores de la muestra fecal, resultando más adecuados aquellos que se encuentran en la microbiota fecal en mayor cantidad y que son sensibles a los cambios de las condiciones utilizadas en los ensayos, como en el caso de las bifidobacterias.
- El uso de criopreservantes está plenamente justificado para el mantenimiento de la viabilidad en largos periodos de congelación; en comparación con otros criopreservadores utilizados en ensayos anteriores de criopreservación, las soluciones crioprotectoras que dan mejores resultados resultaron ser el DMSO y el Glicerol.
- Para utilizar el DMSO como criopreservante se valoraron las distintas concentraciones utilizadas, observando que, el efecto crioprotector entre una concentración y otra menor, es prácticamente el mismo, por lo que se seleccionó la concentración menor (DMSO 8%), con el fin de minimizar el posible efecto tóxico del DMSO sobre los microorganismos. Además, se concluyó que un segundo ensayo utilizando DMSO 5% podría resultar útil, puesto que, si los efectos a esta concentración siguen manteniéndose, el efecto tóxico aún se vería más reducido.
- Los microorganismos indicadores que forman parte de la microbiota gastrointestinal, sufrieron un primer estrés durante la manipulación y preparación de la solución fecal, que debieron superar para estabilizarse y, de esta manera, mantenerse en un orden constante a lo largo del tiempo de criopreservación. Por ello, se contempló que, tras la adición del criopreservante, sería mejor congelar la muestra y no utilizarla directamente y, una vez los microorganismos superen el primer mes de congelación y estuvieran ya estabilizados, las muestras estarían preparadas para su utilización.
- Los resultados de criopreservación de la solución fecal, obtenidos en este proyecto, han permitido el mantenimiento óptimo de la microbiota durante el tiempo de conservación en congelación y su utilización, de forma práctica, en un ensayo de fermentación colónica en un Digestor *in vitro*. Los niveles microbianos iniciales de inoculación, así como su evolución durante la estabilización del ensayo de fermentación, demuestran que el protocolo de conservación desarrollado es prometedor para lograr la reproducibilidad de los resultados en diferentes ensayos donde se trabaja con microbiota fecal humana.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Aguirre, M., Eck, A., Koenen, M., Savelkoul, P., Budding, A. and Venema, K. (2015). Evaluation of an optimal preparation of human standardized fecal inocula for in vitro fermentation studies. *Journal of Microbiological Methods*, 117, pp.78-84.
- Bd.com. (2018). [online] Available at: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770> [Accessed 18 Apr. 2018].
- Bioterios.com. (2018). [online] Available at: <http://www.bioterios.com/post.php?s=2013-05-01-principios-de-criobiologia> [Accessed 12 May 2018].
- Burke, K. and Lamont, J. (2013). Fecal Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection in Older Adults: A Review. *Journal of the American Geriatrics Society*, [online] 61(8), pp.1394-1398. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgs.12378> [Accessed 15 Apr. 2018].
- Carroll, I., Chang, Y., Park, J., Sartor, R. and Ringel, Y. (2010). Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gut Pathogens*, 2(1), p.19.
- Claesson, M., Jeffery, I., Conde, S., Power, S., O'Connor, E., Cusack, S., Harris, H., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G., Deane, J., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., O'Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., Stanton, C., Marchesi, J., Fitzgerald, A., Shanahan, F., Hill, C., Ross, R. and O'Toole, P. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), pp.178-184.
- Collado Amores, M. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia.
- Diversidadmicrobiana.com. (2018). 1.2.2.2 Género *Clostridium*. [online] Available at: https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=750&Itemid=842 [Accessed 20 May 2018].
- Duncan, S., Stewart, C., Hold, G., Flint, H. and Harmsen, H. (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), pp.2141-2146.
- Egert, M., de Graaf, A., Smidt, H., de Vos, W. and Venema, K. (2006). Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*, 14(2), pp.86-91.
- FAO. Probióticos en los alimentos (2006).
- Fuller, R. and Perdigon, G. (2003). GUT FLORA, NUTRITION, IMMUNITY & HEALTH. Malden: Roy Fuller y Gabriela Perdigón, pp.52-69.
- Fundacionio.org. (2018). [online] Available at: <http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/clostridium.html> [Accessed 19 May 2018].
- Gaci, N., Chaudhary, P., Tottey, W., Alric, M. and Brugère, J. (2017). Functional amplification and preservation of human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), p.1308070.
- Guillen, I., Camacho, H., Tuero, A., Bacardí, D., Palenzuela, D., Aguilera, A., Silva, J., Estrada, R., Gell, O., Suárez, J., Ancizar, J., Brown, E., Colarte, A., Castro, J. and Novoa, L. (2016). PCR
- Conditions for 16S Primers for Analysis of Microbes in the Colon of Rats. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, pp.jbt.16-2703-002.
- Hamilton, M., Weingarden, A., Sadowsky, M. and Khoruts, A. (2012). Standardized Frozen Preparation for Transplantation of Fecal Microbiota for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(5), pp.761-767.
- Hammes, W. and Hertel, C. (2002). Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Research International*, 35(2-3), pp.165-170.
- Heiman, M. and Greenway, F. (2016). A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Molecular Metabolism*, 5(5), pp.317-320.
- Higiene.edu.uy. (2018). [online] Available at: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteriasAnaerobias.pdf> [Accessed 17 May 2018].
- Jiang, Z., Dupont, H., Ke, S. and Alexander, A. (2016). Stability and Efficacy of Frozen and Lyophilized Fecal Microbiota Transplant (FMT) Product in Mouse Model of *Clostridium difficile* Infection (CDI). *Open Forum Infectious Diseases*, 3(suppl_1).
- Johnson, P., Hargreaves, L., Zobrist, C. and Ericsson, A. (2018). Utility of a portable desiccant system for preservation of fecal samples for downstream 16S rRNA amplicon sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 146, pp.1-6.
- Kerckhof, F., Courtens, E., Geirnaert, A., Hoefman, S., Ho, A., Vilchez-Vargas, R., Pieper, D., Jauregui, R., Vlaeminck, S., Van de Wiele, T., Vandamme, P., Heylen, K. and Boon, N. (2014). Optimized Cryopreservation of Mixed Microbial Communities for Conserved Functionality and Diversity. *PLoS ONE*, 9(6), p.e99517.
- Leiva Gea, I. (2014). Caracterización de la microbiota fecal en pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 y su relación con niveles de glucemia y estrés oxidativo. Doctor. Universidad de Málaga.

