



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS CON
PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS E INMUNOMODULADORAS
Y SU INVESTIGACIÓN APLICADA EN SANIDAD ANIMAL**

MARÍA BRAVO SANTILLANA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

2021



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS CON
PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS E INMUNOMODULADORAS
Y SU INVESTIGACIÓN APLICADA EN SANIDAD ANIMAL**

MARÍA BRAVO SANTILLANA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

2021

CONFORMIDAD DE LOS CODIRECTORES

«La conformidad de los directores aparece firmada en la versión original en papel de esta Tesis Doctoral»

Dr. Joaquín Rey Pérez, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, como tutor de la estudiante de doctorado y codirector de la tesis doctoral; **Dr. David Risco Pérez**, investigador en Sanidad Animal en INGULADOS y NEOBEITAR, y **Dra. Rosario Cerrato Horrillo** investigadora y responsable del Departamento I+D+i en INGULADOS, codirectores de la tesis doctoral.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada «**Caracterización de bacterias ácido-lácticas con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras y su investigación aplicada en sanidad animal**» ha sido desarrollada con financiación del Programa de Doctorados Industriales (Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, DI-17-09603) para su desempeño en INGULADOS SL bajo la tutela de la Universidad de Extremadura.

Que la mencionada tesis doctoral debe estar sometida a un **proceso de protección** debido a la transferencia de tecnología y conocimiento que conlleva la solicitud de **dos patentes** de invención y debe quedar eximida temporalmente de la obligación de ser publicada de manera completa en el repositorio digital abierto durante un periodo de 5 años.

Que la tesis doctoral codirigida por nosotros y realizada por María Bravo Santillana reúne los requisitos para optar al título de **Doctora Internacional** así como para la **Mención Industrial** al título.

«El informe favorable de los directores aparece firmado en la versión original en papel de esta Tesis Doctoral y los documentos que certifican las menciones se entregarán una vez autorizado el procedimiento de confidencialidad»

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

Subvenciones para contratos para la formación de doctores en empresas (DI-17-09603) del Programa de Doctorados Industriales de la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, 2017.



Becas QUERCUS+ para la financiación de formaciones prácticas mediante estancias en el extranjero, 2016-2017.



Y ha sido consecuencia de la participación en los siguientes proyectos de I+D+i:

«Alternativa a antibióticos para el control de enfermedades en especies cinegéticas (INMUNOBALANCE)» del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (IDI-20201262) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades



«Nuevos compuestos postbióticos procedentes de ungulados para la mejora del sistema inmune de los corderos (POSBIOLAMB)» de la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura (IDA2-19-002-3)



«Interacción sinérgica de antibióticos con nuevos compuestos bioactivos secretados por bacterias» y «Efectos de la administración de elementos inmunomoduladores en rumiantes» del ICEX (España Exportación e Inversiones) y el Ministerio de Industrial, Comercio y Turismo.



«Caracterización de productos inmunomoduladores para el control de la tuberculosis bovina en fauna salvaje» de la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura (AA/17-0001-1).



AGR

— .

Agradecimientos



Llevo días, incluso meses, pensando en cómo trasladar mi gratitud a todas las personas que me han acompañado en este camino. Espero saber transmitir con palabras los agradecimientos de corazón que tengo en mi cabeza desde hace mucho tiempo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores. Gracias a Joaquín Rey, que fue la primera persona que vio en mí esa chispa que yo aún no sabía que tenía. Muchas gracias por estar conmigo desde el primer día, a ti puedo considerarte mi padre en el mundo de la investigación y te estaré eternamente agradecida por darme la primera oportunidad de mi vida, por querer siempre lo mejor para mí y por facilitarme la toma de decisiones en todo momento. Gracias a Rosario Cerrato, que me propuso el cambio de rumbo que, sin duda, habrá marcado para siempre mis comienzos en este mundo. Nada de esto habría sido posible sin tus ideas, sin tu apoyo constante y sin tu optimismo, sin todo el trabajo en la sombra que haces por mí y por todos los que trabajamos en INGULADOS. Tú eres mi madre y la madre de todos en esta familia que se ha formado gracias a ti y gracias a Pedro. Gracias a David Risco, por hacer que hasta lo más difícil pareciese sencillo, por darme la confianza que he necesitado en algunos momentos y porque, cuando las cosas se pusieron del revés, te cruzaste en mi camino para ponerlas de frente. Te has convertido en mi referente, eres ese hermano mayor al que todos quieren parecerse. *«Si he llegado a ver más lejos, ha sido encaramándome a hombros de gigantes»* – Isaac Newton

Gracias a Pedro Fernández, por dejarme crear y ayudarme a crecer, por darle valor a mis ideas y ayudarme a materializarlas. Gracias por apostar por mí, por darme el impulso que he necesitado siempre en el momento preciso, y por implicarte siempre en aportar lo que me faltaba en ocasiones para que pudiese seguir avanzando. Muchas gracias por preocuparte por mi bienestar, eres el ejemplo perfecto del jefe perfecto. *«Locura es hacer lo mismo una y otra vez esperando obtener resultados diferentes»* – Albert Einstein.

Muchísimas gracias a todo el equipo de INGULADOS, espero que todos sintáis cada página de este trabajo como vuestra, porque sin vosotros nada de esto habría sido posible. Gracias a Waldo, por todo lo que has aportado al desarrollo de esta tesis, por

sacarme al campo a respirar el aire que me ha dado la vida y por dejarme aprender de ti. Hemos estado en los momentos difíciles estos últimos años y espero que podamos seguir acompañándonos, sobre todo, en los momentos felices. Gracias a Pilar, más que una compañera, mi amiga, por tener siempre buenas palabras, me has transmitido tu cariño, tu apoyo y, sobre todo, tu confianza en mí. Gracias por haber sabido elegir los momentos para darme buenos consejos que me llevo para siempre y por tu predisposición a ayudarme y enseñarme siempre. Gracias a Verónica, porque tu colaboración ha sido fundamental para que muchos estudios saliesen adelante, igual que el trabajo diario que haces en laboratorio con una labor indispensable para este equipo. Gracias por tu entrega y por tu apoyo, que ha sido esencial tanto laboral como personalmente. Gracias a Maru, la pieza fundamental que hace que todo el trabajo que los demás hacemos encaje, por tu paciencia con nosotros y por intentar entendernos para ayudarnos siempre. Da mucha confianza tener a una persona como tú, siempre un paso por delante, detrás de todo. Gracias a María José, porque desde el primer día que iniciábamos la carrera como novatas hasta el día de hoy, el destino ha querido que nos uniésemos cada día más, tu apoyo ha sido fundamental en esta fase final. Gracias a Carlos, a Javier y a todos los que han pasado por nuestros laboratorios en determinados momentos, porque han empleado sus horas de trabajo en darme a mí un tiempo valiosísimo que necesitaba para sacar esto adelante. Gracias a Julián Navarro, que nos permite tener lo que hoy disfrutamos, que nos ha aportado el impulso que necesitábamos para crecer y ha confiado en este y todos nuestros proyectos. Gracias por darme un futuro en este camino que he elegido. *«Solo la ciencia nos puede otorgar los elementos para salvar a la naturaleza y, con ello, a la humanidad»* – Félix Rodríguez de la Fuente.

Me gustaría expresar mi gratitud hacia todas las personas e instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Gracias a todas las empresas colaboradoras, a todos los trabajadores y propietarios de las fincas y las cooperativas que han participado en los estudios de este trabajo. Agradezco enormemente a Jesús Núñez por hacer de esta tesis doctoral tan personal un documento con el que me siento identificada, gracias por ocuparte de la maquetación como un grandísimo profesional. Gracias también a Paco Pulido, que realizó la fotografía que fue elegida como portada

de esta tesis y por cederla de forma desinteresada. «*Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo*» – Eduardo Galeano.

Quiero agradecer especialmente a Jorge Gutiérrez, por descubrirme el maravilloso mundo de las bacterias ácido-lácticas, sin duda tus contribuciones han dotado de calidad científica esta tesis doctoral y marcaron el inicio del camino que me dio el salto que necesitaba para crecer profesional y personalmente. Gracias por todos tus consejos siempre en buen momento. Gracias a la University of Surrey, a Fernando Martínez, Arnoud van Vliet y Theo por vuestras aportaciones y a Katie y Athanasios por vuestro apoyo y vuestra ayuda. Gracias todos los que hicieron que las estancias en Inglaterra fuesen de las mejores experiencias de mi vida, en especial a Iliana, a Marco, a Manuel, a Pablo, a Corrado y a todos los brindaron de recuerdos mi estancia allí. «*The microbe is nothing, it's the environment*» – Louis Pasteur.

Muchas gracias al grupo de investigación en Configuración de Sistemas Moleculares y Celulares (COSMYC) por abrirme las puertas, por despertar mi curiosidad y acercarme al mundo de la biología molecular. Gracias a Paco Centeno, a Chema Carvajal y a Ángel Román por poner vuestros conocimientos y laboratorios a nuestra disposición, por entender y respetar mis tiempos y mis ideas, por permitirme aprender de vosotros y con vosotros. Mil gracias a todos vuestros pupilos que tanta ayuda desinteresada me han brindado, en especial a Sergio y Selene, por acogerme en Badajoz como una más, por mandarme vuestra fuerza y confianza en la fase final. Todas las estancias allí han aportado mucho y los proyectos nos auguran un camino juntos que será seguro muy enriquecedor. «*Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar erróneamente es mejor que no pensar nada*» – Hipatia de Alejandría.

Mi agradecimiento hacia a los miembros de la Unidad de Infecciosas del HCV-UEx. Gracias a Juanma, a Javier y a Miguel, por vuestras enseñanzas, a Remi, que me enseñó a coger una pipeta y creyó en mí desde la primera vez que pisé un laboratorio, a María Gil, que compartió muchos momentos conmigo en ese periodo de mi formación, a Almudena y al resto de personas que me ayudasteis cuando estaba allí. Gracias a mis compañeros de promoción, en especial a Ángela, a Marga, a Jaime Galeano y a María

Matilla, pero también a todos los que fuisteis importantes en esa etapa, que me aportasteis tanto en los pasos previos a esto y con los que compartí muchos instantes en un momento especial de mi vida, sin el cual no estaría ahora aquí. Gracias a todos los profesores y profesionales que me enseñaron durante el Grado en Veterinaria las bases de lo que hoy se refleja en este trabajo, en especial a Joaquín Sánchez, a Rafael Barrera y a Patricia Ruiz, os guardo un cariño especial. *«Nada en este mundo debe ser temido, sino entendido»* – Marie Curie.

Durante toda mi trayectoria académica he tenido la suerte de contar con muchas personas que me han impulsado a llegar hasta aquí. Gracias al colegio San Antonio de Padua, su actual Directora Titular Sonia Martín, por contar conmigo y permitirme transmitir mi pasión por la investigación a los alumnos cada año y a todos los demás profesores y resto de profesionales que participaron en mi educación y a día de hoy siguen mis pasos y me apoyan en mi camino. Ojalá pudiese nombraros a todos los que me aportasteis tanto, *«porque dando, se recibe»* – San Francisco de Asís. El colegio me inició en el deporte que ha marcado mi vida y mi trayectoria personal. Gracias a todos mis entrenadores, compañeras de equipo y a todas las personas que me ha regalado el baloncesto, que me aportaron muchísimo dentro de las pistas y que me ha servido de vía de escape durante toda mi etapa académica y también laboral. Gracias a todas las personas que me han permitido transmitir a las niñas mi pasión por este deporte. Gracias a Martina, que ha sido un gran apoyo en los momentos difíciles en el ámbito personal y que me ha acompañado también durante esta tesis doctoral. Gracias a Pedro Juan, a Sergio Martínez, a David González, por todo vuestro apoyo y a todo el equipo de Salubriá y, en especial, a Mario Díaz, por cuidar de mi rodilla y de mi cabeza en muchas ocasiones. *«No es que queramos ganar, es que queremos ser mejores»* – Laia Palau.

Mi agradecimiento especial para mis míticos, mis amigos de siempre y para siempre. A Marina, mi *«superstar»*, gracias por hacer que la distancia entre Irlanda y España parezca cercana, por hacerme sentir cada vez que nos reencontramos que el tiempo no pasa por nuestra amistad y que vamos a ser *Best Friends Forever*. A Jorge, por no fallar nunca, por estar siempre ahí con tu alegría y tu forma especial de ver las cosas, por tus intentos de entender cada palabra complicada que sale de mi boca y que hace que sienta que tengo

un amigo apoyándome al lado. A Carolina, por confiar en mí con los ojos cerrados, por esa risa contagiosa y todas las palabras bonitas que te salen de lo más profundo y me han dado la energía cuando más lo necesitaba, sin saberlo. A Pedro, por volver siempre a recordarnos que somos los de siempre, por esas tonterías que te sacan las sonrisas. A Inés, a Judith, a Maru, a los Albertos, por hacer de cada vez que nos juntamos todos, momentos memorables. Mención especial a mi Chef Pound, gracias a Carmen, María, Jorge, Sergio y Marta me he sentido acompañada, ellos me han facilitado el camino. Gracias por enseñarme el licor de crema catalana el día de mi 30 cumpleaños, sin el cual la recta final habría sido un infierno. Gracias por los viernes y domingos de baloncesto, por conformar este grupo burbuja que nos ha ayudado a superar una pandemia. *«Lo más importante es intentar inspirar a las personas, para que ellos puedan ser grandes en cualquier cosa que quieran hacer»* – Kobe Bryant.

Mi eterno agradecimiento a María por darme alas y no ponerme techo, porque no solo me has dejado volar, sino que te has elevado conmigo y no has permitido que me caiga. *«Pies, ¿para qué los quiero si tengo alas para volar?»* – Frida Kahlo.

Gracias a toda mi familia, la que está cerca y la que está lejos, porque sé que seguís cada paso que doy y no me dejáis nunca de acompañar, aunque sea en la distancia. Gracias a Los Gilitos, porque compartís a millones tanto el orgullo de mis logros en el mundo académico como todos esos vídeos y risas en el grupo de WhatsApp que nos salva de no poder habernos visto más. Por muchos más mensajes reenviados en ese grupo que nos mantiene unidos. Gracias a los Bravo, que llevan la palabra «valiente» por naturaleza en el apellido y me servís como inspiración, sois mis referentes. Gracias a mi familia madrileña y vitoriana, por acogernos siempre con cariño y hospitalidad y brindarnos vuestro amor desde la distancia, sé que no me dejáis nunca de acompañar. A mi familia de Cáceres, gracias por estar tan cerca, dándome todo el apoyo que siento con fuerza. Todo es mucho más fácil cuando recibes el sustento de tantas y tantas personas. *«Cuando cae la nieve y sopla el viento blanco, el lobo solitario muere, pero la manada sobrevive»* – Juego de tronos.

Mi más sincero reconocimiento en especial a Gema por ser mi confidente, por estar conmigo cuando más lo necesito. Gracias toda tu familia y en especial a Marta, «miniyo», tu personalidad te hará convertirte en una mujer fuerte y sin barreras. *«No importa lo grande que sea la casa, sino lo feliz que sea el hogar»* – Anónimo.

Gracias a mis padrinos Choni y Luis, por todo el amor que me transmiten como si fuese una hija más y gracias a Luisito, un amigo muy especial que me enseñó desde pequeña que los sentimientos no pueden comprarse. Muchas gracias por contagiarme tu sentimiento de alegría y a ti y a mis padrinos por estar siempre a mi lado y compartir mis momentos más felices. *«Las palabras amables pueden ser cortas y fáciles de decir, pero sus ecos son infinitos»* – Madre Teresa de Calcuta.

Gracias a los Moreno Lobato, la familia con la que no compartimos sangre, pero decidimos compartir nuestra vida. Gracias a Ana y a Bea por entenderme, por acompañarnos en los momentos difíciles y hacernos partícipes de los momentos felices, por darle un sentido especial a la palabra «vecinas», que ahora significa «mucho más que amigas», porque denota cercanía. *«Te llevo en mi corazón y cerca me tendrás»* - Coco.

Gracias a mis perritas, por darme su amor sin pedir nada a cambio. A Hydra, que dio a amor a mis padres cuando nosotras todavía no habíamos llegado y nos protegió como si fuésemos sus cachorras. A Cora, que llegó a nuestra vida para cambiarnos los esquemas y tiene su forma especial de querernos desde entonces. A Trufa, que ha puesto mi vida patitas arriba y me ha despertado los fines de semana temprano para ponerme pronto a escribir. *«Si hay una cosa que nadie ha podido comprar con dinero, esa es el movimiento de la cola de un perro»* – La dama y el vagabundo.

Gracias a mis padres Pedro y Montaña, cuyo legado nos ha dado la mayor lección de vida. Durante muchos años luchasteis por el sueño de convertirnos en padres y 30 años después estoy aquí gracias a vosotros, porque nunca os rendisteis. Gracias a vosotros ahora sé que puedo conseguir todo lo que me proponga y no pienso rendirme nunca hasta conseguirlo. Gracias, mamá, por tu ejemplo de fortaleza ante las adversidades,

por contagiarnos tus ganas, tu risa y tus lágrimas de felicidad. Gracias, papá, por ayudarme cuando se puede y apoyarme cuando no, por protegerme y por demostrarnos a todos que juntos siempre seremos más fuertes. Os quiero con todo mi corazón. *«Vuestro mérito no es haberme dado la vida, sino haberme enseñado a vivir»* – Elvira Sastre.

Gracias a mi hermana Carmen, que es la persona más importante de mi vida, mi gran ejemplo a seguir, aunque sea biológicamente la pequeña. Hicieron falta 18 meses de mi vida para entender que solo hay una persona en el mundo a la que se puede querer más que a uno mismo. Gracias por confiar incondicionalmente en mí desde el primer día hasta el último, por alentarme en los fracasos y alegrarte por mis logros como si fuesen tuyos, y es que en parte lo son. Por eso te dedico a ti de forma especial esta tesis doctoral, porque nada de esto habría sido posible sin el ejemplo de fortaleza y resiliencia que transmites día a día, eres mi heroína: una superviviente. *«Aunque nos quedan muchas batallas por librar, tenemos algo que Voldemort no tiene: algo por lo que merece la pena luchar»* – Harry Potter.

María Bravo Santillana

Cáceres, 2 de agosto de 2021

DED

— .

Dedicatoria



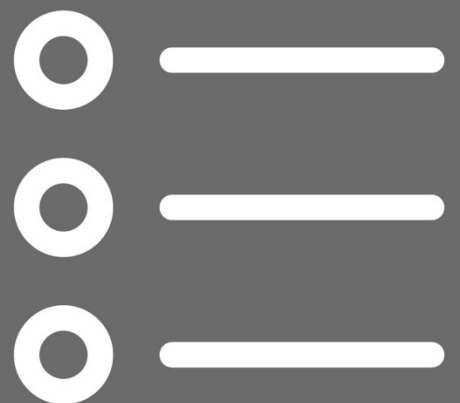
A todas las niñas que sueñan con ser científicas

A todas las mujeres que luchan por llegar lejos

A mi hermana, Carmen, para que nunca te
falte un motivo por el que seguir adelante

IND

— .
Índices



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN / Abstract	44
RESUMEN	46
ABSTRACT	50
REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	54
Importancia de la microbiota en los hospedadores	58
La microbiota de la fauna silvestre	63
Las bacterias ácido-lácticas	65
Compuestos bioactivos en alimentos y piensos: los posbióticos	68
INTRODUCCIÓN A LA TESIS DOCTORAL Y OBJETIVOS	74
Introducción a la tesis doctoral	76
Estructura de la tesis doctoral	78
Objetivos de la tesis doctoral	80
BLOQUE I: Experimentos de laboratorio <i>in vitro</i>	85
<i>Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias</i>	<i>89</i>
INTRODUCCIÓN	91
MÉTODO	97
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	105
RESULTADOS	106
DISCUSIÓN	124
<i>CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación <i>in vitro</i> de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora</i>	<i>133</i>
INTRODUCCIÓN	135
MÉTODO	145
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	153
RESULTADOS	154
DISCUSIÓN	170

<i>CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos</i>	181
INTRODUCCIÓN	183
MÉTODO	187
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	193
RESULTADOS	194
DISCUSIÓN	200
Bloque II: Experimentación ANIMAL <i>in vivo</i>	207
<i>CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón</i>	211
INTRODUCCIÓN	213
MÉTODO	218
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	225
RESULTADOS	226
DISCUSIÓN	230
<i>CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería</i>	235
INTRODUCCIÓN	237
MÉTODO	243
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	253
RESULTADOS	254
DISCUSIÓN	263
<i>CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre</i>	271
INTRODUCCIÓN	273
MÉTODO	280
FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO	285
RESULTADOS	286
DISCUSIÓN	291
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico	297
<i>CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica</i>	301
INTRODUCCIÓN	303
CONCLUSIONES	321
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	335

APÉNDICES	388
<i>APÉNDICE I</i>	390
<i>APÉNDICE II</i>	395
<i>APÉNDICE III</i>	396
<i>APÉNDICE IV</i>	405

ÍNDICE DE TABLAS

REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	54
Tabla A. Definiciones de productos bioactivos utilizados en alimentación humana y animal aceptados por la comunidad científica en la actualidad	69
BLOQUE I: Experimentos de laboratorio <i>in vitro</i>	85
<i>Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias</i>	89
Tabla 1.1. Información general sobre las fincas incluidas en el estudio	97
Tabla 1.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S de ARNr de las 30 cepas de 4 poblaciones de jabalíes	107
Tabla 1.3. Selección final de aislados	109
<i>CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos</i>	181
Tabla 3.1. Resultado de la concentración bacteriana y actividades antimicrobianas para los aislados de BAL seleccionados	194
Figura 3.3. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana encontrada para las diferentes fracciones por pesos moleculares de <i>L. salivarius</i> C12. Las fracciones más pequeñas (3 -10 KDa y < 3 KDa) conservan buena parte de la actividad basal del sobrenadante completo (control).	197
Bloque 2: Experimentación ANIMAL <i>in vivo</i>	207
<i>CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón</i>	211
Tabla 4.1. Elaboración de los grupos de la fase previa del estudio experimental	221
Tabla 4.2. Elaboración de los grupos de la primera fase del estudio experimental	222
Tabla 4.3. Elaboración de los grupos de la segunda fase del estudio experimental	223
<i>CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería</i>	235
Figura 5.2. Distribución provincial del censo de ovino en España (datos del año 2019). Fuente: S.G. Análisis, Coordinación y Estadística (MAPA).	239
Tabla 5.2. Resultados de los parámetros productivos por grupos de estudio	258

Tabla 5.3. Hemogramas completos de cada grupo al inicio de la experiencia, valores de referencia y sus unidades	261
Tabla 5.4. Hemogramas completos al final de la experiencia de cada grupo de estudio, valores de referencia y sus unidades	261
Tabla 5.5. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo antes del estudio, valores de referencia y sus unidades	262
Tabla 5.6. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo al finalizar el estudio, valores de referencia y sus unidades	262
<i>CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre</i>	271
Figura 6.1. Mapa epidemiológico de la tuberculosis bovina en España, prevalencia por comarcas, año 2019. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.	274
Tabla 6.1. Resultados de la evaluación patológica y del estudio serológico de los dos grupos de estudio en las temporadas previa y posterior a la suplementación	288
Tabla 6.2. Resultados por grupos de edad de la evaluación patológica y el estudio serológico del grupo suplementado antes y después de la suplementación con el posbiótico	290
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico	297
<i>CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica</i>	301
Figura 7.2. Ejemplo de productos de la gama INGUBAL en las instalaciones de INGULADOS.	312

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO 54

Figura A. Funciones de la microbiota intestinal. Fuente: adaptado de Biocodex-Microbiota Institute 60

Figura B. Árbol filogenético de la familia Lactobacillaceae. En el centro, los nuevos grupos filogenéticos descritos se muestran con sus ramas del mismo color. Los anillos externos proporcionan información sobre las características genómicas y el origen de las especies, incluido el gradiente de color en rojo (contenido Guanina-Citosina) y los círculos representan el tamaño del genoma. Fuente: Zheng et al., 2020. 66

BLOQUE I: Experimentos de laboratorio *in vitro* 85

Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias 89

Figura 1.1. Cribado de actividad antimicrobiana. La placa madre o placa primaria muestra las BAL aisladas (A) y el ensayo de actividad frente a *M. smegmatis* muestra algunos aislados con actividad antimicrobiana (halos de inhibición, B). 106

Figura 1.2. Localización geográfica de las 4 fincas de estudio (puntos), la prevalencia de lesiones compatibles con TB se muestra al lado de cada punto y el perfil de BAL encontrado se indica mediante una imagen de las bacterias predominantes. Las regiones coloreadas en el mapa muestran la clasificación del riesgo de TB en fauna silvestre en las comarcas de España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, datos de 2020). Todas las fincas muestreadas se encuentran en zonas con alto riesgo de TB para la fauna silvestre, siendo el perfil predominante de lactobacilos en los jabalíes que habitan en fincas con estado libre de la enfermedad. 108

Figura 1.3. Tinción de Gram y observación al microscopio de inmersión de las especies *L. plantarum* (A), *L. paracasei* (B), *P. acidilactici* (C) y *E. faecalis* (D). 109

Figura 1.4. Las BAL aisladas de jabalíes libres de TB muestran una fuerte actividad antimicobacteriana y sus genomas contienen genes que codifican bacteriocinas y una gran variedad de metabolitos antimicrobianos secundarios. **(A)** Reducción en las unidades de fluorescencia (FU) emitidas por *M. bovis* BCG en cocultivos con las BAL tras 48 h de incubación. La reducción de la FU se calculó utilizando al menos 2 réplicas biológicas y fue normalizada con la FU de *M. bovis* BCG en monocultivo. **(B)** Reducción en el recuento de colonias de *M. bovis* BCG en monocultivo (izquierda) con respecto al cocultivo (derecha) con un aislado de lactobacilo. **(C)** Clústeres de bacteriocinas de clase II identificadas en el genoma de los lactobacilos. La

nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O'Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraducciona (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris). **(D)** Genes asociados con la producción y acumulación de H₂O₂ (verde y naranja) y otros metabolitos secundarios como lactato, acetato, etanol y CO₂ (azul) en los aislados. Se muestra la proporción en la barra y el número de genes encontrados en blanco. 112

Figura 1.5. Recuentos bacterianos de los aislados de *L. plantarum* **(A)** y de *L. salivarius* y *L. paracasei* **(B)** como monocultivos (barras negras) y cocultivos con BCG (barras grises) tras una incubación de 0, 24 y 48 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). Los recuentos bacterianos se expresan como log₁₀ (CFU / mL) 114

Figura 1.6. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 horas (h) de incubación en sobrenadantes ácidos (pH 4,5) libres de células obtenidos a partir de monocultivos de lactobacilos (izquierda) o cocultivos de *M. bovis* BCG con lactobacilos (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se calculó a partir de la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus correspondientes controles (barras negras). Los controles se cultivaron con BCG en sobrenadantes libres de células obtenidos de un caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado izquierdo) y monocultivos de BCG de 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado derecho), ambos a pH 4,5. Los datos son media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, **p <0,01, ***p<0.005, ****p<0.001) y son representativos de 3 réplicas biológicas cada uno. 114

Figura 1.7. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 h de incubación en sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) obtenidos a partir de monocultivos de 24h de *L. plantarum* C1, EML1 y SA3 (izquierda) o de co-cultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin suplementación de nutrientes. Los controles de *M. bovis* BCG se incubaron en sobrenadantes libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de *M. bovis* BCG incubados durante 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan como media ± DE con análisis estadístico (prueba t de Student, * p<0,05, ** p <0,01) y representan 3 réplicas biológicas cada uno. 116

(A) Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. plantarum* C1, EML1, SA3 (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha). **(B)** Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. plantarum* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha) suplementados con caldo MH con OADC (10%),

Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma proporción. 116

Figura 1.8. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 h de incubación en sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) y obtenidos a partir de monocultivos de 24 h de *L. salivarius* C2, y C12 y *L. paracasei* SA5 (izquierda) o de cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* C2, y C12 y *L. paracasei* SA5 en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de GFP (FU, barras grises claro para *L. salivarius* y gris oscuro para *L. paracasei*) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin suplementación de nutrientes. Los controles de *M. bovis* BCG se incubaron en sobrenadantes libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de *M. bovis* BCG incubados durante 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan como media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, * p<0,05, ** p <0,01) y representan 3 réplicas biológicas cada uno. 117

(A) Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. salivarius* y *L. paracasei* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* y *L. paracasei* (derecha). **(B)** Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. salivarius* y *L. paracasei* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* y *L. paracasei* (derecha) suplementados con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma proporción. 118

Figura 1.9. Recuentos bacterianos de cultivos de cepas de *L. plantarum* C1, EML1 y SA3 y *L. paracasei* SA5 tras una incubación de 0 y 24 h en: (i) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de *M. bovis* BCG (barras negras); (ii) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de *M. bovis* BCG suplementado con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1 (barras de color gris oscuro); y (iii) caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (barras de color gris claro). Los recuentos bacterianos están expresados como log₁₀ (CFU / mL). 119

Figura 1.10. Clústeres de genes de bacteriocinas de clase II identificados en el genoma de las cepas de lactobacilos y nivel de expresión de genes que codifican los precursores de bacteriocinas en cultivos de lactobacilos expuestos a diferentes concentraciones crecientes de células *M. bovis* BCG. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraducciona (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris). 121

C1. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. plantarum* C1 (en representación de todas las cepas de *L. plantarum*) y el nivel de expresión de sus genes de la bacteriocina precursora correspondiente *plnE* y *plnF* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro). 121

SA5. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. paracasei* SA5 y el nivel de expresión de los de la bacteriocina precursora correspondiente *A* y *B* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro). 121

C2. Clúster de la bacteriocina de péptido único de *L. salivarius* C2 y el nivel de expresión de los genes de la bacteriocina precursora correspondiente *T α* y *T β* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro). 121

Figura 1.11. Los lactobacilos interactúan con las células sanguíneas porcinas, interfiriendo con la fagocitosis de *M. bovis* BCG de una manera diferente según la especie. 123

(A) El gráfico SSC/FSC representa las áreas correspondientes a las células sanguíneas porcinas y el gráfico SSC/GFP muestra sus áreas correspondientes en condiciones normales (*mock*) y cuando se exponen a *M. bovis* BCG, *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5. Las células sanguíneas se indican en verde (linfocitos), naranja (monocitos) y rojo (polimorfonucleares). **(B)** El gráfico SSC/GFP muestra la respuesta de las células sanguíneas porcinas a BCG-GFP solo (-) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5. Las áreas SSC/FSC para cada una de las condiciones se incluyen arriba y la intensidad GFP emitida por los fagocitos se indica en el control de BCG-GFP: negativa (-), positiva (+) y muy positiva (++). **(C)** Porcentaje de fagocitos que se unen a *M. bovis* BCG solos (barra negra) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media \pm DE con el análisis estadístico de la prueba t de Student (***) $p < 0,001$. **(D)** Porcentaje de fagocitos que fagocitan *M. bovis* BCG solos (barra negra) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media \pm DE con el análisis estadístico de la prueba t de Student (***) $p < 0,001$. 123

CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora 133

Figura 2.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas de clase I, II, III. Fuente: (Tulini, 2014) 140

Figura 2.2. Interacción de las BAL con los macrófagos para la regulación de las rutas inmunitarias de señalización NF-kB y IFN-I vía TLR. Adaptado de: (J. B. Li et al., 2013). 143

Figura 2.3. Mapa de calor que muestra la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos que se utilizan con frecuencia en medicina veterinaria y humana. La susceptibilidad se cuantificó utilizando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, $\mu\text{g/mL}$) y se representan como gradientes de color. Las cepas que son reconocidas como resistentes por los estándares FEEDAP se indican con una «R». La R redondeada indica concordancia entre la resistencia genotípica y fenotípica, con los marcadores de genes de resistencia mostrados en cursiva. No se requiere la evaluación de

vancomicina (n.r.) para los lactobacilos y estreptomycinina para *L. plantarum*, debido a su resistencia natural innata a estos antibióticos. 155

Figura 2.4. Genes de resistencia antimicrobiana y marcadores genéticos de virulencia. Los aislados de lactobacilos y pediococos carecen de genes de resistencia y virulencia, a excepción de *L. salivarius* C2 que presenta genes para la resistencia a tetraciclinas; y los aislados de enterococos presentan numerosos marcadores genéticos de resistencias antimicrobianas y virulencia, en especial las dos cepas de *E. faecalis*. 156

Figura 2.5. Árbol filogenético de los aislados de *L. plantarum* 158

Figura 2.6. Árbol filogenético de los aislados de *L. salivarius* 159

Figura 2.7. Árbol filogenético de los aislados de *L. paracasei* 160

Figura 2.8. Árbol filogenético de los aislados de *Pediococcus acidilactici* 161

Figura 2.9. Árbol filogenético de los aislados de *E. faecalis* 162

Figura 2.10. Árbol filogenético de los aislados de *E. casseliflavus* 163

Figura 2.11. *E. faecalis* inhibe *E. coli* y produce potencialmente bacteriocinas modificadas postraduccionalmente. **(A)** Reducción logarítmica de las ufc/ml de *E. coli* cuando se cocultiva con las BAL tras 24 h de incubación. La reducción logarítmica se calculó utilizando al menos 3 réplicas biológicas con respecto al monocultivo de *E. coli*. **(B)** Agar selectivo para enterobacterias (VRBG) que contiene el monocultivo de *E. coli* y un cocultivo con *E. faecalis* A1. **(C)** Clústeres de genes implicados en la biosíntesis de sactipéptidos y lantipéptidos, dos bacteriocinas modificadas postraduccionalmente que se encuentran en los aislados de *E. faecalis* A1 y R8 y *E. casseliflavus* R95. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraducciona (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris). 164

Figura 2.12. *L. salivarius* muestra actividad extracelular contra *Pasteurella multocida* y potencialmente secreta múltiples bacteriolisinas y bacteriocinas de clase II **(A)** Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL) de los sobrenadantes obtenidos de los aislados frente a *P. multocida* serotipo B después de una incubación durante 24 h a 37 °C. La UA / mL se define como el recíproco de la mayor dilución que muestra una clara inhibición del crecimiento del patógeno. **(B)** *P. multocida* en un ensayo de microdilución usando caldo Mueller Hinton. Inhibición del crecimiento después de la exposición con el sobrenadante de un cultivo de *L. salivarius* C2 (derecha) con respecto al control (izquierda). 165

Figura 2.13. *P. acidilactici* R91 muestra una clara actividad anti-listerial y potencialmente bacteriocinas de un solo péptido sin modificar compatible con pediocina. **(A)** Prueba de la gota o «spot-on-agar» de los cultivos de las BAL frente a *Listeria monocytogenes*. Los controles se muestran en la fila inferior: *L. plantarum* WCFS-1 (pH +, acidulante), *P. acidilactici* PA1.0 (productor de pediocina, Ped), *Lactococcus lactis* NZ9700 (productor de nisina, Nis) y *Lactococcus*

lactis NZ9800 (control negativo, pH-). **(B)** Grupo de genes implicados en la síntesis hipotética de Pediocin PA-1 en *Pediococcus acidilactici* R91. La nomenclatura es la misma que la citada anteriormente: las bacteriocinas precursoras (verde) y las proteínas de transporte / inmunidad (rojo). 166

Figura 2.15. Los lactobacilos activan respuestas inmunitarias innatas protectoras en macrófagos y poseen moléculas asociadas con la activación de TLR. La activación de las rutas NF-κB **(A)** e IFN- γ **(B)** se cuantificó en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA expuestos a las BAL. La activación de NF-κB / IRF se presenta con respecto al control y los datos representan al menos 3 réplicas biológicas. **(C)** Los aislados se distribuyen de manera diferente según su capacidad para activar las vías NF-κB / IFN- γ . Las especies *L. plantarum* y *L. paracasei* desencadenan respuestas significativas de IRF, mientras que las cepas de *L. salivarius* inducen la activación de NF-κB. **(D)** Los aislados poseen genes asociados con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como TLR y NOD, que incluyen fimbria / pili, componentes de la pared celular y agonistas de TLR2. 169

CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos 181

Figura 3.1. Curvas de concentración bacteriana en función del tiempo de fermentación para *L. plantarum* EML1 (círculos), *L. casei* SA5 (cuadrados) y *L. salivarius* C12 (triángulos). Los puntos marcados con estrellas muestran la actividad antimicrobiana máxima, que se detecta al final de la fase exponencial para EML1 y en la fase estacionaria para SA5 y C12. 195

Figura 3.4. Técnica E-test para el patógeno *E. coli* multirresistente en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica *L. salivarius* C12. **(A)** Se observa un crecimiento total del patógeno pese a la colocación de las tiras con antibióticos (>256 $\mu\text{g/mL}$) y **(B)** la aparición de inhibición del cultivo al añadir el sobrenadante de la bacteria C12, con diferentes puntos de corte para los diferentes antibióticos. 199

Figura 3.5. Técnica E-test para el patógeno *P. multocida* resistente a tetraciclinas y el antimicrobiano doxiciclina en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica *L. salivarius* C12. Se observa una disminución en el punto de corte equivalente a la CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ en el control **(A)** a 1 $\mu\text{g/mL}$ al añadir el sobrenadante al 10 % **(B)**. 199

Bloque 2: Experimentación ANIMAL *in vivo* 207

CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón 211

Figura 4.1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en los diferentes grupos del estudio. **(A)** En la fase previa se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, $P < 0,0001$) en la supervivencia de los animales infectados (triángulos) con respecto a los animales que no fueron infectados (círculos y cuadrados, superpuestos), incluidos los que recibieron el suplemento. **(B)** En la fase 1 se infectó a los animales con la DL50, tanto en el grupo control sin tratamiento (círculos) como en el grupo suplemento (triángulos) no se observaron diferencias en

la supervivencia de los animales, que fue del 50 %. El grupo antibiótico (cuadrados) tuvo una supervivencia del 100 pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, $P < 0,78$). **(C)** En la fase 2 se infectó a los animales con la DL100, que provocó una mortalidad del 100 % en el grupo control (círculos), antibiótico (cuadrados) y suplemento (triángulos). Sin embargo, se registró una supervivencia del 33,33 % en el grupo que fue tratado con antibióticos en combinación con el suplemento (test del logaritmo del rango, $p < 0,05$). 228

Figura 4.2. Síntomas y signos compatibles con la infección experimental por *Pasteurella multocida* en modelo ratón. **(Ai)** Pelos erizados y exudado ocular no hemorrágico, más leve y **(Aii)** hemorrágico, más grave. **(B)** Hallazgo de adherencias en cavidad torácica durante la necropsia. **(Ci)** Pulmón con lesiones neumónicas compatibles con la infección y **(Cii)** pulmón aparentemente sano, sin lesiones macroscópicas. 229

CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería 235

Figura 5.1. Resumen del contexto de la necesidad de búsqueda de alternativas 238

Tabla 5.1. Diseño de los grupos de estudio 246

Figura 5.3. Detalle de los grupos de estudio en el cebadero 245

Figura 5.4. Báscula de pesaje electrónica en el cebadero 249

Figura 5.6. Distintos tipos de lesiones neumónicas encontradas durante el análisis macroscópico realizado tras el sacrificio de los animales en el matadero. 256

Figura 5.7. Mejora en los indicadores sanitarios en el grupo suplementado con el posbiótico. **(A)** El grupo control muestra mayor porcentaje de pulmones con lesiones neumónicas y **(B)** el grupo control presenta lesiones más extensas, esto es, de mayor gravedad, que el grupo suplementado. Los resultados se expresan en porcentaje de media y el error estándar de esta. **(C)** Mayor porcentaje de decomisos en el grupo suplementado. **(D)** El patógeno *Pasteurella* spp. fue el aislamiento predominante en los pulmones con lesiones neumónicas del grupo control, a diferencia del grupo suplementado. 257

Figura 5.8. Mejora en los parámetros productivos del grupo suplementado. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. **(Ai)** El grupo suplementado partía de una media de pesos menor antes del inicio de la experiencia ($P=0,004$) y **(Aii)** alcanzó el mismo peso final que el grupo control al final del cebo ($P=0,996$) **(B)** El ritmo de crecimiento, expresado en Ganancia Media Diaria (GMD, g), fue superior en el grupo suplementado (GMD en el primer periodo $P=0,0975$, GMD total $P=0,236$). **(C)** El índice de conversión fue inferior en el grupo suplementado. 259

CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre 271

Figura 6.2. Categorización administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos. Fuente: Guía de Aplicación para el sector cinegético del Real Decreto 138/2020, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis. 276

Figura 6.3. Localización geográfica de las 20 fincas incluidas en el estudio	281
Figura 6.4. Animal adulto junto a varios animales jóvenes (rayones)	289
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico	297
<i>CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica</i>	<i>301</i>
Figura 7.1. Diagrama de flujo de los procesos del Departamento de Desarrollo de Productos	311

RES

— .

Resumen
Abstract



RESUMEN

La compleja interacción entre la microbiota y su hospedador constituye un modelo de estudio que puede ser replicado para el desarrollo de nuevas herramientas que contribuyan al control de determinadas enfermedades. Los animales silvestres tienen una microbiota que destaca por ser más diversa y funcional y esta es, por tanto, una fuente de microorganismos beneficiosos que pueden ser explotados industrialmente para la obtención de compuestos bioactivos. La microbiota de los animales silvestres resistentes de forma natural al desarrollo de ciertas enfermedades podría servir, por tanto, como alternativa innovadora para el control de esas afecciones en otros animales más susceptibles. Las bacterias ácido-lácticas que forman parte de la microbiota favorecen los mecanismos de defensa del hospedador debido, fundamentalmente, a sus propiedades para producir moléculas antimicrobianas y a su capacidad de interacción con el sistema inmunitario. Gracias a sus aplicaciones tecnológicas, se utilizan desde hace décadas en formulaciones como los probióticos o los posbióticos, que han demostrado aportar numerosos beneficios para la salud de los animales en los que son utilizadas. Los posbióticos son unos productos innovadores, recientemente definidos y aceptados por la comunidad científica, que contienen los subproductos metabólicos bioactivos, así como los componentes estructurales bacterianos en una preparación final obtenida a partir de la fermentación microbiana controlada.

En esta tesis doctoral se describen los procedimientos de aislamiento y caracterización de bacterias con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la microbiota de jabalíes, así como los criterios de selección de candidatas a ser utilizadas para el diseño de un pienso funcional. Asimismo, la gran novedad de esta tesis de Doctorado Industrial supone culminar con su investigación aplicada mediante la elaboración de un producto posbiótico que incluye diversos estudios de validación en condiciones experimentales y su ratificación en situaciones reales en sanidad animal, tanto en fauna salvaje como en animales destinados a producción.

Se encontró un perfil predominante de lactobacilos en poblaciones de jabalíes libres de tuberculosis, pese a estar localizadas en zonas catalogadas como de alto riesgo de esta

enfermedad, que es una de las más importantes que afectan a la cabaña ganadera y a la fauna silvestre. Las características antagonistas de las bacterias ácido-lácticas (BAL) aisladas en estos animales frente a *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis, parecen indicar que la microbiota juega un papel fundamental en la protección del hospedador frente al desarrollo de la patología. Todas las bacterias aisladas de este grupo de fincas, con la situación sanitaria excepcional descrita, se consideran seguras para su utilización en diferentes fórmulas y muestran proximidad filogenética con cepas de diverso origen, muchas de ellas utilizadas en productos comerciales. Además, poseen moléculas que pueden actuar como inmunomoduladoras activando rutas inmunitarias como la NF- κ B o la ruta del interferón (IFN). Por el contrario, se encontró un perfil totalmente diferente en las fincas con alta prevalencia de tuberculosis, con abundancia de enterococos relacionados filogenéticamente con cepas patógenas y que además contienen en el genoma varios genes de resistencia antimicrobiana y determinantes de virulencia. Estos enterococos no mostraron un perfil inhibitorio frente *M. bovis*, pero sí frente a *E. coli*, y poseen genes que codifican para la producción de metabolitos antimicrobianos, incluidos las bacteriocinas, pero no parecen interactuar con ninguna de las rutas inmunitarias estudiadas. Los pediococos fueron encontrados en ambos grupos de estudio y mostraron un gran potencial beneficioso, en especial un aislado de *P. acidilactici* productor de pediocina que muestra una actividad antimicrobiana muy potente frente a *Listeria monocytogenes*.

Los lactobacilos que mayor potencial beneficioso mostraron se estudiaron en mayor profundidad para optimizar la producción de metabolitos antimicrobianos con potencial inhibitorio frente a varios patógenos de importancia veterinaria. La fracción molecular que mayor influencia tiene sobre la actividad detectada fueron de origen proteico, incluidas las bacteriocinas de diferentes clases que, en ocasiones, actúan de forma sinérgica entre ellas y con antimicrobianos de diversas familias. De hecho, el primer modelo experimental propuesto en esta tesis doctoral consistió en una infección por *Pasteurella multocida* en modelo ratón, seguido de la administración de un suplemento elaborado a partir de los metabolitos, producidos por una bacteria con actividad frente a este patógeno, y el antibiótico doxiciclina, que mostraron sinergia funcional en los estudios *in vitro*. El suplemento elaborado mejoró la supervivencia de los ratones

infectados con la dosis letal absoluta cuando se utilizó una terapia combinada con doxiciclina, en comparación con los ratones que únicamente recibieron el antibiótico o el suplemento.

A partir de la caracterización microbiana y de la información obtenida de las etapas anteriores, se llevó a cabo una etapa final que consistió en la elaboración de sendos productos posbióticos específicamente diseñados para la mejora de los indicadores sanitarios y productivos en ganadería y para el control de la tuberculosis en fauna salvaje. El primer producto posbiótico mejoró la prevalencia y gravedad de las lesiones neumónicas y se asoció a un mayor ritmo de crecimiento de los animales, lo que se tradujo en una mejor eficiencia alimentaria en corderos en cebo cuyo principal problema sanitario consiste en la patología producida por *Pasteurella multocida*. El segundo producto posbiótico se asoció a una disminución en la incidencia de tuberculosis, así como en la presencia de lesiones compatibles con esta enfermedad y en la seroprevalencia de anticuerpos frente a *M. bovis*, agente causal de la misma, en poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural a la infección. Por tanto, la utilización de posbióticos en ganadería constituye una herramienta innovadora para limitar la administración de antimicrobianos a situaciones terapéuticas, satisfaciendo el incremento en la demanda de productos de origen animal. Por otro lado, la administración de posbióticos puede ser considerada como una estrategia factible para el control de la tuberculosis e introducirse como herramienta complementaria en los programas de erradicación de la enfermedad a gran escala.

El método desarrollado en esta tesis de Doctorado Industrial ha tenido un impacto significativo sobre la actividad de la empresa INGULADOS, que ha visto incrementada su competitividad en el sector, debido a que el lanzamiento de una gama de productos posbióticos ha favorecido la creación de una nueva línea de trabajo y un nuevo perfil laboral. Además de las publicaciones científicas generadas y su difusión, la transferencia tecnológica se ha materializado en la solicitud de dos patentes de invención. Los estudios de esta tesis doctoral han incrementado el conocimiento disponible sobre la interacción entre el hospedador y su microbiota y arroja grandes perspectivas de futuro a la utilización de elementos innovadores en Sanidad y Producción Animal.

ABSTRACT

The crosstalk between the microbiota and its host represents a study model that can be replicated for the development of novel tools to control certain diseases. Wild animals harbor a microbiota that overhangs for the greater diversity and functionality. Hence, it is presented as a source of beneficial microorganisms that can be industrially exploited to obtain bioactive compounds. The microbiota of animals being naturally resistant to the development of certain diseases could therefore serve as an innovative alternative for its control in susceptible animals. The lactic acid bacteria from of the microbiota favor the defense mechanisms of the host, mainly due to their properties to produce antimicrobial molecules and their ability to interact with the immune system. Due to their technological applications, they have been used for decades in formulations such as probiotics or postbiotics, which have demonstrated to provide numerous benefits for the health of the animals in which they are used. Postbiotics are innovative products, recently defined and accepted by the scientific community, which contain bioactive metabolic by-products, as well as bacterial structural components in a final preparation obtained from controlled microbial fermentation.

This doctoral thesis describes the procedures for the isolation and characterization of bacteria with antimicrobial and immunomodulatory properties from wild boar microbiota, as well as the criteria for selecting candidates to be used for the design of a functional feed. Similarly, the great novelty of this Industrial Doctorate thesis supposes concluding with its applied research through the elaboration of a postbiotic product. The development of the postbiotic includes several validation studies under experimental conditions and its ratification in real situations in animal health, both in wildlife and livestock.

A predominant profile of lactobacilli was found in populations of tuberculosis (TB) free wild boar, despite living in areas classified as high risk for this disease, which is one of the most important affecting both livestock and wildlife. The antagonistic characteristics of lactic acid bacteria (LAB) isolated in these animals against *Mycobacterium bovis*, the

causative agent of TB, seem to indicate that the microbiota plays an essential role in the protection against the development of the disease. All bacteria isolated from the group with this exceptional health status, are considered safe for its use in different formulas and show phylogenetic proximity with strains of diverse origin, including strains used in commercial products. In addition, the isolates harbor immunomodulatory molecules activating immune pathways such as NF- κ B or the interferon pathway (IFN). On the contrary, a totally different profile was found in populations with a high prevalence of TB, with an abundance of enterococci closely related to pathogenic strains and containing several genes for antimicrobial resistance and virulence determinants within their genomes. These enterococci did not show an inhibitory profile against *M. bovis*, but they did against *E. coli*, and they possess genes encoding for the production of antimicrobial metabolites, including bacteriocins. However, these isolates do not seem to interact with any of the immune pathways studied. Pediococci were found in both study groups and showed great beneficial potential, especially a pediocin-producing *P. acidilactici* isolate showing a very strong antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*.

The lactobacilli that showed the greatest beneficial potential were deeply investigated to optimize the production of antimicrobial metabolites with inhibitory potential against various pathogens of veterinary importance. The molecular fraction that has the greatest influence on the activity detected were of protein origin, including bacteriocins of different classes that occasionally act synergistically with each other and with antimicrobials. In fact, the first experimental model proposed in this doctoral thesis is an infection by *Pasteurella multocida* in a mouse model, followed by the administration of a supplement produced from microbial metabolites with *in vitro* activity against this pathogen, and the doxycycline. The supplement improved the survival of mice infected with the absolute lethal dose when combined with doxycycline, compared to mice that received only the antibiotic or the supplement.

Based on the microbial characterization and the information obtained from the previous phases, a final stage was carried out with the elaboration of two postbiotics. Both products were specifically designed for the improvement of the sanitary and productive

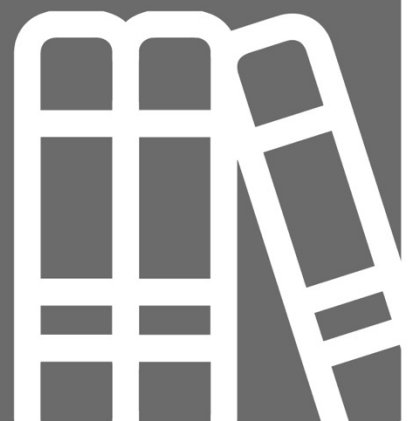
indicators in livestock and for the control of TB in wildlife, respectively. The first postbiotic product improved the prevalence and severity of pneumonic lesions in fattening lambs whose main health problem is the pathology produced by *Pasteurella multocida*. The postbiotic supplementation was also associated with a higher growth rate of the animals translating to better feed efficiency. The second postbiotic product was associated with a decrease in the incidence of tuberculosis, along with a reduction in the presence of lesions compatible with this disease and in the seroprevalence of antibodies against *M. bovis* in naturally exposed wild boar. Therefore, the use of postbiotics in livestock is presented as an innovative tool to limit the administration of antimicrobials to therapeutic situations, satisfying the increased demand for products of animal origin. On the other hand, the administration of postbiotics can be considered as a feasible strategy for the control of TB and can be introduced as a complementary tool in large-scale eradication programs of the disease.

The method developed in this Industrial Doctorate thesis has had a significant impact on the activity of INGULADOS. The company has increased its competitiveness within its sector, since the launch of a range of postbiotic products has favored the creation of a new line of work and a new job profile. In addition to the scientific publications generated and their communication, technology transfer has resulted in the application for two invention patents. The studies of this doctoral thesis have increased the available knowledge on the interaction between the host and its microbiota and show great future prospects for the use of innovative elements in Animal Health and Production.

REV

— .

Revisión de
antecedentes y
marco teórico



Importancia de la microbiota en los hospedadores

La «microbiota» es un complejo ecosistema formado por todos los microorganismos que residen de forma habitual en un organismo superior, denominado «hospedador». Este conjunto de microorganismos coloniza los tejidos sanos de los hospedadores, especialmente aquellas superficies que están más expuestas al medioambiente como la piel, las cavidades oral y nasofaríngea, el tracto genitourinario y a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, que es la microbiota más extensa y también la más estudiada (Karczewski et al., 2014; Schwartz y Rusch, 2016). Además, también se ha comprobado que existe una población microbiana en el tracto respiratorio, incluidos los pulmones, y en otras partes del cuerpo que se consideraban hasta hace muy poco estériles, como la placenta de los mamíferos (Pelzer et al., 2017; Schwartz y Rusch, 2016). La microbiota puede ser autóctona, cuando reside de forma permanente en el hospedador y establece con él una relación de simbiosis, contribuyendo de forma esencial al desarrollo de funciones importantes para el mismo; o alóctona, cuando solo está presente de forma transitoria en un momento concreto de la vida del animal y puede o no establecer una relación de simbiosis con él (Nava y Stappenbeck, 2011). Hablando estrictamente, la microbiota es el conjunto de los taxones microbiológicos, mientras que al conjunto del material genético que alberga se le conoce con el término «microbioma» (Mohajeri et al., 2018).