- Lim, M., Song, E., Kim, S., Lee, J. and Nam, Y. (2018). Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), pp.151-157.
- Ljungh, Å. and Wadström, T. (2009). *Lactobacillus molecular biology. From genomics to probiotics*. Norfolk: Caister Academic Press, pp.290-295.
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordon, J., Jansson, J. and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, [online] 489(7415), pp.220-230. Available at: <https://www.nature.com/articles/nature11550> [Accessed 10 Mar.2018].
- Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., de Wiele, T. and Possemiers, S. (2010). In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant- derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), pp.168-176.
- McDonald, J., Schroeter, K., Fuentes, S., Heikamp-deJong, I., Khursigara, C., de Vos, W. and Allen-Vercoe, E. (2013). Evaluation of microbial community reproducibility, stability and composition in a human distal gut chemostat model. *Journal of Microbiological Methods*, [online] 95(2), pp.167-174. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701213002716> [Accessed 11 Mar. 2018].
- Medeiros, M. and de Albuquerque, U. (2012). The pharmacy of the Benedictine monks: The use of medicinal plants in Northeast Brazil during the nineteenth century (1823–1829). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), pp.280-286.
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G. and Huis in't Veld, J. (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), pp.108-114.
- Molly K, Vandewoestijne M, Verstraete W (1993) Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:254–258.
- Molly, K., Woestyne, M. and Smet, I. (1994). Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 7(4).
- Moschen, A., Wieser, V. and Tilg, H. (2012). Dietary Factors: Major Regulators of the Gut's Microbiota. *Gut and Liver*, [online] 6(4), pp.411-416. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493718/> [Accessed 11 Mar. 2018].
- Nelson, K. (2011). Metagenomics of the human body. *Karen E. Nelson*, pp.79-90.
- O'Hara, A. and Shanahan, F. (2007). Gut Microbiota: Mining for Therapeutic Potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(3), pp.274-284.
- O'Toole, P. and Claesson, M. (2010). Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 20(4), pp.281-291.
- Ou, J., Yao, C., Rotbart, A., Muir, J., Gibson, P. and Kalantar-zadeh, K. (2015). Human intestinal gas measurement systems: in vitro fermentation and gas capsules. *Trends in Biotechnology*, 33(4), pp.208-213.
- Payne, A., Zihler, A., Chassard, C. and Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, 30(1), pp.17-25.
- Petrosino, J., Highlander, S., Luna, R., Gibbs, R. and Versalovic, J. (2009). Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry*, 55(5), pp.856-866.
- Pinzón Gutiérrez, Y., Lizette Bustamante, S. and Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, [online] 11(2), pp.8-18. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77613172002.pdf> [Accessed 18 Apr. 2018].
- Puerta-García, A. and Mateos Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 51(10), pp.3426-31.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H., Tims, S., Zoetendal, E. and de Vos, W. (2013). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, [online] 15(4), pp.1146-1159. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.12023> [Accessed 10 Mar.2018].
- Rodríguez de Santiago, E., García García de Paredes, A. and Ferre Aracil, C. (2015). Trasplante de microbiota fecal: indicaciones, metodología y perspectivas futuras. *Argent Coloproct*, [online] 26(4), pp.225-234. Available at: http://sacp.org.ar/revista/files/PDF/26_04/SACP_26_04_04.pdf [Accessed 14 Apr.2018].
- Rota, M. (2006). Diabetes Promotes Cardiac Stem Cell Aging and Heart Failure, Which Are Prevented by Deletion of the p66shc Gene. *Circulation Research*, 99(1), pp.42-52.
- Rotbart, A., Yao, C., Ha, N., Chrisp, M., Muir, J., Gibson, P., Kalantar-zadeh, K. and Ou, J. (2017). Designing an in-vitro gas profiling system for human faecal samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, pp.754-764.
- Round, J. and Mazmanian, S. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), pp.313-323.
- Sartor, R. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*, 126(6), pp.1620-1633.