La microbiota está compuesta principalmente por bacterias y, en una menor proporción, por arqueas, virus y por eucariotas como los hongos, las levaduras y los nematodos (Kapitan et al., 2018; Schwartz y Rusch, 2016). Es complicado establecer unas líneas generales en relación a la composición de la microbiota por taxones, puesto que son muchos los factores que afectan a la distribución de las poblaciones microbianas en los animales: la predisposición genética, la edad, la alimentación, el hábitat, los factores relacionados con el estrés, el consumo de determinados medicamentos (Bahrndorff et al., 2016; Correa-Fiz et al., 2019; Qin et al., 2020)... De esta manera, la microbiota difiere entre las especies animales debido a las diferencias existentes en los procesos metabólicos y fisiológicos. Las poblaciones microbianas se encuentran distribuidas en nichos altamente especializados para la realización de funciones determinadas dentro

de los órganos y sistemas (Huttenhower et al., 2012; Nava y Stappenbeck, 2011). Así, podemos encontrar una población microbiana muy diversa en el tracto gastrointestinal, que se encuentra distribuida de forma estratégica a lo largo del mismo (Nava y Stappenbeck, 2011) y que es muy diferente en animales rumiantes y monogástricos (O'Donnell et al., 2017); y una microbiota mucho menos diversa en el tracto urogenital, porque sus funciones son más limitadas, aunque no por ello son menos importantes (Huttenhower et al., 2012; Thomas-White et al., 2018). La primera colonización microbiana en el caso de los mamíferos se produce principalmente a través del canal del parto de la madre y de la leche materna pero recientemente se han descrito algunos estudios que podrían evidenciar que esa primera colonización podría tener lugar previamente, a través de la placenta, que hasta hace muy poco se consideraba estéril (Pelzer et al., 2017; Schwiertz y Rusch, 2016). La microbiota en los animales comienza a desarrollarse tras el nacimiento, o antes de él, y va evolucionando durante las primeras etapas de su vida hasta establecerse en su hospedador (Karczewski et al., 2014).

Los factores que pueden influir en el establecimiento de las diferentes poblaciones microbianas son muchos y muy diversos, algunos todavía desconocidos, e incluyen la edad, factores asociados al estrés como factores ambientales, la alimentación, la localización geográfica... (Bahrndorff et al., 2016; Karczewski et al., 2014). Las diferencias interindividuales han sido más estudiadas en la especie humana, están relacionadas con predisposiciones genéticas y pueden condicionar al padecimiento de determinadas enfermedades (Ahern y Maloy, 2020; Karczewski et al., 2014).

Funciones de la microbiota como parte de la relación simbiótica con su hospedador

Las poblaciones de microorganismos que forman parte de la microbiota han coevolucionado con sus hospedadores hasta establecerse como parte de los mismos mediante un largo proceso de selección natural (Moya et al., 2008). El proceso dinámico de coevolución ha supuesto un gran impacto en la evolución animal, gracias a que los microorganismos han establecido con el organismo superior una relación de simbiosis (Bahrndorff et al., 2016; Moya et al., 2008), participando en el desarrollo de numerosos procesos fisiológicos. Este tipo de asociación simbiótica se produce en la naturaleza

cuando dos organismos o grupos de organismos se benefician el uno del otro, lo que se conoce como «mutualismo»; o cuando solo uno de ellos recibe el beneficio, sin ocasionar ningún perjuicio al otro, que recibe el nombre de «comensalismo». Además, en función de la localización del microorganismo en el hospedador, se puede distinguir entre «ectosimbiosis», cuando están alojados en la superficie de algunos órganos o mucosas; y «endosimbiosis», cuando residen dentro de células eucariotas especializadas y han coevolucionado con el hospedador contribuyendo al mantenimiento de funciones de una importancia vital para el mismo (Moya et al., 2008).

Por todo esto, las funciones que desempeñan las diferentes microbiotas en los hospedadores son importantes para el correcto funcionamiento de sus aparatos y sistemas y son, por tanto, esenciales para garantizar un buen estado de salud. La microbiota más ampliamente estudiada y que aporta mayores funciones para el organismo superior es la microbiota que reside en el aparato digestivo (Figura A) y, en concreto, las poblaciones bacterianas que forman parte de la microbiota intestinal (Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018; Kim et al., 2017).

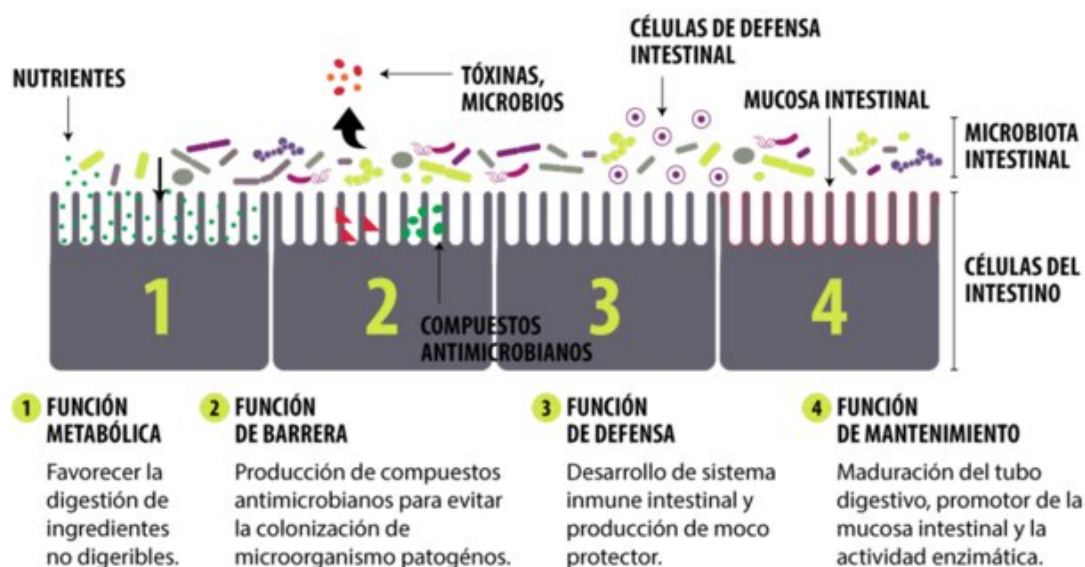


Figura A. Funciones de la microbiota intestinal. Fuente: adaptado de Biocodex-Microbiota Institute

La microbiota gastrointestinal participa activamente en los procesos metabólicos. Por un lado, favorece la digestión de los alimentos llevando a cabo procesos de fermentación de fibras solubles, como celulosas o pectinas y otros hidratos de carbono

complejos, como los almidones, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como acetato, propionato o butirato, que sirven como fuente de energía para las células epiteliales intestinales (Lee y Hase, 2014; Rowland et al., 2018). Este proceso se hace mucho más patente en rumiantes, puesto que la base de su metabolismo en el rumen se fundamenta en la obtención de energía en forma de AGCC a partir de la degradación de la celulosa de las plantas por parte de la microbiota ruminal (Hooper et al., 2002). La función metabólica también incluye la síntesis de vitaminas, especialmente la vitamina K y algunas vitaminas del grupo B, incluida la biotina, la cobalamina, el folato, la tiamina y la riboflavina, entre otras (Hooper et al., 2002; Lee y Hase, 2014; Rowland et al., 2018). Algunos estudios ponen de manifiesto que la microbiota podría tener un papel importante en los procesos de degradación de proteínas y en la obtención de péptidos y aminoácidos (Hooper et al., 2002; Rowland et al., 2018). En rumiantes es especialmente importante destacar la síntesis de proteína microbiana que tiene lugar en el rumen como parte de un complejo proceso de aprovechamiento del nitrógeno no proteico (Hooper et al., 2002).

La microbiota tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la función de barrera intestinal. Por un lado, favoreciendo los procesos de proliferación y diferenciación de las células epiteliales (Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018), que se renuevan continuamente contribuyendo a la homeostasis del epitelio intestinal, y también mediante la producción de moco en la capa mucosa que tapiza todo el tracto gastrointestinal (Alam y Neish, 2018; Schroeder, 2019). Además, la microbiota intestinal estabiliza la permeabilidad selectiva del epitelio intestinal, por un lado, contribuyendo a la absorción de nutrientes como vitaminas y minerales al permitir su paso a través de la membrana y, por otro, contribuyendo a su función de barrera que impide el paso de microorganismos patógenos y sus toxinas así como otras sustancias nocivas (Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018).

Por último, la microbiota intestinal tiene una importante función de defensa debido al papel de estos microorganismos simbioses sobre la maduración del sistema inmunitario, que se produce fundamentalmente de forma local en el intestino (Ahern y Maloy, 2020). Además, la microbiota también influye en el desarrollo de los diferentes

tipos de respuesta inmunitaria, no solo a nivel local, sino también de forma sistémica, mediante procesos complejos en los que participan otras microbiotas del organismo y células inmunitarias (Chen et al., 2018; Unger y Bogaert, 2017). Tanto las células del sistema inmunitario innato como las del sistema inmunitario adquirido, se ven moduladas por la microbiota del tracto intestinal mediante sistemas de comunicación que se basan en la secreción de microvesículas y AGCC. La microbiota intestinal modula la respuesta inmunitaria, contribuyendo a que esta sea más rápida y eficaz y también mantiene el equilibrio entre señales de inflamación y regulación (Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018).

Además, las poblaciones bacterianas residentes en las diferentes superficies, confieren resistencia a la colonización por agentes patógenos y oportunistas, puesto que comparten con ellos los receptores de mucosa, compiten por los nutrientes del nicho que ocupan y además algunas especies tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas (Buffie y Pamer, 2013; Litvak y Bäumler, 2019; Sorbara y Pamer, 2019). Estos mecanismos, que confieren protección frente al desarrollo de diversas enfermedades infecciosas, han sido estudiados especialmente en la microbiota intestinal (Buffie y Pamer, 2013; Ducarmon et al., 2019; Kim et al., 2017) y en la microbiota de la piel (Chen et al., 2018; Litvak y Bäumler, 2019). Además, estos mecanismos de defensa ante infecciones, junto a la proliferación de células inmunitarias y maduración del tejido linfoide asociado a los bronquios, parecen ser las funciones principales de protección que ejerce la microbiota respiratoria (Unger y Bogaert, 2017; Yatera et al., 2018).

La asociación simbiótica entre los microorganismos, fundamentalmente bacterianos, y el hospedador, es muy importante para el desarrollo correcto de todas las funciones de los aparatos y sistemas de los animales, para lo cual se considera primordial el mantenimiento de una microbiota sana y equilibrada en los organismos superiores.

La microbiota de la fauna silvestre

Una vez descritas las funciones principales de la microbiota en los procesos fisiológicos animales, el papel que desempeñan las poblaciones microbianas en la fauna silvestre merece especial atención. En los animales que viven en libertad, la asociación entre la microbiota intestinal y su hospedador tiene una gran importancia biológica para la supervivencia y conservación de las especies, ya que influye en la capacidad de adaptación de los animales al ecosistema en el que habitan (Bahrndorff et al., 2016; Gao et al., 2020; Qin et al., 2020). La microbiota y sus genes asociados, el microbioma, confieren adaptabilidad a determinadas variaciones en la alimentación y el metabolismo, incluso a lo largo de las diferentes estaciones del año (Gao et al., 2020; Qin et al., 2020; Sun et al., 2016); favorecen la tolerancia a perturbaciones medioambientales (Bahrndorff et al., 2016) y también confieren resistencia a determinadas enfermedades (Correa-Fiz et al., 2019; Gazzaniga y Kasper, 2018).

Se ha demostrado mediante diversos estudios que los animales silvestres muestran una microbiota intestinal diferente, más diversa y abundante, que la de las mismas especies criadas en cautividad y la de sus homólogos domésticos (Correa-Fiz et al., 2019; Gao et al., 2020; Gibson et al., 2019; Prabhu et al., 2020; Qin et al., 2020; Ushida et al., 2016). Algunos estudios han puesto de manifiesto que la microbiota de los animales silvestres destaca por la mayor funcionalidad de sus poblaciones bacterianas, especialmente relacionadas con la activación de rutas metabólicas y del sistema inmunitario (Gao et al., 2020; Gibson et al., 2019; Prabhu et al., 2020). Los factores que contribuyen a la heterogeneidad de la microbiota intestinal en los animales salvajes son fundamentalmente las diferencias en la alimentación (Correa-Fiz et al., 2019; Prabhu et al., 2020; Qin et al., 2020; Ushida et al., 2016), las condiciones ambientales (Gao et al., 2020; Prabhu et al., 2020), el genotipo del hospedador salvaje (Qin et al., 2020; Ushida et al., 2016), los diferentes requerimientos metabólicos (Gao et al., 2020; Gibson et al., 2019; Qin et al., 2020; Sun et al., 2016) y los factores asociados a la domesticación, que ha tenido un gran impacto negativo sobre la microbiota de algunas especies (Prabhu et al., 2020; Ushida et al., 2016).

La mayor diversidad y abundancia de la microbiota en la fauna silvestre puede tener importantes implicaciones para el manejo de los animales, tanto salvajes como domésticos. Es importante tener en cuenta estas diferencias en los programas de reintroducción de animales criados en cautividad, como especies en peligro de extinción, en la que una microbiota menos diversa podría dificultar su adaptación a las condiciones de vida libre y disminuir la probabilidad de supervivencia (Bahrndorff et al., 2016; Gibson et al., 2019; Qin et al., 2020). Debido a que se han descrito grupos bacterianos que podrían ser los responsables de la resistencia de algunos animales silvestres a determinadas enfermedades que afectan al ganado doméstico, la fauna salvaje podría ser una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para modular la microbiota de los animales más susceptibles a esas enfermedades (Bahrndorff et al., 2016; Correa-Fiz et al., 2019).

En este sentido, se considera que los suidos pueden ser un buen modelo de estudios comparativos de la microbiota, debido a que el jabalí (*Sus scrofa*), ancestro del cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*), y otros suidos próximos a él filogenéticamente, como el facóquero común (*Phacochoerus africanus*) o potamoquero rojo (*Potamochoerus porcus*), viven en la actualidad en condiciones de vida salvaje (Correa-Fiz et al., 2019; Ushida et al., 2016). El jabalí podría ser el modelo ideal para estos estudios, ya que es una especie omnívora con un espectro trófico muy amplio, que presenta una gran capacidad de adaptación a hábitats muy diferentes, explotando eficientemente los recursos disponibles, tanto de origen natural como fuentes de alimentación de origen humano, como los cultivos (Fernández-Llario, 2006). Se han descrito diferencias en la microbiota del jabalí y otros suidos salvajes con respecto al cerdo doméstico (Correa-Fiz et al., 2019; Ushida et al., 2016), que evidencian que los suidos salvajes tienen una microbiota más abundante y diversa que puede contribuir a esa gran capacidad de adaptación. Además, la mayor diversidad en la microbiota ha sido relacionada previamente con un mejor estado de salud de los hospedadores y la resistencia a algunas enfermedades que comparten con el cerdo doméstico (Correa-Fiz et al., 2019). No obstante, los estudios de caracterización de las poblaciones bacterianas para el control de enfermedades en el cerdo doméstico y otras especies son aún muy limitados, siendo este un campo muy interesante que se encuentra en desarrollo.

Las bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias que residen de forma habitual en las diferentes microbiotas de los organismos superiores, además de en otros muchos nichos ecológicos como plantas o alimentos (Duar et al., 2017).

Las BAL pertenecen al orden Lactobacillales, que a su vez agrupa varias familias y géneros muy diversos en cuanto a su morfología, metabolismo y fisiología (Mekadim et al., 2019). La familia más representativa de este grupo es Lactobacillaceae, que incluía hasta el año 2020 únicamente los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, a los que se ha sumado *Leuconostoc* y 23 nuevos géneros derivados de *Lactobacillus*, como se muestra en la Figura B (Zheng et al., 2020). Otras familias representativas de este grupo son Enterococcaceae (género *Enterococcus*), Streptococcaceae (géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*) y Leuconostocaceae (género *Leuconostoc*) (Pessione, 2012). De forma general, las BAL son Gram positivas (Gram +), catalasa negativas, anaerobias facultativas o microaerófilas, de morfología esférica o bacilar y tienen como característica principal la producción de ácido láctico como metabolito final de la fermentación de carbohidratos (Mekadim et al., 2019; Pessione, 2012). Aunque la mayoría de las especies han obtenido el estado de «Presunción Cualificada de Seguridad» (QPS, *Qualified Presumption of Safety*) y son reconocidas como seguras, algunas especies y cepas, especialmente de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, pueden ser patógenas (Pessione, 2012).

Las BAL destacan por tener diversas aplicaciones tecnológicas en el ámbito de la alimentación humana y animal, debido a las características de su metabolismo fermentativo (Mekadim et al., 2019). Así, son generalmente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, cárnicos, frutas y vegetales y pueden mejorar las características organolépticas y las propiedades nutricionales de los alimentos (Mekadim et al., 2019). Asimismo, las BAL han demostrado tener numerosos beneficios para la salud de los hospedadores y, por ello, constituyen uno de los principales grupos de microorganismos que se utilizan desde

hace décadas en formulaciones con compuestos bioactivos, como los probióticos y sus productos derivados (Piqué et al., 2019), que se definirán más adelante.

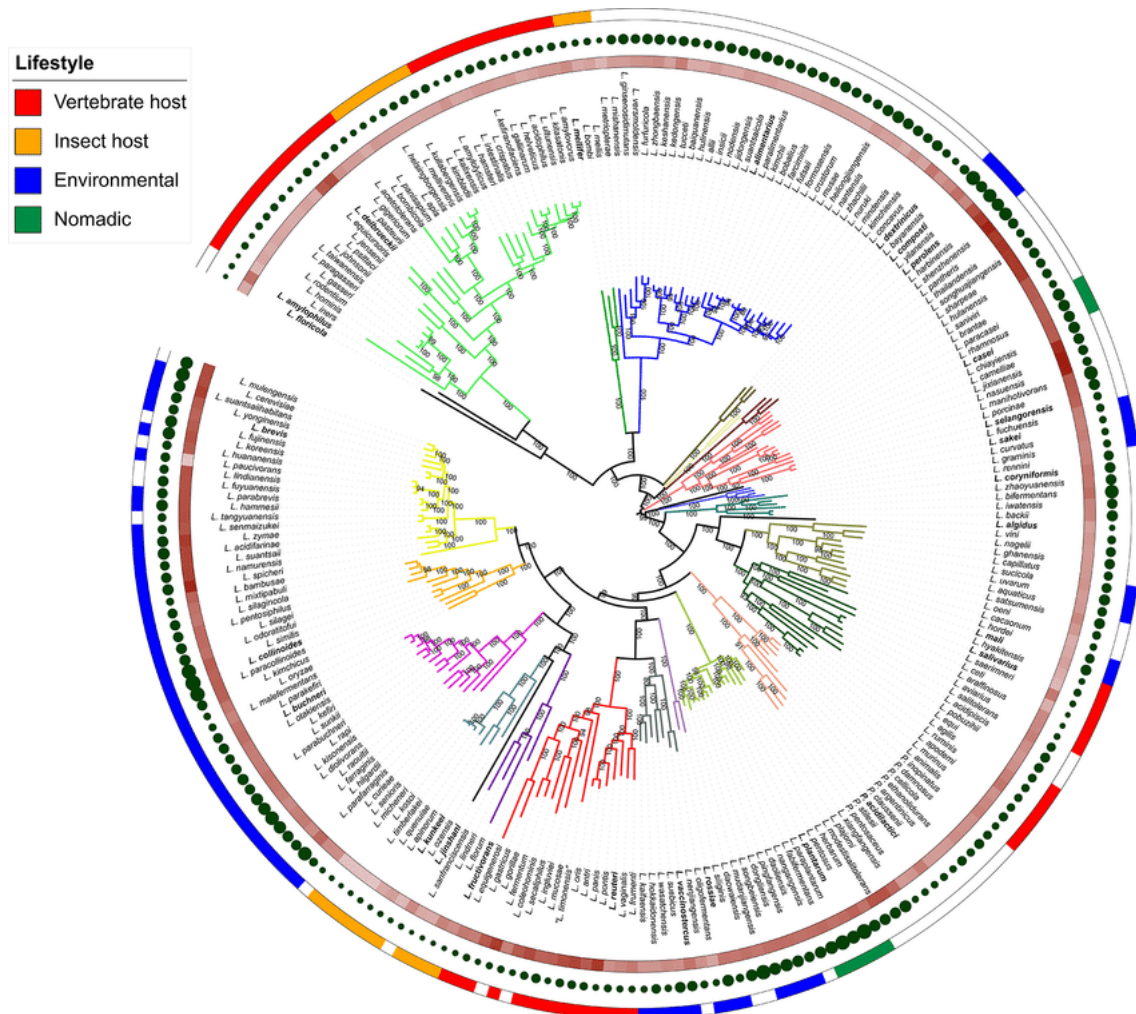


Figura B. Árbol filogenético de la familia Lactobacillaceae. En el centro, los nuevos grupos filogenéticos descritos se muestran con sus ramas del mismo color. Los anillos externos proporcionan información sobre las características genómicas y el origen de las especies, incluido el gradiente de color en rojo (contenido Guanina-Citosina) y los círculos representan el tamaño del genoma. Fuente: Zheng et al., 2020.

En relación con sus propiedades fermentativas, las BAL facilitan la digestión y el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta y también participan en la síntesis de algunos micronutrientes, como las vitaminas del grupo B (LeBlanc et al., 2011; Pessione, 2012). De forma general, se ha documentado ampliamente la capacidad de las BAL para inhibir patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas, muchas de ellas derivadas de su metabolismo como los ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético o propiónico) y metabolitos de bajo peso molecular (como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, ácidos grasos...); y también proteínas y péptidos antimicrobianos como las

bacteriocinas (nisina, pediocina...) (Amado et al., 2016; Mathur et al., 2020). Estas propiedades antimicrobianas, unidas al principio de exclusión competitiva ya mencionado, le confieren capacidad para establecerse en su nicho ecológico del hospedador y modular la microbiota comensal hacia grupos de bacterias beneficiosos, en detrimento de grupos potencialmente patógenos (Mekadim et al., 2019; Pessione, 2012; Piqué et al., 2019).

Por otro lado, se ha descrito la capacidad de las BAL para interactuar con el sistema inmunitario de los organismos superiores. Las BAL, y otros grupos minoritarios de microorganismos que forman parte de la microbiota del hospedador, poseen una gran variedad de moléculas que se conocen con el nombre de «Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos» (MAMP, *Microbe-Associated Molecular Patterns*). Gracias a los MAMPs, estos microorganismos pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador para diferenciarlos de los patógenos, mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), fundamentalmente receptores tipo Toll en la superficie celular (TLR, Toll-like receptors) o tipo NOD, en el citoplasma (NLR, NOD-like receptors) (Dolasia et al., 2018). Los MAMPs pueden ser componentes estructurales, fundamentalmente de la pared bacteriana como el peptidoglicano o los exopolisacáridos; o moléculas secretadas, como los AGCC: acetato, propionato, butirato... (Hevia et al., 2015). Todas estas moléculas interactúan con el sistema inmunitario del hospedador, participando en varios procesos fisiológicos animales, como ya se describió anteriormente en el apartado sobre la función defensiva de la microbiota.

Muchas especies de BAL que forman parte de las superficies y mucosas humanas y animales, establecen con sus hospedadores una relación de simbiosis mediante la cual pueden aportar numerosos beneficios para la salud de los mismos (LeBlanc et al., 2011; Mekadim et al., 2019). Estas propiedades beneficiosas pueden ser explotadas para la producción de compuestos funcionales como los prebióticos, los probióticos o los posbióticos.

Compuestos bioactivos en alimentos y piensos: los posbióticos

Los alimentos o piensos funcionales son aquellos que incorporan ingredientes o aditivos bioactivos con numerosas propiedades beneficiosas para los animales que los consumen y siempre bajo determinadas circunstancias. En este sentido, entendemos como aditivos funcionales a todos aquellos ingredientes que, incorporados en la dieta de los animales, pueden mejorar su bienestar y productividad más allá de lo que cabría esperar o explicar por su simple potencial nutricional (Velasco et al., 2006).

Dentro de los compuestos funcionales, aquellos de la familia de los «-bióticos» incluyen productos como los prebióticos, los probióticos, los simbióticos y los posbióticos cuyas definiciones se muestran en la tabla A. No obstante, existen otros conceptos menos utilizados y que han quedado obsoletos con el nuevo consenso de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) publicado recientemente (Salminen et al., 2021), que no se incluyen en este documento. Tanto los «prebióticos», ingredientes no digestibles; como los «probióticos», microorganismos vivos; y los «simbióticos», la combinación de ambos, son productos muy habituales en el mercado y su utilización está muy extendida en el campo de la nutrición animal. No obstante, los posbióticos, el miembro más novedoso de la familia de los compuestos bioactivos, aún no es muy conocido.

Los «posbióticos» son productos o subproductos metabólicos bioactivos, secretados por bacterias vivas o liberados a partir de la lisis de la membrana celular bacteriana, que pueden ser utilizados para mejorar la salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019). Este concepto, por definición, es bastante amplio y hasta hace poco tiempo se encontraba en revisión por solapar su definición con otros productos que actualmente se encuentran obsoletos, como los «paraprobióticos» o los «probióticos fantasma», que constituían solo las células microbianas inactivadas (Collado et al., 2019; Wegh et al., 2019). No obstante, a mediados del año 2021 se publicó un consenso científico internacional de la ISAPP que considera como posbiótico toda aquella

preparación que incluya tanto los microorganismos inanimados como sus componentes siempre que aporten un beneficio sobre la salud del hospedador (Salminen et al., 2021). La utilización de la palabra «inanimadas» en lugar de «inactivadas» haciendo referencia a las células microbianas, radica en que la utilización de microorganismos que no estén vivos no implica que estos hayan perdido su funcionalidad. Los posbióticos son factores solubles liberados durante la fermentación o la lisis bacteriana y pueden incluir metabolitos como enzimas, péptidos, proteínas, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y lípidos (AGCC); y componentes estructurales, fundamentalmente de la pared celular bacteriana, como ácidos teicoico y lipoteicoico, peptidoglicano, proteínas de la capa superficial bacteriana y otros polisacáridos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019). En los estudios científicos publicados hasta la fecha se consideran fundamentalmente los posbióticos de origen bacteriano, especialmente del grupo de las BAL mencionadas anteriormente, y más concretamente los producidos por especies que pertenecían tradicionalmente al género *Lactobacillus*. No obstante, existen otras especies bacterianas y de levaduras con capacidad para producir metabolitos bioactivos (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Tabla A. Definiciones de productos bioactivos utilizados en alimentación humana y animal aceptados por la comunidad científica en la actualidad

Concepto	Definición	Referencia
Prebiótico	ingredientes no digeribles de los alimentos que son utilizados como sustrato por los microorganismos del hospedador para aportar beneficios sobre su salud	(FAO/OMS, 2001; ISAPP, 2021)
Probiótico	microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del hospedador	(FAO/OMS, 2001; ISAPP, 2021)
Simbiótico	mezcla sinérgica de microorganismos vivos y su sustrato que mejoran la salud del hospedador	(FAO/OMS, 2001; ISAPP, 2021)
Posbiótico	factores solubles generados del metabolismo de los probióticos, así como las células microbianas inanimadas que mejoran la salud del hospedador	(ISAPP, 2021; Aguilar-Toalá et al., 2018)

Proceso de producción y ventajas de los posbióticos

El proceso de elaboración de un posbiótico consiste en la generación de los compuestos bioactivos en una matriz durante la fermentación microbiana bajo una serie de condiciones controladas que son específicas para cada microorganismo (Wegh et al., 2019). Tras este proceso se obtiene un producto final elaborado a partir de ingredientes bioactivos que puede denominarse fórmula o pienso funcional (Cicenia et al., 2014). Estos ingredientes funcionales consiguen mimetizar y optimizar los efectos de los probióticos sin la necesidad de administrar las bacterias vivas, lo que le confiere numerosas ventajas.

En el caso de los probióticos, para que el producto sea efectivo es necesario que los microorganismos vivos colonicen el intestino, lo que supone un gran reto tecnológico. Se han descrito una serie de factores que podrían dificultar este proceso y que son difíciles de controlar, como las características propias de la microbiota del hospedador, el consumo de antibióticos u otros medicamentos y las diferencias interindividuales relacionadas con la genética de cada sujeto (Marco y Tachon, 2013). Por otro lado, es muy complicado conocer si, una vez alcanzan su sitio de acción, se dan las condiciones necesarias para que los microorganismos probióticos produzcan las sustancias beneficiosas en la cantidad deseada. El gran avance que suponen los posbióticos es que los metabolitos bioactivos se producen en condiciones óptimas y se vehiculan directamente en dosis controladas a su sitio de acción sin necesidad de colonización microbiana (Cicenia et al., 2014).

Otra de las grandes ventajas tecnológicas es que la vida útil de los posbióticos es mayor y además se simplifican las condiciones de almacenamiento y transporte del producto final (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cicenia et al., 2014; Wegh et al., 2019). Esto es especialmente importante cuando no se dan las condiciones ideales para la conservación de probióticos, como podría ocurrir en condiciones de campo.

Por último, la administración de posbióticos disminuye la probabilidad de presentar efectos adversos como transferencia de genes de resistencia y bacteriemia, que se dan

esporádicamente tras la administración de probióticos, aunque en muy raras ocasiones se observan complicaciones graves (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Modo de acción de los posbióticos

Los posbióticos tienen, de forma general, efectos locales: modulador de la microbiota, antimicrobiano e inmunomodulador; y otros efectos sistémicos derivados que favorecen los procesos fisiológicos animales y confieren un enorme beneficio para la salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).

La modulación de la microbiota se lleva a cabo mediante moléculas señalizadoras que inducen complejos sistemas de comunicación celular (Xavier, 2018). Por ejemplo, las vesículas extracelulares (VEs) contienen gran diversidad de sustancias como proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, glucolípidos y polisacáridos, que interactúan con la microbiota del hospedador transfiriendo material genético y proteínas y participando en los procesos de señalización (Wegh et al., 2019). De esta manera se consigue modificar la composición de las poblaciones microbianas, creando un equilibrio favorable entre especies beneficiosas y potencialmente nocivas.

La actividad antimicrobiana de los posbióticos se debe a la presencia de compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, especialmente bacterias Gram + y Gram -. Estos compuestos son fundamentalmente proteínas y péptidos pequeños, como las bacteriocinas; y ácidos orgánicos, como el lactato o el acetato (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019). También se han descrito enzimas y otras moléculas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2018).

La interacción de los metabolitos bioactivos producidos por microorganismos con el sistema inmunitario del hospedador está generando cada vez más interés en la comunidad científica actual. El efecto inmunomodulador de los posbióticos está relacionado con su capacidad de inducción o supresión del sistema inmunitario y la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cicienia et al., 2014; Wegh et al., 2019). Algunos metabolitos que

participan en este proceso son los AGCC, como el acetato o el propionato, que potencian la función de barrera intestinal, favoreciendo la inmunidad de las mucosas y tiene un efecto sobre la diferenciación de los macrófagos y las células dendríticas (Wegh et al., 2019). También se han descrito varias proteínas y polisacáridos, como el lipopolisacárido, con diversos efectos sobre rutas inmunológicas y la producción de citoquinas (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cicenía et al., 2014).

Beneficios de los posbióticos para la sanidad animal

Los posbióticos consiguen mejorar los indicadores de salud y aumentar el rendimiento productivo y la rentabilidad de los animales, disminuyendo los procesos que cursan con una gran mortalidad y morbilidad, especialmente durante las fases críticas de la producción. Varios estudios realizados en corderos, cerdos y pollos de engorde han demostrado que la administración de posbióticos mejora los indicadores productivos de los animales (Bajagai et al., 2016; Humam et al., 2019; Izuddin, Loh, Samsudin, et al., 2019) y un estudio realizados en gallinas de puesta encontró una mejora en la producción y calidad de los huevos (Loh et al., 2014). El empleo de estos suplementos durante las fases de mayores requerimientos nutricionales, facilita la digestibilidad y el aprovechamiento de los nutrientes, favoreciendo la producción y absorción de sustancias que son esenciales para aumentar el ritmo de crecimiento de los animales y la eficacia en la transformación de los alimentos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Bajagai et al., 2016). Además, la modulación de la microbiota intestinal aumenta las poblaciones beneficiosas de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en detrimento de coliformes y otras enterobacterias potencialmente patógenas, entre los que se encuentran *E. coli* y *Clostridium* spp. (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Sin duda, una gran potencialidad de los posbióticos para la sanidad global está en la reducción de la utilización de antimicrobianos. Esto se consigue, por un lado, porque gracias a la capacidad de las BAL para producir sustancias inhibitorias del crecimiento de patógenos, se postulan como una novedosa alternativa para la limitación del uso de antibióticos en animales de producción. La creciente preocupación por la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos ocasionó la prohibición de la utilización de

estos como promotores del crecimiento en el año 2006 y a partir de ahí se han desarrollado distintas estrategias recogidas en el PRAN (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos, 2014-2018; 2019-2021). Además, algunas de estas sustancias inhibitorias se han utilizado en combinación con la terapia antibiótica, contribuyendo al tratamiento de la infección potenciando su efecto antimicrobiano y previniendo el desarrollo de resistencias antimicrobianas si se consigue el mismo efecto terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).

Por otro lado, debido a su capacidad para potenciar el sistema inmunitario, se consigue que los organismos animales puedan hacer frente a determinadas enfermedades de forma más efectiva, disminuyendo la cantidad de antibióticos a administrar y, en algunos casos, evitando su utilización. Este efecto antimicrobiano e inmunomodulador puede ser un factor muy relevante en la mejora en la salud de los animales y en los indicadores productivos, optimizando la rentabilidad de las explotaciones ganaderas. Pese a que existen algunos estudios preliminares en este sentido, se necesitan más investigaciones en profundidad en animales de producción, especialmente en condiciones reales, pero que cumplan los criterios básicos de cualquier ensayo experimental.

— .

Introducción general a la tesis doctoral y objetivos



Introducción a la tesis doctoral

Los microorganismos que residen de forma habitual en un hospedador forman parte de un complejo ecosistema, conocido con el nombre de «microbiota», que participa en el desarrollo de multitud de procesos fisiológicos. La microbiota de la fauna silvestre es más diversa y abundante que la de los animales domésticos y destaca por la mayor funcionalidad de sus poblaciones bacterianas (Gao et al., 2020; Qin et al., 2020). Asimismo, tiene una gran relevancia biológica para la supervivencia y conservación de las especies, ya que influye en la capacidad de adaptación de los animales al ecosistema en el que habitan. De hecho, se han descrito grupos bacterianos que podrían ser los responsables de la resistencia de algunos animales silvestres a determinadas enfermedades que afectan al ganado doméstico. Por todo esto, la fauna salvaje podría ser una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para modular la microbiota de los animales más susceptibles a esas enfermedades (Bahrndorff et al., 2016; Correa-Fiz et al., 2019).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) conforman un grupo de microorganismos muy estudiado por sus numerosas aplicaciones tecnológicas y por sus propiedades beneficiosas para la salud humana y animal. Este tipo de bacterias han demostrado aportar beneficios muy variados, por un lado, favoreciendo los procesos de digestión, absorción y síntesis de nutrientes, debido a las características de su metabolismo fermentativo; y, por otro lado, potenciando los sistemas innatos para la lucha frente a patógenos, debido principalmente a sus propiedades para producir metabolitos antimicrobianos y a su capacidad para interactuar con el sistema inmunitario del hospedador (Mekadim et al., 2019; Pessione, 2012). Por todo esto, se utilizan de forma habitual en formulaciones con compuestos bioactivos, como los probióticos y otros productos derivados, como los posbióticos (Piqué et al., 2019).

En este sentido, los piensos funcionales son aquellos que incorporan compuestos bioactivos que pueden mejorar la salud y la productividad de los animales más allá de lo que cabría esperar únicamente por su potencial nutricional (Velasco et al., 2006). Los

posbióticos son productos o subproductos metabólicos bioactivos y componentes estructurales bacterianos que son generados en una matriz durante un proceso de fermentación microbiana controlada. Los posbióticos constituyen un producto innovador que se produce a partir de bacterias probióticas que se encuentran inanimadas, conservando su actividad funcional, en la preparación final y que incluye los metabolitos de fermentación generados de forma espontánea con un rendimiento optimizado (Salminen et al., 2021). Estos productos se encuentran en auge y se postulan como una nueva alternativa para el manejo de ciertas patologías que afectan a la sanidad y a la productividad de los animales.

La necesidad de la incorporación de nuevas herramientas preventivas o terapéuticas para el control de enfermedades infecciosas viene determinada por la emergencia de patógenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos de uso común, lo que condujo a la prohibición de la utilización de estos como aditivos en alimentación animal en las últimas décadas y a promover su limitación a condiciones terapéuticas (Bajagai et al., 2016). Estas nuevas alternativas necesitan ser investigadas en profundidad mediante una caracterización completa en condiciones de laboratorio que aseguren, por una parte, su inocuidad y, por otra parte, su efectividad (Soltani et al., 2021). Para esto, se deben complementar los procedimientos de laboratorio mediante la extrapolación de los estudios en animales de experimentación, en una primera fase, y en las condiciones más reales de campo, en una segunda fase.

Por todo esto, la elaboración de un producto innovador que pueda ser comercializado para el control de determinados procesos de importancia en sanidad animal, requiere del diseño de una batería de procedimientos que incluyan un extenso trabajo de investigación y el cumplimiento de una serie de requisitos que aseguren su calidad.

Esta tesis doctoral presenta la particularidad de pertenecer a un proyecto de investigación industrial, desarrollado en el seno de la empresa INGULADOS SL, que pretende generar conocimiento científico y tecnológico que pueda ser aplicado por la propia empresa, para aumentar su competitividad en el sector; y transferido a la sociedad en general, para solventar el problema de salud pública planteado.

Estructura de la tesis doctoral

Este documento se estructura en tres bloques claramente diferenciados, que se complementan entre sí. El **BLOQUE I** aglutina una serie de experimentos de laboratorio *in vitro*, divididos en tres capítulos, que describen los procedimientos para la selección y la caracterización de las propiedades de las BAL aisladas de animales silvestres con situaciones epidemiológicas particulares. El capítulo I, denominado «Aislamiento y selección de BAL de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferente prevalencia de tuberculosis (TB) y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias», describe los procedimientos para el aislamiento de BAL simbioses de la microbiota de jabalíes y pretende descifrar el papel de estas en relación con la TB, una importante enfermedad que afecta tanto a la fauna silvestre como a la ganadería doméstica, generando importantes pérdidas económicas en todo el mundo. En el segundo capítulo titulado «Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación *in vitro* de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora» se realiza una valoración de las propiedades beneficiosas de las BAL aisladas en relación con tres aspectos fundamentales: su seguridad para los hospedadores, su capacidad para interactuar con las células inmunitarias de los hospedadores y sus propiedades para producir sustancias antimicrobianas frente a patógenos animales. En el tercer y último capítulo de este bloque, llamado «Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudio de sinergia con antibióticos» se describen los procedimientos para dilucidar el origen de los componentes que ejercen fundamentalmente la actividad antimicrobiana, se optimiza su efecto y se evalúan en sinergia con antibióticos de uso común en medicina veterinaria.

Por otro lado, el **BLOQUE II** describe tres modelos experimentales de investigación aplicada *in vivo* para tratar de buscar aplicaciones a las propiedades potencialmente beneficiosas detectadas. En cada uno de los estudios se elaboró un producto diferente a partir de una selección de BAL aisladas de la microbiota de jabalíes con una situación sanitaria excepcional. Este bloque está estructurado en tres capítulos de investigación aplicada en sanidad animal con tres modelos que van desde lo más experimental,

comenzando con un estudio en animales destinados a fines científicos, cuyas condiciones están totalmente controladas en todo momento; pasando por un modelo doméstico que presenta las condiciones habituales de estabulación de los animales durante un periodo determinado de tiempo, con una intervención moderada; hasta finalizar con el tercer modelo, que es el silvestre, que refleja las condiciones más reales posibles en animales que viven en libertad, pero cumpliendo determinados requisitos para ser considerado un modelo experimental. De este modo, capítulo IV se denomina «Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón» y describe la investigación *in vivo* de una de las sinergias funcionales detectadas en el capítulo III, para el tratamiento de la infección experimental producida por *Pasteurella multocida* mediante la administración combinada de un antibiótico y un suplemento elaborado con metabolitos de las BAL. El capítulo V «Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería» describe el efecto de un producto posbiótico añadido al pienso en un cebadero ovino durante el periodo de engorde de los animales de producción. El capítulo VI «Administración de posbióticos para el control de TB en fauna silvestre» cierra el bloque de experimentación animal con un estudio en jabalíes que pretende controlar la TB, la enfermedad en relación con la cual se seleccionaron las BAL beneficiosas, mediante la administración de un producto posbiótico con propiedades antagónicas para *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la TB.

Por último, el **BLOQUE III** presenta un capítulo único, que es el capítulo VII de la tesis doctoral, denominado «Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica» que describe la transferencia de tecnología y conocimiento que se ha derivado de la presente tesis de doctorado industrial, materializando el impacto que ha tenido el desarrollo de procesos sobre la empresa INGULADOS y describiendo tanto las actividades de difusión y divulgación que se han realizado, así como la protección de determinadas invenciones mediante la solicitud de dos patentes.

Objetivos de la tesis doctoral

En base a todo lo anterior y a los antecedentes previamente desarrollados, esta tesis doctoral plantea los siguientes objetivos generales:

BLOQUE I: experimentos de laboratorio *in vitro*

Capítulo I → objetivo I

Dilucidar si la microbiota de las poblaciones de jabalíes contribuye a mantener un estado libre de tuberculosis en fincas localizadas en zonas de alto riesgo de la enfermedad mediante el estudio de las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de su perfil de bacterias ácido-lácticas con capacidad para antagonizar *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis.

Capítulo II → objetivo II

Estudiar las propiedades potencialmente beneficiosas de las bacterias ácido-lácticas aisladas de la microbiota de jabalíes mediante un análisis genotípico y fenotípico completo del perfil de seguridad de los aislados, de su actividad antimicrobiana frente a patógenos del jabalí y de sus propiedades inmunomoduladoras.

Capítulo III → objetivo III

Determinar la naturaleza de la fracción antimicrobiana y estudiar la sinergia de los metabolitos producidos al sobrenadante de forma óptima con una selección de antibióticos frente a patógenos importantes en medicina veterinaria.

BLOQUE II: experimentación animal *in vivo*

Capítulo IV → objetivo IV

Estudiar el efecto de la administración por vía oral de un suplemento elaborado a partir de los metabolitos producidos por las bacterias ácido-lácticas en combinación con la terapia antibiótica para el control de una neumonía experimental en modelo ratón.

Capítulo V → objetivo V

Analizar el efecto de la administración de un producto posbiótico elaborado a partir de una selección de aislados sobre los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en un cebadero de corderos.

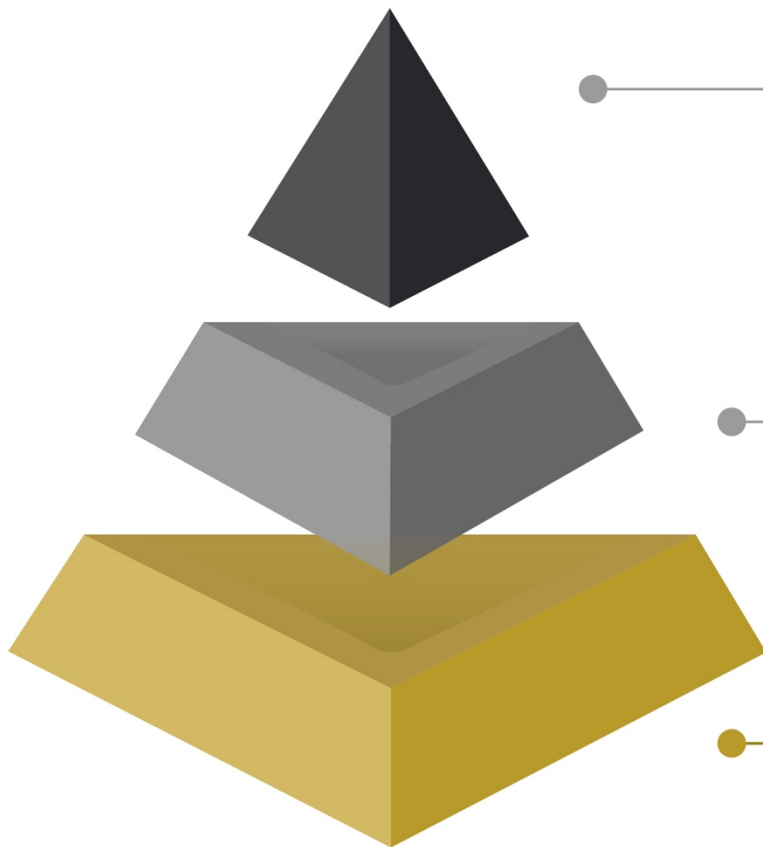
Capítulo VI → objetivo VI

Evaluar el efecto de un producto posbiótico administrado durante la época de suplementación llevada a cabo en poblaciones de jabalíes sobre la situación epidemiológica de la tuberculosis.

BLOQUE III: transferencia de tecnología y conocimiento científico

Capítulo VII → objetivo VII

Transferir la tecnología y el conocimiento científico derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral mediante la solicitud de patentes de invención, la aplicación de los conocimientos al desarrollo de procesos en la empresa y la difusión de los resultados mediante la asistencia a congresos y la publicación en revistas científicas y divulgativas.



Bloque 03
Transferencia tecnológica
y conocimiento científico

Bloque 02
Experimentación
animal *in vivo*

Bloque 01
Experimentos de
laboratorio *in vitro*.

Objetivo 1 | Cap I

<<Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias>>

Objetivo 2 | Cap II

<<Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación *in vitro* de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora>>

Objetivo 3 | Cap III

<<Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos>>

Objetivo 4 | Cap IV

<<Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón>>

Objetivo 5 | Cap V

<<Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería>>

Objetivo 6 | Cap VI

<<Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre>>

Objetivo 7 | Cap VII

<<Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica>>

Bloque 03

Bloque 02

Bloque 01

Bloque 1

Experimentos de laboratorio *in vitro*



ÍNDICE BLOQUE I

Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias	89
<i>INTRODUCCIÓN</i>	91
<i>MÉTODO</i>	97
<i>Figura resumen del método</i>	105
<i>RESULTADOS</i>	106
<i>DISCUSIÓN</i>	124
CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora	133
<i>INTRODUCCIÓN</i>	135
<i>MÉTODO</i>	145
<i>Figura resumen del método</i>	153
<i>RESULTADOS</i>	154
<i>DISCUSIÓN</i>	170
CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos	181
<i>INTRODUCCIÓN</i>	183
<i>MÉTODO</i>	187
<i>Figura resumen del método</i>	193
<i>RESULTADOS</i>	194
<i>DISCUSIÓN</i>	200

LAB

CAPÍTULO I

Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para antagonizar las micobacterias



INTRODUCCIÓN

La importancia de la tuberculosis en reservorios silvestres como el jabalí

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica causada por varias especies de micobacterias perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que afecta al sector ganadero y cinegético y genera importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Ayele et al., 2004; Naranjo et al., 2008). A pesar de las estrictas medidas llevadas a cabo durante las campañas de erradicación en los últimos años, esta enfermedad sigue siendo muy prevalente en algunos países europeos, incluida España, donde las especies ganaderas cohabitan con reservorios silvestres de micobacterias, especialmente *M. bovis* (Corner, 2006; Naranjo et al., 2008). Los ungulados salvajes como el jabalí europeo (*Sus scrofa*) muestran una alta prevalencia TB en algunas zonas de España (Risco et al., 2019), complicando una completa eliminación de la enfermedad en estas áreas. Aunque estas cuestiones se tratarán en mayor profundidad en el capítulo IV, la evidencia científica sugiere que, junto con los estudios epidemiológicos y ecológicos, es necesario un mejor conocimiento de la patología y transmisión de la infección por *M. bovis* para determinar el papel significativo de estos animales silvestres en el mantenimiento de la TB.

Al igual que otras especies del CMT, las células de *M. bovis* son inicialmente fagocitadas por macrófagos en el hospedador, donde pueden sobrevivir, replicarse y diseminarse a diferentes partes anatómicas del cuerpo (Cosma et al., 2003). Cuando los macrófagos transportan las bacterias a tejidos más profundos, se produce la acumulación de otras células inmunitarias alrededor de los focos infectados para formar granulomas, que son complejos inmunitarios organizados formados por macrófagos, linfocitos y neutrófilos diferenciados, aunque los neutrófilos también están presentes en las primeras etapas de la infección. Pese a la formación de los granulomas en el hospedador como respuesta a la infección, la bacteria persiste de forma indefinida existiendo la posibilidad de una reinfección, pero sin síntomas específicos, que es la paradoja central de la inmunidad frente a *M. bovis* (Cosma et al., 2003). Algunos estudios han confirmado que un elevado

número de individuos dentro de un grupo de animales infectados no muestran signos clínicos, pero presentan lesiones generalizadas en la inspección *post mortem* (Menin et al., 2013). En el caso de los jabalíes, a menudo se encuentran patrones generalizados de la infección con lesiones torácicas y abdominales, generalmente en los nódulos linfáticos traqueo-bronquiales y mesentéricos (Martín-Hernando et al., 2007; Matos et al., 2016).

Los jabalíes asintomáticos con lesiones generalizadas excretan una gran cantidad de bacilos de *M. bovis* al medio ambiente (Risco et al., 2019; Santos et al., 2015). La vía de contagio de *M. bovis* es a través de la mucosa oronasal mediante los alimentos, el agua o el aire y la bacteria se disemina desde los nódulos linfáticos submandibulares o mesentéricos al resto del organismo (Martín-Hernando et al., 2007; Matos et al., 2016; Menin et al., 2013). Sin embargo, la distribución variable de las lesiones sugiere que; primero, no es posible dilucidar si la vía respiratoria o la digestiva es más relevante en estos animales; y, en segundo lugar, la respuesta inmunitaria de cada individuo puede influir en el resultado de la enfermedad. Las razones de esta variabilidad en la distribución de las lesiones no ha sido completamente explicada y podría deberse a la variabilidad genética del jabalí (Acevedo-Whitehouse et al., 2005).

En jabalíes se ha comprobado cómo la presencia de otros microorganismos puede influir en el desarrollo de la TB. Así, los jabalíes portadores de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y de parásitos del género *Metastrongylus*, ambos patógenos en esta especie, tienen más probabilidad de desarrollar lesiones generalizadas de TB (Risco et al., 2014). Por otro lado, durante los últimos años, se ha propuesto en medicina humana la posibilidad de que la microbiota del hospedador pueda contribuir a la resistencia a esta enfermedad en determinados individuos, como se abordará en este capítulo.

Contribución de la microbiota comensal en la lucha frente a la tuberculosis

Como se ha visto en la introducción, los microorganismos simbiotes de un organismo participan en muchos procesos fisiológicos y contribuyen a mantener un buen estado de salud en los animales. De hecho, la ausencia de alteraciones en los microorganismos que forman parte de la microbiota, es decir, una microbiota sana, conocida con el

nombre de «eubiosis», puede ser considerada como un importante indicador de salud en las poblaciones animales.

Las micobacterias patógenas, como *M. tuberculosis* o *M. bovis*, son microorganismos adaptados a su hospedador que han coevolucionado con el mismo y han desarrollado estrategias para evadir los mecanismos de defensa. De hecho, una de las primeras barreras que deben eludir es la microbiota comensal, que reside en las mucosas de los hospedadores, y que tiene como función primordial dificultar este proceso y evitar la infección de los macrófagos, su nicho replicativo (Cambier et al., 2014).

Son muchos los estudios recientes que han puesto de manifiesto que una microbiota alterada en uno o varios aparatos o sistemas del organismo, conocida con el nombre de «disbiosis», puede condicionar al padecimiento de un gran número de enfermedades de todo tipo (du Teil Espina et al., 2019; Nicholson et al., 2012; Peters et al., 2019). Diversos estudios en la especie humana y en modelos animales han demostrado el papel protector que tiene la microbiota digestiva frente a la colonización y el desarrollo de la TB pulmonar (Dumas et al., 2018; Y. Hu et al., 2019). De hecho, se han descrito alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en pacientes con tuberculosis (Luo et al., 2017; Winglee et al., 2014).

Esta asociación entre la microbiota digestiva y una enfermedad eminentemente respiratoria en humanos, forma parte del complejo eje intestino-pulmón y no ha sido estudiada en animales hasta la fecha. En el caso de especies como el jabalí, la asociación entre la microbiota digestiva y la TB podría ser incluso más relevante, dado que la presencia de lesiones generalizadas con afectación digestiva son hallazgos relativamente frecuentes durante la inspección *post mortem* (Vicente et al., 2006). Esto puede deberse a que en esta especie es importante la vía de contagio oral mediante ingestión de agua o alimentos contaminados, o incluso de carroña.

Por otro lado, algunas especies de bacterias que forman parte de la microbiota comensal producen sustancias que tienen propiedades antimicobacterianas e inmunomoduladoras, es decir, con potencial para antagonizar el desarrollo de bacterias

del MTC (Dumas et al., 2018; Hong et al., 2016; Wood et al., 2017). Estas propiedades podrían realzar el papel de la microbiota comensal para frenar el desarrollo de la enfermedad cuando se produce el contagio.

Papel relevante del grupo de las bacterias ácido-lácticas en la microbiota comensal

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias que residen de forma habitual en la microbiota digestiva de los mamíferos (Duar et al., 2017). Uno de los géneros más representativos de este grupo, que se conocía hasta el año 2020 como *Lactobacillus*, en la actualidad se encuentra dividido en 23 nuevos géneros, como se ha comentado en la introducción. No obstante, las bacterias que formaban parte de él se pueden seguir nombrando con el término general «lactobacilos», puesto que se considera de utilidad al tratarse de géneros de especies con características comunes (Zheng et al., 2020). Otros géneros de importancia en este grupo son los pediococos (*Pediococcus* spp.) y enterococos (*Enterococcus* spp.) que, si bien muestran algunas diferencias con respecto los géneros anteriores, comparten un número elevado de propiedades (Pessione, 2012). No obstante, es importante destacar que varias especies del género *Enterococcus* se han relacionado con procesos patológicos (Braïek y Smaoui, 2019; Pessione, 2012).

Se han descrito varias especies de BAL con capacidad para modular la respuesta inmunitaria de los hospedadores ya que interactúan con las células epiteliales y las células presentadoras de antígenos como los macrófagos y han sido estudiadas con mayor profundidad en los lactobacilos (Mohamadzadeh et al., 2005; Rocha-Ramírez et al., 2017). Aunque los mecanismos específicos todavía no se conocen del todo, se ha demostrado que los componentes de la pared celular y la membrana de estas bacterias, como los pili (fimbrias), los peptidoglicanos, los ácidos lipoteicoicos (LTA, WTA) o los exopolisacáridos (EPS), desempeñan un papel importante en la activación de las células fagocíticas de la respuesta inmunitaria innata (Hevia et al., 2015).

La participación de los lactobacilos en determinados procesos fisiológicos del hospedador es fundamental para mantener una adecuada homeostasis de la

microbiota, evitando las disbiosis, particularmente en el intestino (Diep et al., 2009; Gueimonde et al., 2013; Liu et al., 2014). El mantenimiento de un equilibrio microbiano beneficioso en el hospedador previene la colonización de patógenos oportunistas (Martin et al., 2013). Las BAL producen metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol y bacteriocinas para competir con otros microorganismos y establecerse en su nicho ecológico (Pessione, 2012). Algunos de estos compuestos, principalmente las bacteriocinas, han demostrado tener actividad frente a *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Stedman et al., 2018; Todorov et al., 2008, 2014). Aunque se describirán con más detalle en el capítulo siguiente, de forma general, las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que pueden clasificarse en tres clases diferentes dependiendo de su estructura química y tamaño: la clase I incluye péptidos menores de 10 kDa termoestables y modificados postraduccionalmente (ej., nisina), la clase II engloba también a los péptidos pequeños y termoestables pero no modificados (ej., pediocina) y dentro de esta clase se encuentra la IIa, con una secuencia consenso; la IIb, bacteriocinas de dos péptidos; la IIc, péptidos pequeños termoestables y la IId, las bacteriocinas de péptido único; así como otras subclases menos estudiadas. Por último, las bacteriocinas de clase III se corresponden con péptidos no modificados, termolábiles y mayores de 10 kDa con un mecanismo de acción bacteriolítico (bacteriolisinas) o no lítico (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Además, las bacteriocinas también pueden contribuir a los efectos inmunomoduladores sobre las células mononucleares de sangre periférica y las células dendríticas (Hegarty et al., 2016).

Debido a que la bacteria patógena *M. bovis* penetra en el organismo a través de las mucosas de los tractos respiratorio o digestivo, donde residen los lactobacilos y otras BAL de la microbiota del hospedador, antes de interactuar con los macrófagos, que son el nicho óptimo para su replicación y supervivencia; y al hecho de que la microbiota puede interactuar con los macrófagos y desarrollar actividad antimicrobiana, estas bacterias beneficiosas podrían ejercer un efecto protector y evitar la diseminación de la micobacteria por el resto del organismo.

A raíz de todo lo anteriormente expuesto se propuso como **objetivo** general dilucidar si la microbiota de las poblaciones de jabalíes contribuye a mantener un estado libre de

TB en fincas localizadas en zonas de alto riesgo de la enfermedad, debido a sus propiedades para antagonizar la bacteria causante de la enfermedad *M. bovis*. Para ello, en este capítulo I se propusieron los siguientes **objetivos** específicos:

- Realizar el aislamiento de BAL de la microbiota digestiva de jabalíes en fincas con diferente situación epidemiológica con relación a la TB.
- Descifrar el papel de las BAL que forman parte de la microbiota comensal en el desarrollo de la TB, analizando la capacidad para antagonizar al agente causal de la misma, *M. bovis*: por un lado, estudiando los efectos antimicrobianos de las BAL para inhibir el crecimiento de *M. bovis* y el origen de las actividades inhibitorias encontradas y, por otro, analizando sus propiedades para modular la capacidad fagocítica de los macrófagos.

MÉTODO

1. Selección de fincas de estudio y toma de muestras fecales de jabalíes

Se seleccionaron cuatro fincas situadas en el centro y oeste de España con diferentes localizaciones geográficas, todas ellas situadas en zonas calificadas como especial riesgo (alto) de TB en fauna silvestre. Las fincas 1, 2 y 3 tienen nula prevalencia de TB en jabalíes pese a estar rodeada de fincas con altas prevalencias de la enfermedad. La finca 4, por el contrario, tiene una prevalencia del 20% de TB en la población de jabalíes (Tabla 1.1). Todas las prevalencias se estimaron a partir de datos recogidos en las historias clínicas de las fincas durante los últimos años y están calculadas a partir de lesiones compatibles con tuberculosis de un porcentaje de animales abatidos en las acciones cinegéticas de las mismas (datos no incluidos en este documento).

La toma de muestras se realizó mediante hisopo rectal con medio AMIES (DELTALAB) de 37 animales jóvenes menores de un año, incluyendo animales vivos capturados mediante capturaderos y animales muertos abatidos en monterías. Los hisopos rectales fueron transportados al laboratorio y conservados a 4 °C durante un máximo de dos días hasta su procesamiento. Tras la toma de muestras, los animales vivos fueron liberados inmediatamente a su hábitat natural.

Tabla 1.1. Información general sobre las fincas incluidas en el estudio

	Fincas del estudio			
	1	2	3	4
Localización	Cuenca (40° 7' 53.77"N / 2° 31' 2.9"O)	Badajoz (38° 58' 44.6"N / 5° 8' 53.37"O)	Ciudad Real (39° 2' 8.35"N / 4° 10' 27.89"O)	Cáceres (39° 48' 28.84" N / 5° 55' 59,88" O)
Área (Ha)	800	500	2500	4900
Vallado perimetral	Cerramiento cinegético	Cerramiento cinegético	Cerramiento cinegético	Abierta
Densidad (jabalíes / Km²)	45	75	35	15

	Fincas del estudio			
	1	2	3	4
Alimentación	Recursos naturales y suplementación con pienso especial para jabalí y cereal en siembras	Recursos naturales y suplementación con maíz y pienso especial para jabalí	Recursos naturales y suplementación con suero lácteo, pienso especial para jabalí y cereal	Recursos naturales
Ración de la suplementación	<i>Ad libitum</i>	0.7 kg / animal	<i>Ad libitum</i>	Sin suplementación
Cohábitat con otros ungulados	Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	Ciervo común (<i>Cervus elaphus</i>) y muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>)	Ciervo común (<i>Cervus elaphus</i>), muflón europeo (<i>Ovis musimon</i>) y corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	Ciervo común (<i>Cervus elaphus</i>)
Prevalencia de lesiones de TB (%)	0	0	0	20
Otras enfermedades	No se detecta	<i>Chlamydia</i> Mal rojo (<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>)	<i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pasteurella multocida</i> B	Sin información

2. Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas con potencial antimicrobiano

En el laboratorio de microbiología, se introdujeron los hisopos en 10 mililitros (mL) de agua de peptona (Oxoid) y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en medio MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe, Oxoid), selectivo para el aislamiento de BAL. Tras la incubación de las placas en microaerofilia a 37 °C durante 48-60 horas (h) se seleccionaron las placas que tuvieran un número aproximado de 20 a 100 colonias. De estas placas se inocularon 70 colonias diferentes morfológicamente en una

microplaca de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™) con caldo MRS y se incubaron a 37°C durante 48 h en microaerofilia.

Se utilizaron dos bacterias indicadoras de actividad antimicrobiana para realizar una primera selección de BAL con potencial inhibitorio. Por un lado, se usó *Mycobacterium smegmatis* mc²155, que es una micobacteria no patógena de rápido crecimiento que ha sido utilizada previamente para un cribado rápido de actividad antimicobacteriana (Stedman et al., 2018) y, por otro, se utilizó *Micrococcus luteus* ATCC4698, una bacteria altamente sensible a la actividad antimicrobiana del pH, de las bacteriocinas y otros compuestos secretados (Stedman et al., 2020). *M. smegmatis* se cultivó en caldo TSB (Oxoid) suplementado con 0,05 % de Tween 80 (Sigma) durante 37 °C durante 48 h a 200 rpm en un agitador orbital y *M. luteus* se cultivó en las mismas condiciones, pero en TSB sin suplementar. Los aislados crecidos en MRS fueron inoculados mediante un replicador (Scienceware® 96-well replicator, Sigma-Aldrich) en el medio agar Triptona Soja (TSA, Oxoid) con la bacteria indicadora previamente sembrada de forma masiva. Las placas se incubaron 37 °C durante 48 h y las colonias que mostraron actividad antimicrobiana, detectada mediante la presencia de halos de inhibición, se identificaron mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa y secuenciación del gen 16S de ARN ribosómico (ARNr, LGC Genomics). Se realizó una primera selección diferentes especies de bacterias con distinta morfología y características tintoriales de los animales pertenecientes a las diferentes fincas. Las BAL seleccionadas se conservaron con glicerol al 15 % a -80°C.

3. Cocultivos de bacterias ácido-lácticas con *M. bovis* BCG y determinación de la tasa de supervivencia

Para la confirmación de la actividad antimicrobiana frente a micobacterias, se realizaron cocultivos de las BAL seleccionadas y dos cepas de *M. bovis* BCG: BCG Pasteur y BCG $\Delta leuD$ pAS^{OriM}XF (Brosch et al., 2000; Stedman, 2017). Ambas cepas se cultivaron en caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 10 % Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa (OADC, Sigma-Aldrich), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich), 0,2 % glicerol y 40 µg/mL kanamicina a 37 °C en agitador orbital a 225 rpm durante 5-7 días. BCG $\Delta leuD$ pAS^{OriM}XF

expresa la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP) de manera que su crecimiento puede monitorizarse mediante la medición de la fluorescencia (Borsuk et al., 2007).

Las BAL de forma individual y las cepas de BCG se cocultivaron en medio Mueller Hinton (MH) suplementado con 10 % Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa (OADC, Sigma-Aldrich), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich) y 0,2 % de glicerol, a una concentración inicial de $5 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colonias (ufc)/ mL y $5 \cdot 10^6$ ufc/mL, respectivamente. Estas condiciones son óptimas para el crecimiento de ambos tipos de bacterias, sin perjudicar a ninguna de ellas (Stedman et al., 2018). Los cocultivos y sus correspondientes controles (monocultivos) se incubaron a 37 °C durante 48 h y se tomaron muestras a tiempo 0, 24 y 48 h para determinar la tasa de supervivencia de *M. bovis*.

La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG en los cocultivos se determinó de forma directa, mediante recuento de bacterias en medio selectivo, y de forma indirecta, mediante medición de la expresión de GFP. El medio selectivo utilizado fue Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado con 5 % OADC y 0,2 % de glicerol, que permite el crecimiento de micobacterias e inhibe el crecimiento de BAL. También se realizaron recuentos de BAL para monitorear su crecimiento en medio MRS. Los resultados se expresaron como \log_{10} de las ufc/mL. La expresión de fluorescencia en los cocultivos se midió a 485/535 nanómetros (nm) en el lector DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) y la expresión de GFP se indicó mediante unidades de fluorescencia (Fluorescence Units, FU).

4. Evaluación del efecto de determinados parámetros sobre la actividad encontrada frente a *M. bovis* BCG

Se midió el pH de los cocultivos mediante un pH-metro (Hanna) a tiempo inicial (0 h) y final (48 h) para determinar el efecto del pH en la tasa de supervivencia de *M. bovis*. Además, con este mismo objetivo, se monitorizó la tasa de supervivencia del monocultivo de *M. bovis* BCG en el mismo medio MH-OADC-TW80-Gly a pH7 y pH4,5.

Para determinar el efecto de los metabolitos producidos por las BAL que mostraron actividad, la cepa BCG $\Delta leuD$ pAS^{OriM}XF se cultivó a una concentración de $5 \cdot 10^8$ ufc/mL en los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos de dichas BAL, libres de células microbianas, que fueron propagadas en el medio MH-OADC-TW80-Gly. Esta misma cepa fue también cultivada en los sobrenadantes del cocultivo entre las BAL que mostraron actividad y *M. bovis* BCG, para comprobar si la presencia del patógeno puede potenciar la producción de componentes antimicrobianos por parte de las BAL. El sobrenadante se utilizó a dos concentraciones: directamente obtenido del cocultivo sin diluir y también diluido en proporción 1:1 en el mismo medio indicado. Por último, para detectar un posible efecto inductor de los metabolitos de *M. bovis* BCG sobre la producción de metabolitos con capacidad antimicrobiana, se cultivó *M. bovis* BCG en sobrenadantes obtenidos del cultivo de las BAL que mostraron actividad en sobrenadantes del monocultivo de BCG en el mismo medio indicado, sin diluir y diluido 1:1 y bajo las condiciones descritas anteriormente.

Todos estos experimentos fueron realizados con ajuste de pH a 7 y 4.5 para determinar un posible efecto sinérgico entre el pH y los metabolitos antimicrobianos. Todos los sobrenadantes se obtuvieron mediante centrifugación a 5000 rpm. La tasa de supervivencia se calculó de la misma manera indicada anteriormente, mediante la emisión de fluorescencia (GFP) y se expresó en FU.

5. Secuenciación completa del genoma y confirmación de las especies

Las BAL con actividad antimicrobiana potencial en el procedimiento de cribado frente a *M. smegmatis* y frente a *M. luteus* que fueron seleccionadas de ambos grupos de estudio, fueron enviadas a MicrobesNG, de la Universidad de Birmingham (Reino Unido) para la secuenciación completa del genoma mediante la plataforma Illumina MiSeq, tras la extracción del ADN con el kit EZNA® (Omega Bio-Tek, USA). El ADN de cada aislado fue secuenciado utilizando lecturas de de 2 x 250 pares de bases (bp) (paired-end, desde ambos extremos). La calidad de las lecturas generadas se evaluó mediante la herramienta Trimmomatic. Los genomas fueron ensamblados a partir de las lecturas utilizando Shovill versión 1.0.4 con SPAdes 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). La calidad del

ensamblaje se evaluó mediante N50 y L50 utilizando Quast versión 4.5 (Gurevich et al., 2013) y las anotaciones se generaron mediante Prokka versión 1.13 (Seemann, 2014). La confirmación de la identificación de las especies bacterianas se realizó mediante las herramientas online StrainSeeker y ANItools (Han et al., 2016; Roosaare et al., 2017), que permite una identificación rápida y fiable que especies mediante comparación de los genomas con cepas bacterianas relacionadas.

6. Identificación de genes que codifican para la producción de metabolitos antimicrobianos y moléculas inmunomoduladoras

La identificación de clústeres de genes asociados a la producción de bacteriocinas se realizó mediante el software online BAGEL4 (van Heel et al., 2018). Este software permite una identificación rápida y fiable de todo tipo de clústeres de bacteriocinas, que frecuentemente están compuestos por genes que codifican para un precursor (pre-bacteriocina), proteínas encargadas del transporte y procesamiento de la pre-bacteriocina a bacteriocina activa, enzimas encargadas de modificaciones postraduccionales y proteínas inmunitarias. Además, la anotación de los genomas se utilizó para detectar la presencia o ausencia fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfocetolasa, dos enzimas que participan en las dos rutas metabólicas glucolíticas principales: la ruta Embden-Meyerhof (EMP) y la ruta de la fosfocetolasa (PKP) (Papagianni, 2012). Las BAL homofermentativas convierten los azúcares en ácido láctico mediante la ruta EMP, mientras que las heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂) mediante la ruta PKP. Las anotaciones se utilizaron también para identificar genes asociados con la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), incluyendo genes que codifican para la piruvato oxidasa (*Pox*), lactato oxidasa (*Lox*) y NADH oxidasas, y también genes que codifican para NADH peroxidasas.

Las anotaciones de los genomas también permitieron la búsqueda de componentes microbianos de la pared bacteriana y la membrana celular previamente relacionados con la activación de macrófagos mediante TLR y/o receptores fagocíticos como exopolisacáridos (EPS), precursores fimbriales, ácido teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA) y adhesinas (Hevia et al., 2015; Sengupta et al., 2013; Van Tassell y Miller, 2011).

7. Nivel de expresión de genes relacionados con precursores de bacteriocinas

Se determinó el nivel de expresión de genes que codifican para precursores de bacteriocinas en los aislados que mostraron actividad antimicrobiana frente a *M. bovis* BCG. El ARN total se extrajo de los aislados de BAL en monocultivo y en cocultivo con BCG a diferentes concentraciones (10^6 y 10^7 ufc/mL) utilizando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics Limited). Las muestras se tomaron durante la fase de crecimiento exponencial a una densidad óptica medida a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,6. El ARN se trató con TURBO DNasa (Ambion) para eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) mediante el SuperScript® III First-Strand Synthesis System de Invitrogen. Los análisis se llevaron a cabo en el sistema QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando la SYBR Master Mix (Applied Biosystems) y los cebadores específicos que se muestran en el apéndice IA.

Los transcritos de ARN se amplificaron en placa de 96 pocillos utilizando tres réplicas técnicas obtenidas de al menos dos réplicas biológicas. Se utilizó el método $\Delta\Delta CT$ para el cálculo de la cuantificación relativa de la expresión de ARN mensajero (ARNm) en los monocultivos de BAL y en los cocultivos a diferentes concentraciones de *M. bovis* BCG. El nivel de expresión génica se normalizó utilizando los transcritos constitutivos *gyrA* y *dnaG*, como ha sido recomendado previamente (Rocha et al., 2015). Los resultados se expresaron en \log_2 .

8. Ensayo de fagocitosis con células sanguíneas porcinas

Se realizó la toma de muestras de sangre completa en tubos heparinizados de cerdos sanos del Pirbright Institute (Reino Unido), que tiene licencia para la realización de este tipo de procedimiento animal (UK Home Office, Animal Scientific Procedures Act1986). 100 μ L de sangre con una cantidad estimada de 10^6 leucocitos se diluyeron en proporción 1:1 con 10 mM de EDTA (EDTA-PBS) y fueron expuestos a *M. bovis* BCG $\Delta leuD$ pAS^{OriM}XF en combinación con cada una de las BAL. La multiplicidad de la infección (MOI) fue de 10 bacterias por cada célula sanguínea. Se utilizaron monocultivos de todas las

bacterias como controles. El cocultivo de células sanguíneas y las bacterias se incubó en un agitador orbital a 37°C durante 30 minutos y después de esta incubación se lisaron las células mediante la solución de lisis RBC (Biologend) 1 x seguida de incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con EDTA-PBS, fueron resuspendidas en PBS y procesadas por el citómetro de flujo BD FACS Celesta. Se midieron diferentes parámetros: la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) fueron utilizados para distinguir las principales poblaciones sanguíneas en función de su tamaño y granularidad (por ejemplo, linfocitos vs. fagocitos), mientras que el canal FITC permite medir diferentes intensidades de fluorescencia emitida (GFP) en las células sanguíneas que se unen (ej. linfocitos) y/o fagocitan (ej. fagocitos como monocitos y polimorfonucleares tales como neutrófilos) a la micobacteria. El diagrama resultante SCC/GFP se utilizó para evaluar la influencia de las BAL en la fagocitosis.

9. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Los datos se muestran con la media \pm DE (desviación estándar) y representan tres réplicas biológicas. Las diferencias entre aislados se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher.

Figura resumen del método

01.

Selección de fincas y toma de muestras.



02.

Aislamiento y cribado de BAL.



03.

Identificación y selección de BAL.



04.

Actividad antimicrobiana e inmunomoduladora frente a *M. bovis*



05.

Secuenciación y estudio de los genomas.



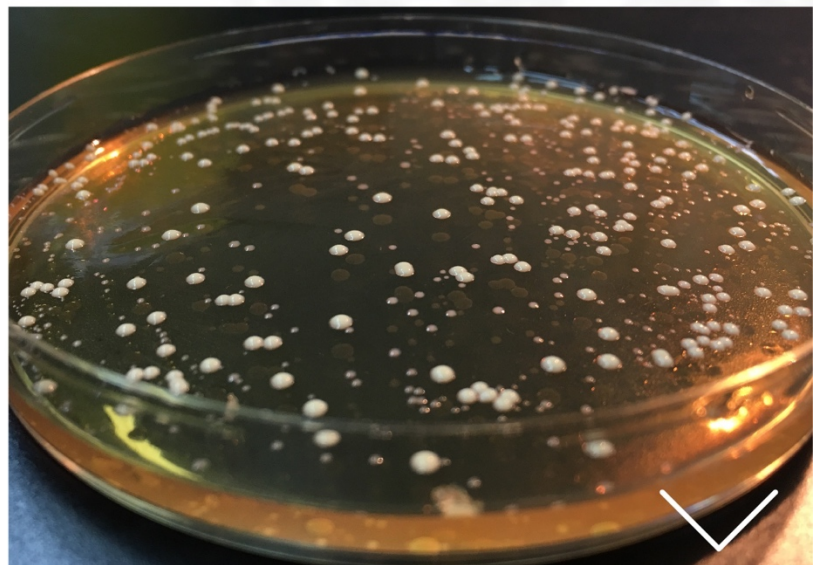
06.

Expresión de precursores de bacteriocinas.



07.

Estudio estadístico.



RESULTADOS

Jabalíes con diferente situación epidemiológica con relación a la TB muestran diferentes perfiles de BAL comensales y actividad antimicobacteriana

Se obtuvieron un total de 30 BAL aisladas de hisopos rectales de jabalíes con capacidad para inhibir el crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 y/o *M. luteus* (Figura 1.1, Tabla 1.2). La identificación de los aislados mediante 16S ARNr arrojó 7 especies diferentes: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus lolii* y *Escherichia coli*. Se encontraron dos perfiles muy diferenciados, que fueron divididos en grupo 1 y grupo 2. El grupo 1 se corresponde con un perfil predominante de lactobacilos (bacterias que anteriormente pertenecían al género *Lactobacillus*, recientemente reclasificado), e incluye a las fincas 1, 2 y 3, que están libres de TB. Por el contrario, en el grupo 2 se ha encontrado un perfil predominante de enterococos, que se corresponde con la finca 4, con una alta prevalencia de TB. Los pediococos se encontraron en ambos grupos. Los resultados se muestran resumidos de forma gráfica en la figura 1.2.

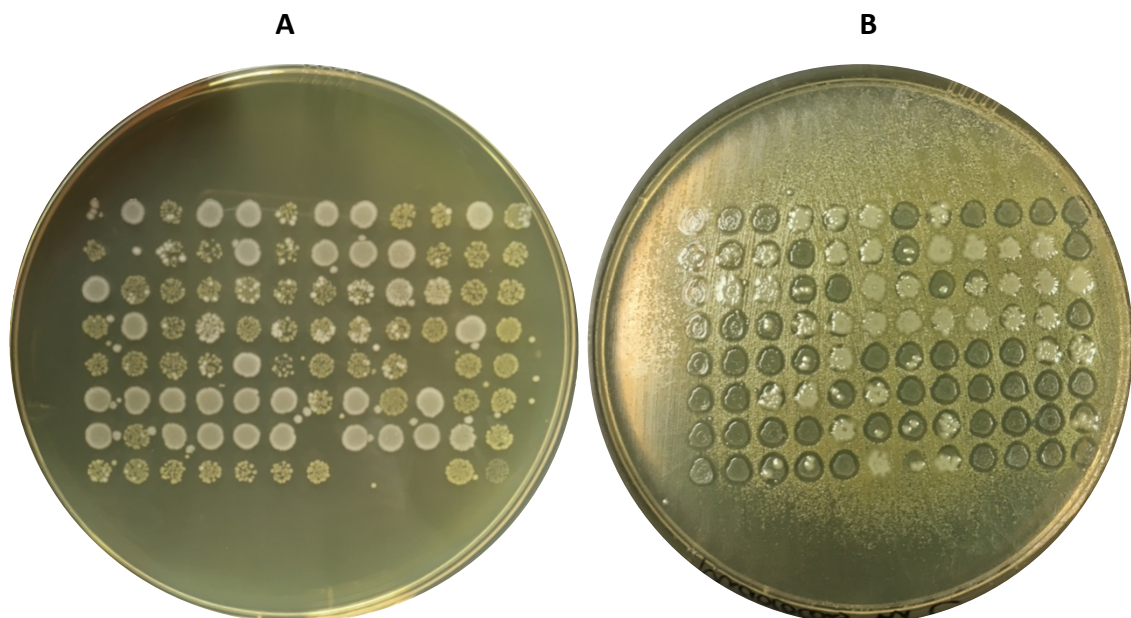


Figura 1.1. Cribado de actividad antimicrobiana. La placa madre o placa primaria muestra las BAL aisladas (A) y el ensayo de actividad frente a *M. smegmatis* muestra algunos aislados con actividad antimicrobiana (halos de inhibición, B).

Tabla 1.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S de ARNr de las 30 cepas de 4 poblaciones de jabalíes

Población de jabalíes	Cepa
Finca 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain TMW 1.1623
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain JCM1046
Finca 1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> strain IIA
Finca 1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BCC1
Finca 1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain ZPA017
Finca 1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain TMW
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain 32
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain 32
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BCC1
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BCC1
Finca 1	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> strain CICC 23174
Finca 2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain TMW
Finca 2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain TMW 1.1623
Finca 3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain TMW 1.1623
Finca 3	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> strain IIA
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain sorialis
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCIM5025
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain Cp5 16S
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCIM5025
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCIM5025
Finca 4	<i>Pediococcus lolii</i> strain CJ66
Finca 4	<i>Escherichia coli</i> isolate RAD07 16S
Finca 4	<i>Enterococcus</i> spp. strain Y-52
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NRIC 0111
Finca 4	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NCIM5025

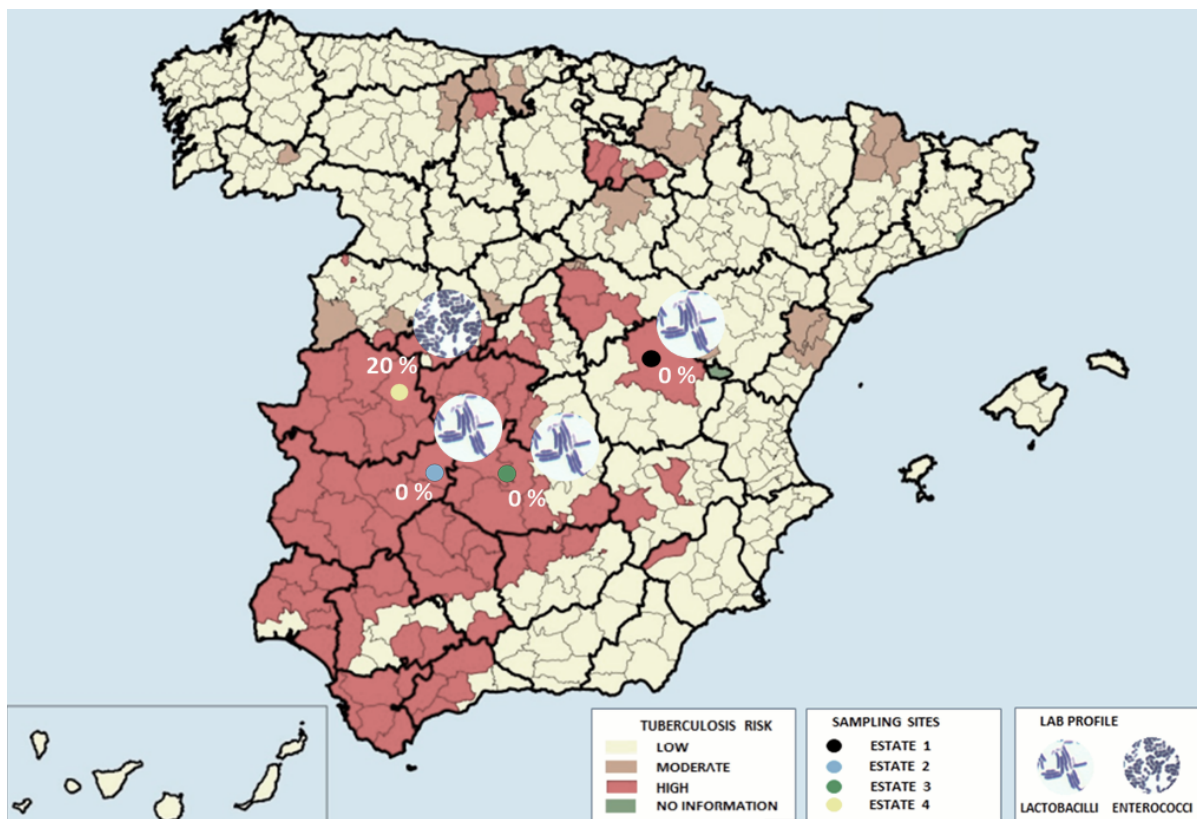


Figura 1.2. Localización geográfica de las 4 fincas de estudio (puntos), la prevalencia de lesiones compatibles con TB se muestra al lado de cada punto y el perfil de BAL encontrado se indica mediante una imagen de las bacterias predominantes. Las regiones coloreadas en el mapa muestran la clasificación del riesgo de TB en fauna silvestre en las comarcas de España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, datos de 2020). Todas las fincas muestreadas se encuentran en zonas con alto riesgo de TB para la fauna silvestre, siendo el perfil predominante de lactobacilos en los jabalíes que habitan en fincas con estado libre de la enfermedad.

Tras la primera selección de las especies de bacterias con actividad antimicrobiana potencial en el estudio de cribado con distinta morfología y características tintoriales (Figura 1.3, Tabla 1.3), se seleccionó una representación de las diferentes especies identificadas mediante secuenciación parcial del gen 16S que incluyese aislados que proviniesen de diferentes animales y fincas para el estudio de las propiedades antimicobacterianas y la secuenciación completa del genoma. La mayoría de las especies se confirmaron mediante secuenciación completa del genoma, a excepción de R91 que fue finalmente *P. acidilactici* y R95 que fue *E. casseliflavus*. La selección final de cepas se encuentra en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Selección final de aislados

Grupo	Finca	Identificación	Especie
Fincas libres de TB	1	C1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	1	C2	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
	1	C12	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
	1	C5	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	2	EML1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	3	SA3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	3	SA5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
Finca con alta prevalencia de TB	4	A1	<i>Enterococcus faecalis</i>
	4	R8	<i>Enterococcus faecalis</i>
	4	R91	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	4	R95	<i>Enterococcus casseliflavus</i>

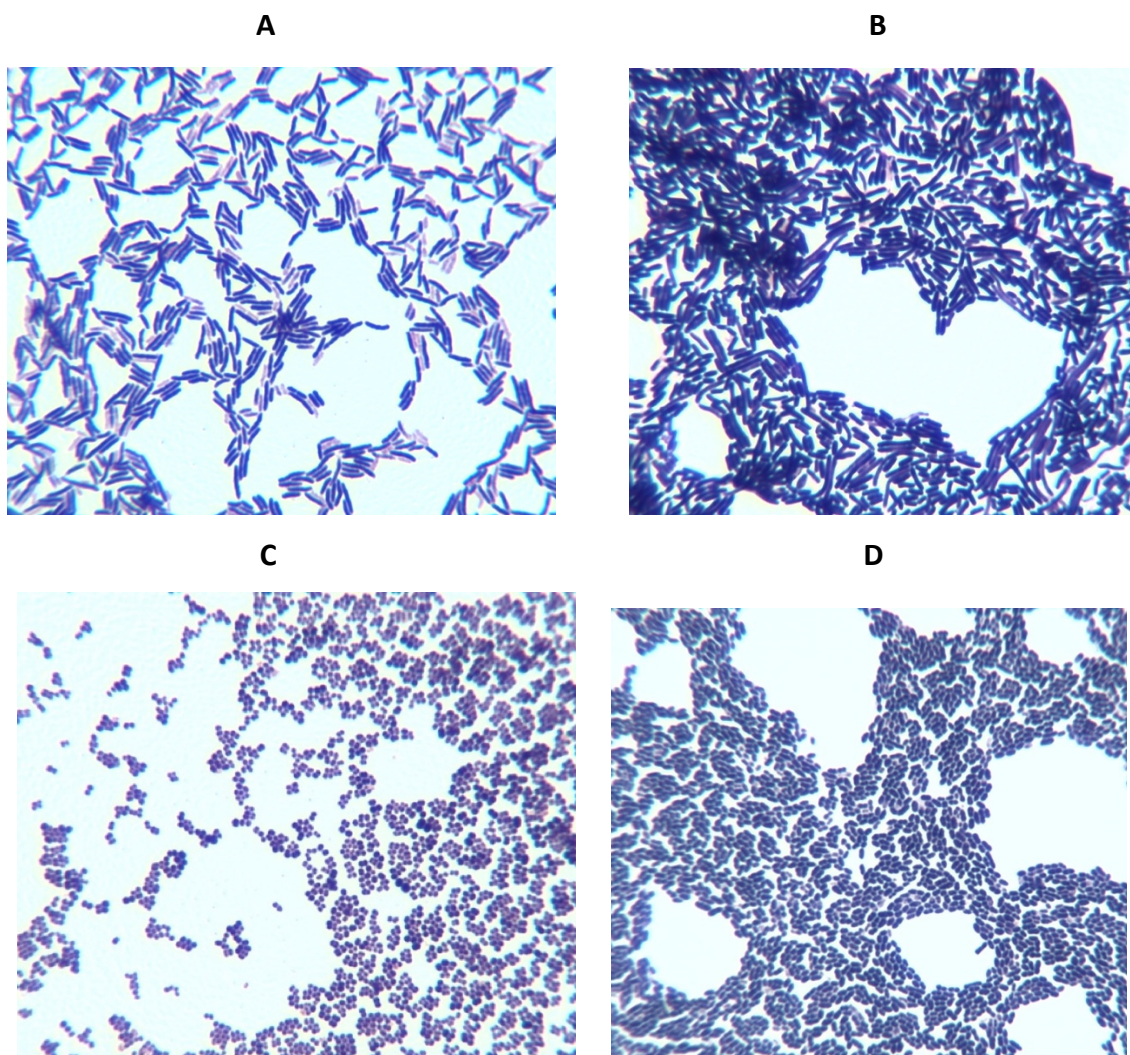


Figura 1.3. Tinción de Gram y observación al microscopio de inmersión de las especies *L. plantarum* (A), *L. paracasei* (B), *P. acidilactici* (C) y *E. faecalis* (D).

Las bacterias ácido-lácticas de los jabalíes que habitan en fincas libres de TB inhiben *M. bovis* y poseen genes que codifican la producción de metabolitos antimicrobianos, incluidas bacteriocinas

Las 11 cepas seleccionadas se cocultivaron con *M. bovis* BCG Pasteur y la cepa $\Delta leuD$ pAS^{OriM}XF que expresa la proteína fluorescente GFP. Los lactobacilos del grupo 1, fincas libres de TB, redujeron significativamente la emisión de GFP (Figuras 1.4A y 1.4B) y esta reducción se correlacionó positivamente con los recuentos de la micobacteria (Apéndice IB). Por el contrario, los enterococos del grupo 2, finca con alta prevalencia de TB, mostraron un efecto antimicobacteriano mucho más limitado, con una reducción hasta dos veces menor a que la observada por los lactobacilos. Es muy interesante que esta diferencia antimicrobiana por grupos también se diese en el caso de los pediococos, que fueron encontrados en ambos. El aislado *P. acidilactici* C5 proveniente del grupo de fincas libres de TB mostró una gran capacidad inhibitoria frente a la micobacteria, mientras que la misma especie bacteriana aislada de la finca con alta prevalencia de TB mostró una inhibición significativamente menor ($p < 0.0001$).

Para tratar de correlacionar el efecto antimicobacteriano de los aislados con su genotipo, se realizó una búsqueda de compuestos antibacterianos en los genomas (Figura 1.4C y 1.4D). Las anotaciones del genoma nos permitieron identificar los genes que codifican para las enzimas fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfoacetolasa en todos los aislados de lactobacilos, demostrando su papel como heterofermentadores facultativos. Nuestros aislados son capaces de convertir carbohidratos en lactato utilizando la ruta EMP y / o producir lactato en combinación con etanol, acetato y dióxido de carbono como metabolitos antimicrobianos a través de la ruta PKP. Además, todos los aislados albergan genes asociados con la producción de H₂O₂: *Pox*, *Lox* y / o NADH oxidasas, así como NADH peroxidasa. El número de marcadores de H₂O₂ disminuye progresivamente en los pediococos y enterococos. Los aislados de *Pediococcus* y *E. casseliflavus* también son heterofermentadores facultativos, pero sus genomas solo albergan un gen PKP. Por el contrario, los dos *E. faecalis* actúan como homofermentadores obligados ya que sus genomas solo poseen el gen de la fructosa-6-fosfato aldolasa, que convierte los azúcares en lactato a través de EMP.

El análisis del genoma de BAGEL4 identificó grupos de genes implicados en la síntesis de bacteriocinas de clase II y III, incluidas bacteriocinas de un solo péptido en *L. salivarius* C12 (Apéndice IC); bacteriocinas de dos péptidos en todas las cepas de *L. plantarum* y *L. paracasei* SA5 (Apéndice ID), y bacteriolisinas en todos los aislados de lactobacilos (Apéndice IE). Los dos precursores de bacteriocina de un solo péptido identificados en el genoma de *L. salivarius* ($T\alpha$, $T\beta$) muestran una homología muy alta con dos bacteriocinas de clase II de *L. salivarius* BGH01 (Busarcevic y Dalgarrondo, 2012), mientras que los dos precursores los genomas de los aislados de *L. plantarum* (*plnE*, *plnF*) son idénticos a los genes precursores de plantaricina *plnE* y *plnF* de *L. plantarum* C11 (Anderssen et al., 1998). Los precursores de bacteriocina de dos péptidos que se encuentran en el genoma de *L. paracasei* SA5 (*A*, *B*) también fueron idénticos a dos bacteriocinas hipotéticas de clase II de *L. paracasei* DPC6800 (Stefanovic et al., 2016) y *L. paracasei* UCD174 (Broadbent et al., 2012). Por otro lado, los genes de las bacteriolisinas que identificamos en todos los genomas de los lactobacilos codifican enzimas que hidrolizan los peptidoglicanos de la pared celular entre ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamida, o entre N-acetilmuramoilo y residuos L-aa. Estas enzimas normalmente tienen un sitio de reconocimiento de diana y un dominio catalítico que muestra homología con endopeptidasas, muramidasa o amidasa (Cotter et al., 2005). Además, a diferencia de los grupos de bacteriocina de clase II, las bacteriolisinas no tienen genes de inmunidad específicos que acompañen a los genes precursores de bacteriocina, ya que dependen de modificaciones de la pared celular productora para inferir resistencia. Las bacteriolisinas identificadas fueron muy abundantes en *L. salivarius* C2, seguidas de *L. salivarius* C12 y *L. paracasei* SA5 (Apéndice IE). Las cepas de *L. plantarum* solo comparten dos de ellas con el resto de los aislados.

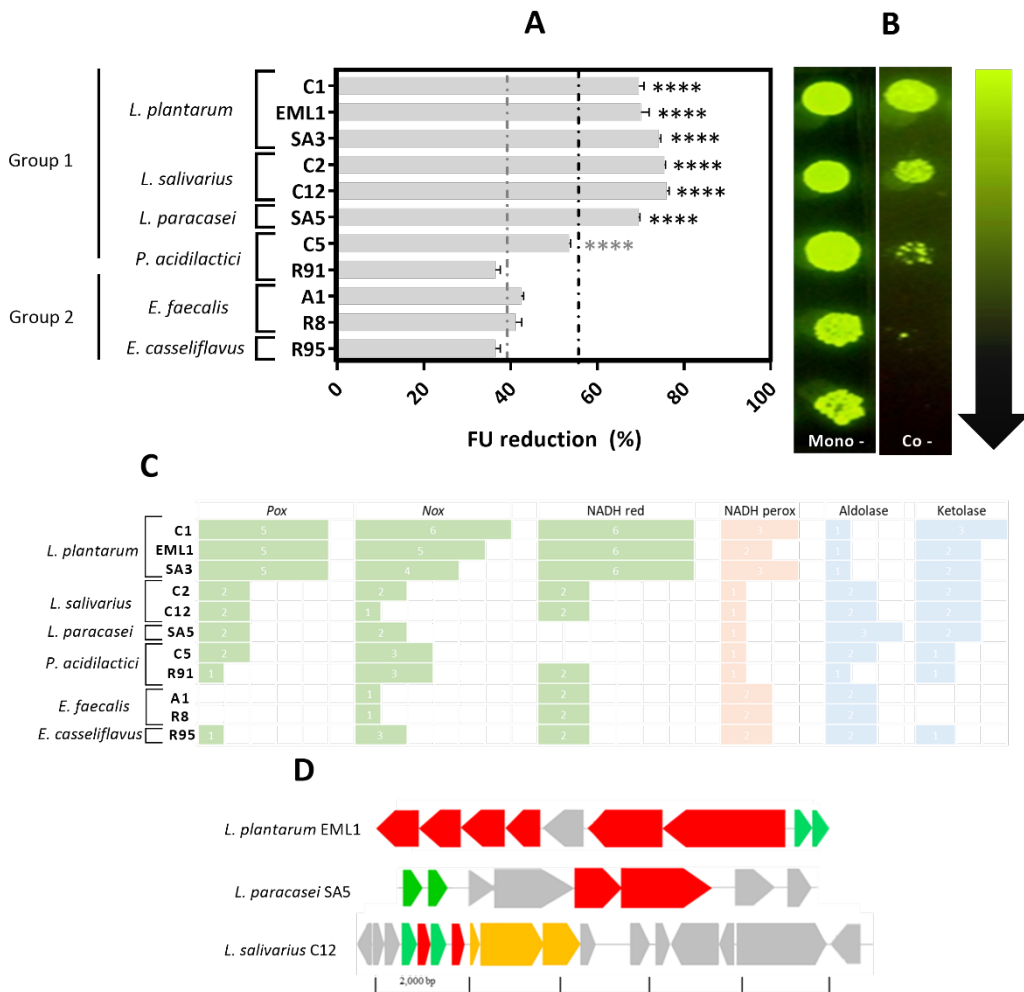


Figura 1.4. Las BAL aisladas de jabalíes libres de TB muestran una fuerte actividad antimicrobiana y sus genomas contienen genes que codifican bacteriocinas y una gran variedad de metabolitos antimicrobianos secundarios. **(A)** Reducción en las unidades de fluorescencia (FU) emitidas por *M. bovis* BCG en cocultivos con las BAL tras 48 h de incubación. La reducción de la FU se calculó utilizando al menos 2 réplicas biológicas y fue normalizada con la FU de *M. bovis* BCG en monocultivo. **(B)** Reducción en el recuento de colonias de *M. bovis* BCG en monocultivo (izquierda) con respecto al cocultivo (derecha) con un aislado de lactobacilo. **(C)** Clústeres de bacteriocinas de clase II identificadas en el genoma de los lactobacilos. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris). **(D)** Genes asociados con la producción y acumulación de H₂O₂ (verde y naranja) y otros metabolitos secundarios como lactato, acetato, etanol y CO₂ (azul) en los aislados. Se muestra la proporción en la barra y el número de genes encontrados en blanco.

Los metabolitos producidos por los lactobacilos reducen la tasa de supervivencia de BCG a pH ácido

Se monitorizó el pH de los cocultivos y se observó que los lactobacilos disminuían el pH hasta 4,5, más que los enterococos. Debido a esto y a que el pH de los monocultivos apenas descendió de 7 a 6,8 se realizaron los diferentes experimentos para demostrar si el pH ácido de este grupo de bacterias podría tener una influencia sobre la actividad encontrada. Sin embargo, la viabilidad de BCG no se alteró al ser cultivada a pH 4,5, es decir, no se observó una reducción en los recuentos bacterianos ni en la emisión de GFP. Estos experimentos confirman que el pH ácido es insuficiente para explicar el efecto negativo sobre la supervivencia de BCG.

Para comprobar si el efecto antimicrobiano encontrado en los lactobacilos se debe a la acumulación de metabolitos tóxicos, se monitorizó la tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG en sobrenadantes obtenidos a partir de monocultivos de lactobacilos y de cocultivo entre lactobacilos y BCG, tras 24 h de incubación. Para estos experimentos, la tasa de supervivencia se registró únicamente como emisión de GFP, ya se observó una correlación positiva muy significativa entre los recuentos bacterianos totales y la emisión de GFP (Apéndice IB). Se recogieron sobrenadantes libres de células tanto de monocultivos de lactobacilos como de cocultivos de lactobacilos y *M. bovis* BCG para determinar si la presencia de *M. bovis* puede actuar como un inductor de la producción de compuestos antimicrobianos por parte de los lactobacilos. Se realizó la toma de muestras de sobrenadante a las 24 h, ya que los lactobacilos experimentaron un aumento logarítmico significativo en los recuentos bacterianos durante este tiempo (Figura 1.5). No se encontraron diferencias significativas en los recuentos bacterianos ni en los pH de los cultivos de lactobacilos, tanto monocultivos como cocultivos. Como se ilustra en la Figura 1.6, se observaron reducciones muy significativas con todos los sobrenadantes de cultivo, ya sea de monocultivos o cocultivos con BCG, especialmente después de 48 h. Esto demostró que la actividad antimicobacteriana de los lactobacilos en cocultivos podría deberse al efecto combinado del pH ácido y la acumulación de metabolitos antimicrobianos derivados de los lactobacilos.

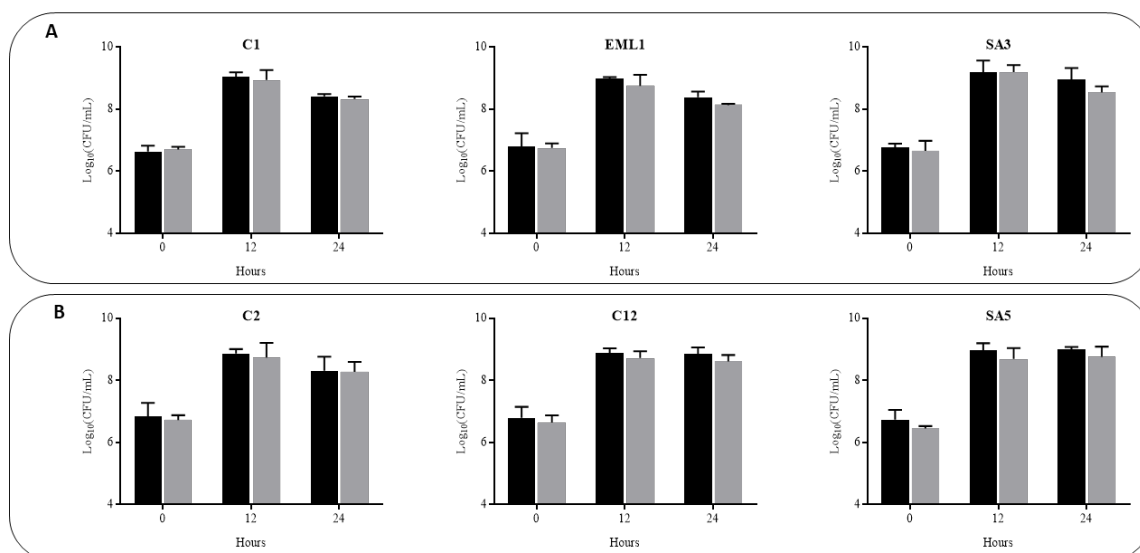


Figura 1.5. Recuentos bacterianos de los aislados de *L. plantarum* (A) y de *L. salivarius* y *L. paracasei* (B) como monocultivos (barras negras) y cocultivos con BCG (barras grises) tras una incubación de 0, 24 y 48 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). Los recuentos bacterianos se expresan como log₁₀ (CFU / mL)

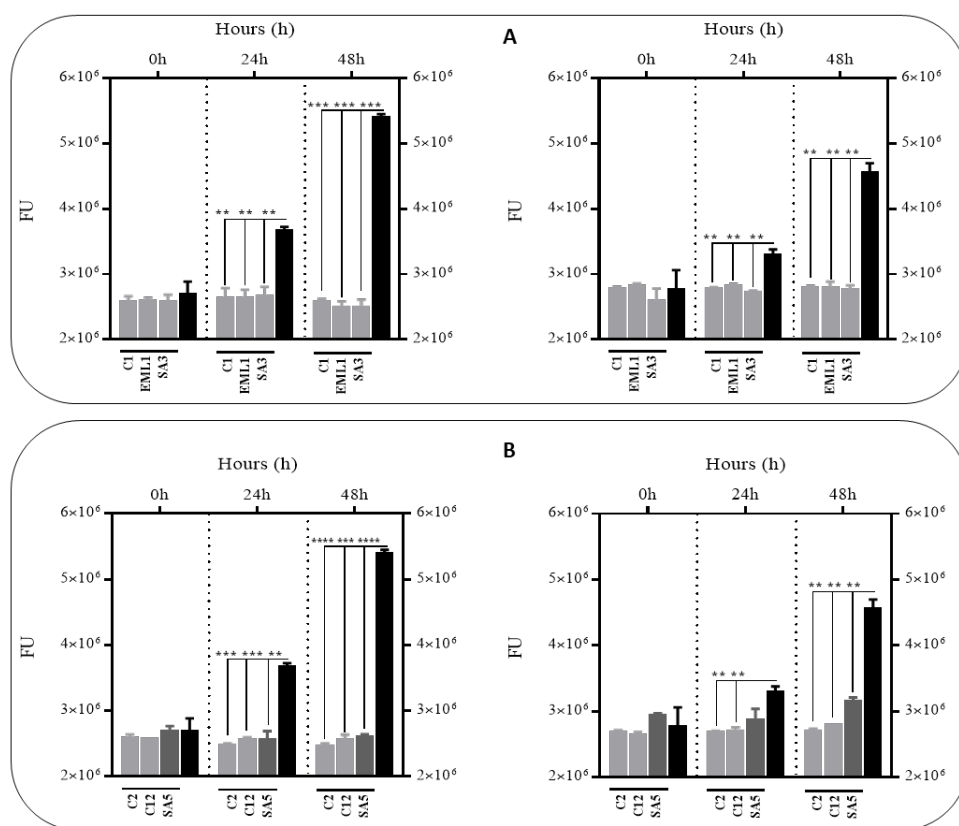


Figura 1.6. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 horas (h) de incubación en sobrenadantes ácidos (pH 4,5) libres de células obtenidos a partir de monocultivos de lactobacilos (izquierda) o cocultivos de *M. bovis* BCG con lactobacilos (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se calculó a partir de la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus correspondientes controles (barras

negras). Los controles se cultivaron con BCG en sobrenadantes libres de células obtenidos de un caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado izquierdo) y monocultivos de BCG de 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado derecho), ambos a pH 4,5. Los datos son $\text{media} \pm \text{DE}$ con análisis estadístico (prueba t de Student, $**p < 0,01$, $***p < 0.005$, $****p < 0.001$) y son representativos de 3 réplicas biológicas cada uno.

(A) Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. plantarum* C1, EML1, SA3 (izquierda) o cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha). **(B)** Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. salivarius* C2 y C12 y *L. paracasei* SA5 (izquierda) o cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* y *L. paracasei* (derecha).

Los metabolitos de los cocultivos de *L. plantarum* con *M. bovis* BCG reducen la tasa de supervivencia de *M. bovis* independientemente del pH y la suplementación de nutrientes

Para confirmar el efecto antimicobacteriano de los metabolitos producidos por los lactobacilos, realizamos los mismos experimentos descritos anteriormente con los sobrenadantes, tanto en monocultivos como en cocultivos con *M. bovis* BCG, pero a pH 7, para excluir el efecto antimicrobiano del pH ácido. También incluimos una tercera condición experimental al diluir los sobrenadantes en medios de cocultivo frescos para determinar la influencia de la alteración de nutrientes causada por el metabolismo de los lactobacilos. En el caso de los aislados de *L. plantarum*, no se observaron reducciones significativas en la supervivencia de *M. bovis* BCG usando los sobrenadantes obtenidos a partir de sus monocultivos (Figura 1.7). Sin embargo, la reducción fue muy significativa cuando utilizamos los sobrenadantes obtenidos a partir de los cocultivos de las 3 cepas de *L. plantarum* con BCG. Estos resultados sugieren que nuestras cepas de *L. plantarum* producen ciertos metabolitos antimicobacterianos en mayor cantidad en presencia de *M. bovis* BCG, que actuaría como inductor. Además, esta actividad antimicrobiana inducida parece ser estable a diferentes rangos de pH y con distinta composición de nutrientes.