Schneider H, Fischer D, Failing K, Ehling C, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M, Investigations on a cryopreservation protocol for long-term storage of psittacine spermatozoa using cockatiel semen as an example, *Theriogenology* (2018), doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.027.

Schwartz, A. (2016). *Microbiota of the Human Body*. Herborn: Editorial Board, pp.6-32/33- 44/95-108/109-154.

Singh, S., Padovani, D., Leslie, R., Chiku, T. and Banerjee, R. (2009). Relative Contributions of Cystathionine β -Synthase and γ -Cystathionase to H₂S Biogenesis via Alternative Trans- sulfuration Reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), pp.22457-22466.

Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B. and Basit, A. (2008). The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, [online] 363(1-2), pp.1-25. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682282> [Accessed 11 Mar. 2018].

Stewart, A., Tsubouchi, A., Rolls, M.M., Tracey, W.D., Sherwood, N.T. (2012). Katanin p60-like1 Promotes Microtubule Growth and Terminal Dendrite Stability in the Larval Class IV Sensory Neurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 32(34): 11631--11642.

Terreros C., M., Huanca L., W., Arriaga C., I. and Ampuero B., A. (2015). Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), p.420.

Thompson-Chagoyán, O., Maldonado, J. and Gil, A. (2005). Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition*, 24(3), pp.339-352.

Thompson-Chagoyán, O., Maldonado, J. and Gil, A. (2005). Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition*, 24(3), pp.339-352.

Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D. and Ventura, M. (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(1), pp.35-50.

Van de Wiele, T., Gallawa, C., Kubachka, K., Creed, J., Basta, N., Dayton, E., Whitacre, S., Du Laing, G. and Bradham, K. (2010). Arsenic Metabolism by Human Gut Microbiota upon in Vitro Digestion of Contaminated Soils. *Environmental Health Perspectives*, 118(7), pp.1004-1009.

Vida Lúcida. (2018). 5 causas que afectan a la flora intestinal. [online] Available at: <https://www.lavidalucida.com/5-causas-que-afectan-la-flora-intestinal.html> [Accessed 13 Apr. 2018].

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P. and Bassaganya-Riera, J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(6), pp.929-939.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R., Bartelsman, J., Dallinga-Thie, G., Ackermans, M., Serlie, M., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van HylckamaVlieg, J., Bloks, V., Groen, A., Heilig, H., Zoetendal, E., Stroes, E., de Vos, W., Hoekstra, J. and Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), pp.913-916.e7.

Wlodarska, M. and Finlay, B. (2009). Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. *Mucosal Immunology*, 3(2), pp.100-103.

Yang, H., Wang, J., Lv, Z., Tian, J., Peng, Y., Peng, X., Xu, X., Song, Q., Lv, B., Chen, Z., Sun, Z. and Wang, Z. (2018). Metatranscriptome analysis of the intestinal microorganisms in *Pardosa pseudoannulata* in response to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [online] 159, pp.1-9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29730401> [Accessed 9 Mar.