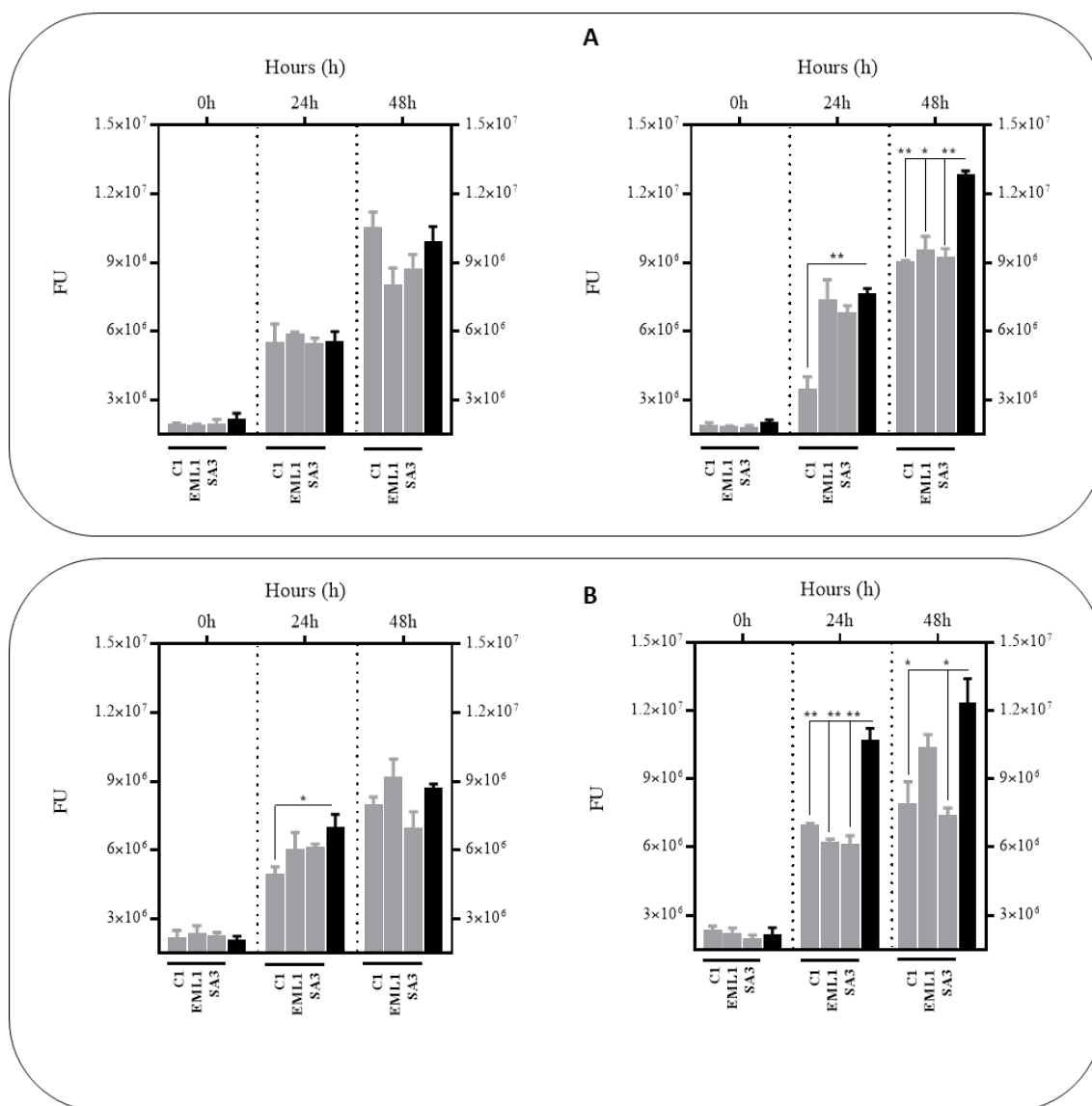


Figura 1.7. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 h de incubación en sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) obtenidos a partir de monocultivos de 24h de *L. plantarum* C1, EML1 y SA3 (izquierda) o de co-cultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin suplementación de nutrientes. Los controles de *M. bovis* BCG se incubaron en sobrenadantes libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de *M. bovis* BCG incubados durante 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan como media \pm DE con análisis estadístico (prueba t de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) y representan 3 réplicas biológicas cada uno.

(A) Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. plantarum* C1, EML1, SA3 (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha). **(B)** Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. plantarum* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. plantarum* (derecha) suplementados con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma proporción.

El efecto antimicrobiano de los metabolitos de *L. salivarius* y *L. paracasei* depende del pH y, en el caso de *L. paracasei*, de la presencia del inductor

Igual que en el caso anterior, no se encontraron reducciones significativas en la supervivencia de *M. bovis* BCG utilizando los sobrenadantes obtenidos de monocultivos de *L. salivarius* y *L. paracasei* a pH 7, con o sin suplementación de nutrientes (Figura 1.8). De hecho, la supervivencia de BCG aumentó en los sobrenadantes que provenían de los monocultivos de *L. salivarius* sin suplementación y los sobrenadantes recogidos de los cocultivos de *L. salivarius* y BCG, lo que confirma que el efecto antimicrobiano de las cepas de *L. salivarius* es dependiente del pH. Por el contrario, la tasa de supervivencia de BCG disminuyó ligeramente en los sobrenadantes derivados de cocultivos de *L. paracasei* y BCG, lo que sugiere un papel de BCG como inductor de la producción de compuestos antimicrobianos en *L. paracasei*. No obstante, esta inducción parece tener un efecto significativamente menor que la observada con *L. plantarum*.

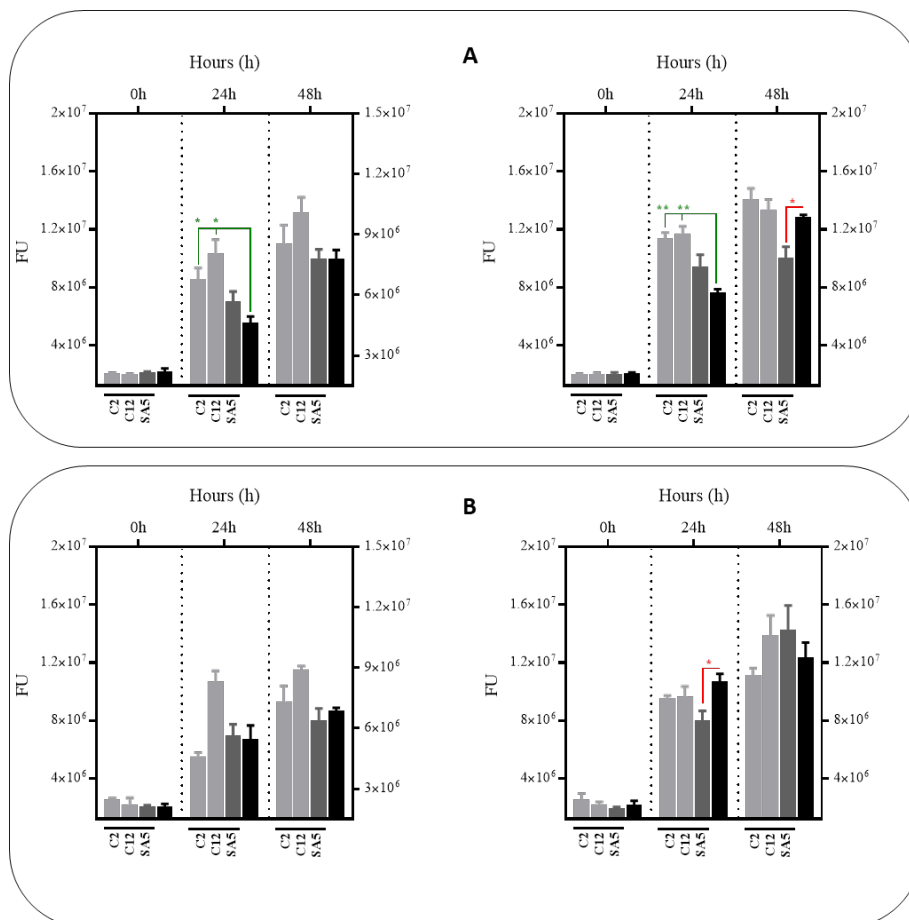


Figura 1.8. Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 48 h de incubación en sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) y obtenidos a partir de monocultivos de 24 h de *L. salivarius* C2, y C12 y *L.*

paracasei SA5 (izquierda) o de cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* C2, y C12 y *L. paracasei* SA5 en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de GFP (FU, barras grises claro para *L. salivarius* y gris oscuro para *L. paracasei*) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin suplementación de nutrientes. Los controles de *M. bovis* BCG se incubaron en sobrenadantes libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de *M. bovis* BCG incubados durante 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan como media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, * p<0,05, ** p <0,01) y representan 3 réplicas biológicas cada uno.

(A) Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. salivarius* y *L. paracasei* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* y *L. paracasei* (derecha). **(B)** Tasa de supervivencia de *M. bovis* BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de *L. salivarius* y *L. paracasei* (izquierda) y cocultivos de *M. bovis* BCG con las cepas de *L. salivarius* y *L. paracasei* (derecha) suplementados con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma proporción.

Los metabolitos de BCG no influyen en la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* y *L. paracasei*

Para probar si el efecto inductor comentado anteriormente, dependía de la producción de metabolitos por parte de *M. bovis* BCG, en lugar de depender simplemente de las células microbianas, monitorizamos la tasa de supervivencia de *M. bovis* en sobrenadantes sin células derivados de cultivos de *L. plantarum* y *L. paracasei* que se propagaron durante 24 h en sobrenadantes *M. bovis* BCG. También incluimos dos condiciones experimentales adicionales al complementar los sobrenadantes con medios de cocultivo frescos, pero también al hacer crecer los lactobacilos en caldo de cocultivo fresco completo para considerar la posible influencia negativa de la alteración de nutrientes en el crecimiento de los lactobacilos. No se registraron diferencias significativas en los recuentos bacterianos registrados para los 3 tipos diferentes de cultivos de lactobacilos (Figura 1.9). El pH de los sobrenadantes de los cultivos de lactobacilos propagados en los sobrenadantes de *M. bovis* BCG fue ligeramente superior a 4,5 pero no se observaron diferencias significativas en comparación con los otros cultivos de lactobacilos. Como se ilustra en la Fig. S4, no se observaron reducciones significativas en la supervivencia de *M. bovis* usando los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de *L. plantarum* desarrollados en sobrenadantes de cultivos de *M. bovis* BCG,

con o sin suplementación de nutrientes. Estos datos sugieren que los metabolitos de *M. bovis* BCG no tienen ningún efecto inductor sobre la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* y *L. paracasei*, este efecto se debe a la presencia de las propias células microbianas de la micobacteria.

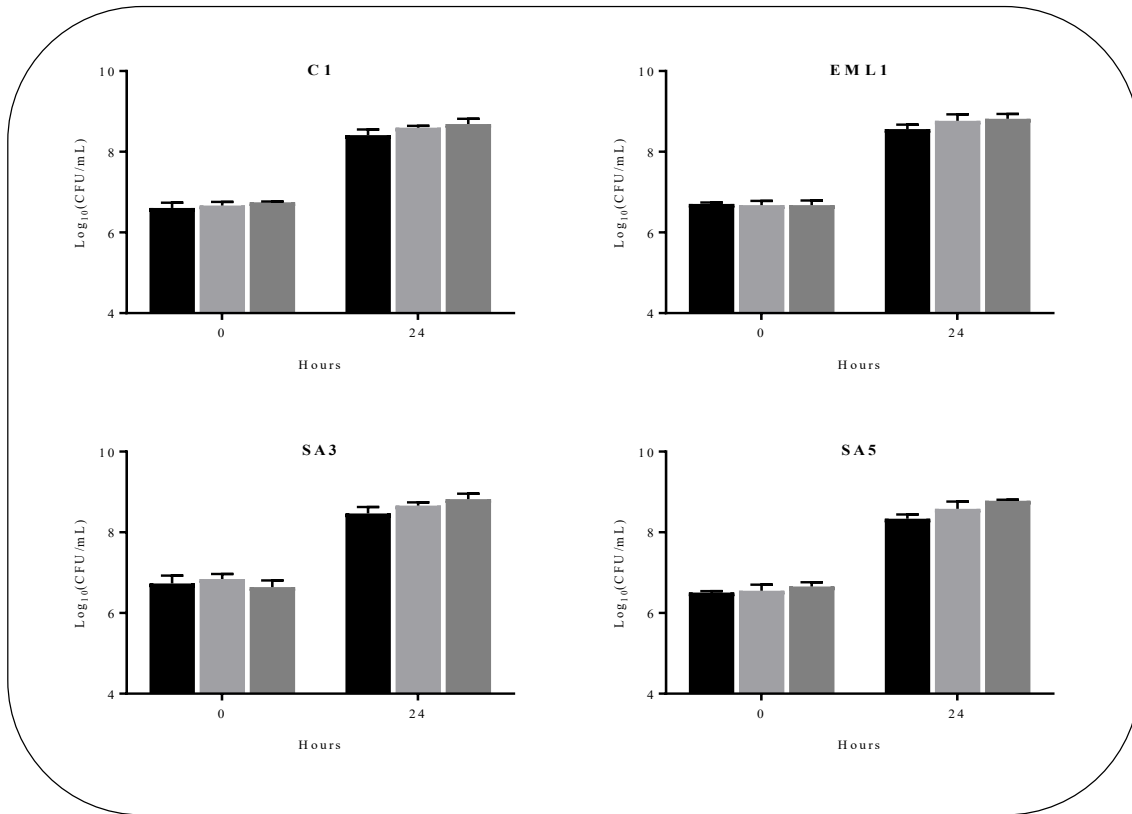


Figura 1.9. Recuentos bacterianos de cultivos de cepas de *L. plantarum* C1, EML1 y SA3 y *L. paracasei* SA5 tras una incubación de 0 y 24 h en: (i) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de *M. bovis* BCG (barras negras); (ii) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de *M. bovis* BCG suplementado con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1 (barras de color gris oscuro); y (iii) caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (barras de color gris claro). Los recuentos bacterianos están expresados como log₁₀ (CFU / mL).

Los genes que codifican las bacteriocinas de dos péptidos de *L. plantarum* y *L. paracasei* se sobreexpresan en presencia de células de *M. bovis*.

Para determinar si la presencia de células de *M. bovis* puede regular el nivel de expresión de las bacteriocinas de clase II identificadas, realizamos una RT-PCR para cuantificar la cantidad de transcripciones derivadas de los genes precursores de bacteriocinas en *L. plantarum* C1, EML1 y SA3, *L. salivarius* C2 y *L. paracasei* SA5 (indicadas en verde en la parte superior de la figura 1.10). El ARN se obtuvo de cultivos de lactobacilos expuestos a concentraciones crecientes de células de *M. bovis* BCG durante la fase de crecimiento exponencial. Como se ilustra en la figura 1.11, el nivel de expresión de los genes *plnE* y *plnF* depende de la cantidad de células de *M. bovis*, puesto que se observa un aumento muy significativo de la expresión en comparación con los monocultivos de *L. plantarum*. Observamos resultados similares con los genes *A / B* de *L. paracasei* SA5 aunque el aumento en la expresión génica fue mucho menor. Por el contrario, la expresión de los genes *T α / T β* en *L. salivarius* C2 no se vio afectada por la presencia de células de *M. bovis* (Figura 1.10). Estos datos confirman, no solo el efecto inductor de las células de *M. bovis* BCG sobre la actividad antimicrobiana mostrada por *L. plantarum* y *L. paracasei*, sino también el posible papel de las bacteriocinas de dos péptidos en dicha actividad antimicobacteriana.

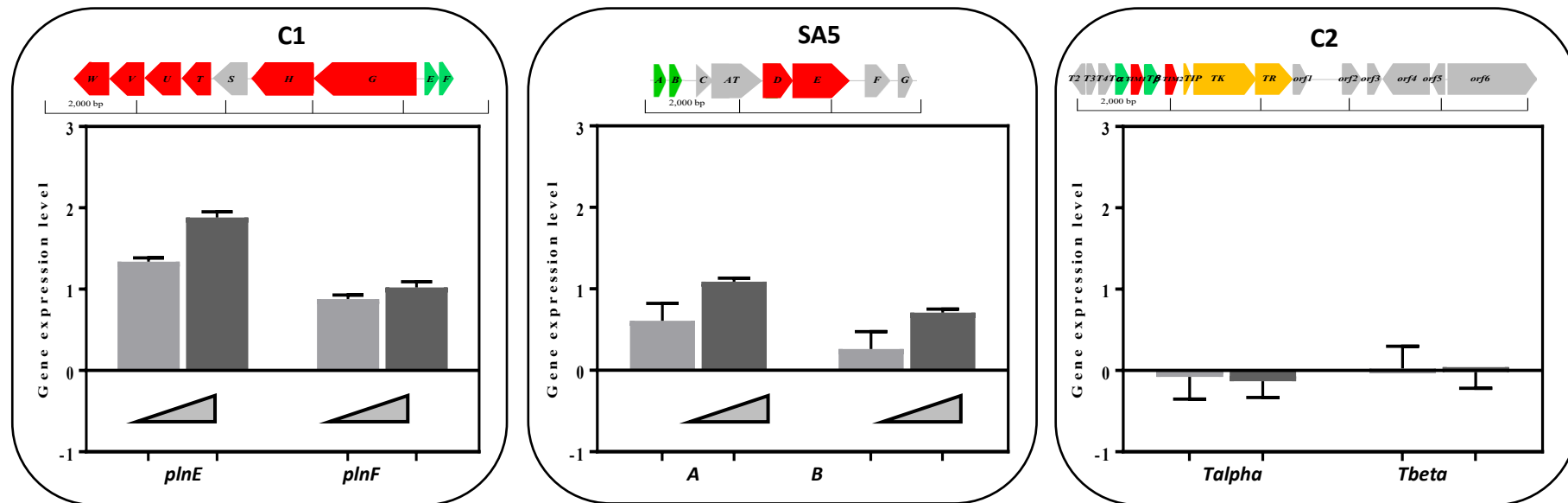


Figura 1.10. Clústeres de genes de bacteriocinas de clase II identificados en el genoma de las cepas de lactobacilos y nivel de expresión de genes que codifican los precursores de bacteriocinas en cultivos de lactobacilos expuestos a diferentes concentraciones crecientes de células *M. bovis* BCG. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris).

C1. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. plantarum* C1 (en representación de todas las cepas de *L. plantarum*) y el nivel de expresión de sus genes de la bacteriocina precursora correspondiente *plnE* y *plnF* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro).

SA5. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. paracasei* SA5 y el nivel de expresión de los de la bacteriocina precursora correspondiente *A* y *B* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro).

C2. Clúster de la bacteriocina de péptido único de *L. salivarius* C2 y el nivel de expresión de los genes de la bacteriocina precursora correspondiente *T α* y *T β* en cultivos expuestos a células de *M. bovis* BCG a 10^6 UFC / ml (barras de color gris claro) y 10^7 UFC / mL (barras grises oscuro).

Las especies de lactobacilos influyen de forma diferente en la fagocitosis de *M. bovis* BCG

En la figura 1.11A se ilustra el gráfico FSC-SSC que indica la presencia de linfocitos, monocitos y PMN (neutrófilos) en sangre porcina. A diferencia de lo que ocurre con las cepas *M. bovis* BCG y *L. salivarius*, la presencia de *L. plantarum* y *L. paracasei* altera significativamente el perfil de dispersión sanguínea, lo que complicó la identificación de monocitos y neutrófilos. Sin embargo, la distribución de linfocitos y fagocitos que observamos en los gráficos de SCC-GFP, nos permite distinguir entre las células sanguíneas que se han unido a la micobacteria o que la han fagocitado, en función de la intensidad de emisión de fluorescencia (GFP) (Figura 1.11B). Se encontraron tanto linfocitos como fagocitos positivos para GFP, pero la mayor intensidad fluorescencia se observó en las células fagocíticas. *L. salivarius* no tuvo un efecto significativo sobre la unión de *M. bovis* BCG (Figura 1.11C) ni sobre la respuesta fagocítica (Figura 1.11D) sin embargo, estos parámetros sí se alteraron significativamente en presencia de *L. plantarum* y *L. paracasei*. Aunque ambos lactobacilos aumentaron la unión entre *M. bovis* BCG y los fagocitos (Figura 1.11C) su efecto sobre la respuesta fagocítica fue completamente diferente (Figura 1.11D): *L. plantarum* disminuyó la fagocitosis de la micobacteria, mientras que *L. paracasei* la aumentó. Los datos fueron consistentes entre las diferentes especies, pero en los gráficos solo se muestra una representación de cada especie para facilitar su interpretación.

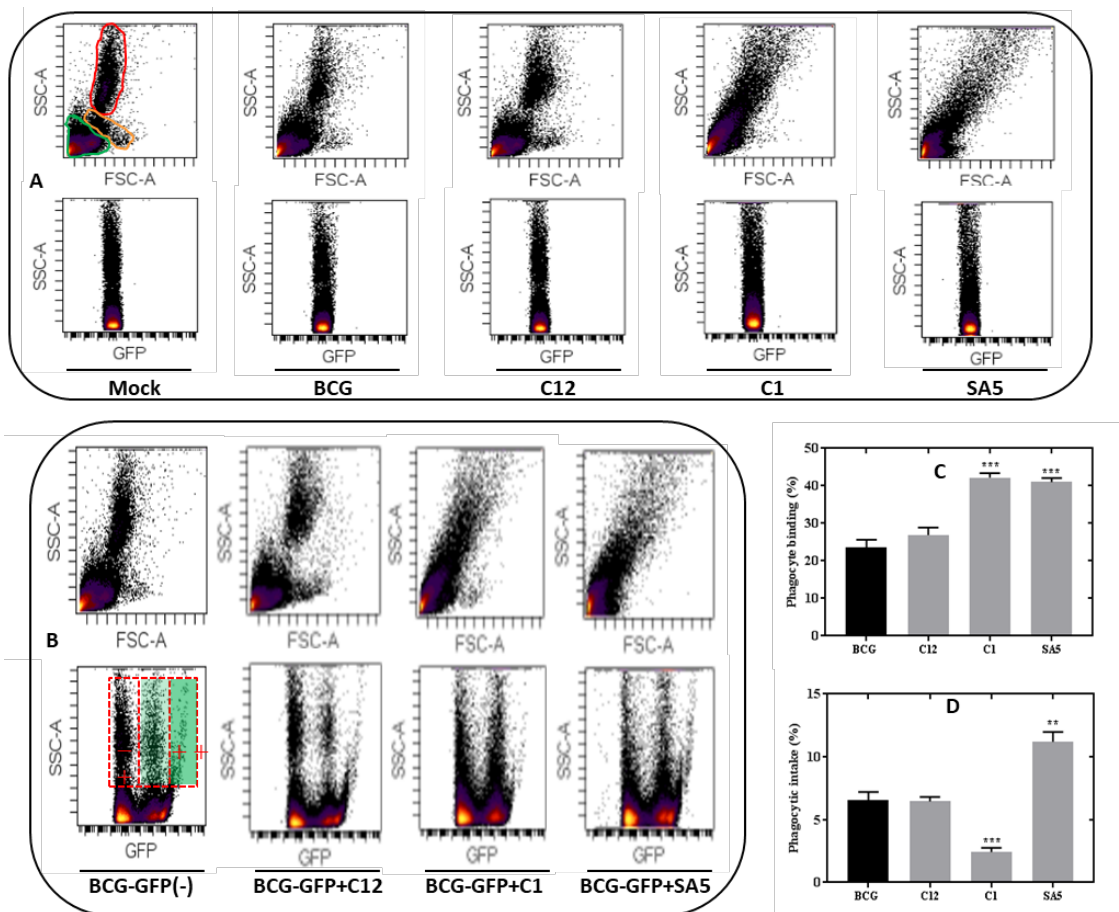


Figura 1.11. Los lactobacilos interactúan con las células sanguíneas porcinas, interfiriendo con la fagocitosis de *M. bovis* BCG de una manera diferente según la especie.

(A) El gráfico SSC/FSC representa las áreas correspondientes a las células sanguíneas porcinas y el gráfico SSC/GFP muestra sus áreas correspondientes en condiciones normales (*mock*) y cuando se exponen a *M. bovis* BCG, *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5. Las células sanguíneas se indican en verde (linfocitos), naranja (monocitos) y rojo (polimorfonucleares). **(B)** El gráfico SSC/GFP muestra la respuesta de las células sanguíneas porcinas a BCG-GFP solo (-) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5. Las áreas SSC/FSC para cada una de las condiciones se incluyen arriba y la intensidad GFP emitida por los fagocitos se indica en el control de BCG-GFP: negativa (-), positiva (+) y muy positiva (++) . **(C)** Porcentaje de fagocitos que se unen a *M. bovis* BCG solos (barra negra) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE con el análisis estadístico de la prueba t de Student (***) $p < 0,001$. **(D)** Porcentaje de fagocitos que fagocitan *M. bovis* BCG solos (barra negra) o en combinación con *L. salivarius* C12, *L. plantarum* C1 y *L. paracasei* SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE con el análisis estadístico de la prueba t de Student (***) $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

En este estudio, se encontraron BAL comensales con importantes propiedades para antagonizar a la bacteria *M. bovis* en jabalíes de tres fincas geográficamente dispersas, pero que tienen como característica común la prevalencia baja o nula de TB pese a estar rodeadas de áreas con un historial clínico significativo de la enfermedad y estar localizadas en áreas de alto riesgo de TB en fauna salvaje (Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (Complejo Mycobacterium Tuberculosis)., 2020). En este primer grupo de estudio, las BAL comensales mostraron un perfil de lactobacilos predominante que redujeron significativamente la supervivencia de *M. bovis*, el agente causal de la TB en el jabalí. Por el contrario, el segundo grupo de estudio, que está formado por jabalíes que habitan en una finca con elevadas prevalencias de la enfermedad, mostró un perfil de BAL comensales completamente diferente, puesto que albergan enterococos, que no disponen de esas propiedades antagonizantes, pese a que en un estudio previo los autores demostraron el efecto antimicobacteriano de algunos enterococos (Fellag et al., 2020). Curiosamente, esta tendencia antimicobacteriana por grupos se mantiene en el caso de los pediococos, que fueron encontrados en ambos grupos. El aislado *P. acidilactici* C5 del grupo libre de TB mostró una gran actividad inhibitoria frente a la micobacteria, mientras que el *P. acidilactici* de la finca con alta prevalencia de TB no afectó la supervivencia de esta. Es muy probable que estas bacterias comensales con propiedades antimicobacterianas contribuyan a mantener el buen estado de salud de los jabalíes. La composición de la microbiota intestinal se ha correlacionado previamente con la tuberculosis en humanos (Dumas et al., 2018; Fellag et al., 2020; Hu et al., 2019; Luo et al., 2017; Winglee et al., 2014), aunque hasta la fecha no se han realizado estudios similares en animales. Nuestros resultados refuerzan nuestra hipótesis del papel beneficioso de las BAL comensales en la protección del huésped frente a la TB.

En este estudio se describe, por primera vez, lactobacilos aislados de jabalíes con actividad antimicrobiana, concretamente *L. plantarum*, *L. salivarius* y *L. paracasei*. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que encontraron que *M. bovis* BCG y *M. bovis* son inhibidos por lactobacilos aislados de heces de tejón o presentes en productos lácteos fermentados (Macuamule et al., 2016; Mariam, 2009; Stedman et al., 2018). Otros estudios previos que describen aislados de BAL en jabalíes, se centran en describir los perfiles de resistencias antimicrobianas en lactobacilos y enterococos (Klose et al., 2014; Poeta et al., 2007) y serán tratados en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral.

Inicialmente sospechamos que la actividad antimicrobiana que mostraban nuestros aislados podía deberse al pH ácido, sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados y otros estudios (De la Rúa-Domenech, 2006; Stedman et al., 2018) la acidificación del pH resulta insuficiente para disminuir la supervivencia de la micobacteria. De hecho, la especie *M. bovis* muestra cierta resistencia al pH ácido debido a su capacidad natural para adoptar homeostasis intracelular (Rao et al., 2001). En general, los aislados de lactobacilos que hemos obtenido en este estudio parecen producir metabolitos que muestran una actividad antimicrobiana muy significativa contra *M. bovis* BCG, pero solo a pH ácido, lo que sugiere un efecto sinérgico de estos metabolitos y la acidificación del pH. Todos nuestros aislados de lactobacilos contienen genes asociados con la síntesis de lactato y acetato, que inhiben el transporte activo de otras especies bacterianas al causar interferencia en el potencial de membrana; así como otros compuestos antimicrobianos adicionales (etanol, CO₂ y H₂O₂) que pueden prevenir el crecimiento bacteriano al crear un ambiente hostil (Pessione, 2012). El número de marcadores de H₂O₂ es menor en los pediococos y enterococos. Los aislados de *Pediococcus* y *E. casseliflavus* también son heterofermentadores facultativos, pero sus genomas solo albergan un gen PKP. Por el contrario, los dos *E. faecalis* actúan como homofermentadores obligados, produciendo solo lactato (Papagianni, 2012).

La actividad antibacteriana mostrada por los lactobacilos es multifactorial y se deriva tanto de la disminución del pH como de la producción simultánea de ácido láctico y otros metabolitos (Fayol-Messaoudi et al., 2005). De hecho, estas sustancias antimicrobianas

actúan forma sinérgica, ya que el ácido láctico permeabiliza la membrana externa de las bacterias, permitiendo que el resto de metabolitos penetren en las células bacterianas (Alakomi et al., 2000). Los resultados de nuestro estudio demuestran este efecto sinérgico, puesto que la actividad antimicrobiana de los lactobacilos desapareció al neutralizar el pH, es decir, los metabolitos producidos por los lactobacilos son activos a pH ácido. Una de las razones por las cuales los metabolitos producidos por los lactobacilos no muestran actividad frente a *M. bovis* a pH neutro podría deberse que algunas bacteriocinas solo son completamente funcionales en condiciones ácidas. El genoma de todos los aislados de lactobacilos mostró genes relacionados con la biosíntesis de bacteriocinas de clase III conocidas como «bacteriolisinas», especialmente en *L. salivarius*. Las bacteriolisinas son enzimas adaptadas al ambiente ácido en el hospedador, con una actividad bactericida óptima que oscila entre valores de pH de 4 a 6 (Ribelles et al., 2012; Sable y Lortal, 1995). Esto también podría explicar la ausencia de actividad antimicrobiana encontrada en metabolitos de todos los cocultivos de *L. salivarius* a pH 7. Por el contrario, la actividad antimicrobiana observada con los metabolitos derivados de cocultivos de *M. bovis* BCG con *L. plantarum* y *L. paracasei* no desapareció a pH neutro. Esto sugiere que, en primer lugar, la actividad antimicrobiana depende de las especies de lactobacilos y no siempre está asociada a pH bajos; y, segundo, *M. bovis* BCG puede inducir un efecto bactericida. Curiosamente, encontramos que las cepas de *L. plantarum* y *L. paracasei* portan grupos de genes asociados con la producción de bacteriocinas de clase IIb, que están formadas por dos péptidos diferentes que ejercen una actividad antimicrobiana óptima cuando ambos están presentes en cantidades iguales y que es muy estable en un rango muy amplio de pH (1-11) (Nissen-Meyer et al., 2010). Los genes que codifican los dos péptidos están uno al lado del otro en el mismo operón donde se encuentran otros genes asociados con el procesamiento, el transporte y la inmunidad.

Los genes que codifican la bacteriocina de dos péptidos que identificamos en el genoma de las tres cepas de *L. plantarum* son idénticos a los dos genes del operón *plnEF*. Los genes *plnE* y *plnF* permiten la expresión de dos péptidos, denominados plantaricinas E y F, que interactúan entre sí para formar una estructura de hélice-hélice que se une a una proteína de membrana específica de la bacteria diana, presumiblemente un

transportador de la superfamilia APC, lo que ocasiona la destrucción de la membrana y, como consecuencia, la muerte celular (Ekblad et al., 2016; Oppegård et al., 2016). El resto de los genes que detectamos en los genomas de *L. plantarum* son idénticos al operón *plnWVUTSHG*, que participan en el transporte, procesamiento y autoprotección (Diep et al., 2009). Los operones *plnEF* y *plnWVUTSHG* se encuentran de forma frecuente en muchas cepas de *L. plantarum* junto con otros grupos de bacteriocinas de dos péptidos como plantaricina JK, aunque en algunos casos se ha detectado de forma aislada (Sáenz et al., 2009; Tai et al., 2015). Asimismo, detectamos un clúster de genes implicados en la síntesis hipotética de una nueva bacteriocina de dos péptidos en *L. paracasei*. El clúster está compuesto por dos genes que codifican para dos bacteriocinas que muestran cierta similitud con la termofilina A (Ward y Somkuti, 1995) y la carnocina CP51 (Herbin et al., 1997), seguidos de un gen de galactósido O-acetiltransferasa y dos genes adicionales implicados en la inmunidad y el transporte. La carnocina CP51 se expresa con el péptido complementario carnocina CP52 en *Carnobacterium* y termofilina A glicosilada, como ocurre con algunas plantaricinas (Diep et al., 2009).

Un hecho muy interesante que observamos es que los dos operones que codifican las bacteriocinas de dos péptidos en los aislados de *L. plantarum* y *L. paracasei* se sobreexpresan en presencia de células de *M. bovis* BCG en función de la concentración de estas. Estos resultados podrían explicar la actividad antimicrobiana de los metabolitos obtenidos a partir cocultivos de *M. bovis* BCG con *L. plantarum* y *L. paracasei*. Esta actividad no se detectó cuando se utilizaban los metabolitos del monocultivo o de estos dos lactobacilos propagados en sobrenadantes libres de células, pero con metabolitos liberados al medio por *M. bovis*. De hecho, la regulación de la producción de plantaricina en cocultivos de *L. plantarum* ha sido descrita previamente (Maldonado, Ruiz-Barba, et al., 2004; Maldonado-Barragán et al., 2013). De forma similar a nuestros resultados, un trabajo anterior describe la inducción del operón de la plantaricina NC8 en presencia de otras bacterias grampositivas o de células de otras bacterias inductoras inactivadas por calor (Maldonado, Jiménez-Díaz, et al., 2004). Está descrito que las plantaricinas tienen un espectro de inhibición microbiana bastante estrecho, limitado a inhibir otras especies de lactobacilos y algunas especies Gram + relacionadas (Diep et al., 2009), por ello, nuestros resultados no son suficientes para

confirmar que el efecto antimicobacteriano de *L. plantarum* se deba exclusivamente a la producción de plantaricina. No obstante, el efecto antimicobacteriano encontrado es muy prometedor debido a que las plantaricinas contribuyen a la funcionalidad probiótica una vez se produce la colonización en el intestino (Maldonado-Barragán et al., 2013), y a que las bacteriocinas de clase II tienen actividad antimicrobiana contra *M. tuberculosis* (Sosunov et al., 2007).

A diferencia de las bacteriocinas de dos péptidos, las dos bacteriocinas de péptido único identificadas de *L. salivarius* no mostraron regulación positiva en presencia de células de *M. bovis* BCG, lo que concuerda con el hecho de que los metabolitos de *L. salivarius* no afectaron a la supervivencia de *M. bovis* BCG a pH 7. Las dos bacteriocinas que encontramos en el genoma de *L. salivarius* muestran similitudes con múltiples bacteriocinas de clase IIb previamente descritas en otras cepas de *L. salivarius* (O'Shea et al., 2011) pero también con bacteriocinas blp1 α / blp1 β de *L. salivarius* BGHO1 (Busarcevic y Dalgarrondo, 2012) y ThmA / ThmB (termofilina 13) de *Streptococcus thermophilus* (Marciset et al., 1997). Nuestras dos bacteriocinas de *L. salivarius* contienen la secuencia líder de tipo doble glicina de las bacteriocinas de clase II pero, a diferencia de las bacteriocinas de dos péptidos (clase IIb), sus operones portan genes de inmunidad para cada uno de los precursores. Como estas bacteriocinas también carecen de la secuencia de consenso YGNGV-C de las bacteriocinas de clase IIa, se clasificaron como una bacteriocina de péptido único (clase IIc). La evidencia de que las bacteriocinas blp1 α / blp1 β se producen en medio de cultivo muy selectivo y que las bacteriocinas ThmA / ThmB ejercen su función sin un receptor de membrana bacteriano también podrían explicar la ausencia de actividad antimicobacteriana observada con los metabolitos de *L. salivarius* a pH neutro.

Otro aspecto importante es el hecho de que la privación de nutrientes causada por el metabolismo de los lactobacilos parece no tener influencia en la supervivencia de *M. bovis* BCG. La viabilidad de *M. bovis* BCG registrada tras la incubación en sobrenadantes de monocultivos de lactobacilos ajustados a pH 7 no se vio afectada. Además, los lactobacilos crecen bien en presencia de metabolitos de BCG, lo que sugiere que las vías metabólicas de los lactobacilos y *M. bovis* no tienen interferencia cruzada. Los

lactobacilos, como muchas otras bacterias ácido-lácticas, tienen un metabolismo relativamente simple que convierte los azúcares en piruvato a través de la vía glucolítica, generando energía (Papagianni, 2012), mientras que las micobacterias muestran un metabolismo central de carbono muy complejo, pero flexible, que genera energía a partir de la glucólisis, gluconeogénesis, la vía de la pentosa fosfato y la vía del TCA dependiendo de los recursos disponibles (Cumming y Steyn, 2015). Estos hechos metabólicos, junto con la evidencia de que el pH ácido no tiene efecto antimicobacteriano *in vitro*, refuerzan nuestra hipótesis de que los lactobacilos ejercen actividad antimicrobiana contra *M. bovis* BCG a través de mecanismos sinérgicos que incluyen combinación la del pH ácido con diferentes metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol y bacteriocinas.

Finalmente, determinamos la respuesta fagocítica a *M. bovis* BCG expuestos a lactobacilos. Los aislados de *L. plantarum* y *L. paracasei* tuvieron un efecto significativamente opuesto, mientras que *L. plantarum* disminuyó la fagocitosis de *M. bovis* BCG, *L. paracasei* aumentó la respuesta fagocítica. Por ello, estas dos especies de lactobacilos podrían ser reconocidas por diferentes receptores fagocíticos que, en mayor o menor medida, también podrían estar implicados en el reconocimiento de *M. bovis* BCG. La internalización por los fagocitos es claramente beneficiosa para la supervivencia de las especies del complejo *M. tuberculosis* (el ya mencionado CMT), que pueden ingresar a los macrófagos a través de diferentes moléculas receptoras, incluidos los receptores del complemento involucrados en las vías clásicas y alternativas, como los receptores C1 y receptores de lectina de tipo C (Marakalala et al., 2018; Pieters, 2008). En este sentido, estudios muy recientes han descrito que los lactobacilos son capaces de expresar adhesinas que se unen a receptores de lectina de tipo C (Bene et al., 2017). Curiosamente, los genomas de nuestros aislados de *L. plantarum* han revelado la presencia de *cna*, un gen que codifica una adhesina de colágeno (*cna*) y que no se ha encontrado en el genoma de *L. paracasei*. Esta proteína también bloquea la activación del complemento dependiente de C1 (Kang et al., 2013), por lo que el antagonismo de los aislados de *L. plantarum* frente a la fagocitosis de *M. bovis* podría ser causado por la competencia, no solo por los receptores de lectina, sino también por la vía clásica de activación del complemento.

La razón por la que *L. paracasei* aumenta la fagocitosis de *M. bovis* BCG podría deberse a muchos factores diferentes, incluida la expresión de *spaD*, un gen de proteína fimbrial que hemos identificado en su genoma. Las fimbrias de los lactobacilos facilitan la fagocitosis por los macrófagos a través de la integrina CD11b / CD18 (García et al., 2015), también conocida como receptor del complemento 3 (CR3). Además, CR3 puede actuar como un regulador negativo de los receptores de lectina de tipo C (Q. Zhang et al., 2018) y parece no alterar la progresión de la infección por producida *M. tuberculosis* (Hu et al., 2000). Por lo tanto, las fimbrias podrían promover la fagocitosis por los macrófagos a través los principales receptores fagocíticos de *M. bovis*, como las lectinas. Por otro lado, tanto *L. plantarum* como *L. paracasei* contienen el gen de adhesina rica en serina *sraP*, por lo que estos receptores para el reconocimiento de ácido siálico podrían no tener una influencia significativa en la fagocitosis de *M. bovis* BCG (Kline et al., 2009).

Los aislamientos de *L. salivarius* no tuvieron efectos significativos sobre la unión ni sobre la fagocitosis de *M. bovis* BCG, al contrario que *L. plantarum* y *L. paracasei*. Estas dos especies de lactobacilos también alteraron significativamente el perfil sanguíneo porcino. Los lactobacilos activan los macrófagos a través de los receptores Toll-like (TLR) y nuestras 3 especies de *Lactobacillus* contienen los genes *ItaS1* y *ItaS2* involucrados en la síntesis de ácido lipoteicoico (LTA), un componente principal de la pared celular que actúa como estimulador de TLR2 (Sengupta et al., 2013). Sin embargo, *L. plantarum* y *L. paracasei* también albergan genes que codifican otros componentes de la pared celular y la membrana citoplasmática que no se encontraron en *L. salivarius*, como la proteína fimbrial *spaD* de *L. paracasei* y los genes *tagBFGH* asociados con la biosíntesis de ácidos teicoicos de la pared celular (WTA) en *L. plantarum*. Las fimbrias y WTA son capaces de activar macrófagos a través de TLR5 y 2, respectivamente (Ganguli et al., 2015; Hevia et al., 2015; Yu et al., 2015) y, en nuestras condiciones experimentales, su contribución a la estimulación de fagocitos podría ser mucho más significativo que LTA. La activación de TLR podría colaborar con los receptores fagocíticos y así tener importantes implicaciones posteriores en el proceso de fagocitosis (Gordon, 2016).

Los resultados de este estudio refuerzan la hipótesis del papel beneficioso de las BAL comensales en la protección del huésped frente a la TB y resaltan el papel de la microbiota comensal en la lucha frente a enfermedades infecciosas. Por ello, las bacterias aisladas en este capítulo se estudiarán con más detalle en los siguientes capítulos de esta tesis doctoral para tratar de investigar sobre sus capacidades, tanto antimicrobianas frente a otro tipo de patógenos, como inmunomoduladoras; y poder explotar sus posibles propiedades beneficiosas como probióticos.

LAB

CAPÍTULO II

Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad, determinación *in vitro* de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad inmunomoduladora



INTRODUCCIÓN

Breve resumen histórico del concepto «probiótico»

La palabra «probiótico» deriva del latín *pro* «a favor de» y del griego βίος «vida» (Dwivedi et al., 2016) y la definición que se contempla en la actualidad fue la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2001 como «microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, reportan un beneficio para la salud del hospedador» (FAO/WHO, 2001). Aunque las propiedades beneficiosas para la salud y para la conservación de alimentos de ciertos productos fermentados se conocen desde la Antigüedad, no fue hasta siglos más tarde cuando se le empezó a prestar especial atención. El concepto probiótico empezó a ganar popularidad en la comunidad científica cuando, a raíz de las observaciones de Élie Metchnikoff, científico galardonado con el premio Nobel en 1908, se pudo comprobar cómo la consumición de forma regular de BAL en productos lácteos fermentados estaba asociado con una mejoría de la salud y un aumento de la longevidad. Años más tarde, primero Werner Kollath en 1953 y después Lilly y Stillwell en 1965, propusieron el término «probiótico» en diferentes contextos, siempre bajo la designación de sustancias o productos de fermentación con propiedades beneficiosas. En 1989, Füller modificó ligeramente esta definición, especificando que dichos productos eran microorganismos vivos, más concretamente bacterias y levaduras. En 1998 el *International Life Science Institute* incluyó los términos «salud y bienestar», sentando las bases para el concepto de lo que actualmente conocemos como probióticos (Gasbarrini et al., 2016; López et al., 2007).

Seguridad de los microorganismos destinados a alimentos y piensos

En la actualidad, existe una normativa relativamente amplia sobre la seguridad de las cepas de microorganismos que estén destinados a emplearse como aditivos en alimentos y piensos. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria se estableció en 2002 bajo la cobertura de la Ley General de Alimentación de la Unión Europea (Regulation 178/2002) con el objetivo de proporcionar un asesoramiento científico

independiente sobre los riesgos relacionados con los alimentos. Bajo el amparo de la EFSA, La Comisión Técnica de Aditivos y Productos o Sustancias utilizados en los Piensos para Animales (FEEDAP) proporciona asesoramiento científico sobre la seguridad o la eficacia de los aditivos y los productos o sustancias que se emplean en la alimentación animal. La Comisión Técnica evalúa la seguridad y/o la eficacia que estos suponen para las especies objetivo, el usuario, los consumidores de los productos de origen animal y el medio ambiente. Asimismo, analiza la eficacia de los productos/sustancias biológicas y químicos que se utilizan deliberadamente en los piensos para animales (<https://www.efsa.europa.eu/es/panels/feedap>).

En el año 2007 se introdujo el sistema de evaluación basado en el concepto QPS «Presunción Cualificada de Seguridad» para acelerar el proceso de evaluación de microorganismos que se sabe que carecen de riesgo para los consumidores, siempre como aditivos para alimentos y piensos y no con fines terapéuticos (European Food Safety Authority (EFSA), 2007). Ese mismo año se publica una lista de microorganismos propuestos para la obtención de QPS que se actualizaba anualmente hasta 2014, cuando pasó a actualizarse de forma periódica cada tres años. Actualmente los criterios de un microorganismo para ser incluido en esa lista son los siguientes: deben tener una identidad taxonómica bien definida, se debe disponer de un conocimiento científico suficiente para garantizar su seguridad, debe demostrarse la ausencia de propiedades patógenas y debe describirse claramente su uso previsto.

En el año 2008 la Comisión Técnica de Factores de Peligro Biológicos (BIOHAZ) publicó los criterios actualizados de resistencia a los antimicrobianos, por el que todas las cepas bacterianas que pretendan utilizarse en la producción de alimentos o piensos deben someterse a pruebas para detectar la resistencia a antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria. En el caso de que se detectaran resistencias, el reglamento exige que deba establecerse su base genética y la probabilidad de que se transfiera a otros microorganismos, por lo que no se contemplan como aditivos para piensos las cepas de microorganismos que hayan adquirido resistencia a uno o varios antimicrobianos, salvo que pueda demostrarse que dicha resistencia es el resultado de una o varias mutaciones cromosómicas y que es intransferible (REGLAMENTO (CE) No 429/2008 DE LA COMISIÓN

de 25 de Abril de 2008 Obre Normas de Desarrollo Para La Aplicación Del Reglamento (CE) No 1831/2003 Del Parlamento Europeo y Del Consejo Por Lo Que Se Refiere a La Preparación y Presentación de Solicitudes y a La Evaluación y Autorización de Aditivos Para Piensos, 2008). En este sentido, en el año 2012, la FEEDAP publicó un documento de orientación sobre la evaluación de la susceptibilidad de los aislados bacterianos a los antimicrobianos de importancia en medicina humana y veterinaria, que incluye los criterios para categorizar las cepas en sensibles o resistentes y propone la detección de la base genética de la resistencia cuando se superen los valores de referencia establecidos (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012).

Efecto antimicrobiano de las bacterias ácido-lácticas

Una de las propiedades más explotadas de las BAL para su uso como probióticos es debido a su capacidad para producir un efecto antimicrobiano frente a bacterias, principalmente, aunque también se han descrito frente a hongos (Matevosyan et al., 2019). El efecto antimicrobiano primario de las BAL se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato o del nicho ecológico donde estén establecidas, como un mecanismo evolutivo de selección natural, para lo cual han desarrollado mecanismos de competencia que incluyen la producción de sustancias antibacterianas. Muchas de estas sustancias se producen fruto del metabolismo fermentativo de estas bacterias y, por tanto, la capacidad antimicrobiana de una especie o cepa en cuestión, depende de que el tipo de fermentación se produzca a través de alguna de las dos vías metabólicas glucolíticas principales: la ruta Embden-Meyerhof (EMP) y la ruta de la fosfocetolasa (PKP) (Papagianni, 2012). Las BAL homofermentativas convierten las hexosas en ácido láctico mediante la ruta EMP, mientras que las heterofermentativas además de generar ácido láctico también producen cantidades significantes de ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂) mediante la ruta PKP. La formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente) tiene como consecuencia un descenso del pH que dificulta el desarrollo de un gran número de microorganismos y, por el contrario, favorece el crecimiento de las BAL, que son tolerantes a pH ácidos. Todas estas

moléculas, así como otros componentes de bajo peso molecular como los metabolitos del oxígeno, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, radicales libres y anión superóxido (Vásquez et al., 2009), pueden ejercer una actividad antimicrobiana en mayor o menor medidas.

Por otro lado, las bacteriocinas son unas moléculas de naturaleza proteica, sintetizadas en el ribosoma y que tienen un espectro de inhibición que en ocasiones puede ser muy amplio (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Meade et al., 2020).

Clasificación de las bacteriocinas y sus mecanismos de acción

En la actualidad no se dispone de un consenso en la comunidad científica entre las diferentes clasificaciones de las bacteriocinas producidas por las BAL, la que se describe a continuación es la propuesta por Álvarez-Sieiro et al. (2016), puesto que es la que más se ajusta a este contexto. Esta clasificación engloba a las diferentes clases de bacteriocinas en función de su mecanismo de biosíntesis y su actividad biológica, se muestra una ilustración en la Figura 2.1 (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

La clase I incluye péptidos de pequeño tamaño molecular (< 10 KDa), termoestables y con modificaciones postraduccionales que generan aminoácidos infrecuentes y se subdivide en varias clases. La clase Ia se denominan de forma general «lantipéptidos» o «lantibióticos» cuando tienen actividad antimicrobiana, porque su aminoácido es lantionina o (metil)lantionina y la bacteriocina más estudiada de este grupo es la nisina. El mecanismo de acción antimicrobiano de los lantibióticos es doble, puesto que se debe a su unión al lípido II de la membrana bacteriana, interfiriendo, por tanto, en la síntesis de la pared celular y formando un poro que ocasiona una despolarización de la membrana. La clase Ib y Ic son también péptidos formadores de poro, con diferentes mecanismos de acción, y se corresponden, respectivamente, con péptidos cíclicos del tipo «cabeza-cola» y con los denominados «sactipéptidos» o «sactibióticos» cuando tienen actividad antimicrobiana. La clase Id se corresponde con péptidos lineales que contienen anillos heterocíclicos de tiazoles y oxazoles o sus formas reducidas a tiazolina

y oxazolina; la clase le son las glicocinas, que contiene residuos glicosilados; y la clase lf son los denominados «lasopéptidos», que son microcinas que han sido descritas en enterobacterias. Aunque se han descrito péptidos antimicrobianos de las clases ld, le y lf, su mecanismo de acción necesita ser estudiado con mayor profundidad.

La clase II incluye péptidos de pequeño tamaño molecular (< 10 kDa), también termoestables, pero sin modificaciones postraduccionales. La clase IIa incluye péptidos tipo pediocina que tienen una secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC fundamental para el reconocimiento de la membrana y la formación del poro. Estas bacteriocinas tienen un amplio espectro de inhibición, especialmente frente a *Listeria*, y puede subdividirse a su vez en otros 8 subgrupos. La clase IIb se corresponde con bacteriocinas de dos péptidos que forman un complejo para la formación de los poros, como las plantaricinas EF y JK. La clase IIc son péptidos pequeños que son transportados por péptidos líderes y, por último, la clase IId son bacteriocinas de péptido único diferentes del tipo pediocina. Este es el subgrupo más heterogéneo de esta clase, puesto que tiene diferentes estructuras y mecanismos de acción, que puede incluir tanto la formación de poros como la inhibición en la síntesis de la pared celular mediante unión al lípido II, como en el caso de la nisina.

Por último, las bacteriocinas de clase III se corresponden con péptidos no modificados, termolábiles y mayores de 10 kDa, cuya estructura está compuesta por diferentes dominios. Su mecanismo de acción puede ser bacteriolítico, denominadas «bacteriolisinas», que causan la destrucción de la célula bacteriana mediante la escisión de los enlaces del peptidoglicano de la pared; o no lítico, que puede incluir alteración en el metabolismo de los azúcares o inhibición en la biosíntesis del ADN o las proteínas de la bacteria diana.

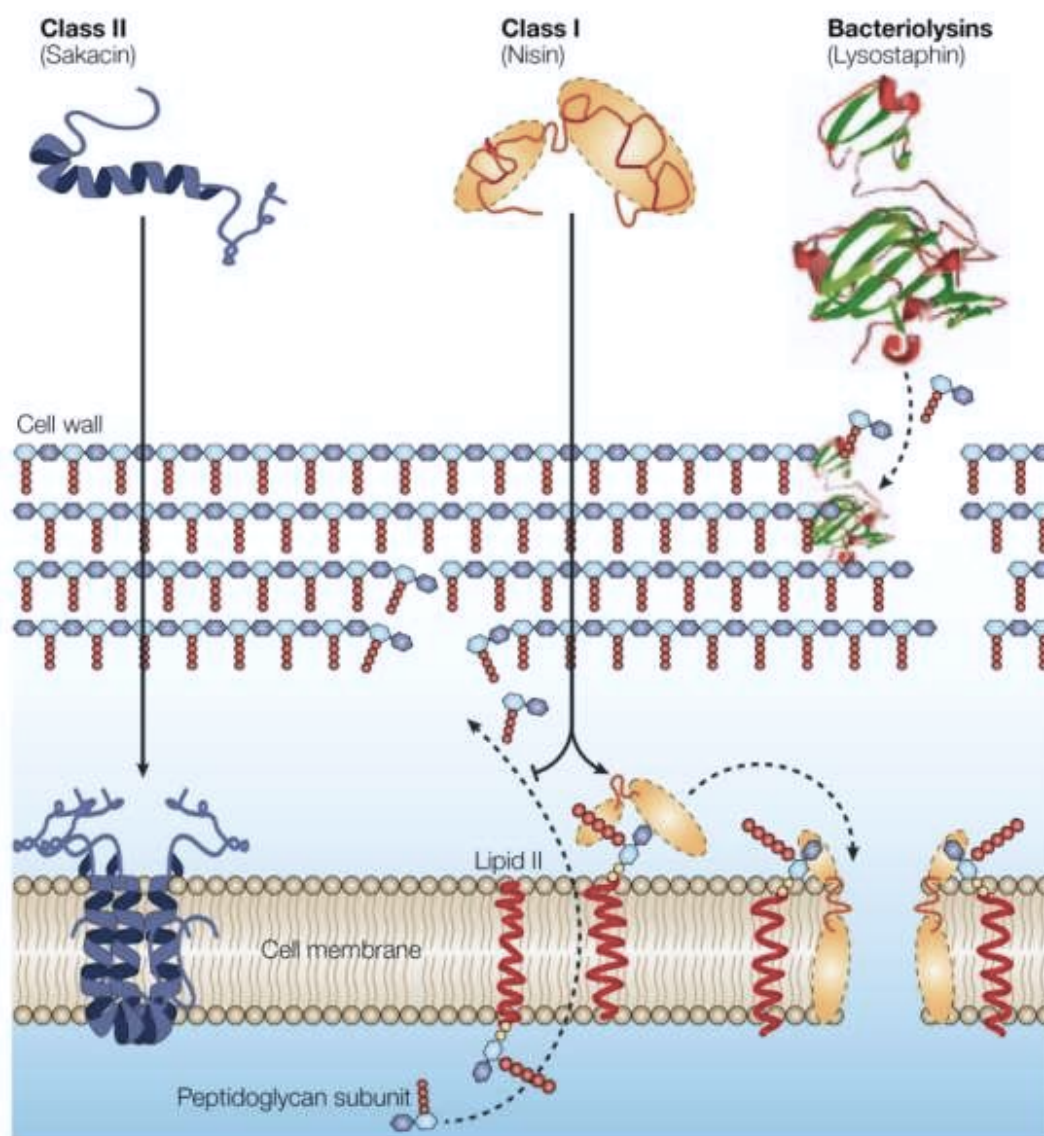


Figura 2.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas de clase I, II, III. Fuente: (Tulini, 2014)

Propiedades inmunomoduladoras de las bacterias ácido-lácticas

Otra de las propiedades de las BAL que más interés está causando durante los últimos años es su capacidad para interactuar con el sistema inmunitario de los organismos superiores en los que habitan, como parte de la microbiota comensal. Está totalmente aceptado por la comunidad científica en general que la microbiota comensal juega un papel esencial en la defensa natural del hospedador frente a agentes patógenos, particularmente los agentes infecciosos (Belkaid y Hand, 2014; Hevia et al., 2015). Las BAL poseen una amplia variedad de moléculas que se conocen con el nombre de

«Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos» (MAMP, *Microbe-Associated Molecular Patterns*), a través de la cual el hospedador distingue la microbiota comensal de los microorganismos patógenos. El reconocimiento de estos ligandos se lleva a cabo mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), fundamentalmente receptores tipo Toll en la superficie celular (TLR, *Toll-like receptors*) y receptores lecitina de tipo C (CLR) o de tipo NOD, en el citoplasma (NLR, *NOD-like receptors*) (Dolasia et al., 2018; Hevia et al., 2015).

Los TLR se localizan en las membranas celulares y se asocian a respuestas proinflamatorias. Son los más estudiados y, hasta la fecha, se han podido identificar 10 tipos de TLR, que son activados por diferentes ligandos (Takeuchi y Akira, 2010). Todos los TLRs contienen en su dominio ectomembranal repeticiones ricas en leucina y presentan un receptor Toll/IL1 intracelular (TIR) para la transducción de señales (Yu y Gao, 2015). Estos receptores se localizan en varios tipos celulares, principalmente en células del sistema inmunitario como células dendríticas o macrófagos, pero los podemos encontrar en otros tipos de células, como en las células epiteliales, y son esenciales tanto para la respuesta inmunitaria innata como adaptativa (Hayden et al., 2006; Pasparakis, 2012). La cascada de señalización que se desencadena cuando se produce la unión del ligando con el TLR provoca la dimerización del receptor y el reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como las proteínas MyD88 y TRIF que llevan a la activación de rutas de señalización importantes para la respuesta inmunitaria protectora, como NF- κ B o IFN-I, que es inductor de la producción de interferón (IFN) (Yu y Gao, 2015).

La ruta de señalización de NF- κ B engloba a factores de transcripción inducibles que regulan una extensa cantidad de genes relacionados con distintas funciones y procesos relacionados con el sistema inmunitario. La activación de NF- κ B asociada a TLR se produce por dos tipos de señalizaciones, la canónica (o dependiente de MyD88) y la alternativa (o independiente de MyD88). La proteína MyD88 activa una cascada de señalización que induce la producción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina (IL) 1, IL-8, IL-2 o factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) (Moreno y Sanchez-Ibarrola, 2003). Los TLR3 y TLR4 utilizan una ruta de señalización independiente a MyD88

que se lleva a cabo a través de la proteína TRIF, crucial para la expresión de los genes de la ruta IFN (Nagai et al., 2006). La vía de activación de IFN mediada por TLR endosomales promueve el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz frente a patógenos virales, puesto que se sensibilizan todas las células del organismo a la apoptosis, eliminando de esta forma el nicho del patógeno intracelular (Kawashima et al., 2013; Koyama et al., 2008).

Los MAMP incluyen una amplia variedad de metabolitos microbianos y componentes estructurales como exopolisacáridos (EPS), peptidoglicano (en Gram+) o lipopolisacárido (en Gram-), lipoproteínas de membrana, ácidos lipoteicoicos y teicoicos (LTA y WTA respectivamente), pili y fimbrias, entre otros (Hevia et al., 2015; Stedman et al., 2020); y también se han descrito metabolitos microbianos secretados al medio como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) acetato, propionato o butirato y las bacteriocinas, mencionadas anteriormente (Hegarty et al., 2016; Hevia et al., 2015; Silva et al., 2020; Stedman et al., 2020).

Estas moléculas tienen la capacidad, por tanto, de actuar como mediadores inmunitarios (Figura 2.2), bien sean proinflamatorios, cuando desencadenen la respuesta inflamatoria; o antiinflamatorios, cuando medien para el desarrollo de una respuesta reguladora o tolerogénica, pero son necesarios más estudios que ahonden en el tipo de mecanismos que se desencadenan (Suez et al., 2019).

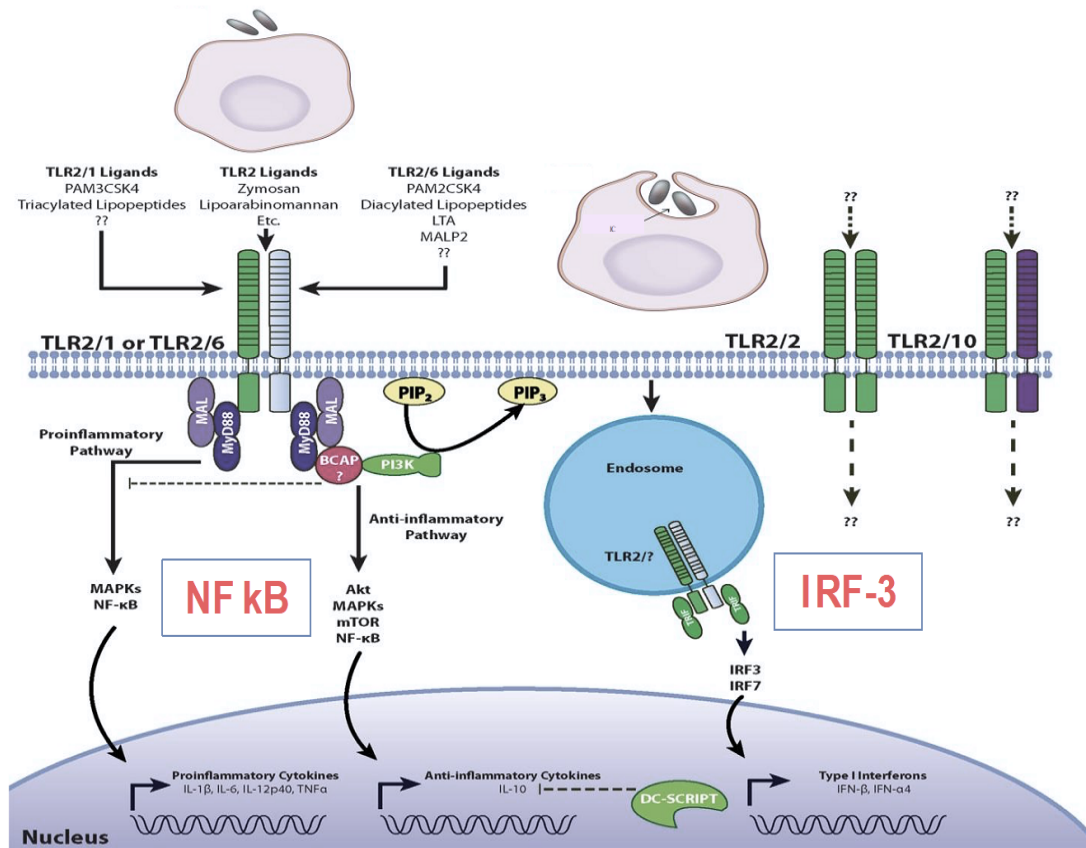


Figura 2.2. Interacción de las BAL con los macrófagos para la regulación de las rutas inmunitarias de señalización NF-κB e IFN-I vía TLR. Adaptado de: (J. B. Li et al., 2013).

El **objetivo** general de este capítulo es el de estudiar las propiedades beneficiosas de las bacterias ácido-lácticas aisladas de la microbiota del jabalí.

Para ello, se propusieron como **objetivos** específicos los siguientes:

- Estudio de la seguridad de los aislados para su posterior utilización para el control de procesos infecciosos mediante: evaluación de sus resistencias antimicrobianas fenotípicas frente a antibióticos de uso común, y genotípicas mediante la búsqueda de genes de resistencia; búsqueda de genes de virulencia y el análisis bioinformático de la proximidad filogenética a otras bacterias ácido-lácticas de diferentes orígenes.
- Caracterización fenotípica de la actividad antimicrobiana frente a patógenos aislados de casos clínicos de jabalíes: *Escherichia coli* como marcador de procesos digestivos,

Pasteurella multocida como marcador de procesos respiratorios y *Listeria monocytogenes* como marcador de procesos sistémicos; y su caracterización genotípica: genes que codifican para metabolitos antimicrobianos, incluidos clústeres de bacteriocinas.

- Determinación de las propiedades de los aislados para modular la respuesta inmunitaria mediante estudio de su fenotipo: interacción con los fagocitos del hospedador y capacidad para activar las rutas NF- κ B y IFN-I en macrófagos *in vitro*; y la evaluación genotípica de sus marcadores inmunomoduladores.

MÉTODO

1. Estudios de seguridad de los aislados

Para evaluar la seguridad de las cepas aisladas y seleccionadas del capítulo anterior, se analizaron diferentes parámetros. En primer lugar, se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a determinados antibióticos y se realizó un estudio genotípico de los aislados para detectar genes de resistencia antimicrobiana y marcadores de virulencia. Además, se realizó un estudio filogenético para comparar las secuencias de nuestros aislados con otras secuencias conocidas de bacterias ácido-lácticas de diferentes orígenes, tanto potencialmente patógenas como beneficiosas.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica

La susceptibilidad de los aislados de bacterias ácido-lácticas seleccionados se cuantificó mediante el ensayo de microdilución en caldo. Los antibióticos seleccionados fueron: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol, siguiendo las recomendaciones del Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias (FEEDAP) utilizados en Alimentación animal de la EFSA (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012). Se realizaron diluciones seriadas en caldo MH de cada uno de los antibióticos frente a una concentración bacteriana de 2×10^5 ufc/mL en placas de 96 pocillos Nunc-MicroWell™ (Thermo Scientific), que fueron incubadas durante 18 h a 37 °C. El crecimiento de las cepas se midió mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm con un lector de microplacas (Multimode Detector DTX 880, Beckman Coulter) y se calculó la concentración inhibitoria mínima (CMI), que se define como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento de la bacteria. Las cepas fueron categorizadas en sensibles o resistentes para cada antibiótico según los valores de referencia definidos por el FEEDAP (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012).

Detección genotípica de marcadores de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia

A partir de la secuencia de los genomas obtenidas y descritas en el capítulo anterior, se realizó una exploración con Abricate versión 0.9 (<https://github.com/tseemann/abricate>) para detectar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana adquiridos y factores de virulencia putativos. Además, se identificaron genes de resistencia adicionales utilizando la base de datos de genes de referencia de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047>) y las dos bases de datos Resfinder (Zankari et al., 2012) y PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). La base de datos de factores de virulencia VFDB se utilizó de la misma forma para detectar genes que codifican factores de virulencia como proteinasas, gelatinasas y proteínas formadoras de biopelículas.

Proximidad filogenética a otros aislados de diferentes orígenes

Para determinar el origen filogenético de los 11 aislados seleccionados, se realizó un estudio de genómica comparada entre estos aislados y otras especies de bacterias ácido-lácticas aisladas de diferentes orígenes (individuos sanos y enfermos, tanto humanos como animales; alimentos y bebidas crudos o fermentados; y medio ambiente, fundamentalmente). Se descargaron todos los genomas públicos de las especies *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. paracasei*, *Pediococcus* spp., *E. faecalis* y *E. casseliflavus*, junto con sus metadatos, de la base de datos del genoma del NCBI utilizando ncbi-genome-download versión 0.2. 9 (<https://github.com/kblin/ncbi-genome-download>). Debido al elevado número de genomas disponibles para *L. plantarum* y *E. faecalis*, se llevó a cabo un primer cribado comparativo utilizando perfiles de frecuencia de características de purina-pirimidina (FFPry) (Sims et al., 2009) para seleccionar las secuencias del genoma más cercanas. La comparación del genoma se llevó a cabo utilizando polimorfismos de nucleótido único del genoma central, identificados por ParSNP versión 1.2 (Pornsukarom et al., 2018; Treangen et al., 2014). Los árboles filogenéticos se generaron con el programa Figtree versión 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2. Caracterización antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas

Se realizó una caracterización antimicrobiana de los 11 aislados seleccionados que mostraron potencial antimicrobiano, especialmente frente a micobacterias, en los ensayos anteriores descritos en el capítulo I. Para estos ensayos se seleccionaron tres especies diferentes para tratar de abarcar un amplio espectro de bacterias Gram + y Gram – y patógenos que afectan a diferentes aparatos o sistemas: *Escherichia coli* como marcador de procesos digestivos, *Pasteurella multocida* como marcador de procesos respiratorios y *Listeria monocytogenes* como marcador de procesos sistémicos. Todas las cepas patógenas han sido aisladas de casos clínicos en jabalíes diagnosticados por la empresa INGULADOS S.L. y han sido identificadas mediante pruebas microbiológicas básicas y moleculares. Los métodos de elección para evaluar la actividad antibacteriana de los aislados de LAB incluyeron tres tipos de técnicas diferentes que fueron optimizadas para cada patógeno: cocultivos, ensayo de microdilución en caldo y «prueba de la gota», más conocida por su nombre en inglés «*spot-on-agar*», como se describió anteriormente (A. Stedman et al., 2020).

Además, se realizó la caracterización genotípica mediante la detección de genes que codifican para metabolitos antimicrobianos, incluidos clústeres de bacteriocinas, mediante los procedimientos descritos en el Capítulo I de esta tesis doctoral. En el capítulo anterior se describieron los genes de los aislados que mostraron actividad antimicobacteriana y en este se realizó el mismo estudio para el resto de aislados seleccionados.

Cocultivos de bacterias ácido-lácticas y un aislado de *E. coli* patógeno

Las BAL seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 37°C durante 24-48 h. El *E. coli* seleccionado se trata de una cepa patógena aislada de un caso clínico en jabalíes y se cultivó en caldo TSB (Oxoid) a 37 °C durante 24 h con aireación. Para evaluar la actividad antimicrobiana de las BAL frente a *E. coli*, se realizaron cocultivos en TSB siguiendo un procedimiento similar al descrito en el capítulo I, con algunas modificaciones. Se inocularon 10⁵ ufc/mL del cultivo en TSB de *E. coli* y 10⁷ ufc/mL de cada BAL cultivadas

en medio MRS. Se preparó un control negativo inoculando 10^5 ufc/mL de *E. coli* en un monocultivo y se le añadió el volumen correspondiente de MRS para normalizar las condiciones. Se incubaron todos los cocultivos a 37 °C durante 24 h con aireación y se sembraron diluciones seriadas en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Oxoid) diseñado para el recuento de enterobacterias y que inhibe el crecimiento de BAL. Los resultados de la actividad inhibitoria del experimento de cocultivo se expresan como reducciones logarítmicas de las ufc/mL.

Ensayo de microdiluciones en caldo frente a una cepa de *Pasteurella multocida* serotipo B

El ensayo de microdiluciones en caldo se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana extracelular de los aislados frente a *P. multocida*, debido a la dificultad para obtener un medio diferencial y específico para este patógeno en concreto (Huberman et al., 2015), a diferencia del caso anterior. Para este ensayo, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células de las cepas de BAL a partir de cultivos puros en caldo MRS (37 °C, 48 h) mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y filtración a través de filtros para jeringa de 0,22 μ m de tamaño de poro (Branchia). La cepa patógena de *P. multocida* serotipo B, aislada de un caso clínico en jabalí (Risco et al., 2013), se cultivó en caldo MH a 37°C durante 48 h con aireación. Los sobrenadantes de todos los aislados se diluyeron en serie y se testaron frente a una concentración de 10^7 ufc/mL del cultivo puro de *P. multocida* siguiendo un procedimiento similar al descrito para la determinación de las CMI de los antibióticos. Los resultados se expresaron como Unidades Arbitrarias (unidades de actividad) por mililitro (UA/mL) que viene definida como el recíproco de la mayor dilución que muestra una clara inhibición del crecimiento del patógeno (Casadei et al., 2009). Para comprobar esta inhibición, se sembraron 100 μ L en MH agar de las diluciones que muestren inhibición del crecimiento.

Prueba de la gota (spot-on-agar) frente a *Listeria monocytogenes*

La prueba de la gota o spot-on-agar permite enfrentar directamente las células microbianas de las dos bacterias a testar y aporta mucha información para la evaluación

de la actividad antimicrobiana de forma rápida y muy visual (Gutierrez et al., 2009). Se depositaron 5 µl de cada cultivo de los aislados de BAL cultivados en MRS en medio MH agar previamente inoculado con 1% de un cultivo de *L. monocytogenes* obtenido en su fase exponencial en medio TSB. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h para evaluar las zonas de inhibición del crecimiento. Se incluyeron como controles de actividad las siguientes cepas: *L. plantarum* WCFS-1, un fuerte acidulante (Kleerebezem et al., 2003); *Pediococcus acidilactici* PA1.0, productor de la bacteriocina de clase IIa sin modificaciones llamada «pediocina» (Gonzalez y Kunka, 1987); *Lactococcus lactis* NZ9700, productor de la bacteriocina de clase I denominada «nisina», con modificaciones postraduccionales; y *Lactococcus lactis* NZ9800, no productor de nisina que actúa como control negativo (Kuipers et al., 1993).

Caracterización genotípica de la actividad antimicrobiana: identificación de genes que codifican para la producción de metabolitos antimicrobianos

Para la caracterización genotípica de la actividad antimicrobiana se siguió el mismo procedimiento descrito en el método del capítulo I para los aislados que mostraron actividad antimicrobiana. En este caso, se extendió el procedimiento al resto de aislados seleccionados, que se resumirá a continuación.

La identificación de clústeres de genes asociados a la producción de bacteriocinas se realizó mediante el software online BAGEL4 (van Heel et al., 2018) y la anotación de los genomas se utilizó para detectar la presencia o ausencia de fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfoctolasa, dos enzimas que participan en las dos rutas metabólicas glucolíticas principales, mediante las cuales se liberan diferentes metabolitos antimicrobianos (ácido láctico, ácido acético, CO₂, etanol...). Las anotaciones se utilizaron también para identificar genes asociados con la producción de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂), incluyendo genes que codifican para la piruvato oxidasa (*Pox*), lactato oxidasa (*Lox*) y NADH oxidasas, y también genes que codifican para NADH peroxidasas.

3. Estudios de evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los aislados de bacterias ácido-lácticas

Para la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los aislados de BAL seleccionados se realizó un estudio fenotípico de sus propiedades *in vitro* mediante un análisis de la capacidad de estos para ser fagocitados y un ensayo para evaluar la activación de dos rutas importantes de la respuesta inmunitaria. Además, se efectuó la caracterización genotípica mediante la detección de genes que codifican para varios ligandos, previamente descritos por otros autores, que pueden interactuar con el sistema inmunitario del hospedador.

Ensayo de la influencia sobre la capacidad fagocítica con células sanguíneas porcinas

Se realizó la toma de muestras de sangre porcina mediante el mismo procedimiento descrito en el capítulo I. La sangre se incubó a 37 °C durante 30 min junto con las cepas de BAL previamente marcadas con PKH2, se lisaron con solución de lisis RBC (Biolegend) y fueron procesadas por el citómetro de flujo BD FACS Celesta mediante los procedimientos descritos previamente (Stedman et al., 2020). Se midieron la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) para distinguir las principales poblaciones sanguíneas en función de su tamaño y granularidad (por ejemplo, linfocitos vs. fagocitos), mientras que el canal FITC permite medir diferentes intensidades de fluorescencia emitida (GFP) en las células sanguíneas que se unen (ej. linfocitos) y/o fagocitan (ej. fagocitos como monocitos y polimorfonucleares tales como neutrófilos). El diagrama resultante SCC/GFP se utilizó para evaluar la fagocitosis de las BAL.

Evaluación de la respuesta macrofágica a las bacterias ácido-lácticas

Se utilizaron las líneas celulares de monocitos de THP-1-IFIT-1-GLuc y THP1-Lucia™ NF-κB (Invivogen) para monitorear la activación de los factores de transcripción IFN-I y NF-κB, respectivamente, tras la exposición a las BAL seleccionadas, mediante el procedimiento descrito anteriormente (Stedman et al., 2020). Las células IFIT1-GLuc y NF-κB-GLuc secretan luciferasa Gaussia (GLuc) bajo el control del promotor IFIT1 y NF-κB, respectivamente. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio Roswell Park

Memorial Institute (RPMI, Sigma Aldrich) 1640 con suero fetal bovino al 15 % (FCS, Seralaf) y penicilina / estreptomicina al 1% (Pen / Strep, Life Technologies) a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Las células se trataron con 20 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) para su diferenciación a macrófagos que posteriormente fueron expuestos a las BAL durante 2 h en medio RPMI con 2% de FCS en una proporción de 20 bacterias viables por macrófago. Después de la exposición, se sustituyó el medio de los macrófagos por RPMI con 2% de FCS y 1% de Pen / Strep y se incubaron durante 20 h. A continuación, se midió la activación de IFIT1 y NF-κB en el lector de placas Clariostar (BMG Biotech) usando coelenterazina (NanoLigh Technology) a 2 µg/ml. La activación de las rutas mencionadas se calculó como un aumento de la actividad luciferasa en los macrófagos expuestos en comparación con las medidas registradas para los macrófagos no expuestos a las BAL.

Caracterización genotípica de la capacidad inmunomoduladora: identificación de genes que codifican para la producción de moléculas inmunomoduladoras

Para identificar los marcadores asociados con las respuestas inmunitarias innatas del hospedador, se siguió el mismo procedimiento genómico descrito para los marcadores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos. Se buscaron proteínas involucradas en los mecanismos de evasión, adhesión y colonización utilizando Abricate y la base de datos VFDB. Además, se exploraron las anotaciones del genoma para identificar ligandos de las BAL interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los TLR o receptores similares a NOD, descritos en la introducción incluidos los exopolisacáridos (EPS), precursores fimbriales, ácido teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA) y lipoproteínas de membrana (Hevia et al., 2015; Sengupta et al., 2013; Van Tassell y Miller, 2011).

4. Estudio estadístico

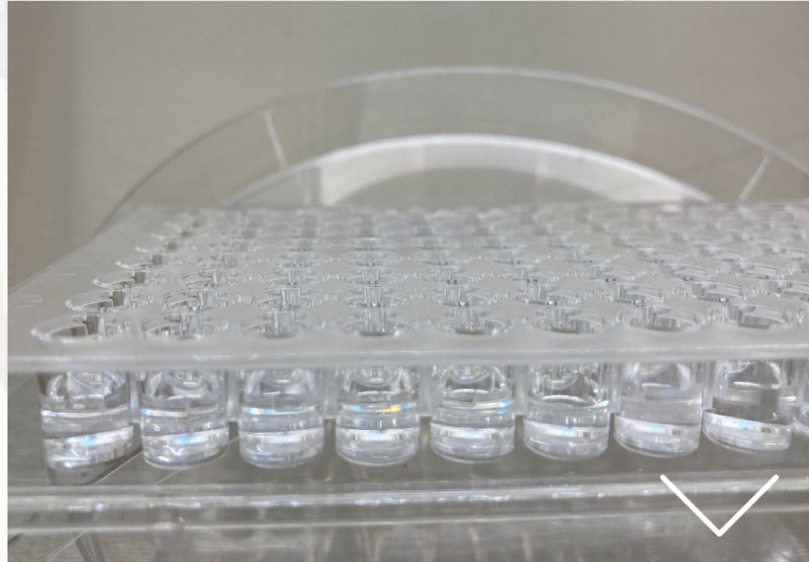
El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Los datos se muestran con la media \pm DE (desviación estándar) y representan tres réplicas biológicas. Las diferencias entre aislados se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher.

Figura resumen del método

01.

Estudios de seguridad

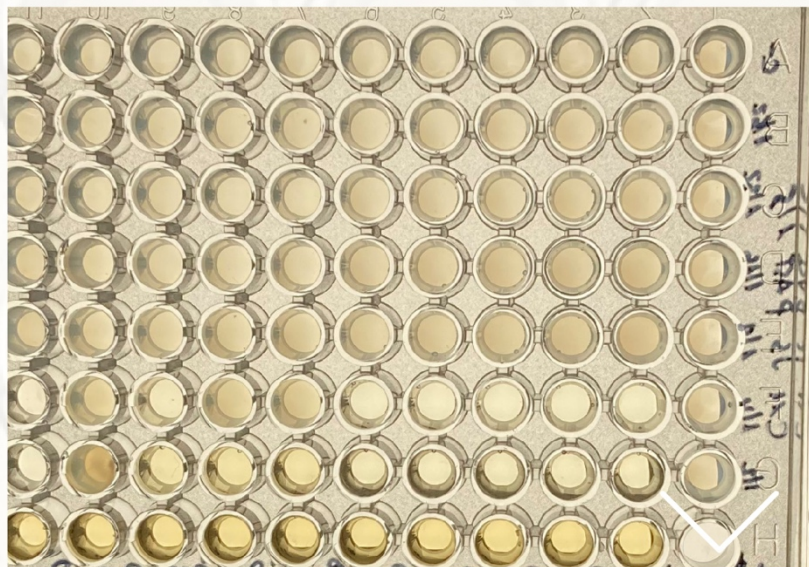
- a. Resistencias antimicrobianas.
- b. Marcadores de virulencia.
- c. Origen filogenético.



02.

Actividad antimicrobiana frente a patógenos.

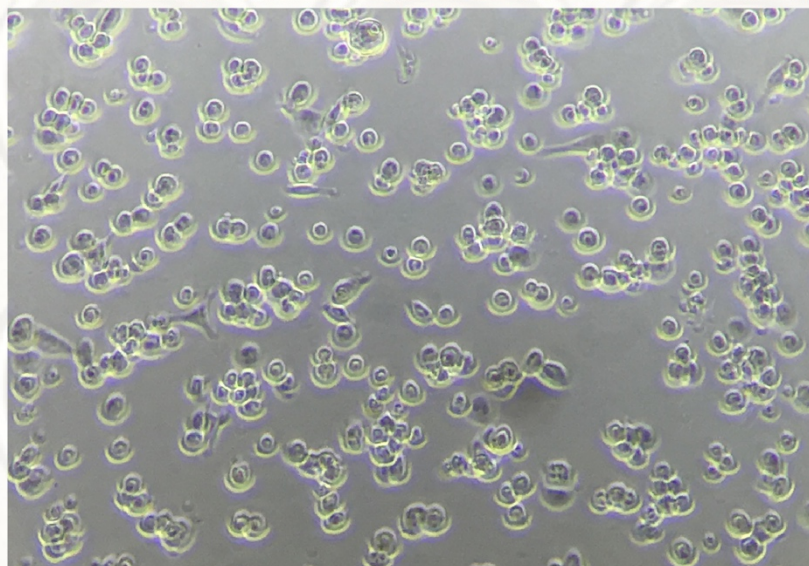
- a. *Escherichia coli*
- b. *Pasteurella multocida*
- c. *Listeria monocytogenes*



03.

Capacidad inmunomoduladora en fagocitos.

- a. Influencia sobre la fagocitosis
- b. Activación de rutas inmunitarias
- c. Patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs)



04.

Estudio estadístico.

RESULTADOS

El perfil de seguridad depende de las cepas y las especies de bacterias ácido-lácticas

Para evaluar la seguridad de los aislados, se cuantificó su susceptibilidad a los antibióticos que se utilizan comúnmente en medicina humana y veterinaria y de forma paralela, se buscaron los genes asociados con resistencias a antibióticos para correlacionar estos marcadores con la tolerancia fenotípica de los aislados (Figura 2.3 y Figura 2.4). Todos los aislados fueron sensibles a ampicilina, cloranfenicol y eritromicina, con la excepción de *E. faecalis* que fue resistente para el último de ellos. Los genomas de las cepas de *E. faecalis* revelaron la presencia de *lsa(A)*, un gen que codifica una bomba de eflujo que confiere resistencia expulsando los macrólidos fuera de la célula (Dina et al., 2003), lo que explicaría la resistencia detectada. Curiosamente, casi todas las cepas fueron relativamente tolerantes a los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina y estreptomina), y algunas de ellas fueron identificadas como resistentes según los estándares FEEDAP, como las cepas de *L. plantarum* C1 y EML1, *L. salivarius* C12 y *P. acidilactici* C5. Sin embargo, no se localizaron marcadores genotípicos de resistencia en ninguno de sus genomas. Por el contrario, se identificaron los genes *tet(L)* y *tet(M)*, asociados con la resistencia a tetraciclina, en las cepas *L. salivarius* C2 y *E. faecalis* A1. Junto con *L. plantarum* C1, estas dos especies mostraron tolerancia a la tetraciclina. Además, observamos que *E. casseliflavus* fue tolerante a la vancomicina y que esta característica fenotípica se correlaciona con la presencia de múltiples genes de resistencia a la vancomicina (*vanC2 / 3*, *vanXY-c4*, *vanT-C*, *vanR-C* y *vanS-C*). Por último, no se encontraron marcadores genéticos asociados a resistencias antimicrobianas en ninguna de las cepas de *P. acidilactici*.

Por otro lado, se buscaron marcadores de virulencia en los genomas de los aislados como parte del estudio de seguridad. Las dos cepas de *E. faecalis* poseen varios genes de virulencia, incluida una serina proteasa (*sprE*), una gelatinasa (*gelE*), proteínas asociadas a producción de biopelículas (*ebpA*, *ebpB*, *ebpC*) y su regulación (*bopD*), reguladores de sistemas de virulencia (*fsrA*, *fsrB*), citolisinas (*cyll*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cyIS*)

y reguladores (*cyIR1*, *cyIR2*); hialuronidasas (*EF0818*, *EF3023*, *EF0485*), proteínas de superficie (*fsr1*) y sustancias de agregación (*asa1*, *prgB/asc10*). Los genomas de lactobacilos y pediococos no mostraron factores de virulencia.

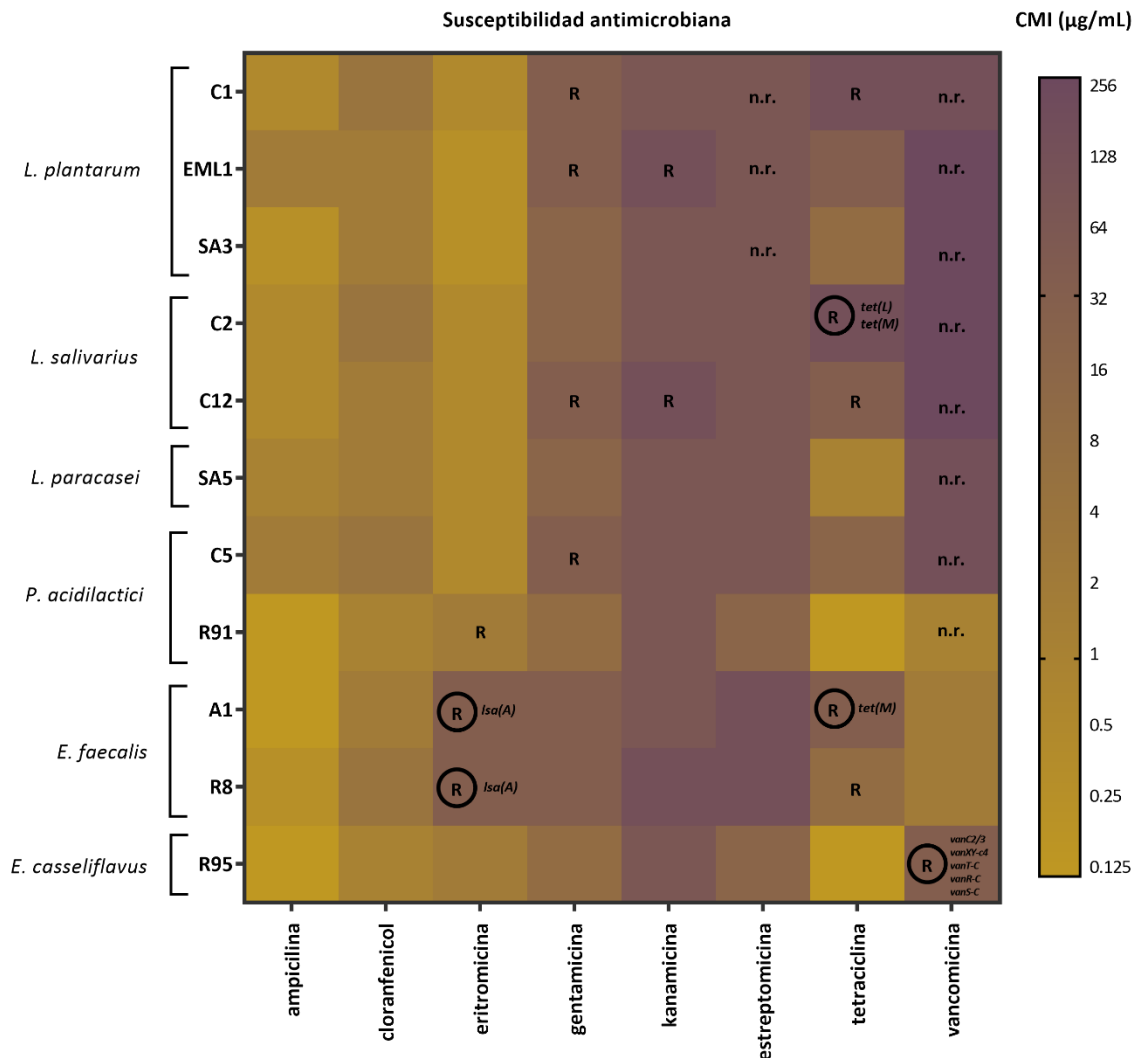


Figura 2.3. Mapa de calor que muestra la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos que se utilizan con frecuencia en medicina veterinaria y humana. La susceptibilidad se cuantificó utilizando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, µg/mL) y se representan como gradientes de color. Las cepas que son reconocidas como resistentes por los estándares FEEDAP se indican con una «R». La R redondeada indica concordancia entre la resistencia genotípica y fenotípica, con los marcadores de genes de resistencia mostrados en cursiva. No se requiere la evaluación de vancomicina (n.r.) para los lactobacilos y estreptomycin para *L. plantarum*, debido a su resistencia natural innata a estos antibióticos.

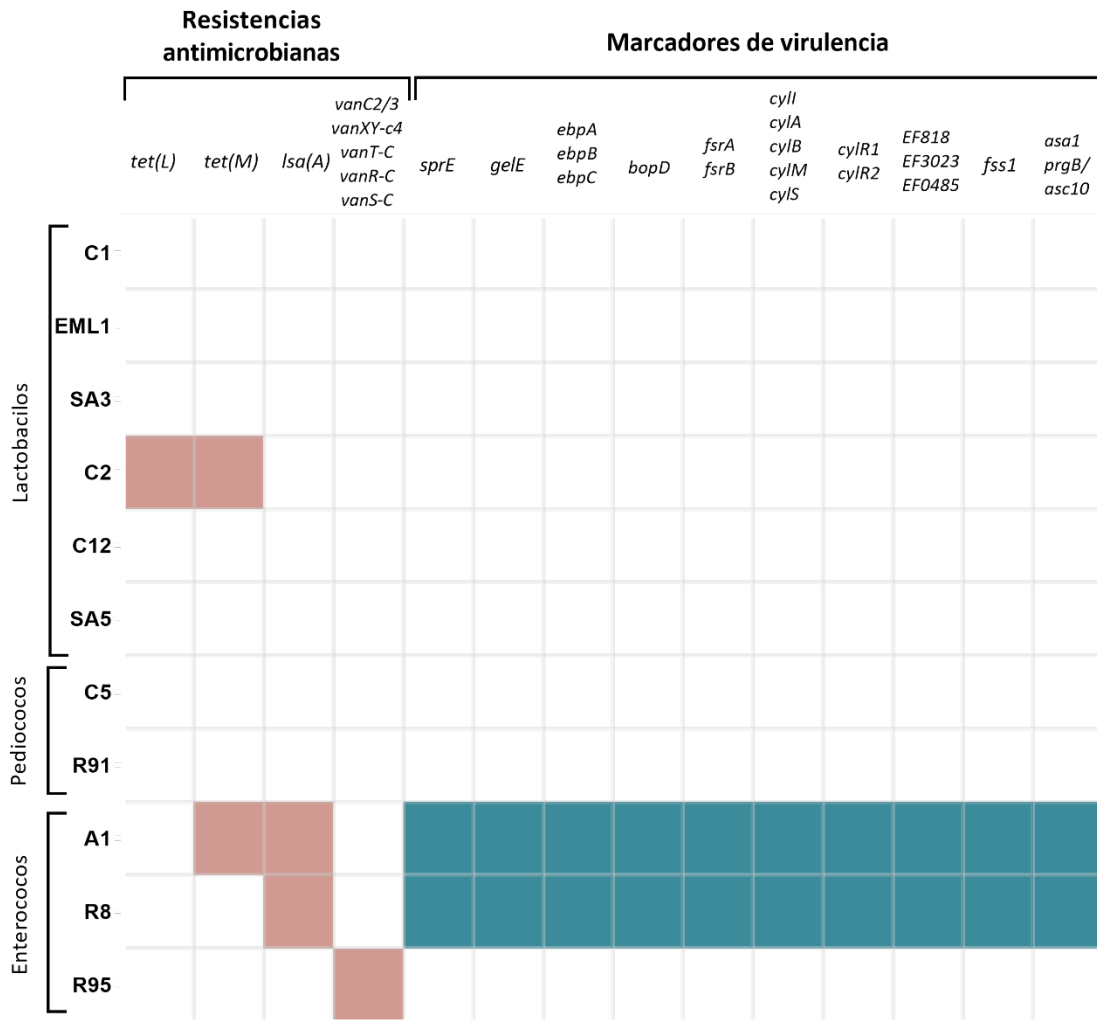


Figura 2.4. Genes de resistencia antimicrobiana y marcadores genéticos de virulencia. Los aislados de lactobacilos y pediococos carecen de genes de resistencia y virulencia, a excepción de *L. salivarius* C2 que presenta genes para la resistencia a tetraciclinas; y los aislados de enterococos presentan numerosos marcadores genéticos de resistencias antimicrobianas y virulencia, en especial las dos cepas de *E. faecalis*.

La proximidad filogenética de BAL varía entre cepas aisladas de alimentos, animales y humanos.

Para complementar el estudio de seguridad y determinar el origen filogenético de los aislados, se realizó un análisis comparativo de los genomas con otros genomas publicados para las mismas especies de BAL con diferentes orígenes. Los aislamientos de *L. plantarum* EML1 y SA3 son casi idénticos y ambos muestran similitudes con el aislado C1 (Figura 2.5). Todos ellos parecen estar relacionados con cepas aisladas de alimentos fermentados o productos relacionados con probióticos. De manera similar, *L. paracasei* SA5 se ubica cerca de cepas derivadas de alimentos, en particular productos

lácteos fabricados para consumo humano (Figura 2.6). Los aislamientos C2 y C12 de *L. salivarius* se agruparon entre otros dos grupos que representan cepas de cerdos sanos y humanos (Figura 2.7). Curiosamente, los aislamientos de *P. acidilactici* C5 y R91 mostraron una proximidad cercana a cepas de diverso origen, incluidos alimentos, animales y humanos (Figura 2.8), sin embargo, se observó una divergencia significativa entre estos dos pediococos. Mientras que la cepa C5 pertenece a un grupo en el que se encuentran otras cepas aisladas de alimentos fermentados, de humanos y animales de compañía, el aislado R91 se relaciona con un grupo diferente de cepas que derivan de alimentos (fermentados y lácteos) y animales de granja (pollo y cerdo), pero ninguna de ellas relacionadas con procesos patológicos. Por el contrario, ambos aislamientos de *E. faecalis* (A1 y R8) están muy cerca de las cepas patógenas aisladas de cerdos (Figura 2.9) De igual manera, *E. casseliflavus* también se encuentra en la proximidad de otros aislados patógenos pero derivados de pacientes humanos (Figura 2.10), aunque el número de genomas disponibles es muy reducido para establecer comparaciones.

Figura 2.5. Árbol filogenético de los aislados de *L. plantarum*

Origen del aislado

- Jabalí
- Alimento crudo / fermentado
- Humano
- Lácteos
- Medio ambiente / plantas
- Animal

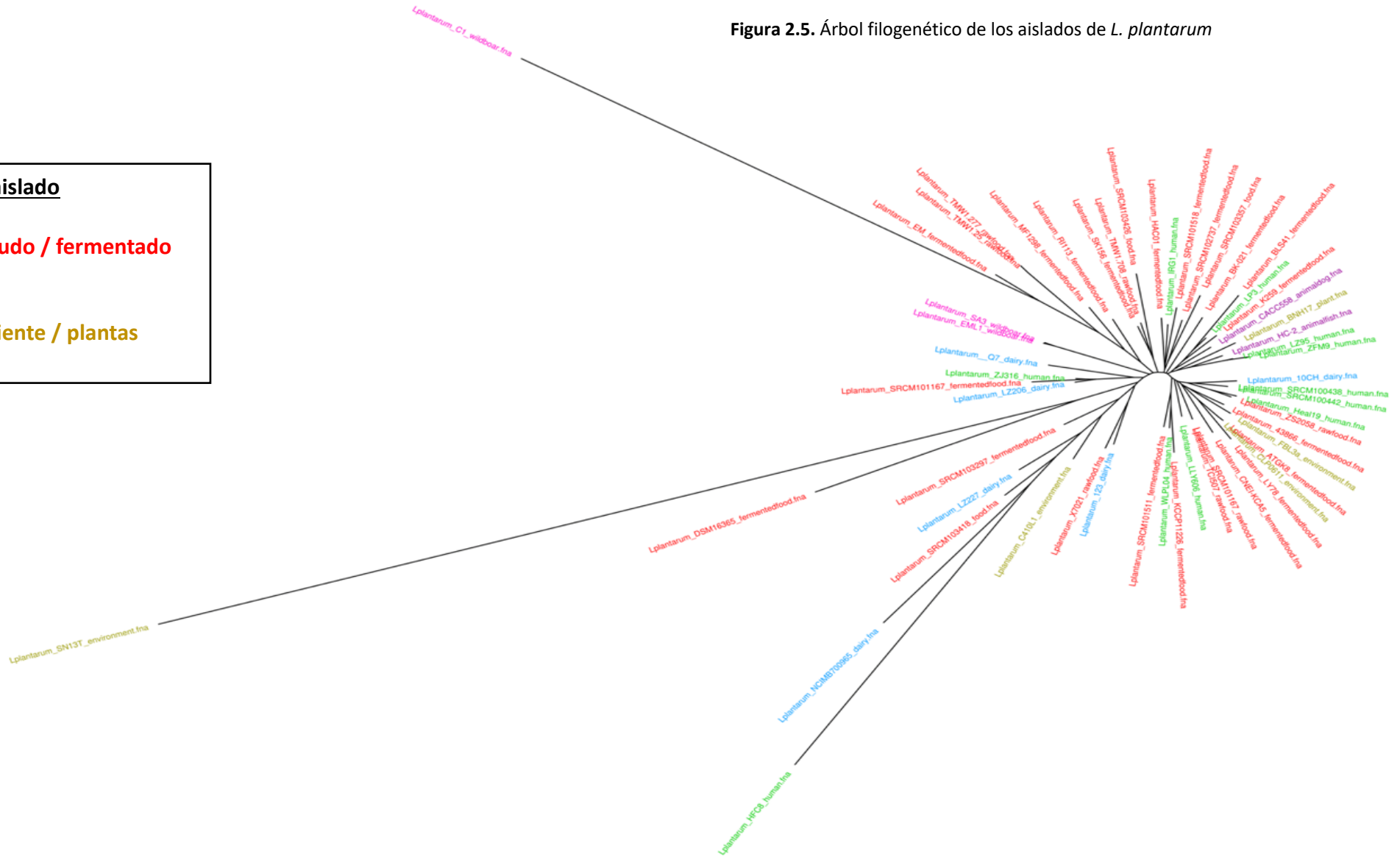
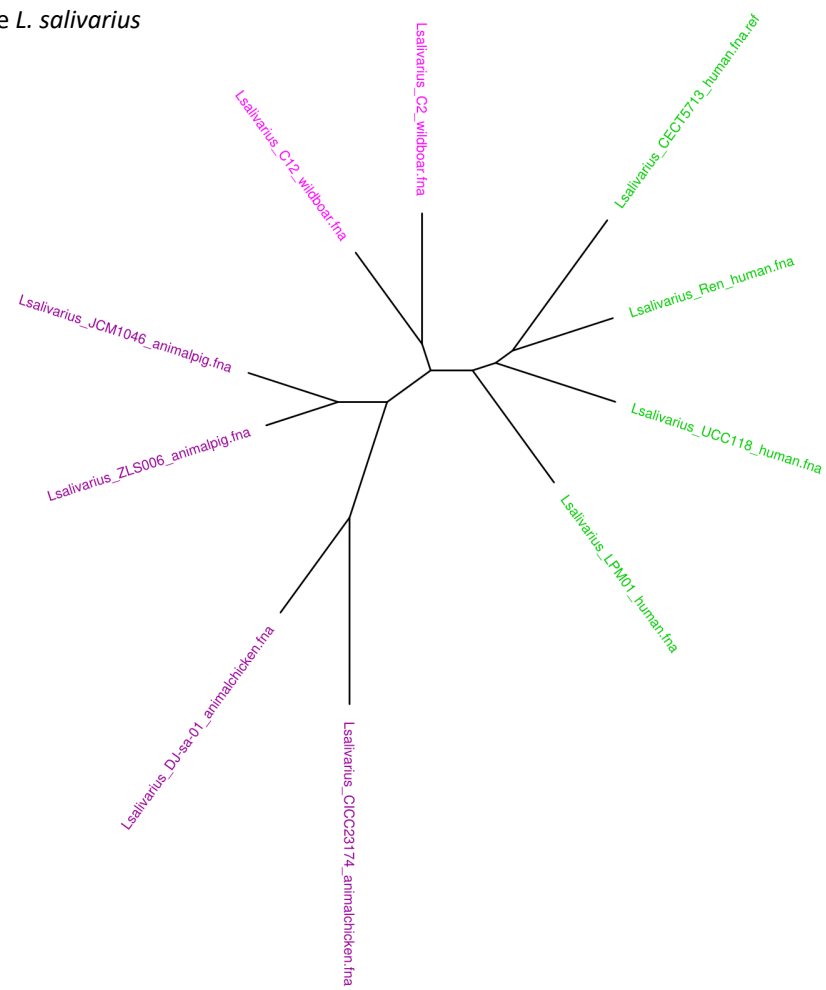
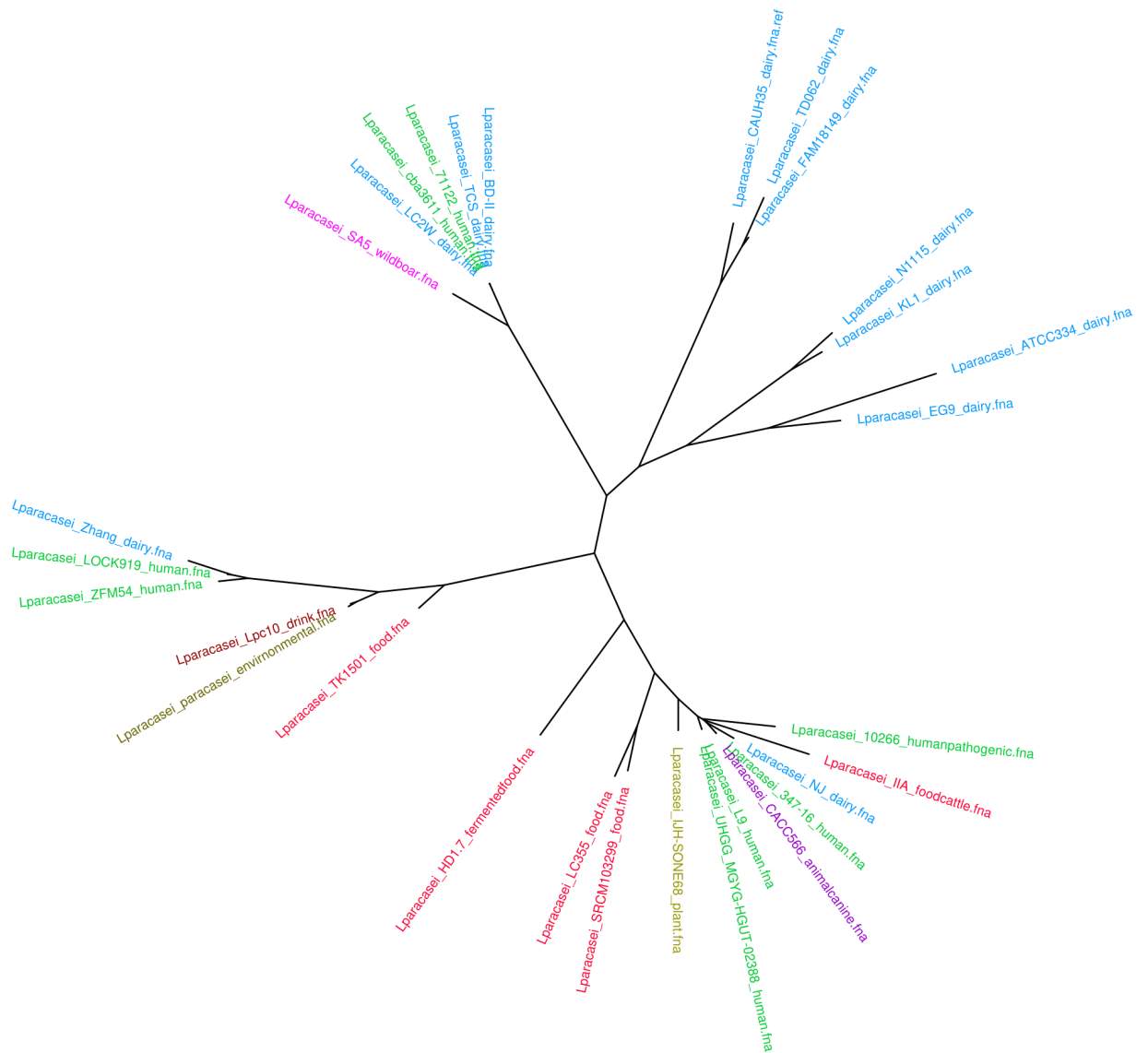


Figura 2.6. Árbol filogenético de los aislados de *L. salivarius*



Origen del aislado
Jabalí
Animal
Humano

Figura 2.7. Árbol filogenético de los aislados de *L. paracasei*

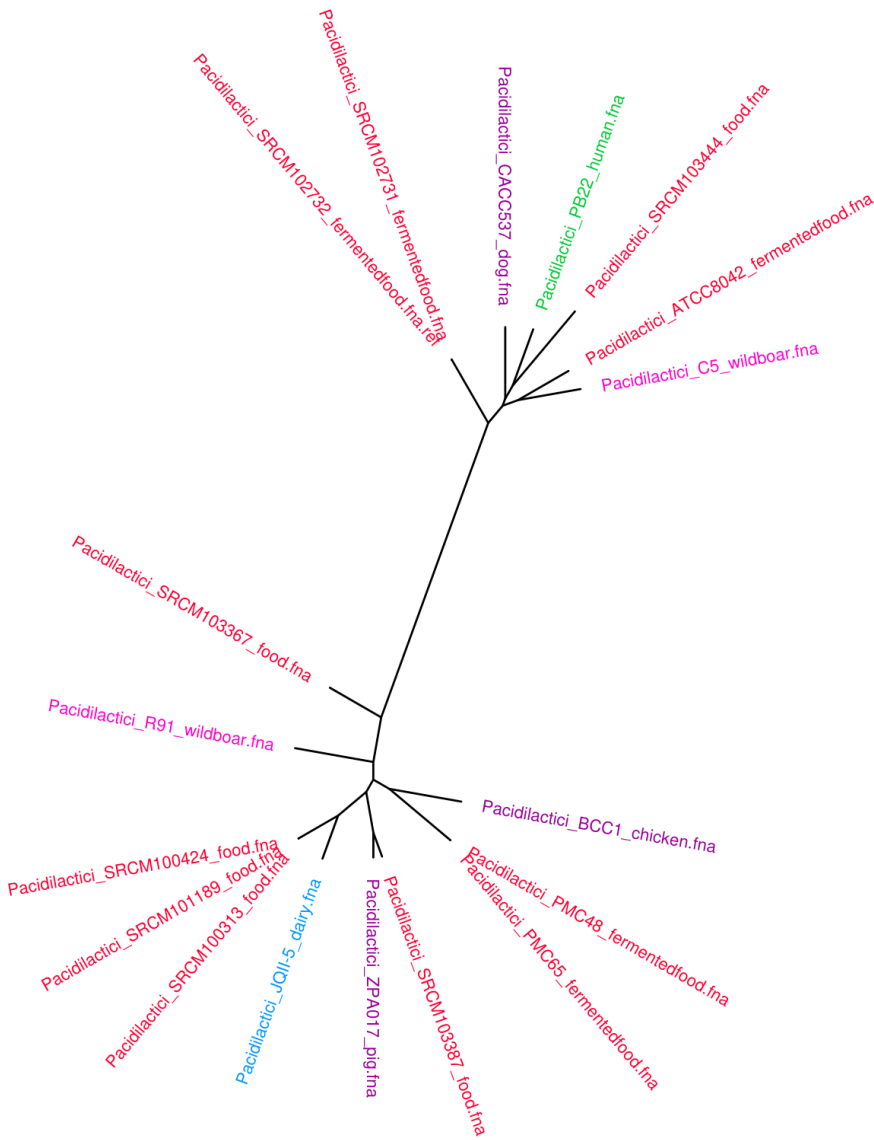


Origen del aislado

- Jabalí
- Lácteos
- Humano
- Alimento crudo / fermentado
- Medio ambiente / plantas
- Animal
- Bebida

0.05

Figura 2.8. Árbol filogenético de los aislados de *Pediococcus acidilactici*



Origen del aislado

- Jabalí
- Alimento crudo / fermentado
- Animal
- Lácteos
- Humano

0.08



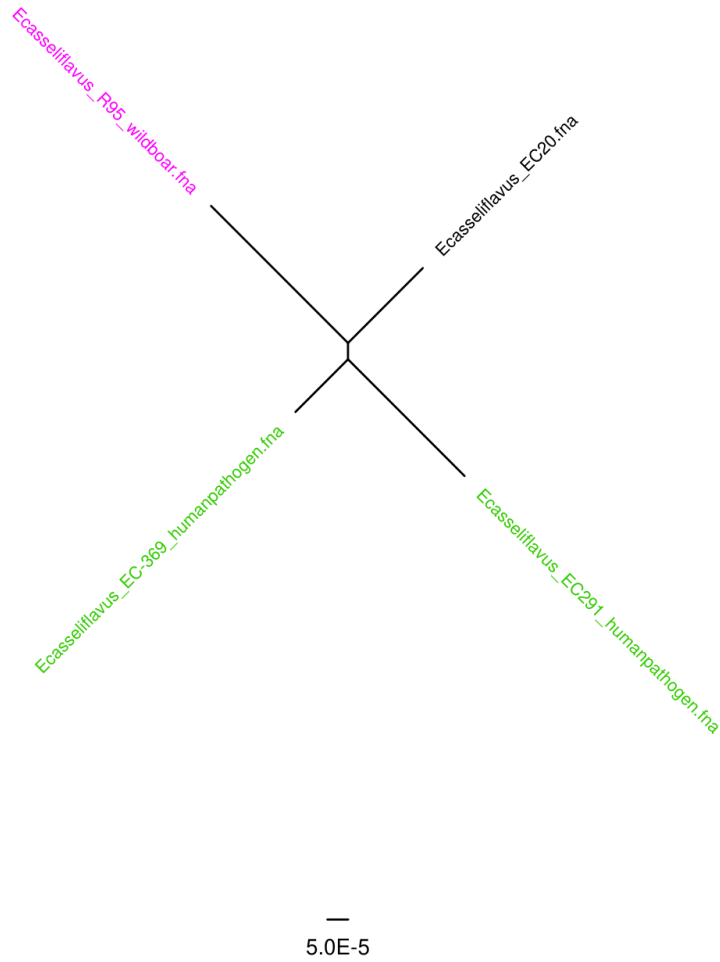
Figura 2.9. Árbol filogenético de los aislados de *E. faecalis*

Origen del aislado

- Jabalí
- Animal
- Humano
- Medio ambiente / plantas
- Alimento crudo / fermentado
- Lácteos



Figura 2.10. Árbol filogenético de los aislados de *E. casseliflavus*



<u>Origen del aislado</u>
Jabalí
Humano
Desconocido

La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas frente a los patógenos es específica de la especie

Las dos cepas de *E. faecalis* muestran la mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y ambas contienen grupos de genes implicados en la biosíntesis de sactipeptidos (Figura 2.11), un grupo de bacteriocinas modificadas postraduccionalmente caracterizadas por la presencia de enlaces entre el azufre de las cisteínas y el carbono alfa de otros residuos (Grove et al., 2017). Además, el aislado *E. faecalis* A1 y *E. casseliflavus* R95 portan genes que codifican un lantipeptido (Figura 2.11C), otra bacteriocina modificada mediante enlaces tioéter postraduccionales (Repka et al., 2017). Por otro lado, los sobrenadantes de cultivos de *L. salivarius* mostraron una actividad muy significativa y específica frente a *P. multocida* (Figura 2.12), que albergan una cantidad considerable de genes que codifican bacteriolisinas, unas bacteriocinas de clase III que hidrolizan los peptidoglicanos de la pared celular (Cotter et al., 2005). Por último, un aislado de *P. acidilactici* (R91) mostró un halo claro de inhibición contra *L. monocytogenes* (Figura 2.13A). Este aislado es el único que mostró actividad frente a este patógeno y el único que posee un grupo de genes asociado con la producción de pediocina (Fig. 2.13B), que muestra una actividad muy conocida por ser anti-listerial.

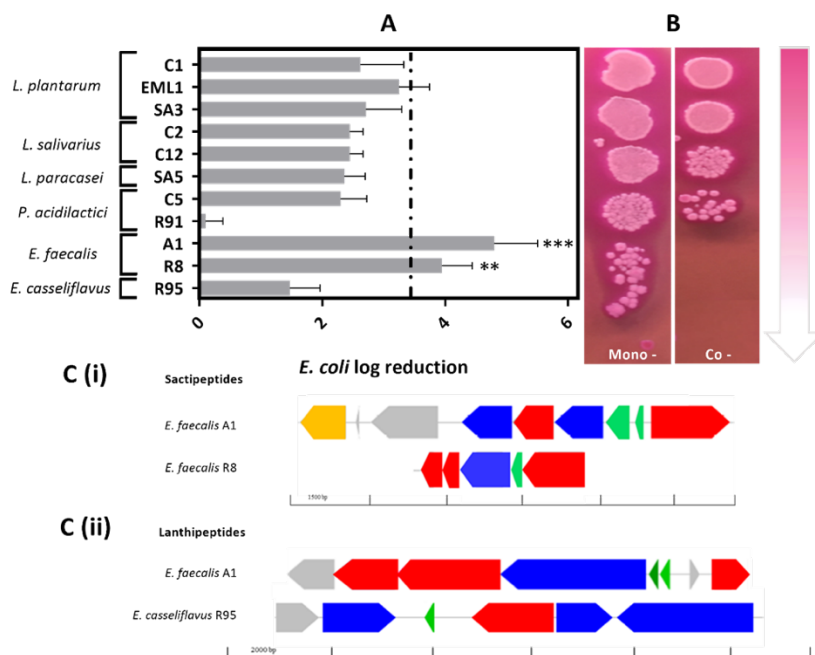


Figura 2.11. *E. faecalis* inhibe *E. coli* y produce potencialmente bacteriocinas modificadas postraduccionalmente. (A) Reducción logarítmica de las ufc/ml de *E. coli* cuando se cocultiva con las BAL

tras 24 h de incubación. La reducción logarítmica se calculó utilizando al menos 3 réplicas biológicas con respecto al monocultivo de *E. coli*. **(B)** Agar selectivo para enterobacterias (VRBG) que contiene el monocultivo de *E. coli* y un cocultivo con *E. faecalis* A1. **(C)** Clústeres de genes implicados en la biosíntesis de sactipéptidos y lantipéptidos, dos bacteriocinas modificadas postraduccionally que se encuentran en los aislados de *E. faecalis* A1 y R8 y *E. casseliflavus* R95. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccionally (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris).

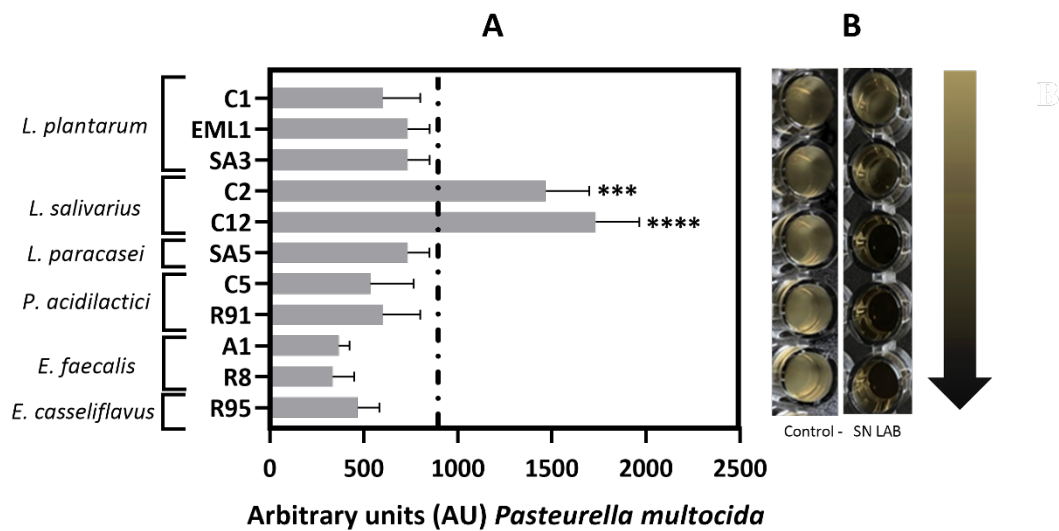


Figura 2.12. *L. salivarius* muestra actividad extracelular contra *Pasteurella multocida* y potencialmente secreta múltiples bacteriolisinas y bacteriocinas de clase II **(A)** Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL) de los sobrenadantes obtenidos de los aislados frente a *P. multocida* serotipo B después de una incubación durante 24 h a 37 °C. La UA / mL se define como el recíproco de la mayor dilución que muestra una clara inhibición del crecimiento del patógeno. **(B)** *P. multocida* en un ensayo de microdilución usando caldo Mueller Hinton. Inhibición del crecimiento después de la exposición con el sobrenadante de un cultivo de *L. salivarius* C2 (derecha) con respecto al control (izquierda).

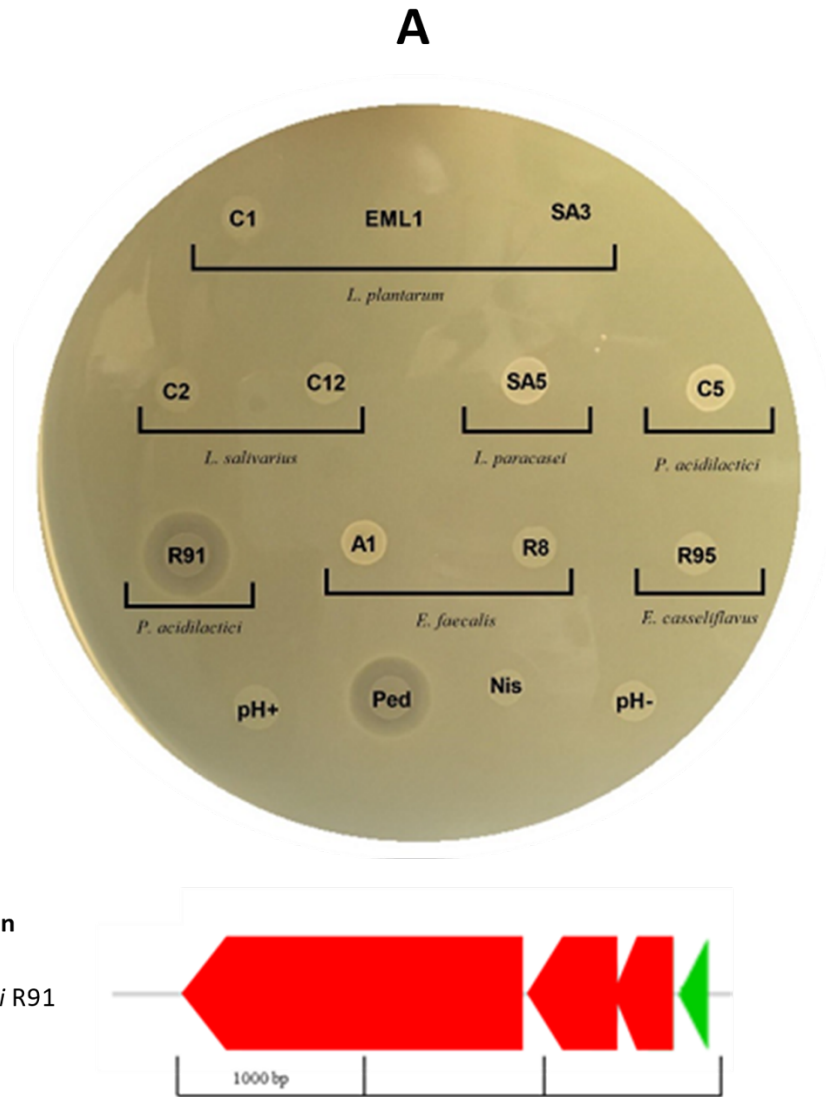


Figura 2.13. *P. acidilactici* R91 muestra una clara actividad anti-listerial y potencialmente bacteriocinas de un solo péptido sin modificar compatible con pediocina. **(A)** Prueba de la gota o «spot-on-agar» de los cultivos de las BAL frente a *Listeria monocytogenes*. Los controles se muestran en la fila inferior: *L. plantarum* WCFS-1 (pH +, acidulante), *P. acidilactici* PA1.0 (productor de pediocina, Ped), *Lactococcus lactis* NZ9700 (productor de nisina, Nis) y *Lactococcus lactis* NZ9800 (control negativo, pH-). **(B)** Grupo de genes implicados en la síntesis hipotética de Pediocin PA-1 en *Pediococcus acidilactici* R91. La nomenclatura es la misma que la citada anteriormente: las bacteriocinas precursoras (verde) y las proteínas de transporte / inmunidad (rojo).

Algunas bacterias ácido-lácticas interactúan con los fagocitos y activan respuestas inmunitarias innatas

El perfil fagocítico de los aislados se determinó mediante FACS utilizando sangre porcina y bacterias marcadas con PKH2. A excepción de *L. salivarius* C12, todos los lactobacilos interactuaron con los fagocitos, entre los cuales los monocitos respondieron mucho más que los neutrófilos, salvo en el único aislado de *L. paracasei* que también interactuó con los neutrófilos (Figura 2.14). Ninguno de los aislados de *Pediococcus* o *Enterococcus* mostró ninguna interacción significativa con los fagocitos. El perfil fagocítico de los lactobacilos se correlacionó positivamente con su capacidad para activar respuestas inmunitarias innatas protectoras en los macrófagos. Todos los lactobacilos indujeron la activación de NF- κ B o IFN-I de forma diferente en función de la especie (Figura 2.15). Tanto *L. plantarum* como *L. paracasei* desencadenan una activación de IFN-I muy significativa, mientras que *L. salivarius* induce de forma muy potente la activación de NF- κ B. El aislado de *P. acidilactici* C5 también activó una respuesta NF- κ B significativa. El resto de los aislamientos, principalmente enterococos, no activó ninguna de las vías de señalización.

Se identificaron en los genomas marcadores asociados con respuestas inmunitarias innatas. Se encontraron genes que codifican proteínas implicadas en mecanismos de evasión, como polisacáridos capsulares (*cap8A*, *capa*, *ywqC*) en todos los aislados; adhesión, las adhesinas (*cna* y *sraP*) en *L. plantarum* y enterococos; y colonización, los factores de virulencia anteriormente descritos para enterococos (Figura 2.14D). Por otro lado, mediante las anotaciones del genoma detectamos otro tipo de ligandos que se asocian con la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los TLR y los receptores tipo NOD (Figura 2.15D). Las moléculas encontradas en los 11 aislados incluyen precursores fimbriales (*ebpA*, *ebpB*, *ebpC*, *fimA* y *comC*) de forma predominante en enterococos; componentes de la pared celular en todos los aislados como LTA (*lta*, *ltaS1_2*, *ltaS1_3*), WTA (*tagGH*, *D-Ala*) y lipoproteínas de membrana (*TmpC*, *lolD*); compuestos solubles en *L. salivarius* y *L. paracasei* (lactocepina *PrpP*) y proteínas ricas en serina-treonina (*STp*) en los pediococos; y agonistas de receptores TLR2 en *L. plantarum* (EPS) y *L. paracasei* (lipoproteína de membrana, *lolD*).

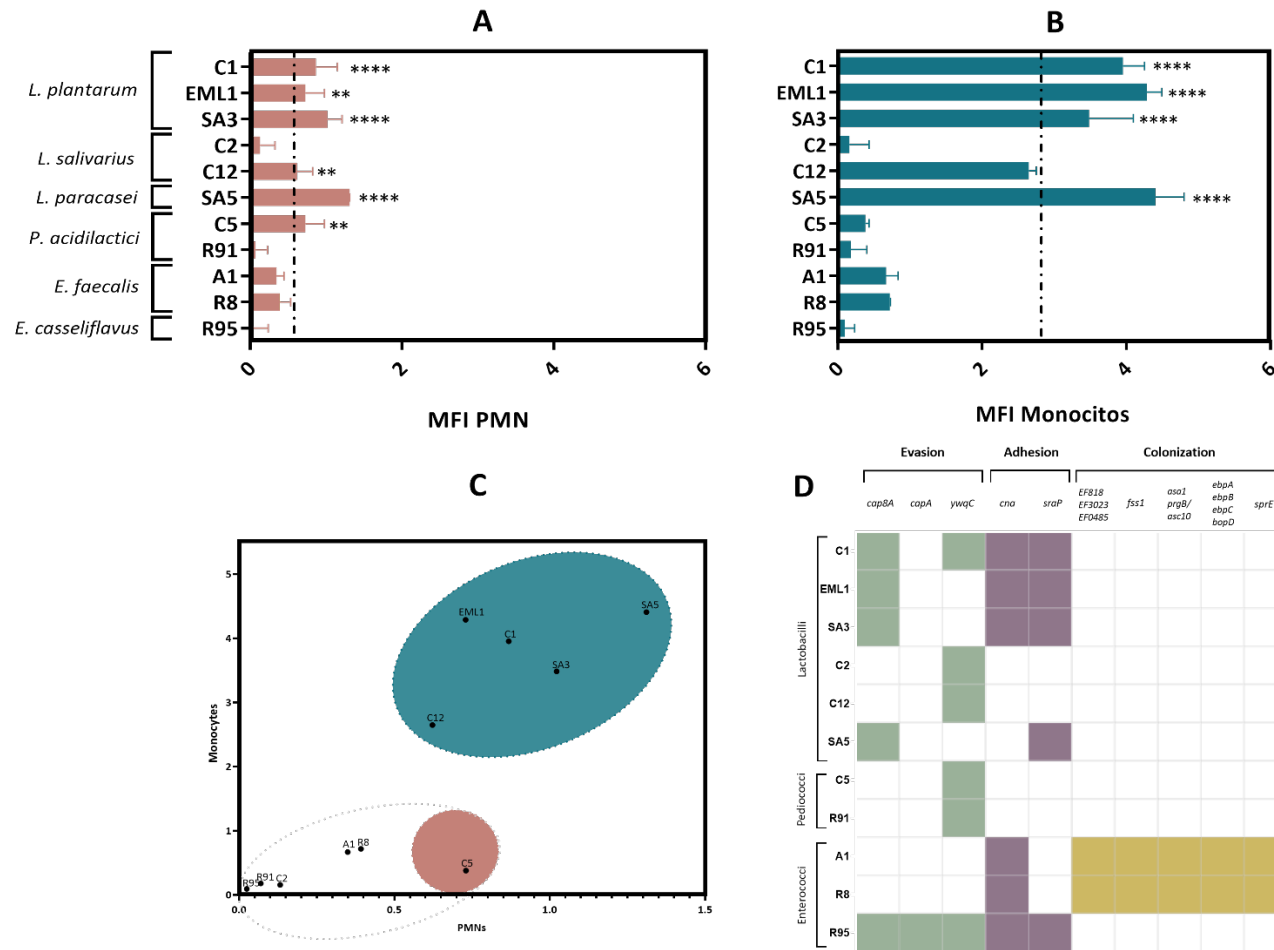


Figura 2.14. Los lactobacilos interactúan con los fagocitos porcinos y portan moléculas asociadas con la adhesión celular. La respuesta de PMN **(A)** y monocitos **(B)** a las BAL se cuantificó utilizando bacterias marcadas con PKH2 y se expresa como log₂ de la intensidad de fluorescencia media (MFI). **(C)** El perfil fagocítico de la mayoría de los aislados de lactobacilos son predominantemente monocíticos, pero *L. paracasei* también interactúa con los PMN. Los enterococos y los pediococos apenas muestran con los fagocitos. **(D)** Los aislados de LAB portan genes que se asocian con la evasión, la adhesión y / o la colonización.

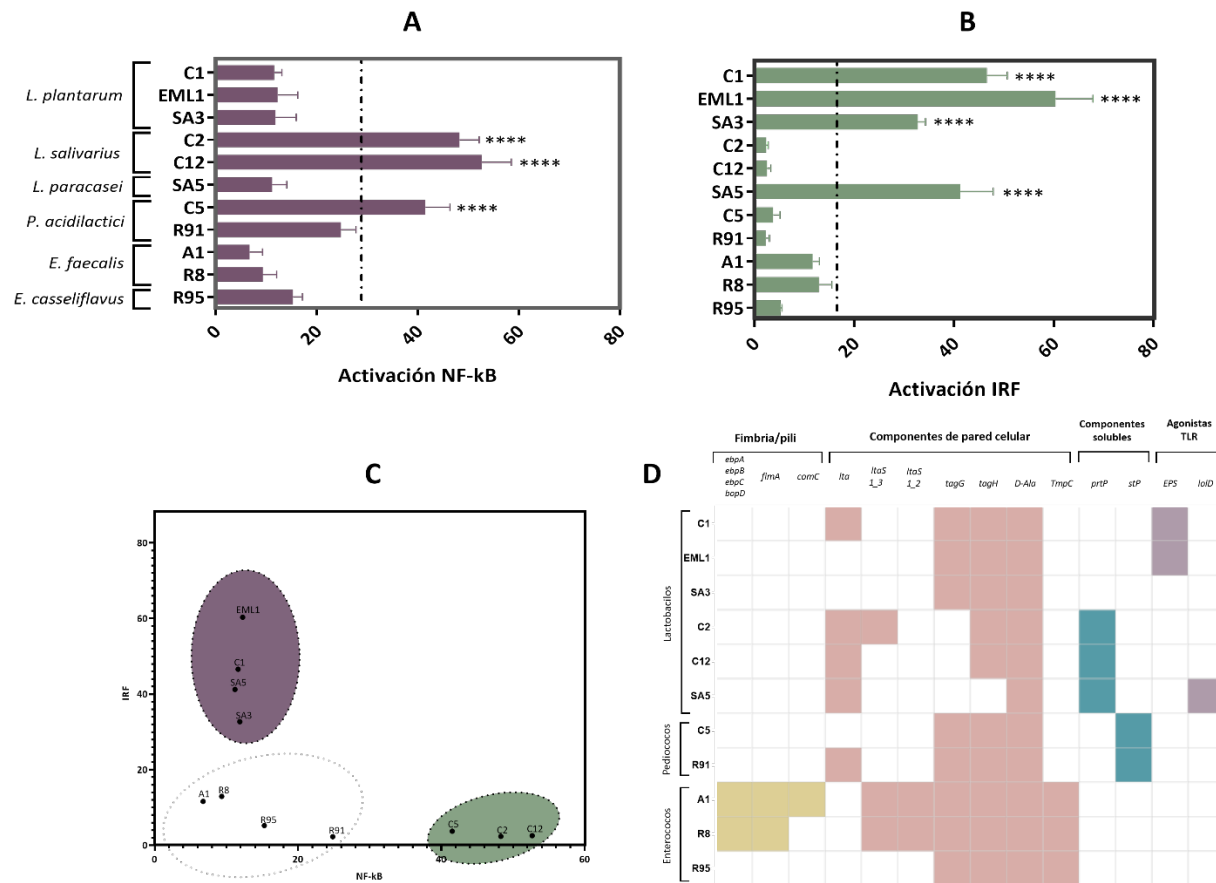


Figura 2.15. Los lactobacilos activan respuestas inmunitarias innatas protectoras en macrófagos y poseen moléculas asociadas con la activación de TLR. La activación de las rutas NF-κB **(A)** e IFN-I **(B)** se cuantificó en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA expuestos a las BAL. La activación de NF-κB / IRF se presenta con respecto al control y los datos representan al menos 3 réplicas biológicas. **(C)** Los aislados se distribuyen de manera diferente según su capacidad para activar las vías NF-κB / IFN-I. Las especies *L. plantarum* y *L. paracasei* desencadenan respuestas significativas de IRF, mientras que las cepas de *L. salivarius* inducen la activación de NF-κB. **(D)** Los aislados poseen genes asociados con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como TLR y NOD, que incluyen fimbria / pili, componentes de la pared celular y agonistas de TLR2.

DISCUSIÓN

En el capítulo anterior, se describió el aislamiento de varias especies de BAL que potencialmente podrían tener propiedades como probióticos, especialmente aquellas que fueron aisladas de jabalíes con una situación epidemiológica particular. Estos animales parecen ser naturalmente resistentes a la tuberculosis, puesto que la prevalencia de la enfermedad es nula pese a que su hábitat está localizado en varias zonas, geográficamente dispersas, de alto riesgo para esta enfermedad y las fincas en las que habitan están rodeadas de zonas con altas prevalencias. Además, dado que estos animales viven en condiciones de libertad y tienen menos influencia humana, gozan de una microbiota que podría disponer de importantes propiedades que deben ser estudiadas y analizadas en profundidad, y cuyas características únicas deben ser explotadas para lograr una mejora en la sanidad de animales que estén más condicionados a padecer enfermedades.

Por ello, se decidió realizar una caracterización probiótica exhaustiva de las 11 BAL aisladas de la microbiota digestiva del jabalí. La caracterización se realizó en tres términos que son fundamentales para este propósito: en primer lugar, se realizaron varios análisis para evaluar la seguridad de los aislados para su posible utilización en animales; en segundo lugar, se analizaron sus propiedades antimicrobianas frente a patógenos de suidos en general y el jabalí en particular y; por último, se estudió su capacidad de interacción con las células del sistema inmunitario en un modelo de sangre porcina. Todos los fenotipos mostrados por las BAL trataron de ser corroborados por su genotipo mediante análisis bioinformáticos.

La mayoría de las especies de lactobacilos y pediococos, comúnmente utilizados en productos probióticos, reciben el estado de presunción cualificada de seguridad (QPS), ya que, en principio, no entrañan ningún tipo de riesgo para su utilización en alimentos y piensos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021). Sin embargo, es recomendable realizar una evaluación completa para garantizar su seguridad, en particular cuando se sospecha que puedan poseer resistencias antimicrobianas

adquiridas que puedan ser transferibles, especialmente cuando vienen codificadas en su genoma (REGLAMENTO (CE) No 429/2008 DE LA COMISIÓN de 25 de Abril de 2008 Obre Normas de Desarrollo Para La Aplicación Del Reglamento (CE) No 1831/2003 Del Parlamento Europeo y Del Consejo Por Lo Que Se Refiere a La Preparación y Presentación de Solicitudes y a La Evaluación y Autorización de Aditivos Para Piensos, 2008; EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012). Los lactobacilos y pediococos aislados en este estudio no portan factores de virulencia y fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos probados, que son los recomendados por la EFSA para este propósito; aunque con algunas excepciones. La resistencia intrínseca encontrada en los aislados de lactobacilos y pediococos a la vancomicina es bien conocida (Campedelli et al., 2019; Goldstein et al., 2015; Nelson, 1999) y, de hecho, no se requiere la evaluación de este antimicrobiano para los grupos de bacterias mencionados (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012). Se encontró cierta tolerancia fenotípica a los aminoglucósidos, siendo algunas de las cepas resistentes, según los estándares FEEDAP, lo que también ha sido descrito previamente (Jaimee y Halami, 2016; Klose et al., 2014; Singla et al., 2018). Aunque se observó resistencia fenotípica a la tetraciclina en tres lactobacilos en este estudio, solo *L. salivarius* C2 porta el determinante genotípico que codifica para la bomba de expulsión activa *tet(L)* y la proteína de protección ribosomal *tet(M)*, que son los marcadores de resistencia adquirida más extendidos en los lactobacilos (Campedelli et al., 2019; Klose et al., 2014). Este aislado no cumple los criterios para el estado QPS y, por lo tanto, no puede ser considerada como aditivo alimentario debido al riesgo de transferencia horizontal de estos genes, que han sido asociados a plásmidos previamente (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012; Jacobsen et al., 2007). El resto de las cepas que presentan una resistencia inherente sin el determinante genético son consideradas aceptables por la FEEDAP. De hecho, los niveles de tolerancia a los antibióticos encontrados en la última década en lactobacilos llevaron a la propuesta de reconsiderar los valores de corte recomendados por la EFSA (Campedelli et al., 2019).

Por el contrario, aunque algunos enterococos se utilizan como aditivos alimentarios, el género no ha obtenido el estado QPS debido al potencial de algunas especies de *ingulados*

transferencia de resistencia y patogenicidad (Hanchi et al., 2018). De hecho, se encontró un perfil de resistencias antimicrobianas y factores de virulencia completamente diferente en este grupo de BAL y prácticamente todas las resistencias fenotípicas detectadas se correlacionan con el genotipo. Ambos *E. faecalis* portan genes intransferibles, localizados en el cromosoma, que confieren resistencia a trimetoprim (dihidrofolato reductasa, *dfrE*) (Coque et al., 1999) y eritromicina (bomba de expulsión activa de múltiples fármacos, *Isa (A)*) (Dina et al., 2003). Los dos aislados de *E. faecalis* también mostraron resistencia a la tetraciclina, pero solo la cepa A1 porta el determinante *tet(M)*, que presenta un gran riesgo de transferencia horizontal como se ha indicado anteriormente (Jacobsen et al., 2007; Jamet et al., 2012). *E. casseliflavus* forma parte del grupo de enterococos con resistencia intrínseca a la vancomicina y además alberga varios determinantes de esta resistencia (Cetinkaya et al., 2000; Lebreton et al., 2014). Estos aislamientos mostraron fenotipos y genotipos similares a estudios previos en jabalíes (Klose et al., 2014; Poeta et al., 2007). Además, los genomas de los dos aislados de *E. faecalis* revelaron la presencia de varios genes de virulencia, incluidas proteasas, gelatinasas, hialuronidasas, citolisinas, sustancias de agregación, proteínas de superficie y asociadas a biopelículas, que han sido ampliamente descritos en estudios previos (Ch'ng et al., 2019; Fisher y Phillips, 2009; Gomes et al., 2008; Martin et al., 2006), así como reguladores de virulencia que parecen jugar un papel importante en la patogénesis (Ali et al., 2017; Ch'ng et al., 2019; Gomes et al., 2008).

Para completar la evaluación de seguridad de los aislados de BAL, los árboles filogenéticos proporcionaron una descripción general de las relaciones evolutivas entre nuestras cepas y otros aislados estrechamente relacionados de diversos orígenes (Baker, 2020). La evolución ecológica de las diferentes especies de BAL nos ayuda a comprender su origen y ha recibido una atención creciente en los últimos años (Duar et al., 2017; Zheng et al., 2015). Utilizando los términos propuestos previamente por algunos autores (Martino et al., 2016), se ha considerado que las especies *L. plantarum* y *L. paracasei* han evolucionado desde tener un comportamiento de «vida libre» asociado fundamentalmente al medio ambiente y a las plantas, a considerarse dos especies «nómadas», que pueden ser encontradas en diversos nichos ecológicos (Duar et al., 2017; Martino et al., 2016). Nuestros aislados de jabalí están relacionados

principalmente con alimentos fermentados y productos lácteos, respectivamente. Por el contrario, *L. salivarius* es una especie que está mejor adaptada a sus hospedadores vertebrados (Duar et al., 2017) y esto se evidencia en nuestras cepas, que están relacionadas con aislamientos de animales sanos. En cualquier caso, nuestros aislados de lactobacilos están estrechamente relacionados con otras cepas ampliamente utilizadas como probióticos de diferentes fuentes (Ai et al., 2011; Choi y Chang, 2015; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2019). Nuestros dos aislados de pediococcus se encuentran en dos grupos diferentes en el árbol filogenético, lo que sugiere diferentes orígenes evolutivos para ellos. Ambos aislamientos están relacionados con cepas alimentarias, sin embargo, C5 muestra la mayor similitud con *P. acidilactici* de la American Type Culture Collection ATCC® 8042™, cuyas propiedades como probióticos se han descrito ampliamente (Cho et al., 2019; Halim et al., 2017; Sandoval-Mosqueda et al., 2019); y *P. acidilactici* R91 se encuentra en el mismo grupo que las cepas de ganadería, pero ninguna de ellas está relacionada con procesos patológicos. Por el contrario, aunque los enterococos también tienen diferentes orígenes en la naturaleza, incluidos el tracto intestinal humano y animal, el medio ambiente y los alimentos, algunas especies aisladas de casos clínicos tienen potencial para causar infecciones (Akter et al., 2020; Hanchi et al., 2018). De hecho, los aislados de enterococos A1 y R8 están muy cerca de varias cepas patógenas aisladas de humanos y animales (Akter et al., 2020). Tanto *E. faecalis* A1 como R8 son similares entre ellos y, curiosamente, están muy próximos filogenéticamente a la cepa CVM N48037F de *E. faecalis* aislada de un jabalí.

En virtud de todo lo anterior, podemos afirmar que, prácticamente todos los lactobacilos y pediococos se consideran seguros para su uso como probióticos, en contraste con los enterococos que pueden representar un riesgo potencial para la salud humana o animal. Además, dado el origen de las muestras, que fue descrito en el capítulo I de esta tesis doctoral, parece que las cepas que son inocuas están relacionadas con un mejor estado de salud en los animales de las fincas de estudio y los enterococos, relacionados con patógenos, se aislaron de animales adaptados a vivir en un ambiente más hostil. Esto nos lleva a pensar que, con una simple toma de muestras y procesamiento microbiológico básico podría ser posible predecir y monitorear el estado de salud y el medio ambiente de los animales, examinando su perfil de BAL comensales

ingulados

más abundante. No obstante, sería necesario confirmar esta cuestión con pruebas de campo e implementar este proceso de selección monitorizando otros parámetros, incluida la presencia de patógenos bacterianos y virales, para establecer buenos indicadores de salud. Además, en un estudio más avanzado con secuenciación completa del genoma y procesamiento bioinformático, se podrían determinar sus marcadores genómicos y sus relaciones filogenéticas para poder obtener más información sobre el origen de los aislados, lo que pone de manifiesto la importancia de la bioinformática para el manejo de poblaciones de fauna salvaje y medio ambiente, un campo totalmente inexplorado hasta la fecha.

El primer cribado antimicrobiano de los aislados se realizó enfrentando las BAL a las bacterias *M. smegmatis* y *M. luteus*, lo que permitió realizar una selección de cepas con potencial actividad antibacteriana. *M. smegmatis* ha demostrado su utilidad como indicador para la detección del efecto antimicobacteriano, como se demostró en el capítulo I y en otro estudio (Stedman et al., 2020), y *M. luteus* es útil para detectar posibles BAL productoras de bacteriocinas, ya que es susceptible a la mayoría de los péptidos modificados postraduccionalmente (Stedman et al., 2020). Con el fin de determinar el potencial de las BAL como probióticos para el control de enfermedades infecciosas en fauna salvaje, se seleccionaron tres patógenos diferentes del jabalí como indicadores de la actividad antimicrobiana.

Se utilizaron dos bacterias Gram- de las cuales una cepa de *E. coli* patógena se seleccionó como indicador representativo de procesos digestivos infecciosos en estos animales (Navarro-Gonzalez et al., 2015) y un aislado de *P. multocida* serotipo B, aislado de un caso clínico en jabalí (Risco et al., 2013), se utilizó como indicador de procesos respiratorios. Las dos cepas de *E. faecalis* muestran una fuerte actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y ambas contienen grupos de genes implicados en la biosíntesis de sactipéptidos, un grupo de bacteriocinas modificadas postraduccionalmente caracterizadas por la presencia de enlaces entre el azufre de las cisteínas y el carbono alfa de otros residuos (Dunbar et al., 2017). Además, el aislado *E. faecalis* A1 y *E. casseliflavus* R95 portan genes que codifican un lantipéptido, otra bacteriocina modificada mediante enlaces tioéter postraduccionales (Repka et al., 2017). Las

bacteriocinas de los enterococos han demostrado ser activas contra un amplio espectro de bacterias Gram-, incluida la *E. coli*, por lo que la actividad específica de estos aislados podría deberse a la producción de estas bacteriocinas, dado que estas dos cepas tenían menos capacidad de producir otros metabolitos antimicrobianos, como se explicó en el capítulo I. En todo caso, se debe explorar la utilización potencial de los aislados de *E. faecalis* productores de bacteriocinas con actividad antimicrobiana probada contra *E. coli* como una posible opción para controlar los brotes de esta infección en animales salvajes y domésticos. Sin embargo, es importante resaltar que estas dos cepas contienen determinantes de resistencia y factores de virulencia y no pueden utilizarse en productos probióticos que contengan bacterias vivas (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021). Una posibilidad que puede ser explorada en un futuro es la purificación de las bacteriocinas y su administración como biofármacos, una vez que se proporcionen evidencias de su actividad y se realicen los ensayos de seguridad y toxicidad que requiera la normativa.

Por otro lado, se encontró una actividad extracelular considerablemente potente a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las dos cepas de *L. salivarius* frente a *P. multocida* serotipo B. Los aislados de *L. salivarius* producen dos tipos de bacteriocinas, tanto de clase II d como numerosas bacteriolisinas de clase III, y diferentes tipos de metabolitos con actividad antimicrobiana como lactato, acetato, etanol, H₂O₂ y CO₂ debido al metabolismo heterofermentativo de estas especies, que ya se explicaron en el capítulo I. Además, el posible efecto sinérgico entre estos metabolitos y el pH se explicó anteriormente y será estudiado en mayor profundidad en capítulos posteriores de esta tesis doctoral. Estudios previos describieron bacteriocinas con efecto inhibitorio sobre Pasteurellaceae (Bizani y Brandelli, 2002; Desriac et al., 2010; Sugita et al., 1997). Además, un estudio publicó una cepa de *L. amylovorus*, una especie filogenéticamente cercana a *L. salivarius* (Duar et al., 2017), con una fuerte actividad contra especies de la familia Pasteurellaceae que podría explicarse por la producción de enterolisina A (Amat et al., 2019), una bacteriocina de clase III que también ha sido encontrada en nuestros aislados.

Para completar el perfil antimicrobiano, se seleccionó la bacteria Gram+ *Listeria monocytogenes*, que puede causar septicemia y procesos reproductivos en cerdos y también ha sido aislada en jabalíes (Weindl et al., 2016; Yoshida et al., 2000). No es sorprendente que la única cepa que mostraba inhibición el aislado de *P. acidilactici* R91, puesto que su genoma reveló que esta bacteria tiene la capacidad de producir pediocina, una bacteriocina de clase IIa muy conocida por tener un efecto anti-listerial que se ha utilizado ampliamente como conservante de alimentos (Amado et al., 2016; Bédard et al., 2018).

Es bien sabido que las BAL que forman parte de la microbiota interactúan con las células inmunitarias del hospedador y juegan un papel importante en el desarrollo de un sistema inmunitario adecuado (Hevia et al., 2015). Sin embargo, se necesita más información acerca de las moléculas y los mecanismos involucrados en esta interacción. La última parte del estudio de caracterización probiótica de los aislados de jabalí, se centra en la determinación de sus propiedades inmunomoduladoras, para lo cual se utilizó un modelo monocítico de sangre porcina, adaptado de un estudio previo que demostró ser útil para este propósito (Stedman et al., 2020).

Se encontró un perfil de activación de las dos rutas de señalización inmunitaria testadas que fue especialmente relevante en los lactobacilos y resultó ser específico de las diferentes especies bacterianas de este estudio. Mientras que los aislados de *L. salivarius* mostraron una gran capacidad para inducir la activación de NF- κ B, la vía del interferón IFN-I fue principalmente activada en presencia de *L. plantarum* y *L. paracasei*. Es importante, además, que perfil fagocítico de los lactobacilos se correlacionó positivamente con esta capacidad para activar respuestas inmunitarias innatas protectoras en los macrófagos, lo que concuerda con la importancia de que se produzca la fagocitosis bacteriana para la activación de mediadores proinflamatorios, mediante estas dos rutas mencionadas (Aderem, 2003; Kaufmann y Dorhoi, 2016). En este sentido, se encontraron en los genomas de *L. plantarum* y *L. paracasei* dos adhesinas (*cna* y *sraP*) asociadas a la internalización por los fagocitos que podrían tener un papel relevante (Foster et al., 2014). Sin embargo, no se encontraron determinantes genéticos que expliquen la internalización de los aislados de *L. salivarius*, aunque la ausencia de

moléculas asociadas a la evasión podría ser suficiente para explicar la fagocitosis en estos aislados. Los pediococos mostraron cierta resistencia a la fagocitosis y una menor activación de las vías, lo que podría explicarse por la presencia de un probable polisacárido capsular en su genoma (*ywqC*), que facilitaría la evasión del sistema inmunitario del hospedador (Mijakovic et al., 2003).

Los fagocitos del sistema inmunitario del hospedador discriminan entre bacterias residentes y patógenas a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los TLR o NLR, que reconocen ligandos microbianos conocidos como MAMP (Hevia et al., 2015; Ren et al., 2016). Los MAMP incluyen una amplia variedad de metabolitos microbianos y moléculas estructurales como EPS, lipoproteínas de membrana, ácidos lipoteicoicos y teicoicos (LTA y WTA respectivamente), pili y fimbrias, entre otros (Hevia et al., 2015; Stedman et al., 2020), que han sido encontrados en todos los aislados de este estudio. Los componentes de la pared celular se encontraron en todos los aislados como LTA (*Ita*, *ItaS1_2*, *ItaS1_3*), WTA (*tagGH*, *D-Ala*), lipoproteínas de membrana (*TmpC*, *lolD*), además del peptidoglicano presente en todas las bacterias Gram+ (Hevia et al., 2015; Ren et al., 2016). Además, cabe destacar que dos aislados de *L. plantarum* poseen genes asociados a la producción de EPS, que recientemente ha sido asociado a la inmunomodulación mediada por TLR2 y TLR4 en esta especie (Barragán et al., 2020); y *L. paracasei* posee una lipoproteína de membrana (*lolD*) que también podría estar involucrada en la activación vía TLR2 (Hutchings et al., 2009). Además, en este aislado se encontró el gen que codifica para lactocepina (*PrtP*), una enzima que contribuye a su efecto inmunomodulador degradando citoquinas proinflamatorias (Hevia et al., 2015; Hörmannspurger et al., 2013). Las proteínas ricas en serina-treonina (*STp*) que han sido encontradas en los pediococos parecen estar involucradas en procesos de agregación bacteriana y en la modulación de las células dendríticas y hasta ahora solo se habían descrito en lactobacilos y bifidobacterias (Hevia et al., 2015). Por otro lado, las bacteriocinas, que también son secretadas, pueden contribuir a los efectos inmunomoduladores actuando sobre las células mononucleares de sangre periférica, como los monocitos, y también sobre las células dendríticas (Hegarty et al., 2016).

Los aislados que mostraron una estimulación de la ruta del interferón poseen los factores de adhesión que favorecerían la fagocitosis y la internalización necesaria para esta vía de señalización, con la subsecuente activación de sensores citosólicos o TLR endosomales, como ha sido propuesto en otros estudios previos (Kawashima et al., 2013; Negishi et al., 2012; Stedman et al., 2020), aunque se necesitaría investigar en profundidad estos mecanismos. No obstante, estos aislados podrían ser buenos candidatos para estimular la respuesta inmunitaria eficaz frente a patógenos virales, puesto que se ha comprobado que la activación de esta ruta sensibiliza las células del hospedador a la apoptosis, eliminando de esta forma el nicho del patógeno intracelular (Kawashima et al., 2013; Koyama et al., 2008). Este hecho es muy importante no solo para el control de enfermedades provocadas por virus en poblaciones animales, sino también para el desarrollo de inmunoadyuvantes de vacunas frente a infecciones por agentes virales (Lebedeva et al., 2018).

Los aislados de *L. salivarius*, que mostraron una especificidad muy elevada tanto antimicrobiana, frente a *P. multocida*, como inmunomoduladora, activando respuestas proinflamatorias mediadas por TLR2 que activarían NF- κ B, que es una ruta fundamental en la lucha frente a enfermedades bacterianas. Por esto, podrían ser utilizados como probióticos para el control de la pasterelosis, que es especialmente importante en animales de producción. De los dos aislados, el que realmente merecería la pena explotar sería el C12, puesto que carece de resistencias antimicrobianas genotípicas. Además, el estudio filogenético reveló que esta especie se encuentra muy adaptada a su hospedador, al contrario que las demás que han sido encontradas en orígenes muy diversos. Esto favorecería su utilización como probióticos, puesto que la colonización sería más eficiente y tendría mayor influencia sobre la fisiología del hospedador (Duar et al., 2017).

Los enterococos no activaron ninguna de las dos vías estudiadas ni interaccionaron con los fagocitos, pese a poseer varios MAMP. Esto puede ser debido a los determinantes que poseen para evadir la respuesta inmunitaria y también a que el hospedador no reconozca estas bacterias como comensales sino como potencialmente patógenas, debido a los marcadores de virulencia que han sido detallados anteriormente y a que el

estudio filogenético reveló una gran diversidad en el origen de las cepas similares. No obstante, dado el potencial antimicrobiano de los aislados, habría que estudiar en profundidad si el origen de esta actividad encontrada está en las bacteriocinas detectadas, para diseñar estrategias de purificación y producción de estas, sin necesidad de utilizar las bacterias vivas, dado su potencial para transferir genes de resistencia y causar enfermedad en los hospedadores. Algunas de estas estrategias incluyen el cultivo de fermentación de las bacterias en sus condiciones óptimas y la purificación mediante ultracentrifugación, cromatografía, precipitación o mediante la producción de recombinantes (Garsa et al., 2014; Van Zyl et al., 2019).

Los pediococos mostraron una respuesta inmunomoduladora más limitada, pero nada desdeñable en el caso de *P. acidilactici* C5, que pareció activar NF- κ B y también mostró algunos ligandos MAMP, aunque tuvo mucha menos influencia sobre la capacidad fagocítica. No obstante, el mayor potencial lo encontramos en el aislado R91, un potencial productor de pediocina, que es una bacteriocina muy importante como conservante para controlar las listeriosis alimentarias (Amado et al., 2016; Bédard et al., 2018) y cuyo uso en sanidad animal está todavía por explorar.

Es muy relevante que la especificidad mostrada por las especies, tanto antimicrobiana como inmunomoduladora, nos deja una colección de aislados bacterianos que cumplen con los requisitos para ser utilizadas en fórmulas funcionales con compuestos bioactivos y que pueden explotarse para aportar soluciones a problemas sanitarios en diferentes poblaciones animales, tanto domésticas como salvajes.

LAB

CAPÍTULO III

Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de sinergia con antibióticos



INTRODUCCIÓN

Etapas del crecimiento microbiano

Las bacterias ácido-lácticas y otros microorganismos beneficiosos tienen capacidad ejercer un efecto inhibitorio para antagonizar a otros microorganismos con los que comparten nicho ecológico, tanto comensales como patógenos. El efecto antimicrobiano primario se debe a mecanismos de competencia por los nutrientes del nicho, pero también puede ser debido a la producción de sustancias inhibitorias producto de su metabolismo, lo que conlleva importantes ventajas tecnológicas (Cotter et al., 2005; Papagianni, 2012; Pessione, 2012).

El crecimiento bacteriano se representa de forma gráfica mediante una curva cuyos tramos definen las diferentes fases del crecimiento en las poblaciones bacterianas. La primera fase se denomina de «latencia» y es un periodo de transición previo al inicio del crecimiento, cuando la bacteria es inoculada en el medio de cultivo. A esta fase le sigue una etapa de «crecimiento exponencial» o «fase logarítmica» en el que la velocidad de crecimiento es máxima hasta que alcanzan la «fase estacionaria», en la que cesa el crecimiento bien por agotamiento de nutrientes o por acumulación de productos tóxicos. La etapa final se conoce como «fase de muerte» porque empieza a disminuir rápidamente el número de células viables (Madigan et al., 2003). La duración de cada una de las fases depende de algunos parámetros como temperatura, tiempo, pH... y de la concentración de determinados nutrientes, y puede variar entre cepas bacterianas, incluso de la misma especie (Bárcena et al., 1998; Todorov y Dicks, 2006). Además, la producción de metabolitos es variable entre las diferentes fases, por lo que, a nivel industrial, es muy importante determinar en qué fases del crecimiento se produce la mayor parte de la actividad antimicrobiana y en qué condiciones de cultivo, de cara a optimizar la producción de moléculas antimicrobianas.

Fracciones antimicrobianas de las bacterias ácido-lácticas

Los componentes antimicrobianos de las BAL pueden ser clasificados en función de su masa molecular, así, pueden ser moléculas de bajo peso molecular como los metabolitos de la fermentación liberados al medio por cualquiera de las dos vías glucolíticas principales: EMP y PKP. Las BAL homofermentativas convierten las hexosas en ácido láctico mediante la ruta EMP, mientras que las heterofermentativas además de generar ácido láctico también producen cantidades significantes de ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂) mediante la ruta PKP (Papagianni, 2012). Todas estas moléculas que se han descrito, así como otros componentes de bajo peso molecular como los metabolitos del oxígeno, por ejemplo peróxido de hidrógeno, radicales libres y anión superóxido (Vásquez et al., 2009), pueden ejercer una actividad antimicrobiana en mayor o menor medida.

Por otro lado, las BAL secretan otro tipo de componentes de alto peso molecular que son principalmente moléculas de naturaleza proteica y que se conocen con el nombre de «bacteriocinas» cuando son secretadas por bacterias Gram-positivas, como el caso que nos ocupa (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Meade et al., 2020). Esta fracción proteica, que es secretada por las bacterias al medio extracelular, es la que tiene mayor interés industrial, por su estabilidad y mayores aplicaciones en sanidad animal y es uno de los mecanismos antimicrobianos naturales más antiguos que se conocen (Cotter et al., 2005). Las bacteriocinas se sintetizan en el ribosoma, pueden tener o no modificaciones postraduccionales y tienen modos de acción y espectro antimicrobiano variable entre las diferentes clases, como se vio en el capítulo anterior.

Efecto sinérgico de los agentes antimicrobianos: combinación de bacteriocinas y antibióticos

Las interacciones de carácter farmacodinámico de tipo funcional entre diferentes compuestos con actividad antimicrobiana se producen cuando se origina un aumento cuantitativo de la acción farmacológica por la acción simultánea de dos agentes, en este

caso, antimicrobianos. Estas interacciones pueden ser de tipo aditivas o de potenciación. Las de tipo aditivas son sumatorias y se producen cuando al efecto terapéutico de un agente se añade el efecto terapéutico de otro, y ocurre generalmente cuando ambos agentes actúan sobre el mismo receptor o tienen el mismo mecanismo de acción. Las interacciones de potenciación son las sinergias propiamente dichas, y se producen cuando el efecto combinado de ambas es mayor al efecto de estos utilizados de forma individual (Blumenthal y Garrison, 2011).

Las bacteriocinas de clase I y II, como se ha visto, tienen un mecanismo de acción muy parecido, que consiste en la formación de poros en la pared celular bacteriana y la disipación de la fuerza motriz de protones, aunque existen particulares en cada clase. Las bacteriolisinas actúan degradando la pared celular bacteriana, mientras que los mecanismos del resto de bacteriocinas de clase III necesitan ser investigados en mayor profundidad, especialmente los de tipo no lítico (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Se ha comprobado que la utilización conjunta de bacteriocinas de diferente clase potencia el efecto antimicrobiano original y amplía su espectro de inhibición frente a un mayor número de patógenos (Soltani et al., 2021). Asimismo, se ha comprobado que el ácido láctico permeabiliza la pared celular favoreciendo también la acción de las bacteriocinas y otros metabolitos antimicrobianos (Alakomi et al., 2000). Por otro lado, la acidificación del pH favorece la acción de las bacteriocinas y además dificulta el desarrollo de un gran número de microorganismos y, por el contrario, favorece el crecimiento de las BAL, que son ácido-tolerantes (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2016; Vásquez et al., 2009). Por todo esto, la acción conjunta de todos los componentes antimicrobianos secretados por las BAL es fundamental para el desarrollo de una actividad antimicrobiana efectiva.

Las bacteriocinas se han utilizado tradicionalmente para el control de la contaminación de los alimentos pero su utilización como agente terapéutico en medicina humana o animal actualmente es limitada debido a su baja biodisponibilidad (Ng et al., 2020; Soltani et al., 2021). Aunque las bacteriocinas por sí mismas se han propuesto como alternativa terapéutica para el tratamiento de diversas infecciones en función de su mecanismo de acción, una opción mucho más eficiente que está cobrando cada vez más relevancia en la actualidad, es utilizarlas en combinación con la terapia antibiótica

(Meade et al., 2020; Ng et al., 2020). La combinación entre determinadas bacteriocinas y los antibióticos, con los que puedan actuar de forma sinérgica, puede contribuir al tratamiento de la infección potenciando su efecto antimicrobiano y también puede prevenir el desarrollo de resistencias antimicrobianas si se consigue el mismo efecto terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).

El objetivo de la terapia antibiótica es eliminar el agente infeccioso del organismo mediante la administración de una cantidad óptima del agente antimicrobiano que supere y mantenga durante un tiempo adecuado una concentración mínima capaz de inhibir al microorganismo patógeno en el lugar de la infección (Bravo, 2019). La resistencia de un microorganismo a un antibiótico al que originalmente era vulnerable ocasiona que la terapia antibiótica se vuelva ineficaz, por lo que las infecciones persisten y se incrementa el riesgo de propagación de los agentes infecciosos. A este fenómeno se le conoce con el nombre de «resistencia antimicrobiana». La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos es una de las mayores preocupaciones en materia de salud a nivel global, puesto que supone una seria amenaza para la Salud Pública mundial. Este fenómeno, unido al hecho de que el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos o antimicrobianos de nueva generación en la actualidad es muy limitado, pone de manifiesto la necesidad para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el control de enfermedades infecciosas (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Mathur et al., 2017).

Los **objetivos** de este capítulo III son:

- Optimizar la producción de moléculas antimicrobianas en una selección de BAL descritas en los capítulos anteriores.
- Determinar la naturaleza de la fracción del sobrenadante con mayor potencial antimicrobiano.
- Estudiar la sinergia *in vitro* de los metabolitos producidos por las BAL y una selección de antibióticos importantes en medicina veterinaria frente a los patógenos indicadores *P. multocida* y *E. coli*.

MÉTODO

1. Optimización de la producción de moléculas antimicrobianas y obtención de sobrenadantes

Para valorar las condiciones de cultivo óptimas para las bacterias, se realizó un estudio de cinética microbiana. Se realizaron fermentaciones controladas a 37 °C y se tomaron muestras a tiempo 24 h, 48 h y 72 h. Estas muestras fueron diluidas en serie y sembradas en MRS para calcular las ufc/mL y se midió la absorbancia a 600 nm mediante un espectrofotómetro (Lan Optics® V-1100).

La monitorización de la producción de metabolitos antimicrobianos se realizó mediante ensayos de actividad iguales a los descritos previamente en el capítulo II y que fueron diferentes para cada BAL, en función de su espectro antimicrobiano. Para *L. plantarum* EML1 y *L. casei* SA5 se eligió como patógeno indicador la bacteria *E. coli*, se realizó la técnica del cocultivo inoculando diferentes proporciones de las BAL y el patógeno en el medio TSB e incubando a 37 °C durante 24 h y se expresaron los resultados como porcentaje de inhibición. Para el ensayo de la bacteria *L. salivarius* C12 se obtuvieron los sobrenadantes libres de células microbianas mediante centrifugación a 5000 r.p.m durante 10 min y posterior filtrado mediante un filtro estéril millipore (Branchia) para jeringa de 0,22 µm y se realizaron diluciones en serie 1:2 en una placa de 96 pocillos con medio MH. Se inoculó la bacteria patógena *P. multocida* con los correspondientes controles y, tras una incubación a 37 °C durante 24 h, se calcularon las Unidades Arbitrarias por mL (UA).

2. Determinación de la naturaleza de la actividad antimicrobiana

Nuestros estudios previos demostraron que la actividad de los sobrenadantes se debe a la presencia de metabolitos liberados durante el proceso de fermentación que ejercen un efecto sinérgico con el pH, siendo más activos a pH ácido. Para comenzar a

caracterizar las fracciones que puedan tener una mayor importancia sobre la actividad total, se realizaron diversos tratamientos de los sobrenadantes, seguido de nuevos ensayos de actividad para determinar, fundamentalmente, la importancia de las moléculas de naturaleza proteica. Los tratamientos realizados se describen a continuación.

Tratamiento enzimático de los sobrenadantes

La enzima DNasa degrada los fragmentos de ADN que hayan podido ser liberados al medio durante la lisis bacteriana. Se añadió DNasa a los sobrenadantes a una concentración final de 0,5 mg/mL y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente.

Las enzimas pronasa, tripsina y proteinasa K son tres enzimas proteolíticas que degradan las proteínas, por lo que objetivo de este tratamiento es eliminar las proteínas del sobrenadante. Se añadieron las enzimas de forma independiente a los sobrenadantes a una concentración final de 0,1 mg/mL para la proteinasa K y a 1 mg/mL para la pronasa y la tripsina. Se añadió la misma concentración de enzimas al mismo volumen de medio MRS como control negativo y se dejaron incubar las muestras problema, el control negativo y un control del sobrenadante sin proteinasa durante 1 h a 56 °C para la proteinasa K y 1 h a temperatura ambiente para las otras dos enzimas. En el caso de la proteinasa K se realizó por duplicado y la mitad de los sobrenadantes se trató a 95 °C durante 15' para desnaturalizar la proteinasa, incluidos los controles negativos, por si el efecto de la incubación a temperatura alta o la propia proteinasa pudiese afectar a la actividad de los sobrenadantes.

Tratamiento de los sobrenadantes con diferentes temperaturas

Se trataron los sobrenadantes a diferentes temperaturas por varios motivos. Por un lado, los tratamientos con calor son importantes durante el proceso de fermentación y, especialmente, para el proceso de inactivación de células vivas para la obtención de productos posbióticos. Por otro lado, algunos grupos de bacteriocinas son

termoestables, mientras que otros son termolábiles, por lo que la información sobre la actividad de los sobrenadantes en función de la temperatura también nos aporta información sobre la contribución de este tipo de bacteriocinas a la actividad.

Se incubó 1 mL de cada sobrenadante a diferentes temperaturas: 40, 70, 80 y 90 °C durante 10 min en un termobloque (Analog heatblock, VWR) y para los controles negativos se incubó 1 mL de MRS a las diferentes temperaturas. Se realizó la incubación por duplicado, incluidos los controles y, una vez transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes se dejaron enfriar de forma progresiva a temperatura ambiente.

Tratamiento de los sobrenadantes con tricloroacético

El objetivo de este tratamiento es lograr la precipitación ácida de las proteínas mediante la adición de tricloroacético (TCA) para separar y concentrar la fracción proteica, sin degradarla. Se añadió TCA a una concentración final del 20 % a los sobrenadantes y al medio MRS como control negativo y se incubaron durante 10 min a 4 °C. Se centrifugaron las muestras y el control a 14.000 r.p.m. durante 5 min, se lavó dos veces el pellet con 200 µL de acetona fría (-20 °C) y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. Se incubó el pellet en un termobloque a 95 °C durante 10' para evaporar la acetona y se resuspendió el pellet seco en 1mL de caldo MRS. Se midió el pH por si hiciese falta neutralizarlo al mismo pH del sobrenadante original.

Separación de las fracciones de los sobrenadantes por peso molecular

Se separaron diferentes fracciones de los sobrenadantes en función de los pesos moleculares de sus componentes, principalmente proteínas, mediante ultracentrifugación y filtración a través de membranas con diferentes cortes de peso molecular. Se utilizaron filtros de 50K, de 30K, de 10K y de 3K (Amicon®) y se emplearon consecutivamente de mayor a menor para obtener las diferentes fracciones, filtrando un volumen total de 10 mL de sobrenadante. Se filtraron los primeros 500 µL en los filtros de 50K en una ultracentrífuga (Eppendorf 5424 R) en refrigeración a 4 °C a 14 K g durante 10 min. Se obtuvo el volumen concentrado en el filtro de 50K centrifugando a

1K g durante 2min en refrigeración (>50K) y el volumen filtrado se conservó (<50K) y se filtró con la siguiente membrana en tamaño. Se repitió el procedimiento para los filtros de 30K (10 min 14 K g), de 10 K (20 min 14 K g) y de 3K (50 min-1h 14K g) utilizando siempre los filtrados de la membrana inmediatamente anterior. Los concentrados obtenidos por fracciones fueron >50 K, 30-50 K, 10-30 K y 3-10 K y el último filtrado se conservó como <3 K. Se anotaron todos los volúmenes filtrados y concentrados para realizar las diluciones pertinentes a la hora de hacer el ensayo de actividad.

Todos los sobrenadantes tratados se congelaron a -80 °C con 15 % de glicerol hasta su procesamiento para el ensayo de actividad.

Mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, se realizó un ensayo de actividad de los sobrenadantes tratados frente a la bacteria indicadora *P. multocida* mediante la técnica de microdiluciones y el cálculo de Unidades Arbitrarias por mL (UA). Este procedimiento permite cuantificar la actividad y así poder comparar los diferentes valores numéricos entre los controles positivos (sobrenadantes sin tratar), las muestras problema (los sobrenadantes tratados) y los controles negativos (el medio de cultivo MRS con y sin los tratamientos de los sobrenadantes).

3. Estudio de los metabolitos en sinergia con antibióticos

El objetivo del procedimiento que será descrito a continuación es el de estudiar la sinergia *in vitro* de los metabolitos producidos por las BAL y una selección de antibióticos importantes en medicina veterinaria frente los patógenos indicadores *P. multocida* y *E. coli*. Ambos aislados patógenos han sido aisladas por INGULADOS en sendos casos clínicos a partir de un brote con elevada mortalidad por pasterelosis en un cebadero de cordero y de un brote de colibacilosis en porcino, respectivamente, y ambos mostraron multirresistencia antimicrobiana. Los antibióticos seleccionados fueron amoxicilina, gentamicina, doxicilina y enrofloxacin, por su utilización en medicina veterinaria debido a que tienen un amplio espectro de acción y también porque pueden ser utilizados en ensayos con roedores de experimentación, que será descrito en el capítulo

siguiente. Para ello, se eligió la técnica del Epsilon test o epsilometría (Etest®, bioMérieux), que es una expansión del método tradicional Kirby-Bauer de difusión de discos en agar que permite realizar una lectura directa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero con modificaciones que permitan incluir los compuestos bioactivos producidos por las BAL y se considera un buen método para la detección de sinergia entre compuestos (Mathur et al., 2017). Así, podremos cuantificar cambios en las CMI cuando incluimos los compuestos bioactivos, detectando posibles casos de sinergia.

En primer lugar, se prepararon placas con medio de cultivo Mueller Hinton y Mueller Hinton II (suplementado con 5 % de sangre de oveja) a las que se añadieron concentraciones crecientes de sobrenadantes con los metabolitos producidos por las BAL. Los sobrenadantes libres de células microbianas se obtuvieron, mediante los procedimientos de centrifugación y filtrado descritos anteriormente, a las condiciones óptimas para cada bacteria determinadas a partir de los resultados del procedimiento de optimización, esto es, 37 °C para todos los aislados durante 24 h para *L. plantarum* y 70 h para *L. casei* y *L. salivarius*. Los sobrenadantes se añadieron al medio MH II antes de solidificar cuando su temperatura fue inferior a 40 °C, para no alterar la fracción proteica. Las concentraciones finales en el medio fueron 5 % y 10 %. A partir de cultivos puros de los patógenos, se prepararon suspensiones en solución salina a una turbidez 0,5 en la escala de McFarland y se inocularon mediante un hisopo en las placas de MH para *E. coli* y MH II para *P. multocida*. Los controles negativos para comparar la posible acción sinérgica consistieron en las placas sin sobrenadantes. Para la realización del Etest® se colocaron las tiras de plástico no poroso (bioMérieux), que llevan incluido un gradiente antimicrobiano de 15 diluciones para cada uno de los antibióticos elegidos (amoxicilina, gentamicina, doxicilina y enrofloxacina) y creando, tras su difusión en el agar, un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico que se reflejan como zonas de inhibición elipsoidales y simétricas a lo largo de las tiras, tras la incubación a 37 °C durante 24 h. El valor de CMI se obtuvo a partir del punto de intersección entre el extremo de inhibición y la tira.

Figura resumen del método

01.

Obtención de sobrenadantes.

02.

Optimización de la producción de metabolitos antimicrobianos.

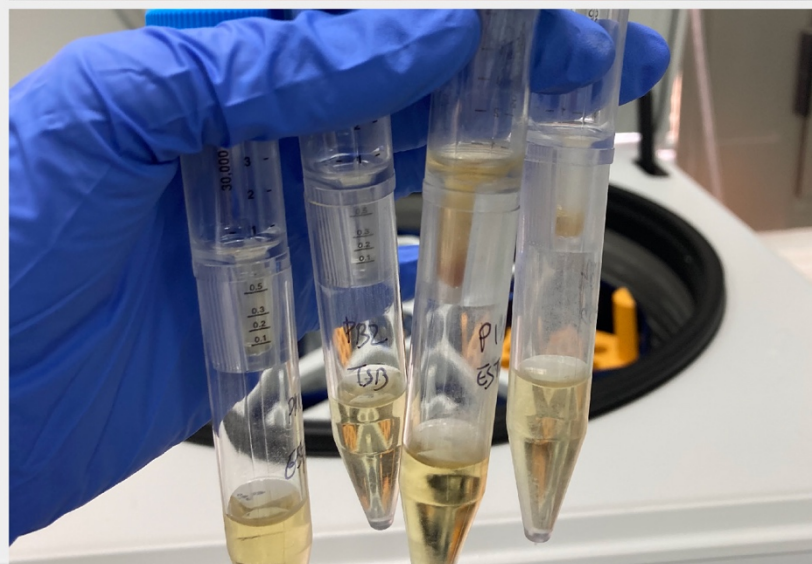
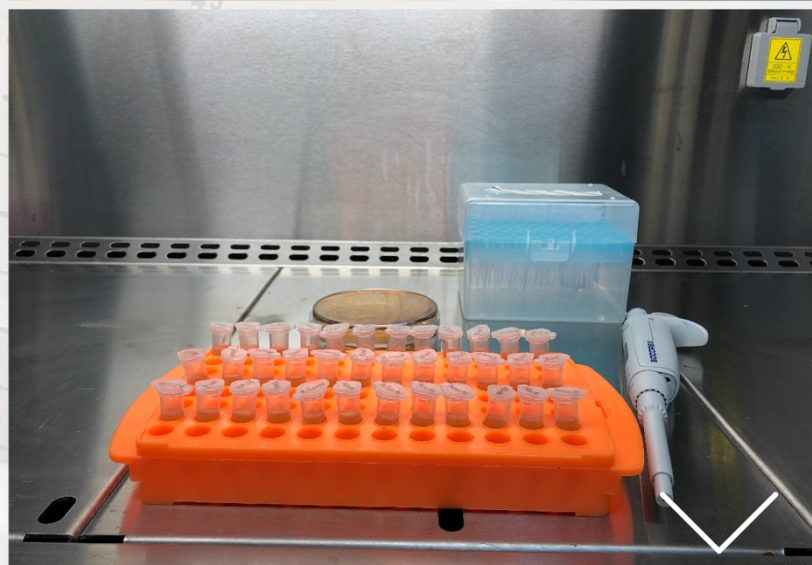
03.

Determinación del origen de la actividad antimicrobiana.

- Tratamiento enzimático de sobrenadantes
- Tratamiento térmico
- Precipitación con tricloroacético
- Separación por peso molecular

04.

Estudios de sinergia con antibióticos.



RESULTADOS

La etapa de crecimiento microbiano en la que se detecta la producción óptima de metabolitos antimicrobianos difiere según la especie

En el caso de *L. plantarum* EML1 y *L. casei* SA5, se decidió utilizar como indicador la bacteria *E. coli* en función de los resultados previos. La actividad máxima (100% de inhibición) se obtuvo con el cocultivo con *L. plantarum* a las 24 h del inicio de la fermentación, cuando la bacteria se encuentra al final de la fase de crecimiento exponencial (Tabla 3.1 y Figura 3.1 y 3.2). En el caso de *L. casei*, su actividad máxima aparece más tarde, a las 72 h después del inicio de la fermentación, durante la fase estacionaria (Tabla 3.1 y Figuras 3.1 y 3.2). En cuanto *L. salivarius* se escogió utilizar como indicador la bacteria *P. multocida* debido también a resultados previos. Como puede observarse en la tabla 3.1, se encontró que la mayor actividad mostrada por esta bacteria se daba a las 72 h después del inicio de la fermentación, cuando la bacteria se encuentra en fase estacionaria, justo después de la fase de crecimiento exponencial, por lo que parece que el crecimiento de esta bacteria es más lento. Además, para todas las bacterias se consiguió incrementar su actividad antimicrobiana con respecto a estudios previos, por lo que se optimizó la producción de metabolitos antimicrobianos.

Tabla 3.1. Resultado de la concentración bacteriana y actividades antimicrobianas para los aislados de BAL seleccionados

	Tiempo (h)	ABS ₆₀₀	Recuentos (ufc/mL)	Actividad antimicrobiana ^a
<i>L. plantarum</i> EML1	0	0,03	1,7·10 ⁶	0 %
	24	6,16	1,51·10 ⁹	100 %
	48	8,11	1,56·10 ⁹	99,97 %
	72	8,6	1,63·10 ⁹	96,67 %
<i>L. casei</i> SA5	0	0,03	1,7·10 ⁶	0 %
	24	6,53	1,37·10 ⁹	65 %
	48	7,16	1,50·10 ⁹	93,5 %
	72	7,82	1,53·10 ⁹	99,87 %
<i>L. salivarius</i> C12	0	0,13	1,29·10 ⁷	0 UA
	24	8,56	1,05·10 ⁹	1600 UA
	48	8,09	1,22·10 ⁹	1600 UA
	72	9,14	1,39·10 ⁹	3200 UA

^aPorcentaje de inhibición de *E. coli* para EML1 y SA5 y Unidades Arbitrarias frente a *P. multocida* para C12.

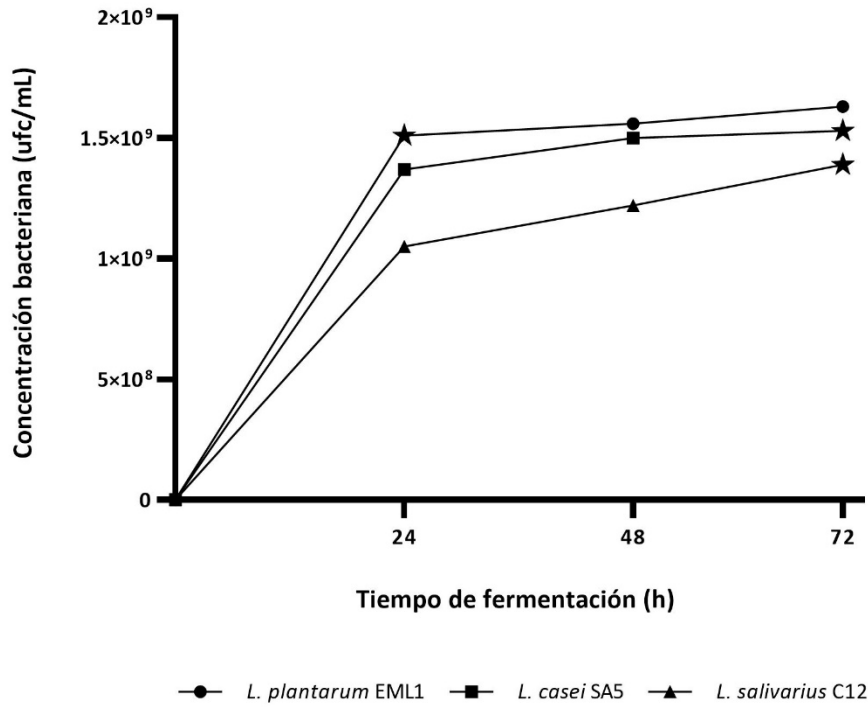


Figura 3.1. Curvas de concentración bacteriana en función del tiempo de fermentación para *L. plantarum* EML1 (círculos), *L. casei* SA5 (cuadrados) y *L. salivarius* C12 (triángulos). Los puntos marcados con estrellas muestran la actividad antimicrobiana máxima, que se detecta al final de la fase exponencial para EML1 y en la fase estacionaria para SA5 y C12.

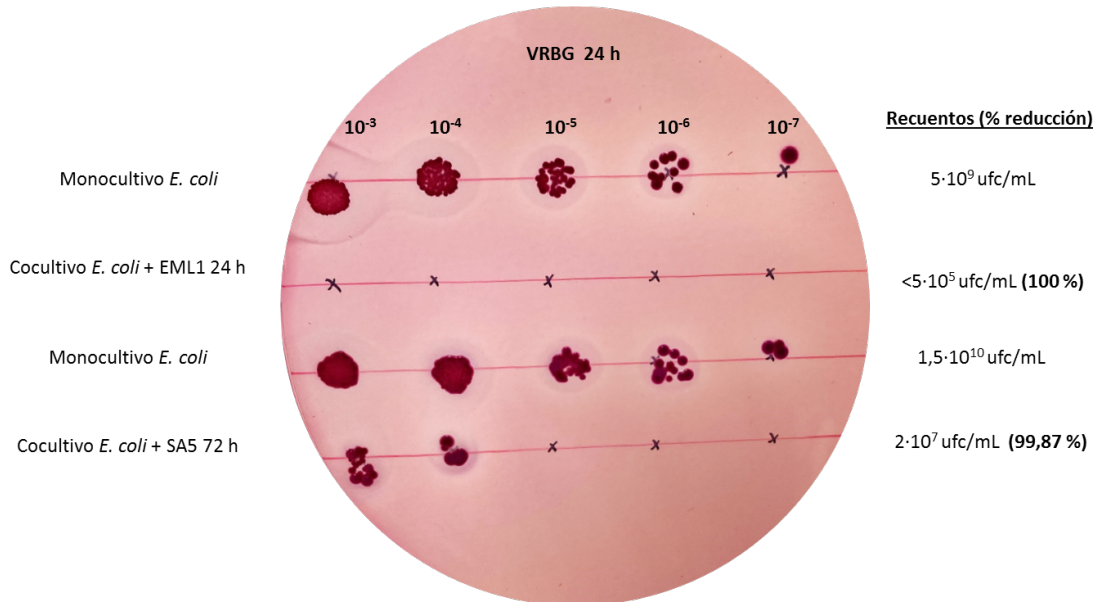
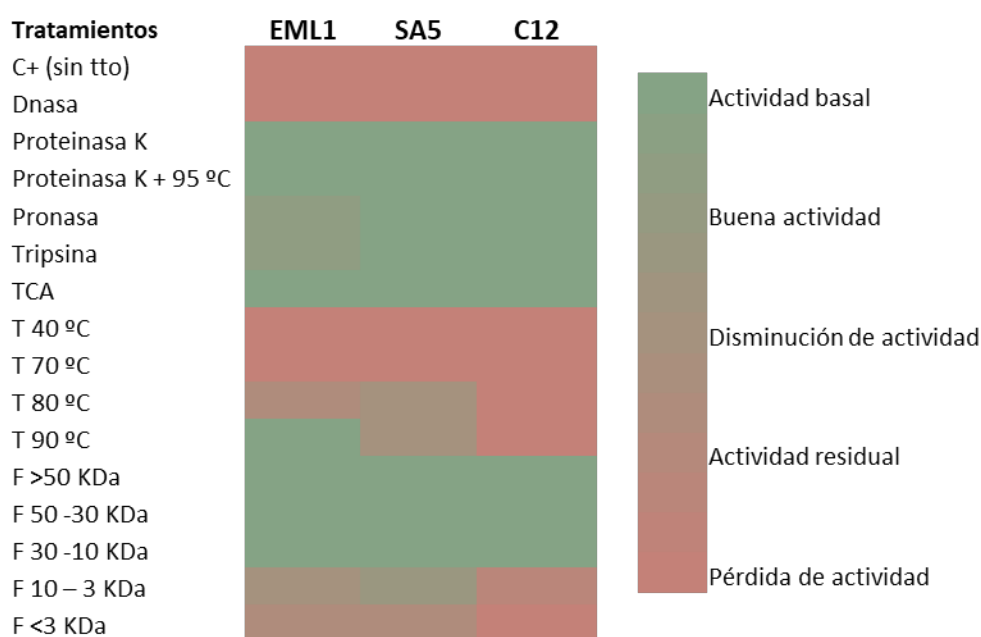


Figura 3.2. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana máxima encontrada para EML1, que representa un porcentaje de inhibición de la bacteria patógena del 100 % con los metabolitos producidos tras 24 h de incubación y de SA5, que es 99,87 %, con los metabolitos antimicrobianos producidos a las 72 h de incubación.

La fracción proteica extracelular contribuye de forma significativa a la actividad antimicrobiana de los cultivos

En la tabla 3.2 se muestran los resultados de forma resumida mediante un gradiente de color que indica si se ha mantenido la actividad antimicrobiana basal, si esta actividad se ha reducido, aunque pueda seguir considerándose como buena o si por el contrario la actividad ha disminuido o incluso ha llegado a desaparecer. Mientras que el tratamiento con DNasa no tuvo ningún efecto sobre la actividad basal de los sobrenadantes, los tratamientos con las enzimas proteolíticas proteinasa K, pronasa y tripsina y la precipitación con tricloroacético ocasionaron una eliminación total de la actividad antimicrobiana. En cuanto a los resultados de los filtrados por pesos moleculares, se obtuvo que las fracciones más pequeñas (F 3 -10 y F < 3 en la tabla) conservan buena parte de la actividad de los sobrenadantes. Por otro lado, en función de los datos obtenidos después de los tratamientos con diferentes temperaturas, observamos que la actividad disminuye a medida que se alcanzan temperaturas altas para EML1 y SA5. Según se muestra en la tabla, para estos dos aislados la actividad se mantiene estable a temperaturas hasta 70 °C y comienza a disminuir a partir de 80 °C, desapareciendo a 90 °C en el caso de *L. plantarum* EML1.

Tabla 3.2. Resultados de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes tratados.



En el caso de *L. salivarius* C12 la actividad se mantiene estable en todo el rango de temperaturas probado (Tabla 3.2) y son las fracciones pequeñas las que muestran la actividad antimicrobiana (Figura 3.3).

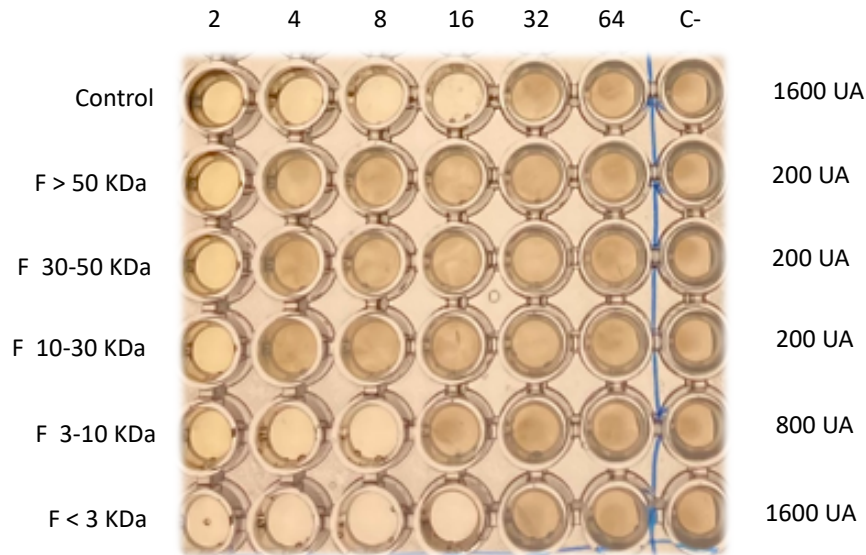


Figura 3.3. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana encontrada para las diferentes fracciones por pesos moleculares de *L. salivarius* C12. Las fracciones más pequeñas (3 -10 KDa y < 3 KDa) conservan buena parte de la actividad basal del sobrenadante completo (control).

Los sobrenadantes de las BAL contienen metabolitos que pueden actuar en sinergia con antibióticos en dos cepas patógenas con multirresistencia antimicrobiana

En la tabla 3.3 se muestran los resultados de las CMI para los dos patógenos indicadores seleccionados del Etest® frente a los antibióticos utilizados de forma aislada y en combinación con los sobrenadantes de las bacterias ácido-lácticas. Los resultados en la tabla se muestran como un gradiente de color, donde el rojo indica que no existió diferencia en la CMI cuando se utilizó en combinación con los sobrenadantes y en verde se muestran las combinaciones en las que existió sinergia, es decir, en las que, al añadir los metabolitos producidos por las bacterias lácticas, la CMI disminuyó.

En el caso de *E. coli* multirresistente, como se observa en la tabla 3.3 y en la figura 3.4, se consiguió inhibición en su crecimiento cuando se combinaron los metabolitos de la bacteria *L. salivarius* C12 y los diferentes antibióticos. La CMI era >256 µg/mL para todos los antimicrobianos, es decir, la bacteria patógena mostraba multirresistencia antibiótica y disminuyó a 0,125 µg/mL para amoxicilina, 16 µg/mL para gentamicina, 2 µg/mL para enrofloxacin y 64 µg/mL para doxamiclina con la adición del sobrenadante. En todos los casos, la bacteria continúa siendo resistente, excepto en el caso de la amoxicilina, que pasó a ser sensible.

En el caso de *P. multocida*, se observó una disminución en la CMI de la doxicilina necesaria para inhibir a la bacteria patógena, del punto de corte equivalente a 4 µg/mL (resistente) a 1 µg/mL (sensible) al combinarlo con los sobrenadantes de todas las bacterias (Figura 3.5). No se detectaron diferencias en el resto de las combinaciones probadas.

Tabla 3.3. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (µg/mL) de los antimicrobianos frente a los patógenos solos y en combinación con los sobrenadantes

	Antimicrobianos				
	Amoxicilina	Gentamicina	Doxiciclina	Enrofloxacin	
Control <i>E. coli</i>	>256	>256	>256	>256	
<i>L. plantarum</i> EML1					
<i>L. casei</i> SA5					
<i>L. salivarius</i> C12					
Control <i>P. multocida</i>	2	2	4	0,125	
<i>L. plantarum</i> EML1					
<i>L. casei</i> SA5					
<i>L. salivarius</i> C12					

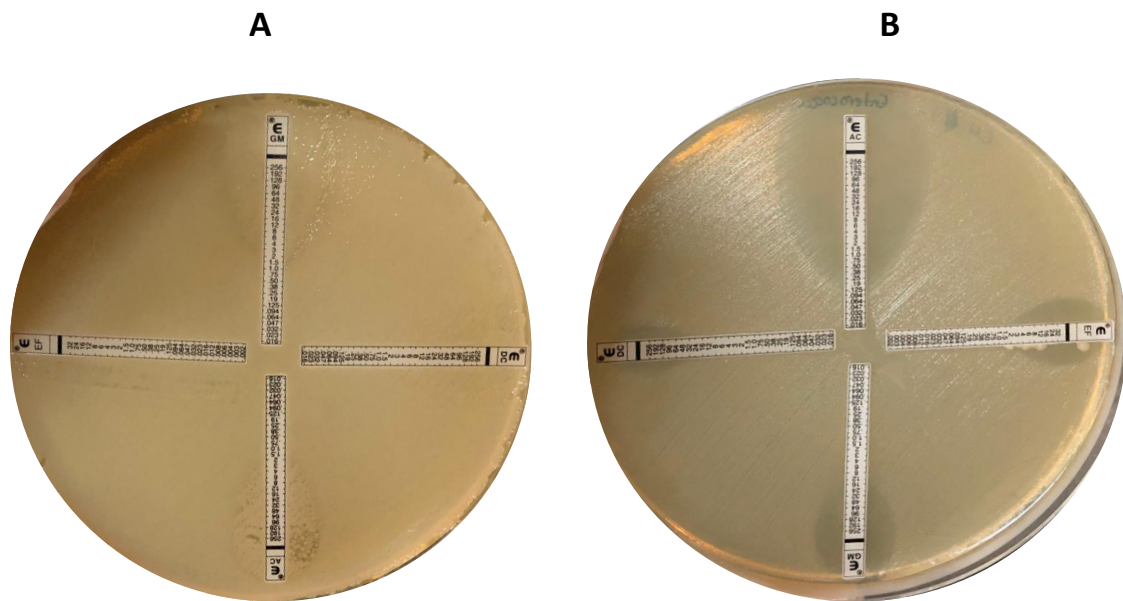


Figura 3.4. Técnica E-test para el patógeno *E. coli* multiresistente en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica *L. salivarius* C12. **(A)** Se observa un crecimiento total del patógeno pese a la colocación de las tiras con antibióticos (>256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y **(B)** la aparición de inhibición del cultivo al añadir el sobrenadante de la bacteria C12, con diferentes puntos de corte para los diferentes antibióticos.

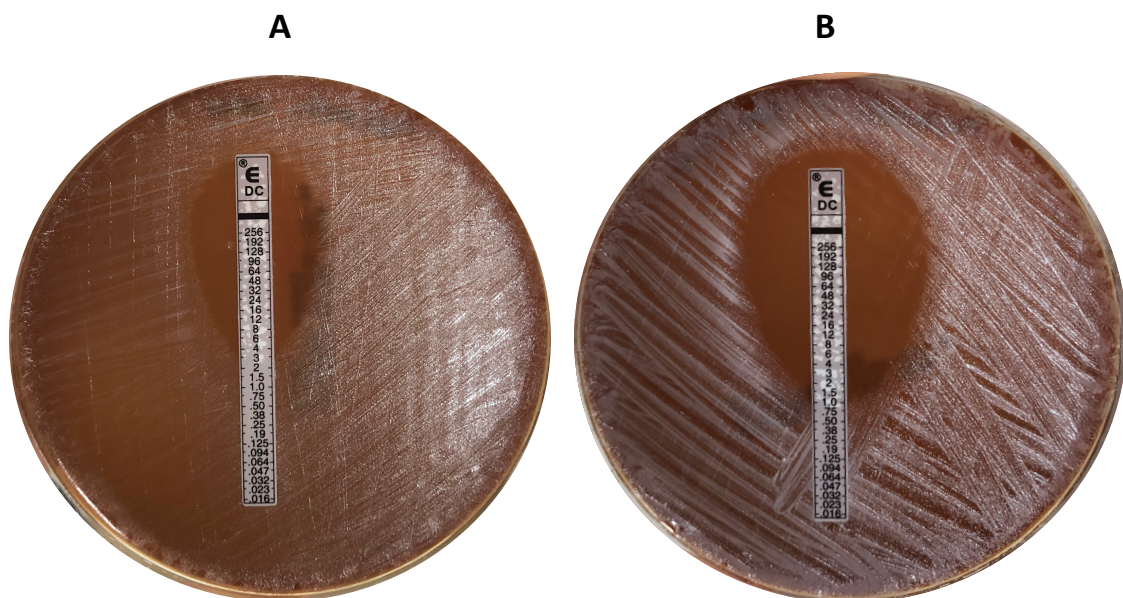


Figura 3.5. Técnica E-test para el patógeno *P. multocida* resistente a tetraciclinas y el antimicrobiano doxiciclina en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica *L. salivarius* C12. Se observa una disminución en el punto de corte equivalente a la CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el control **(A)** a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al añadir el sobrenadante al 10 % **(B)**.

DISCUSIÓN

Debido al metabolismo fermentativo de las BAL su utilización a nivel industrial para la producción de metabolitos inhibidores del crecimiento de patógenos está cada vez cobrando mayor importancia en la actualidad. Por ello, se hace necesario el diseño de estrategias que permitan conocer la naturaleza de esos metabolitos y optimizar su producción. En este trabajo se describen los procedimientos para determinar la naturaleza de los metabolitos antimicrobianos y optimizar su producción en una selección de aislados de BAL descritos en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral.

Como se ha comentado en la introducción, la determinación de la fase de crecimiento microbiano en la que se producen la mayor parte de metabolitos antimicrobianos depende de cada cepa bacteriana y es fundamental para optimizar el proceso tecnológico de elaboración de suplementos con actividad antimicrobiana. En este estudio, se consiguió optimizar la producción de metabolitos antimicrobianos, ya que se obtuvieron valores de actividad antimicrobiana superiores a los arrojados por estudios previos incluidos en esta tesis doctoral, concretamente en el capítulo II. Es muy interesante el hecho de que la actividad antimicrobiana máxima haya sido detectada en diferentes fases del crecimiento microbiano para cada una de las cepas estudiadas, por lo que este método de optimización de la producción de metabolitos antimicrobianos se considera de gran utilidad industrial a la hora de elaborar un suplemento y lograr la máxima eficacia de sus componentes. Algunos otros parámetros que no se han medido en este estudio y que pueden condicionar la actividad antimicrobiana porque favorecen el crecimiento de las cepas bacterianas podrían ser la composición de nutrientes del medio, el pH, la temperatura, la humedad, la concentración de O₂ y CO₂, entre otros (Bárcena et al., 1998; Todorov y Dicks, 2006). Por ello, en futuros estudios se monitorizarán estos parámetros con el objetivo de estandarizar su producción a escala industrial y también de poder abaratar el proceso de producción.

En el caso de *L. plantarum* y *L. casei*, la actividad antimicrobiana máxima frente al patógeno indicador *E. coli* se produce durante la fase de crecimiento exponencial, previo

al inicio de la fase estacionaria, que en este estudio fue a las 24 h después del inicio de la fermentación para la primera cepa y a las 72 h para la segunda, que parece tener un crecimiento más lento. Las curvas de crecimiento microbiano coinciden con estudios previos en otras cepas de estas especies (Al-Otaibi et al., 2016; Barragán et al., 2020; Teneva et al., 2016). La actividad antimicrobiana máxima encontrada coincide con el momento de mayor producción de metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas de clase IIb encontradas en ambos genomas y que fueron descritas en capítulos anteriores (Bárcena et al., 1998; Reenen, 1998; Zacharof y Lovitt, 2012); y con la máxima producción de ácido láctico (Rezvani et al., 2017), que también tiene efecto antimicrobiano frente al patógeno *E. coli* (Teneva et al., 2016). El hecho de que la actividad antimicrobiana de *L. casei* aparezca bastante más tarde puede ser debido a que el pH disminuye de forma más acusada a las 70 h después del inicio de la fermentación, especialmente en esta especie (Al-Otaibi et al., 2016). Además, en el capítulo I ya se comprobó la influencia del pH sobre la actividad antimicrobiana en esta cepa en concreto. Se optimizó la actividad antimicrobiana de estos aislados, debido a que se obtuvo una inhibición de la bacteria patógena, en este caso *E. coli*, del 100 % para *L. plantarum* y de 99,87 % para *L. casei*, correspondiente a una reducción logarítmica de 4,3 y 2,88 respectivamente, superior a la encontrada en trabajos previos de esta tesis doctoral y en estudios de otros autores (Ołdak et al., 2017; Roldán et al., 2011; Teneva et al., 2016). En el caso de *L. salivarius*, ocurre algo similar, se encontró la máxima actividad antimicrobiana frente al patógeno indicador, en este caso *P. multocida*, 72 h después del inicio de la fermentación, cuando la bacteria se encuentra en fase estacionaria, justo después de la fase de crecimiento exponencial, por lo que parece que el crecimiento de esta bacteria es más lento, de acuerdo con algunos estudios en otras cepas de esta especie (Afdora et al., 2010; Sanhueza et al., 2015). En este caso también se incrementó la actividad antimicrobiana con respecto a los estudios previos del capítulo II, en los que los tiempos de fermentación fueron más cortos y menos controlados.

Los tratamientos con enzimas proteolíticas ocasionaron una eliminación total de la actividad antimicrobiana extracelular, lo que concuerda con nuestra hipótesis de que las moléculas de naturaleza proteica contribuyen de forma significativa a la actividad

antimicrobiana de estos aislados (Mirkovic et al., 2015; Saad et al., 2015). Además, si nos fijamos en los resultados de los fraccionamientos por pesos moleculares, podemos observar que las fracciones más pequeñas conservan buena parte de la actividad de los sobrenadantes. Estos filtrados podrían contener péptidos antimicrobianos o bacteriocinas con pesos moleculares menores a 10 kDa, lo que se corresponde con los resultados de la secuenciación de los genomas que se han descrito en los capítulos anteriores. El método de ultracentrifugación utilizado ha sido previamente descrito como uno de los métodos de elección para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas, así como para su separación del resto de componentes y su concentración (Parada et al., 2007). No obstante, deberá combinarse en un futuro con otras técnicas de concentración de proteínas, puesto que, en este estudio, la precipitación ácida con TCA ocasionó una desaparición total de la actividad antimicrobiana. Algunos de los métodos que se han descrito son la precipitación con sales neutras, la diálisis, la cromatografía o la liofilización (Dimitrieva-Moats y Ünlü, 2012; Parada et al., 2007; Xu et al., 2021), pero habría que estudiar en profundidad su rendimiento en péptidos de pequeño tamaño y su factibilidad tecnológica.

En el estudio de termoestabilidad para los aislados EML1 y SA5, se observó que la actividad antimicrobiana fue disminuyendo progresivamente a medida que se fueron alcanzando temperaturas más altas, pero manteniendo una actividad reseñable hasta temperaturas de 90 °C. Esto podría indicar que la actividad antimicrobiana se debe a una combinación de las bacteriocinas de clase II, que son termoestables a temperaturas incluso más altas que las de este estudio (Adesina y Enerijiofi, 2016; Wang et al., 2018) y de clase III, que son termolábiles (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Saad et al., 2015); puesto que observamos una disminución de la actividad, pero no una desaparición total de la misma. Además, las bacteriolisinas, unas bacteriocinas de la clase III, por sí mismas no parecen tener actividad antimicrobiana porque se encontrarían en las fracciones de mayor peso molecular, que carecen de actividad antimicrobiana, como se ha visto anteriormente; y las fracciones pequeñas en las que hipotéticamente estarían las bacteriocinas de clase II, conservan buena parte de la actividad, pero no alcanzan la actividad basal del sobrenadante completo. Los genes que codifican para ambas clases de bacteriocinas fueron descritos en los tres aislados en el capítulo I de esta tesis

doctoral, por lo que estos resultados en su conjunto confirman que la fracción proteica extracelular, en concreto los pequeños péptidos conocidos de forma general como «bacteriocinas», contribuyen de forma significativa a la actividad antimicrobiana de las BAL aisladas y todo parece indicar que actúan de forma sinérgica para lograr la mayor actividad posible. De hecho, se ha demostrado que la utilización de bacteriocinas de diferentes clases, especialmente con mecanismos de acción distintos, incrementa tanto el espectro de actividad como su efecto antimicrobiano y además reduce la probabilidad de desarrollo de resistencias a las bacteriocinas (Soltani et al., 2021; Turgis et al., 2016). En el caso del aislado C12, la actividad antimicrobiana se mantiene estable en todo el rango de temperaturas probado y son las fracciones pequeñas las que conservan buena parte de la actividad (fracción de 3 a 10 KDa) y la totalidad de la actividad (fracción menor de 3 KDa). En este caso la actividad antimicrobiana podría deberse a las bacteriocinas de clase IId cuyos genes se encontraron en el genoma de este aislado y que coincide con los pesos moleculares descritos. En esta bacteria también se encontraron numerosas bacteriolisinas que podrían contribuir a la actividad antimicrobiana de forma sinérgica, como en el caso anterior, pero que por sí mismas no parecen tener actividad, puesto que las fracciones de mayor peso molecular no demostraron inhibición de la bacteria patógena.

Pese a que está muy documentado que las bacteriocinas tienen un efecto antimicrobiano que en ocasiones puede tener un amplio espectro de acción, en la actualidad su uso está limitado a la industria alimentaria (Meade et al., 2020; Ng et al., 2020). Su utilización como fármacos no se contempla en la actualidad debido a que han demostrado tener baja biodisponibilidad, por lo que son necesarias nuevas herramientas terapéuticas para sacar provecho de esta actividad antimicrobiana natural (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Meade et al., 2020; Soltani et al., 2021). Entre estas nuevas opciones terapéuticas destaca su posible utilización en sinergia con la terapia antibiótica, para reducir las dosificaciones de estos contribuyendo así a prevenir el desarrollo de resistencias antibióticas y los efectos secundarios indeseables o secundarios (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Ng et al., 2020). Las bacteriocinas tienen menor espectro de acción que los antibióticos, lo que hace que sean más

selectivas para un patógeno en concreto y más respetuosas con la microbiota (Meade et al., 2020).

En los últimos años está aumentando el número de estudios encaminados a explorar esta nueva opción terapéutica que combina bacteriocinas de diversas clases y antibióticos para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Hanchi et al., 2017; Jabés et al., 2011; Soltani et al., 2021; Turgis et al., 2016). En esta tesis doctoral, se realizó un estudio de sinergia antimicrobiana *in vitro* con una cepa de *E. coli* multiresistente a los antibióticos que presenta una CMI de $>256 \mu\text{g/mL}$ para todos los antimicrobianos seleccionados. Tras la adición del sobrenadante que contiene los metabolitos antimicrobianos de la cepa *L. salivarius* C12, obtenidos bajo sus condiciones óptimas a una concentración del 10 %, la CMI disminuyó para todos los antibióticos. No obstante, solo en el caso de la amoxicilina se considera que el antibiótico podría llegar a tener utilidad clínica tras la adición de los metabolitos antimicrobianos producidos por esta cepa, puesto que el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana considera como punto de corte clínico el valor de CMI inferior a $8 \mu\text{g/mL}$ para este antibiótico (EUCAST, 2021) y el valor obtenido tras la adición de los metabolitos fue de $0,125 \mu\text{g/mL}$. Para todos los demás, pese a que se reduce significativamente el valor de CMI, el punto de corte continúa estando por debajo de los criterios clínicos, por lo que deberán estudiarse nuevas combinaciones. Una posible estrategia podría ser aumentar la concentración del sobrenadante de esta misma bacteria y/o utilizar otro método de determinación de la sinergia que permita ensayar varias dosificaciones a la vez. La realización del procedimiento de determinación de sinergia entre bacteriocinas y antibióticos mediante Etest[®] se considera un método válido para este propósito y se utiliza en la actualidad debido, fundamentalmente, a la rapidez de la técnica y a la facilidad en la lectura de los resultados (Mathur et al., 2017; Orhan et al., 2005). No obstante, existen otros métodos que permiten determinar las cantidades exactas de antibiótico y metabolitos antimicrobianos y además determinan el tipo de sinergia, como la técnica del tablero de ajedrez (LeBel et al., 2013; Mathur et al., 2017). Aunque este método es más costoso y laborioso, se tendrá en cuenta para futuros estudios cuyos objetivos se centren en determinar las dosis mínimas de cada agente antimicrobiano para inhibir el desarrollo de un patógeno en concreto. De forma

similar, en el estudio de evaluación de sinergia frente a *P. multocida*, los sobrenadantes de las tres cepas disminuyeron la CMI para la doxiciclina, de 4 a 1 µg/mL, siendo este su punto de corte clínico.

Dada la novedad y la relevancia científica de estos resultados, se pone de manifiesto la necesidad de validación de estos estudios *in vitro* con un modelo experimental que valide los procedimientos descritos. Los estudios *in vivo* representan una etapa más avanzada de la investigación, que será descrita en el bloque III de esta tesis doctoral.

Bloque 2

Experimentación animal *in vivo*



ÍNDICE BLOQUE II

CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón	211
<i>INTRODUCCIÓN</i>	212
<i>MÉTODO</i>	218
<i>FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO</i>	225
<i>RESULTADOS</i>	226
<i>DISCUSIÓN</i>	230
CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería	235
<i>INTRODUCCIÓN</i>	237
<i>MÉTODO</i>	243
<i>FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO</i>	252
<i>RESULTADOS</i>	254
<i>DISCUSIÓN</i>	263
CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre	271
<i>INTRODUCCIÓN</i>	273
<i>MÉTODO</i>	280
<i>FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO</i>	285
<i>RESULTADOS</i>	286
<i>DISCUSIÓN</i>	291

EXP

CAPÍTULO IV

Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón



INTRODUCCIÓN

Investigación en modelos animales

Un «modelo animal» es una especie distinta de la humana que se utiliza en investigación para obtener información acerca de procesos biológicos que ocurren de forma similar en otra especie, fundamentalmente en la especie humana, en la que ciertos experimentos son impracticables, generalmente por normas éticas. Los estudios *in vivo* permiten extrapolar aspectos de numerosos procesos fisiológicos y patológicos que son imposibles de ensayar en experimentos *in vitro*.

Los modelos animales constituyen, en muchas ocasiones, una etapa más del método científico ampliamente utilizada en el ámbito de la investigación biomédica, ya que contribuye al conocimiento de muchos procesos fisiológicos. Dentro de los modelos animales, diversos mamíferos se utilizan de forma habitual en todo tipo de ensayos debido a su similitud estructural, funcional y genética con el ser humano y otros organismos superiores. Uno de los mamíferos más utilizados y, por ello, cuyos procedimientos están más estandarizados, es el modelo ratón (*Mus musculus*), debido, principalmente, a que existe un extenso conocimiento sobre sus características fisiológicas y genómicas y a que estos animales se mantienen estables genéticamente frente a numerosos estímulos físicos, químicos y biológicos. Además, los ratones alcanzan la madurez sexual en poco tiempo, por lo que se pueden obtener varias generaciones de animales en periodos cortos; y su pequeño tamaño facilita su manejo para los diferentes procedimientos y su mantenimiento en condiciones de bienestar animal de forma económica (Viera y Márquez, 2020).

Pese a que lo ideal es poder sustituir estos procedimientos científicos por otros métodos alternativos que no requieran de la utilización de animales vivos, la experimentación animal es aún muy necesaria para contribuir a la protección de la salud humana, animal y el medio ambiente. Desde la práctica científica, los modelos animales deben garantizar

el cumplimiento de una serie de normas éticas y bioéticas que están amparadas por una normativa estricta.

Legislación en experimentación animal

Desde el año 1986, la Unión Europea (UE) cuenta con una normativa específica que abarca el uso de animales de experimentación animal. En el año 2010 la UE adoptó la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos para reforzar la legislación anterior y mejorar el bienestar de los animales que se utilizan. Esta normativa viene aplicada en España con la legislación más actual, publicada recientemente a través del Real Decreto 118/2021 de 23 de febrero por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, que se establece las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE-A-2013-1337).

Las normativas se fundamentan especialmente en el principio de las tres erres (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). En primer lugar, el principio de «reemplazo» establece la utilización de estrategias avaladas científicamente que no conlleve la utilización de animales vivos. El principio de «reducción» consiste en velar por que el número de animales utilizados en los proyectos en los que no exista una alternativa al ensayo con modelos animales sea el mínimo posible sin comprometer los objetivos de la investigación. Por último, la normativa también establece un principio de «refinamiento» de la cría, el alojamiento y los cuidados, así como de los métodos utilizados en procedimientos, que elimine o reduzca al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales.

No obstante, la legislación establece como objetivo final el reemplazo total de los procedimientos con animales vivos para fines científicos, tan pronto como sea científicamente posible hacerlo, con lo que fomenta la búsqueda de alternativas.

Modelos experimentales en patología infecciosa respiratoria

Los modelos animales que reproducen las enfermedades infecciosas constituyen, desde hace más de un siglo, uno de los pilares fundamentales en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad y en el desarrollo de medidas de control (Miró y Gatell, 2000). Los modelos de neumonías bacterianas provocadas por diferentes agentes causales se han utilizado de forma frecuente para los estudios preclínicos del desarrollo de nuevos antimicrobianos y su actividad antimicrobiana *in vivo* (Pachón et al., 2000). En estos modelos se han utilizado varios tipos de animales destinados a fines científicos, entre los que se incluyen los ratones que pueden ser inoculados por diversas vías, como la instilación intratraqueal o intrabronquial, mediante aerosoles o por vía intraperitoneal (Ferran et al., 2011; Praveena et al., 2010; Vasseur et al., 2017).

El modelo de neumonía experimental está catalogado como un «modelo discriminativo», diseñado para simular la producción de la infección de la manera más similar posible a lo que ocurre de forma natural. Por ello, reúne los criterios ideales de este tipo de modelos de infección, esto es, una técnica de infección simple; microorganismos causantes, ruta de entrada, diseminación en el organismo y afectación tisular muy semejantes a la infección natural; gravedad, curso y duración de la enfermedad predecibles, reproducibles y analizables; y, por último, capacidad de medir y reproducir la eficacia del tratamiento antimicrobiano (Pachón et al., 2000).

Históricamente, primeros modelos de infección respiratoria bacteriana eran los modelos de neumonías neumocócicas, producida por *Streptococcus pneumoniae*, casi exclusivos a principios del siglo XX. Posteriormente, se introdujeron otros patógenos ante el aumento de la casuística en humanos de infecciones por *Staphylococcus aureus* y bacilos Gram- como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Haemophilus influenzae* (Pachón et al., 2000). La infección experimental por *Pasteurella multocida* no es de las más frecuentes en este tipo de modelos, fundamentalmente debido a que no reviste mucha importancia clínica en patología respiratoria humana (Kristinsson y Adam, 2007). No obstante, además de ser una infección zoonótica, es una enfermedad muy relevante en medicina veterinaria debido

a que ocasiona importantes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas (Kristinsson y Adam, 2007; Radostits et al., 2007), como se explicará con más detalle en el capítulo V. Por todo esto, son necesarios más estudios en modelos animales, tanto para conocer la fisiopatología de la infección por *P. multocida*, como para aportar diferentes estrategias terapéuticas para el control de la enfermedad en las poblaciones susceptibles.

Estudios de eficacia y seguridad de los metabolitos producidos por BAL

Entre las nuevas opciones terapéuticas que están cobrando cada vez mayor relevancia en la actualidad, los probióticos y sus derivados se posicionan como una de las alternativas a los antibióticos más utilizadas en ganadería (Bajagai et al., 2016; Ng et al., 2020). Los metabolitos producidos por bacterias probióticas, como las BAL, han demostrado ser útiles para el control de los patógenos alterantes y causantes de toxiinfecciones alimentarias, sin embargo, su utilización como agente terapéutico en medicina veterinaria está actualmente limitada, debido, fundamentalmente, al desconocimiento sobre la farmacocinética de los metabolitos (Ng et al., 2020). De hecho, diversos estudios apuntan a que las bacteriocinas, los componentes producidos por estas bacterias con mayor potencial terapéutico, han demostrado tener baja biodisponibilidad por sí mismas (Ng et al., 2020; Soltani et al., 2021), por lo que una alternativa interesante sería utilizar todos los componentes producidos por las bacterias sin alterar la composición secretada al medio de forma natural.

Una de las principales opciones terapéuticas que se están explorando en la actualidad, es la utilización de estos metabolitos en sinergia con antibióticos, como ya se comentó en el CAPÍTULO III. No obstante, la mayoría de los estudios disponibles en la actualidad se corresponden con ensayos *in vitro* y las actividades antimicrobianas encontradas en el laboratorio no siempre se corresponde con su resultado real *in vivo*, por lo que son necesarios más estudios en modelos animales para dilucidar su utilidad clínica real (Cebrián et al., 2019; Singh et al., 2014). La terapia combinatoria entre estos agentes con sinergia funcional puede contribuir al tratamiento de las enfermedades infecciosas

potenciando el efecto antimicrobiano de los fármacos y también puede prevenir el desarrollo de resistencias antimicrobianas y otros efectos adversos si se consigue el mismo efecto terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).

Por último, es importante destacar que las BAL poseen la presunción cualificada de seguridad (QPS), otorgada por la EFSA, mediante la cual no es necesario someter a ningún microorganismo de este grupo a una evaluación de seguridad completa (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021), pero no está claro si ocurre lo mismo con los componentes producidos por las mismas. Algunos autores apuntan que las bacteriocinas y el resto de metabolitos antimicrobianos son seguros y carecen de toxicidad para las células de los mamíferos, pero es importante realizar estudios de seguridad si se pretenden incluir en la terapia antimicrobiana en un futuro (Soltani et al., 2021).

Por ello, los **objetivos** de este capítulo son:

- Comprobar la seguridad de un suplemento elaborado a partir de los metabolitos producidos por las BAL administrados por vía oral en modelo ratón.
- Estudiar el efecto de la administración vía oral del suplemento en combinación con la terapia antibiótica para el control de la infección experimental producida por *Pasteurella multocida* en modelo ratón.

MÉTODO

A raíz de los resultados obtenidos en los anteriores capítulos de esta tesis doctoral, se seleccionó la bacteria *L. salivarius* C12 para la elaboración de un suplemento, a partir de los metabolitos secretados por la misma, para su administración por vía oral para el control de la enfermedad infecciosa provocada por *P. multocida* en combinación con la terapia antibiótica.

Consideraciones bioéticas

La elección del modelo animal, en este caso modelo ratón (*Mus musculus*) cepa ICR albina, se ha realizado debido a que este se considera el procedimiento óptimo para la realización de una infección experimental *in vivo*, no habiendo posibilidad de sustituirlo por otros métodos alternativos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura (ES 10037000183) previa autorización por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la misma universidad (240/2019), cumpliendo el principio de las tres erres, en la medida de lo posible:

- Reemplazo: no es posible debido a las características de la infección experimental.
- Reducción: aceptando una potencia estadística del 80 %, fijando el nivel de significación en $\alpha=0,05$ y anticipando un tamaño del efecto elevado, puesto que las proporciones esperadas para mortalidad entre grupos tratados y grupo control son de 50 % y 0 %, el número adecuado de individuos por grupo para reducir al máximo su utilización es de 6 animales.
- Refinamiento: el centro en el que se realizó el estudio sigue la normativa vigente en cuanto a mantenimiento de los animales en condiciones óptimas que respeten el bienestar animal y se evitó el sufrimiento de estos mediante sacrificio final.

Los procedimientos en los que los animales pudieron experimentar dolor, sufrimiento o estrés, y su grado de severidad de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos en el Anexo IX del RD 53/2013 son:

- Administración de suplementos y/o antibióticos por vía oral: severidad leve, podría provocar alteración del estado de bienestar por estrés animal, pero de corta duración.
- Infección experimental con *P. multocida* por vía intraperitoneal: de «moderada» a «severa», en función de la progresión de la enfermedad.
- Sacrificio final para estudio anatomopatológico: sin recuperación.

No se contempló la posibilidad de administración de agentes analgésicos o anestésicos porque podrían influir en el desarrollo del estudio. Se procedió al sacrificio final de todos los animales para la realización de una evaluación anatomopatológica al finalizar el estudio y se practicó la eutanasia cuando se detectaron altos niveles de dolor y sufrimiento de los animales. El método eutanásico de elección fue la dislocación cervical, puesto que es un método rápido que no deja residuos en el animal, no interfiriendo, por tanto, en su posterior evaluación patológica.

1. Elaboración del suplemento y selección del antibiótico

El suplemento administrado consiste en el sobrenadante de un cultivo de la bacteria *L. salivarius* C12 añadido al agua de bebida para su administración por vía oral, de modo que se reduzca la manipulación de los animales y, con ello, el estrés, puesto que puede afectar al bienestar animal y al desarrollo de los ensayos. La bacteria se cultivó en las condiciones óptimas para la producción de sus metabolitos, que han sido descritas en el capítulo III, y los sobrenadantes se obtuvieron mediante los procedimientos también detallados previamente.

Por otro lado, el agente terapéutico de elección fue la doxicilina, un antibiótico del grupo de las tetraciclinas que se utiliza para el tratamiento de infecciones que afectan al

aparato respiratorio y además arrojó buenos resultados en sinergia con el sobrenadante de la BAL C12. Asimismo, es importante destacar que es un antibiótico que se utiliza de forma habitual por vía oral en ensayos con ratones por su facilidad de administración en el agua de bebida.

2. Preparación del inóculo del patógeno

Se seleccionó la bacteria patógena *P. multocida* tipo A aislada de un brote de alta mortalidad en un cebadero de corderos y se cultivó en el medio Agar Sangre durante 48 h a 37 °C. Posteriormente, se inoculó en caldo Mueller Hinton durante 48 h a 37 °C. y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en SSF estéril ajustado a dos valores de absorbancia a 450 nm: 0,19 y 0,35 correspondiente a dos dosis de inóculo (10^4 y 10^7 ufc/mL, respectivamente).

3. Fase previa: puesta a punto de las técnicas y seguridad de los suplementos

Esta fase tiene dos objetivos principalmente: por un lado, poner a punto las técnicas y establecer las dosis de infección adecuadas para la realización del ensayo clínico y, por otro lado, garantizar la seguridad para los animales de los metabolitos bioactivos contenidos en los suplementos. Además, también nos permitió calcular el tamaño muestral.

Elaboración de los grupos

Se realizaron 4 grupos de 6 ratones cada uno, separados en jaulas de 3 animales que fueron instaladas en una sala SPF (*Specific Pathogen Free*, libre de patógenos específicos) una semana antes de comenzar los procedimientos para garantizar una correcta adaptación de los animales a su nuevo hábitat. La elaboración de los grupos se realizó como se muestra en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1. Elaboración de los grupos de la fase previa del estudio experimental

Grupo	Tratamiento o infección
Control	No recibió ningún tipo de tratamiento ni infección.
Suplemento	Se administró el suplemento con los metabolitos secretados por la bacteria <i>L. salivarius</i> C12 en una proporción 1:1 semanalmente (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua de bebida en el biberón) durante 21 días.
Infección DL50	Se inyectó una dosis única vía intraperitoneal a cada ratón de 0,2 mL del inóculo a 10^4 ufc/mL.
Infección DL100	Se inyectó una dosis única vía intraperitoneal a cada ratón de 0,2 mL del inóculo a 10^7 ufc/mL.

Se monitorizó el consumo del agua de bebida con y sin suplemento para garantizar que los animales consumían el producto sin problemas y para calcular la dosis que ingirieron los animales. Se observó diariamente a los ratones para evaluar la progresión de la enfermedad mediante la valoración del estado de ánimo (inactividad, anorexia, depresión), la sintomatología propia de la enfermedad (signos respiratorios como disnea, ruidos respiratorios, presencia de exudados) y otros signos particulares de enfermedad en los ratones, como los pelos erizados (Praveena et al., 2010). Además, se registró la mortalidad y se monitorizó la aparición de otros signos y síntomas y se realizó necropsia para estudio anatomopatológico y el diagnóstico de *P. multocida* de los animales que causaron baja mediante los procedimientos que serán detallados más adelante en este apartado.

4. Estudio de la eficacia de los compuestos bioactivos sobre el desarrollo de la infección

Como resultado de la fase previa, se estableció como dosis letal 50 (DL50), es decir, la dosis del patógeno que provoca la muerte de la mitad de los animales, el inóculo de 10^4

ufc/mL. Para esta fase se estableció un nuevo grupo control y dos grupos tratamiento diferentes, a uno se le administró antibiótico y a otro el suplemento (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Elaboración de los grupos de la primera fase del estudio experimental

Grupo	Tratamiento o infección
Control	Se realizó la inyección intraperitoneal de SSF estéril y se rellenó el biberón con 100 mL de agua.
Antibiótico	Se inyectó vía intraperitoneal a cada ratón la DL50 y se administró el antibiótico doxicilina a una dosis de 10 mg/Kg/día durante 5 días en el agua de bebida (300 µL de doxiciclina al 10 % en 100 mL de agua en el biberón).
Suplemento	Se administró el suplemento con los metabolitos bioactivos de la bacteria <i>L. salivarius</i> C12 en una proporción 1:1 semanalmente (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua de bebida en el biberón) durante 14 días antes de la inyección intraperitoneal con el inóculo del patógeno a la DL50. Posteriormente a la infección, se prolongó la administración del suplemento durante 5 días más.

5. Estudio de la eficacia de los compuestos bioactivos en sinergia con antibióticos sobre el desarrollo de la infección

Dado que la DL50 no fue suficiente para valorar el efecto, se realizó un nuevo ensayo con la dosis letal absoluta (DL100), es decir, el inóculo de 10^7 ufc/mL. En esta ocasión, se estableció un nuevo grupo control, dos grupos tratamientos como en la fase anterior y un nuevo grupo tratamiento con una combinación del antibiótico y el suplemento (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Elaboración de los grupos de la segunda fase del estudio experimental

Grupo	Tratamiento o infección
Control	Se realizó la inyección intraperitoneal de SSF estéril y se rellenó el biberón con 100 mL de agua de bebida.
Antibiótico	Se inyectó vía intraperitoneal a cada ratón la DL100 y se administró el antibiótico doxicilina a una dosis de 10 mg/Kg/día durante 5 días en el agua de bebida (300 µL de doxiciclina al 10 % en 100 mL de agua en el biberón).
Suplemento	Se administró el suplemento en una proporción 1:1 semanalmente (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua en el biberón) durante 14 días antes de la inyección intraperitoneal con el inóculo del patógeno a la DL100. Posteriormente a la infección, se prolongó la administración del suplemento durante 5 días más.
Suplemento + antibiótico	Se administró el suplemento a la misma dosis que el grupo suplemento durante 14 días antes de la infección con la DL100 y se administró el antibiótico a la misma dosis que el grupo antibiótico. Posteriormente a la infección, se prolongó la administración del suplemento durante 5 días más.

6. Finalización del estudio y diagnóstico de la infección

Se realizó necropsia a los animales que causaron baja en las siguientes 24 h tras la muerte y al final de cada fase se eutanasió a los supervivientes mediante dislocación cervical para la realización de las necropsias y estudios anatomopatológicos de todos los ratones participantes en el estudio. El objetivo de esta fase es comparar las lesiones, principalmente en los pulmones y realizar el diagnóstico de *P. multocida* para establecer la causa de la muerte. Se tomaron muestras de los pulmones e hígado para confirmar el

diagnóstico de *P. multocida* mediante cultivo en Agar Sangre y MacConkey, pruebas de identificación básicas y confirmación mediante PCR según el protocolo previamente descrito (Townsend et al., 2001).

7. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron las diferencias mediante la prueba del logaritmo del rango (*Logrank test*), estableciendo 5 % de nivel de significación. El resto de los parámetros del estudio se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Chi-cuadrado) para las variables cualitativas y la prueba exacta de Fisher para variables cuantitativas.

Figura resumen del método

01.

Selección de BAL y
antibiótico.



02.

Elaboración del suplemento.



03.

Diseño experimental: ela-
boración de los grupos.



04.

Estudio de seguridad del
suplemento.



05.

Infección experimental



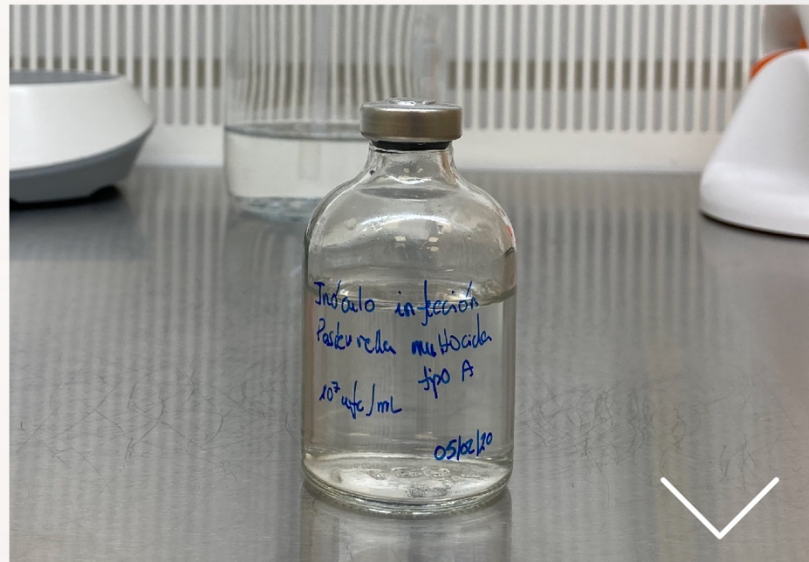
06.

Evaluación de la eficacia
del suplemento.



07.

Estudio estadístico.



RESULTADOS

Los metabolitos contenidos en el sobrenadante de *L. salivarius* son seguros para su administración por vía oral

Los resultados completos del estudio se encuentran en el Apéndice II. Durante la fase previa al desarrollo del ensayo se confirmó que los animales se adaptaron bien a las jaulas en pocos días y no se registraron síntomas compatibles con enfermedad ni alteraciones en el comportamiento típico de la especie en el grupo control ni en el grupo suplementado, por lo que podemos afirmar que los metabolitos contenidos en el suplemento son seguros para su administración por vía oral y respetuosos con el bienestar animal. En todos los animales infectados se detectó el patógeno *Pasteurella multocida* mediante cultivo y confirmación por PCR y, como es lógico, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad y morbilidad (síntomas y lesiones) entre los animales que no fueron infectados, incluidos los que recibieron el suplemento, y los animales infectados. Esto confirma la infección y descarta que se produzcan alteraciones debido a la administración del suplemento (morbilidad, exudados, lesiones macroscópicas en pulmón, hemorragias en cavidad torácica y número de bajas $P < 0,0001$, y adherencias en cavidad torácica $P < 0,05$). Algunos detalles de signos y síntomas se encuentran en la figura 4.2. En cuanto a las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que se muestran en la figura 4.1A, se observaron diferencias estadísticamente significativas mediante el test del logaritmo del rango ($P < 0,0001$).

La DL50 no es adecuada para valorar una posible sinergia del antibiótico y los metabolitos del sobrenadante

En cuanto a los grupos infectados, se estableció como DL50 el inóculo del patógeno a 10^4 ufc/mL, puesto que se produjo una mortalidad del 50 % en este grupo, y como DL100 el inóculo a 10^7 ufc/mL, con una mortalidad del 100 %. Las bajas para la DL50 se observaron en los dos primeros días posinfección (dpi) con animales con síntomas leves

inespecíficos como pelos erizados e inactividad. Las bajas para la DL100 se sucedieron por goteo durante los cuatro dpi con síntomas más graves como signos respiratorios, inactividad total y, en algunos casos, coma previo a la muerte. En la fase 1 se infectó a los animales con la DL50 y se propusieron dos tratamientos: un grupo recibió el suplemento y otro grupo recibió terapia antibiótica. Aproximadamente la mitad de los animales mostró síntomas leves, igual que en la fase previa, y en todos los animales infectados se aisló *P. multocida*, que fue confirmado mediante PCR. No se observaron diferencias en la mortalidad en el grupo control con respecto al grupo suplementado, ni en las curvas de supervivencia (Figura 4.1B, $P=0,78$), sin embargo, todos los animales del grupo antibiótico se recuperaron favorablemente y no se registró ninguna baja en este grupo. Debido a esto, este ensayo no se considera adecuado para evaluar la sinergia del antibiótico y el suplemento, por lo que se repitió el ensayo con la DL100 y se incluyó un grupo con ambos tratamientos.

Los metabolitos antimicrobianos producidos por *L. salivarius* C12 disminuyen la mortalidad provocada por la infección con *P. multocida* en combinación con la terapia antibiótica

En la fase 2 se infectó a los ratones con la DL100 y se obtuvo una mortalidad del 100 % en el grupo control en el grupo que recibió el suplemento y en el grupo que recibió el antibiótico. A diferencia de la fase anterior, el antibiótico no fue suficiente para recuperar a los animales, cuya muerte se produjo tras la aparición de síntomas graves como depresión, signos respiratorios y coma previo a la muerte. Por el contrario, en el grupo que recibió el antibiótico y el suplemento, se encontró una supervivencia del 33,33 % de los animales, además, estos animales supervivientes mostraron síntomas de menor gravedad y consiguieron recuperarse en pocos días. Las diferencias encontradas en las curvas de supervivencia fueron estadísticamente significativas (Figura 4.1C, $P=0,0255$). Se confirmó la infección de *P. multocida* en todos los animales que fueron inoculados, pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el estudio anatomopatológico ni en los síntomas mostrados por los animales ($P>0,05$).

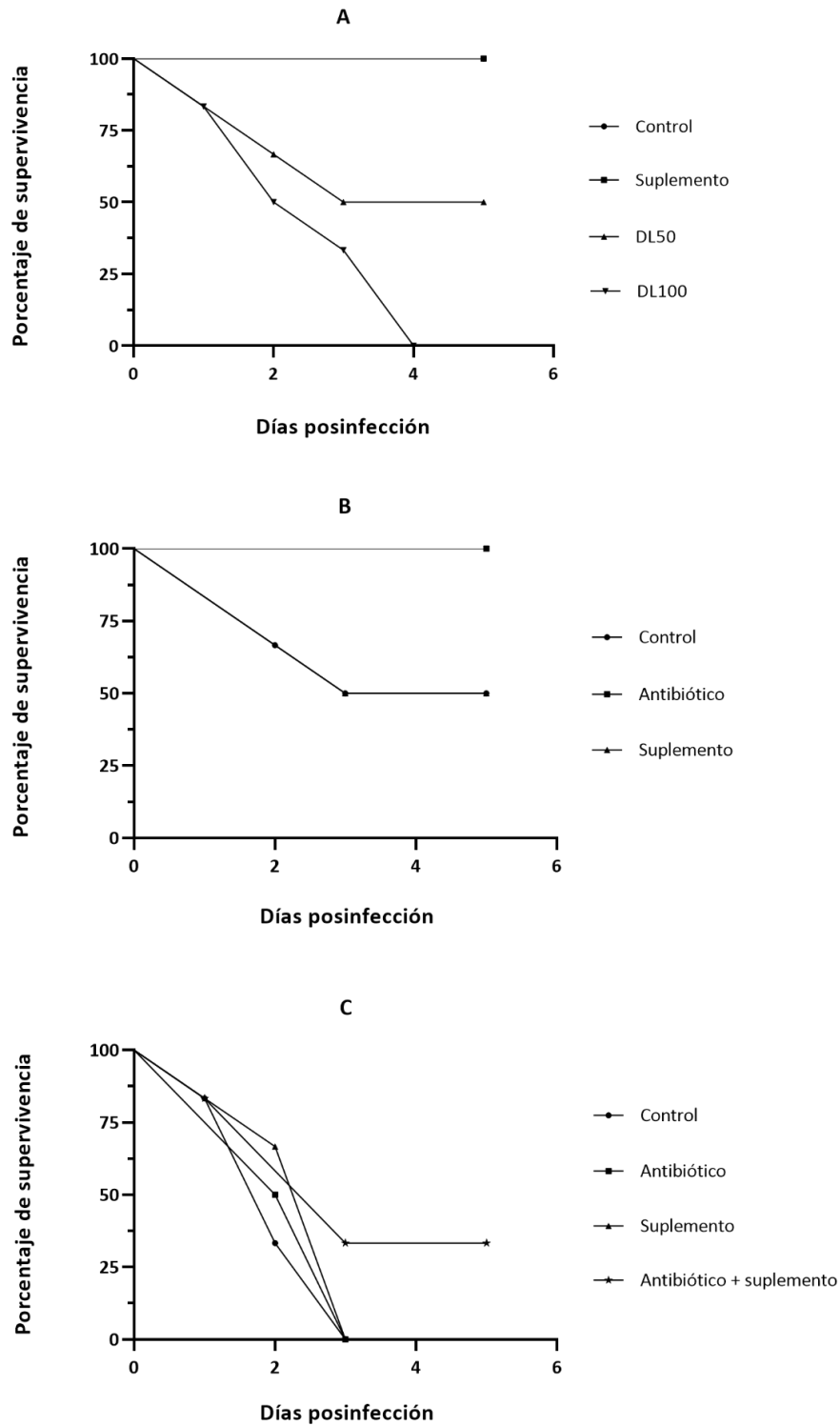


Figura 4.1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en los diferentes grupos del estudio. **(A)** En la fase previa se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, $P < 0,0001$) en la supervivencia de los animales infectados (triángulos) con respecto a los animales que no fueron infectados (círculos y cuadrados, superpuestos), incluidos los que recibieron el suplemento. **(B)** En la fase 1 se infectó a los animales con la DL50 y, tanto en el grupo control sin tratamiento (círculos) como en el grupo suplemento (triángulos) no se observaron diferencias en la supervivencia de los animales, que fue del 50 %. El grupo antibiótico (cuadrados) tuvo una supervivencia del 100 pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, $P < 0,78$). **(C)** En la fase 2 se infectó a los animales con la DL100, que provocó una mortalidad del 100 % en el grupo control (círculos), antibiótico (cuadrados) y suplemento (triángulos). Sin embargo, se registró una supervivencia del 33,33 % en el grupo que fue tratado con antibióticos en combinación con el suplemento (test del logaritmo del rango, $p < 0,05$).

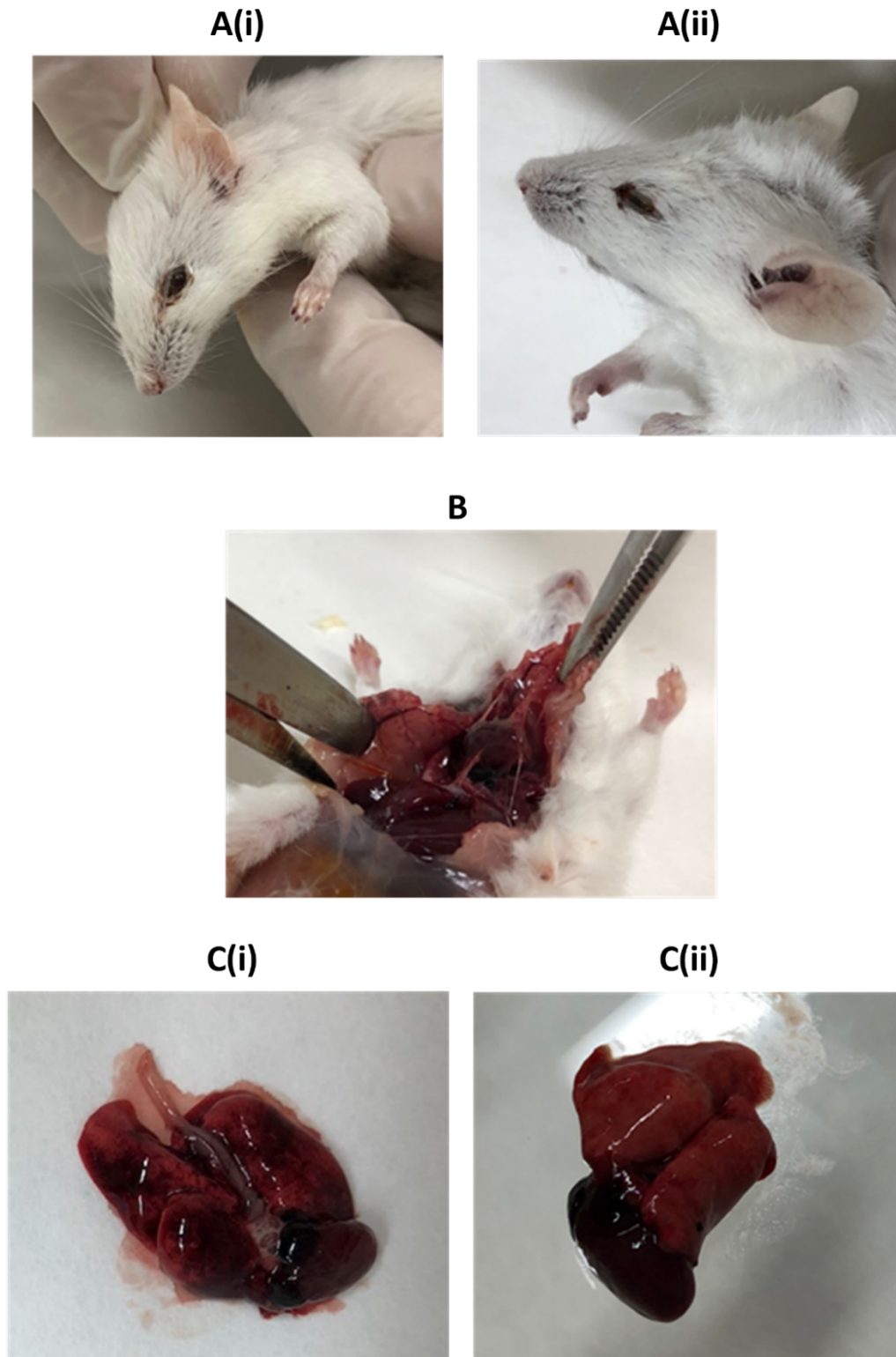


Figura 4.2. Síntomas y signos compatibles con la infección experimental por *Pasteurella multocida* en modelo ratón. **(Ai)** Pelos erizados y exudado ocular no hemorrágico, más leve y **(Aii)** hemorrágico, más grave. **(B)** Hallazgo de adherencias en cavidad torácica durante la necropsia. **(Ci)** Pulmón con lesiones neumónicas compatibles con la infección y **(Cii)** pulmón aparentemente sano, sin lesiones macroscópicas.

DISCUSIÓN

La investigación en modelos animales de infección experimental continúa siendo necesaria para aumentar el conocimiento sobre las enfermedades y sus medidas de control, además de ser fundamental para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. En este capítulo se seleccionó para la infección experimental la bacteria patógena *P. multocida* tipo A, por la importancia que tienen los procesos provocados por esta bacteria en Sanidad Animal, puesto que tienen un gran impacto negativo sobre las explotaciones ganaderas (Radostits et al., 2007). Además, este serotipo en concreto, ha sido previamente estudiado en modelo ratón y sus resultados son extrapolables a otras especies (Ferran et al., 2011; Praveena et al., 2010; Vasseur et al., 2017).

Por otro lado, para la planificación y el diseño de un modelo experimental que replique una enfermedad infecciosa, es necesario realizar una intensa batería de estudios *in vitro* como paso previo al desarrollo del modelo (Miró y Gatell, 2000). En este sentido, a raíz de los resultados descritos en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral, se seleccionó el aislado de BAL *L. salivarius* C12 debido a que produce metabolitos antimicrobianos que actúan en sinergia con el antibiótico doxiciclina, potenciando el efecto inhibitorio frente al patógeno mencionado. En el estudio previo de evaluación de sinergia antimicrobiana, el sobrenadante de esta BAL disminuyó la CMI para la doxiciclina, de 4 a 1 µg/mL, siendo este su punto de corte clínico. Además, este antibiótico se considera de elección para su administración por vía oral para el tratamiento de procesos infecciosos que cursen con neumonía en ratones, incluidos los animales criados en condiciones de laboratorio para este tipo de estudios (Harkness et al., 2013; Morris, 1995).

En la primera fase del ensayo experimental se demostró que el suplemento elaborado a partir de los metabolitos del aislado C12 son seguros para su administración por vía oral, puesto que no se observaron alteraciones en el comportamiento ni presencia de signos clínicos de enfermedad en los animales del estudio. Aunque está aceptado por la comunidad científica que las bacteriocinas y el resto de metabolitos antimicrobianos

producidos por las BAL son seguros y carecen de toxicidad para las células de los mamíferos, debido al estatus QPS de los microorganismos que las producen, es importante realizar estudios de seguridad si se pretenden incluir en la terapia antimicrobiana en un futuro (Soltani et al., 2021). Por lo general, no son necesarios estudios adicionales para asegurar su inocuidad, pero en ocasiones podría ser interesante llevar a cabo estudios de toxicidad en modelos celulares y/o animales para descartar una acción potencialmente perjudicial sobre las células animales o la acumulación de productos tóxicos, sobre todo cuando se trata de componentes del sobrenadante no caracterizados y el objetivo sea el desarrollo de biofármacos (Cebrián et al., 2019; Singh et al., 2014; Soltani et al., 2021).

Debido a la importancia de las infecciones producidas por especies de la familia Pasteurellacea en medicina veterinaria, especialmente en producción animal (Radostits et al., 2007), se diseñó un modelo de infección experimental con un aislado de *P. multocida* obtenido a partir de un brote en un cebadero de corderos. Se infectó a los ratones con *P. multocida* tipo A de forma experimental y para el tratamiento de los animales se propuso una terapia combinatoria entre el antibiótico doxiciclina y un suplemento elaborado a partir de los metabolitos antimicrobianos de la cepa *L. salivarius* C12. El objetivo de la terapia antibiótica es eliminar el patógeno de un organismo mediante la administración de una cantidad óptima del agente antimicrobiano que sea capaz de inhibir al agente infeccioso en el lugar de la infección (Bravo, 2019). Las interacciones de tipo funcional entre diferentes compuestos con actividad antimicrobiana se producen cuando se origina un aumento cuantitativo de la acción farmacológica por la acción simultánea de dos agentes, y se denominan de «potenciación» o sinergias propiamente dichas cuando el efecto combinado de ambos es mayor al efecto de estos utilizados de forma individual (Blumenthal y Garrison, 2011), como lo que ocurre en este ensayo clínico.

La DL50 del patógeno utilizada durante el ensayo no se consideró adecuada para valorar una posible sinergia entre el antibiótico y las fracciones antimicrobianas del suplemento puesto que, si bien la bacteria mostró resistencia antibiótica *in vitro*, la terapia

antibiótica *in vivo* en el modelo animal propuesto consiguió recuperar a la totalidad de los animales. La DL100 causó la muerte de la totalidad de los animales infectados sin tratamiento o con ambos tratamientos por separado, sin embargo, se consiguió recuperar un tercio de los animales cuando se combinaron la terapia antibiótica y el suplemento con los metabolitos antimicrobianos producidos por *L. salivarius* C12, con diferencias estadísticamente significativas en las diferentes curvas de Kaplan-Meier, que son un método válido para analizar diferencias en estudios de supervivencia, incluso cuando se trata de grupos pequeños de comparación (Rich et al., 2010). Nuestros resultados son comparables a otros estudios de infección experimental con *P. multocida* en modelo ratón cuya terapia se basa en la administración de antibióticos (Ferran et al., 2011), pero hasta la fecha este es el primer estudio que ensaya esta asociación para este patógeno en concreto. No obstante, existen diversos estudios en otros modelos animales que confirman la asociación efectiva entre diferentes agentes antimicrobianos, entre los que se incluyen bacteriocinas u otros metabolitos y antibióticos (Mathur et al., 2017; Singh et al., 2014).

Como se ha comentado anteriormente, los metabolitos antimicrobianos de las BAL tienen un mayor espectro de acción frente a bacterias Gram +, más próximas a ellas filogenéticamente y con las que generalmente comparten nichos ecológicos. Además, el mecanismo de acción de la mayoría de las bacteriocinas se basa en actuar sobre la pared bacteriana (Alvarez-Sieiro et al., 2016), motivo por el cual es posible que el efecto terapéutico del suplemento por sí mismo no sea suficiente para el control de la infección producida por el patógeno, que es Gram -. El suplemento podría contener las bacteriocinas de clase II y de clase III que se encontraron en el genoma y cuya actividad antimicrobiana se comprobó en los estudios *in vitro* descritos más arriba y puede deberse a la degradación de la pared bacteriana, que junto con el ácido láctico, que actúa permeabilizando esta membrana celular (Alakomi et al., 2000), favorecería la entrada del antibiótico a la célula del patógeno, donde se une a la subunidad 30S del ribosoma e inhibe la síntesis de proteínas para ejercer su mecanismo de acción inhibiendo el desarrollo de la bacteria. Al combinar todos los metabolitos del suplemento con la terapia antibiótica, se consigue potenciar el efecto antimicrobiano original y ampliar el espectro de inhibición del patógeno, incluso existiendo resistencia

antibiótica, puesto que es importante destacar que la cepa de *P. multocida* utilizada mostró originalmente resistencia a la doxiciclina *in vitro*. Uno de los mecanismos de resistencia a tetraciclinas que se han descrito radica en la alteración de la permeabilidad de la membrana para evitar el paso del antibiótico al interior celular, fundamental para ejercer su mecanismo de acción (Grossman, 2016; Kehrenberg et al., 2001). El mecanismo de acción del ácido láctico y las bacteriocinas en su conjunto podría revertir este mecanismo de resistencia, favoreciendo el paso del antibiótico al interior celular, como se ha comentado anteriormente.

Desde el punto de vista de la investigación básica, sería muy interesante ahondar en el conocimiento de los metabolitos exactos que tienen una mayor actividad y poder realizar una caracterización completa de los sobrenadantes para conocer la totalidad de sus componentes y la interacción entre ellos, determinando las bases farmacodinámicas de la sinergia detectada. Los componentes antimicrobianos podrían identificarse de forma fiable mediante resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía o espectrometría de masas (Aguilar-Toalá et al., 2018; Kanak y Yilmaz, 2018; Şanlıbaba y Güçer, 2015) y la cuantificación de la fracción proteica mediante el método de Bradford o utilizando el ácido bicinconínico (BCA) (Cleveland et al., 2002; Kawai et al., 2004). Esta caracterización completa será llevada a cabo en futuros estudios para lograr la optimización de la producción de los metabolitos que jueguen un papel más relevante y poder cuantificarlos para la realización de estudios dosis-efecto. No obstante, desde el punto de vista industrial, el suplemento elaborado, con todos sus componentes en las proporciones que se generan de forma espontánea, ha demostrado ser seguro y tener efectividad en el tratamiento de una enfermedad de gran relevancia en Sanidad Animal.

Esta tesis doctoral engloba, por primera vez, un conjunto de experimentos encaminados a optimizar la producción de metabolitos de una cepa de *L. salivarius* para elaborar un suplemento que actúe de forma sinérgica con la terapia antibiótica para el control de una infección experimental por *P. multocida*. El modelo experimental de este estudio no solo comprueba la eficacia del suplemento elaborado, sino que además ha permitido validar el método de selección de las bacterias beneficiosas, la evaluación de su

actividad antimicrobiana y el proceso de optimización de metabolitos y detección de sinergias con antibióticos *in vitro*, descrita en los capítulos del bloque anterior.

Las infecciones experimentales en modelos animales son fundamentales para evaluar la efectividad y seguridad de un nuevo tratamiento o una nueva pauta antimicrobiana (Miró y Gatell, 2000) y podrían ser consideradas como un paso previo a la elaboración de un producto que pueda ser administrado y analizado en condiciones reales, más allá de las puramente experimentales, como se verá en los siguientes capítulos. Este estudio sienta las bases científicas del desarrollo industrial de un producto posbiótico, que será definido y descrito en los siguientes capítulos de esta tesis doctoral, y que surge de forma innovadora como nueva alternativa para el control de enfermedades infecciosas en medicina veterinaria, que compense la escasez de antibióticos de nueva generación y ayude a combatir el grave problema de las resistencias a los antibióticos.

EXP

	Sangre	Heces	
	2	2	No se muestra
	2	—	
6	10	—	
8		—	
9.2	36	—	
6.8	30	—	
20.8		—	
19.4	19	—	
17.8		—	

→ diarrea

CAPÍTULO V

Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en ganadería



INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alternativas a los antibióticos: una necesidad actual

El sector ganadero ha sufrido importantes transformaciones y ha ido progresando de forma exponencial durante las últimas décadas, siendo el sector que más crecimiento ha experimentado dentro de la economía agrícola. La ganadería aporta un 40 % del valor de la producción agrícola global y representa el principal medio de subsistencia de casi 1.300 millones de personas en todo el mundo. El crecimiento poblacional y económico ha favorecido la intensificación en la producción ganadera como respuesta al incremento en la demanda de productos de origen animal (Alexandratos y Bruinsma, 2012; Bajagai et al., 2016). Estos hechos han traído aparejados dos graves problemas relacionados con la Salud Pública. Por una parte, la administración de antibióticos en dosis subterapéuticas como promotores del crecimiento para aumentar los indicadores productivos de los animales es una de las principales causas de aparición y diseminación de resistencias antimicrobianas, lo que ocasionó la prohibición de esta práctica en todos los países de la Unión Europea en el año 2006 (EC/1831/2003). Por otra parte, la emergencia de las enfermedades zoonóticas transmitidas a través de los alimentos de origen animal, denominadas «toxiinfecciones alimentarias», continúan siendo una seria amenaza para la Salud Pública y además causan importantes pérdidas económicas en las producciones a nivel mundial (Bajagai et al., 2016; Gil-Sánchez, 2003).

En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas para limitar la administración de antimicrobianos para su uso terapéutico y permitan satisfacer el incremento en la demanda de productos de origen animal, sin comprometer la salud de estos y de las personas (Bajagai et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). Estas alternativas deben ser sostenibles; mejorar los indicadores productivos de los animales y, sobre todo, su salud, la salud medioambiental y, con ello, la salud humana bajo la estrategia global «One Health» (Figura 5.1).



Figura 5.1. Resumen del contexto de la necesidad de búsqueda de alternativas

El sector ovino de carne y la importancia de mitigar los problemas asociados a los factores de estrés

El sector de los pequeños rumiantes representa en torno al 3,8 % de la Producción Final Agraria (PFA) en España, lo que supone un 9,9 % de la Producción Final de la rama Ganadera (PFG), ocupando el quinto lugar en importancia económica en nuestro país. En cuanto al sector ovino en particular, el 80 % del censo se encuentra localizado en 5 comunidades autónomas, siendo Extremadura la primera comunidad en censo, con el 24 % (Figura 5.2). En la Unión Europea, España aportaría aproximadamente el 18 % del censo total de ovino, situándose como el segundo país en importancia por número de animales, superado únicamente por Reino Unido (Bravo et al., 2020; *Caracterización Del Sector Ovino y Caprino En España*, 2019).

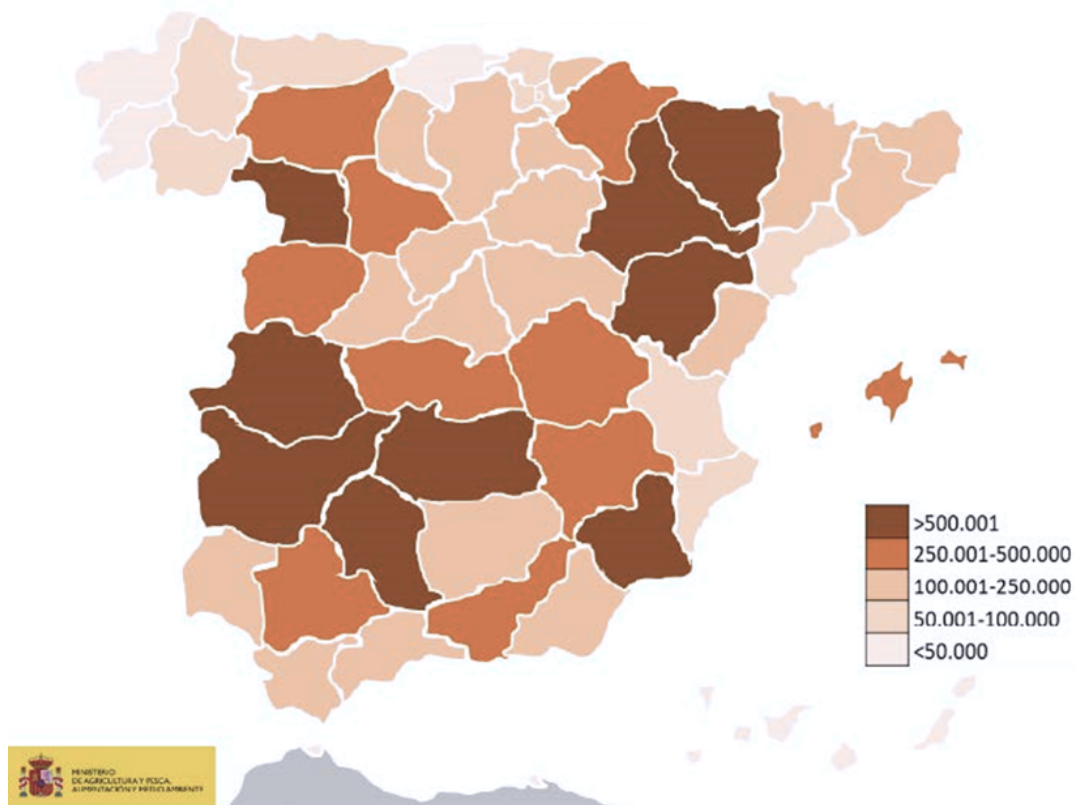


Figura 5.2. Distribución provincial del censo de ovino en España (datos del año 2019).

Fuente: S.G. Análisis, Coordinación y Estadística (MAPA).

Las explotaciones clasificadas para la producción cárnica representan más del 75 % del total de la producción ovina nacional (González et al., 2016; *Caracterización Del Sector Ovino y Caprino En España*, 2019). El periodo de cebo de los animales es una etapa crucial en la producción de ovino de carne, debido a que las condiciones de intensificación empleadas en este periodo conllevan importantes factores que pueden afectar al estrés de los animales, como el destete, el transporte y la adaptación al cebadero. Los grandes niveles de estrés que sufren los animales frecuentemente pueden ocasionar el padecimiento de importantes problemas sanitarios, con la consecuente bajada en la producción y pérdidas económicas (Bajagai et al., 2016; González et al., 2016).

Los factores estresantes relacionados con el manejo de los corderos pueden alterar la composición y las importantes funciones de la microbiota, lo que resulta en una disbiosis que tiene consecuencias negativas para la salud animal (Deng et al., 2017; Li et al., 2019).

De hecho, cada vez existe una mayor evidencia científica del papel importante que tiene

la microbiota del tracto gastrointestinal en la rentabilidad de los animales de producción (Bajagai et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Yoon et al., 2015). Por todo esto, se ha incrementado la necesidad de mitigar los problemas asociados a la intensificación de la producción ganadera, como ocurre en la etapa de cebo de los animales, que consigan aumentar los aspectos relacionados con el bienestar animal sin ocasionar un detrimento de los parámetros productivos de los animales y respetando la normativa actual en materia de aditivos promotores del crecimiento.

Importancia de las pasteurelosis en cebaderos de ovino

Los procesos respiratorios causados por patógenos infecciosos son una de las patologías más importantes en la producción ovina (Risco y García, 2020). Las «pasteurelosis» representan uno de los procesos más relevantes y están producidos por distintos agentes bacterianos pertenecientes a la familia Pasteurellaceae, entre la que destacan los géneros *Pasteurella*, *Mannheimia* y *Bibersteinia* (Martín-Palomino, 2020).

En general, el desencadenamiento de estos procesos es de naturaleza multifactorial y se asocia con la presencia de otros factores concurrentes. Entre ellos, destacan los factores relacionados directamente con el hospedador (edad, estado fisiológico, sistema inmunitario, etc.), agentes infecciosos concomitantes (virus, bacterias, parásitos, etc.) y factores ambientales (cambios bruscos en la temperatura, gases irritantes, etc.) y de manejo, que pueden verse altamente influenciados por el estrés (Radostits et al., 2007; Risco y García, 2020).

Las especies *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Bibersteinia threalosi* son las que originan mayor morbilidad y mortalidad en pequeños rumiantes y constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas, debido a que causan una disminución en la rentabilidad de los animales y un aumento en los costes por tratamientos (Lacasta et al., 2008; Martín-Palomino, 2020; Radostits et al., 2007). Estas especies bacterianas forman parte de la microbiota residente en el tracto respiratorio superior de los animales y pueden ejercer como patógenos oportunistas, ocasionando

una disbiosis que es perjudicial para el animal, cuando se dan los factores concurrentes antes mencionados (Martín-Palomino, 2020).

Utilización de compuestos bioactivos en piensos funcionales como alternativa

En la actualidad, el empleo de aditivos funcionales en nutrición animal es la principal opción para mejorar los índices productivos, prevenir la aparición de enfermedades y respetar el bienestar animal (Bajagai et al., 2016). En este sentido, entendemos como «piensos funcionales» a los piensos para alimentación animal suplementado con compuestos bioactivos que, incorporados a la dieta de los animales, pueden mejorar su bienestar y productividad más allá de lo que cabría esperar o explicar por su simple potencial nutricional (Velasco et al., 2006).

Entre los componentes bioactivos más utilizados en alimentación animal, los compuestos de la familia de los -bióticos son los más utilizados. Tanto los «prebióticos», ingredientes no digeribles que actúan como sustrato de microorganismos beneficiosos; como los «probióticos», los propios microorganismos vivos que confieren beneficios para la salud; y los «simbióticos», la combinación de ambos, son productos muy habituales en el mercado y su utilización está muy extendida en el campo de la nutrición animal. No obstante, los «posbióticos», el miembro más novedoso de la familia de los compuestos bioactivos aún no es muy conocido. Si bien los probióticos son generalmente las bacterias vivas que producen sustancias beneficiosas para la salud, los posbióticos engloban toda aquella preparación que incluya tanto los microorganismos beneficiosos inanimados como sus componentes (Salminen et al., 2021). El consenso publicado a mediados del año 2021 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) indica que el término «inanimadas» en lugar de «inactivadas», haciendo referencia a las células microbianas, radica en que la utilización de microorganismos que no estén vivos no implica que estos hayan perdido su funcionalidad.

Así, los posbióticos son productos o subproductos metabólicos bioactivos, secretados por bacterias vivas o liberados a partir de la lisis de la membrana celular bacteriana, que

pueden ser utilizados para mejorar la salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019). Los posbióticos pueden incluir metabolitos como enzimas, péptidos, proteínas, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y lípidos (AGCC); y componentes estructurales, fundamentalmente de la pared celular bacteriana, como ácidos teicoico y lipoteicoico, peptidoglicano, proteínas de la capa superficial bacteriana y otros polisacáridos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).

La gran potencialidad de los posbióticos en producción animal se le atribuye debido a la gran variedad de los efectos de sus componentes, que pueden ser tanto locales, principalmente a nivel intestinal, como sistémico, mediante la acción reguladora de sus moléculas. No obstante, depende en gran medida de la cepa bacteriana que se utilice en su producción y de los tipos de compuestos bioactivos que produzcan, que en ocasiones son difíciles de cuantificar y caracterizar. El número de estudios en esta área es todavía muy limitado, por lo que es necesaria una mayor investigación, en especial en condiciones reales de campo.

El **objetivo** general de este capítulo es evaluar el efecto beneficioso de un producto posbiótico elaborado a partir de una selección de BAL sobre los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en corderos de cebo.

Para ello, los **objetivos** específicos son los siguientes:

- Realizar una selección de BAL beneficiosas para elaborar un producto posbiótico con los compuestos bioactivos producidos por las mismas que sea específico para el control de los procesos infecciosos más comunes en un cebadero de ovino.
- Analizar el efecto de la administración del producto añadido al pienso de cebo sobre los indicadores sanitarios y su repercusión sobre los parámetros productivos de los corderos.

MÉTODO

1. Diagnóstico previo de procesos infecciosos en el cebadero

Como paso previo al estudio, se llevó a cabo un análisis completo para diagnosticar los procesos infecciosos más frecuentes en corderos de cebo y detectar el momento de máxima incidencia de estos procesos. Se evaluó el historial clínico de los animales enfermos y/o que causaron baja en los meses previos al ensayo y posteriormente se realizaron 20 necropsias regladas y completas de corderos fallecidos en el cebadero entre los meses de mayo y junio de 2019. Se aislaron los agentes infecciosos involucrados y se determinó el cuadro patológico que presentaban los animales (respiratorio, digestivo, septicémico, etc.), el curso de la enfermedad (agudo o crónico) y la causa más probable de la muerte.

En el caso de los pulmones, se realizó un estudio macroscópico para evaluar el tipo de neumonía (bronconeumonía, neumonía intersticial, neumonía fibrinosa o neumonía tromboembólica) el curso de las lesiones (agudo o crónico), la presencia de exudado (seroso, fibrinoso o purulento) el grado de extensión o afectación del pulmón (% de órgano afectado). Se tomaron muestras de los pulmones, hígado, riñón e intestino de los corderos y se realizó cultivo en medios Agar Sangre y MacConkey para el aislamiento de bacterias, que fueron inicialmente identificadas mediante pruebas bioquímicas básicas (catalasa y oxidasa), por sus características tintoriales (tinción de Gram) y la galería API®ID (bioMérieux). Los aislados bacterianos potencialmente patógenos fueron confirmados mediante técnicas moleculares y se conservaron con un 15 % de glicerol a -80 °C para pruebas posteriores.

2. Selección de BAL con actividad frente a los patógenos más frecuentes del cebadero

Para realizar la selección de BAL con actividad antimicrobiana frente a los patógenos obtenidos en el cebadero, se empleó la técnica de microdilución en caldo mediante los

procedimientos previamente descritos en esta tesis doctoral. También se tuvieron en cuenta los resultados de estudios previos de la capacidad inmunomoduladora de los aislados, seleccionando aquellas BAL que potencialmente podrían favorecer la activación de rutas inmunitarias protectoras frente a los procesos infecciosos diagnosticados.

3. Elaboración del producto posbiótico

En función de los resultados de los procedimientos anteriores, se seleccionó una combinación de BAL que pueda favorecer el control de los patógenos en el cebadero de ovino. Las BAL seleccionadas están depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron utilizada para desarrollar un producto posbiótico cuya composición está protegida por secreto industrial.

De forma general, el posbiótico se obtiene a partir de la fermentación de los cultivos de microorganismos que son transformados durante el propio proceso de fabricación conforme al reglamento (UE) 2017/1017 (European Commission, 2017). El proceso general fue desarrollado en las instalaciones de la empresa PentaBiol S.L. (Navarra, España) y consiste en una fermentación líquida en medios de cultivo en un circuito de fermentadores cerrado, controlando diferentes parámetros como temperatura, pH y contaminaciones con microorganismos no deseados, seguida de una inactivación. La fase final de producción incluye una etapa de secado del producto fermentado y el molido en un molino de molturación.

El producto final obtenido se presenta como gránulos desecados, está registrado como suplemento alimentario y se añade al pienso animal sin alterar la composición analítica del mismo ni los patrones dietéticos de los animales. Además, se considera seguro para su uso como complemento alimenticio debido a que todas las BAL utilizadas durante el proceso de fermentación cumplen los requisitos de la evaluación de QPS (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021).

4. Diseño del estudio experimental: elaboración de los grupos de estudio

El estudio fue desarrollado en un cebadero de ovino (Fomento Ovino Extremeño, FOVEX, S.A.T.) durante el periodo de cebo de corderos en la época de máxima incidencia de procesos infecciosos. Esta fue detectada mediante la evaluación del historial clínico previo de un cebadero perteneciente a la misma cooperativa, con animales del mismo origen y, por tanto, con procesos infecciosos similares. Un total de 200 corderos de unos 2 meses de edad y 18 Kg de peso vivo fueron distribuidos de forma aleatoria en dos grupos de 100 animales, como se detalla en la Figura 5.3 y su pauta de alimentación se realizó como se describe en la tabla 5.1. Todos los animales fueron identificados individualmente mediante doble crotal electrónico.



Figura 5.3. Detalle de los grupos de estudio en el cebadero

Tabla 5.1. Diseño de los grupos de estudio

Grupo	Alimentación
Control	Se alimentaron con el pienso de cebo estándar durante el periodo de cebo
Suplementado	Recibieron el mismo pienso estándar suplementado con un 0,4 % del producto posbiótico (4 gramos por kilogramo de pienso) durante todo el periodo de cebo

Todos los animales se alimentaron *ad libitum* durante las 7 semanas y media de realización del estudio, previas a su transporte al matadero, y tenían agua de bebida a su disposición en todo momento.

5. Estimación de los parámetros sanitarios

Los indicadores sanitarios monitorizados durante el estudio fueron el índice de mortalidad, los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos antes y después del cebo y el estudio macroscópico de las lesiones detectadas, principalmente en los pulmones, tras el sacrificio en el matadero.

Índice de mortalidad

Se estimó el índice de mortalidad de cada grupo anotando las bajas detectadas a lo largo de la realización del estudio. El índice de mortalidad se expresa en porcentaje y relaciona el número de animales fallecidos con respecto al total.

Analíticas sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre de 50 animales elegidos de forma aleatoria de cada grupo mediante punción en la vena yugular al inicio del estudio y al final de la experiencia, previo al sacrificio. Las muestras de sangre entera se recogieron en tubos

con EDTA para análisis hematológico y las muestras para la obtención del suero se depositaron en tubos con activador de la coagulación para la determinación de los parámetros bioquímicos. Las muestras se transportaron a 4 °C y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, donde el suero se obtuvo mediante centrifugación a 3000 r.p.m.

Se realizaron hemogramas completos mediante un analizador de hematología (Celltac α MEK-6550, Nihon Kohden) para determinar los parámetros de la serie roja, que incluye recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM); la serie blanca, que incluye recuento de leucocitos y porcentaje de linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos; y la serie plaquetar.

Además, se realizó un perfil bioquímico completo mediante un analizador automático de química clínica (Biosystem A15) para determinar el perfil proteico, es decir, las proteínas totales y la albúmina; el perfil hepático, que incluye las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) y la bilirrubina; el perfil renal, que incluye la creatinina y la urea; y otros parámetros del perfil general como la fosfatasa alcalina (ALP) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

Estudio macroscópico de las lesiones

El sacrificio de los animales se realizó en el matadero de EA Group localizado junto al cebadero del estudio siguiendo la normativa vigente según el Reglamento (CE) 1099/2009. Los corderos fueron eviscerados y se inspeccionaron las canales de cada uno de ellos de forma individual, manteniendo la identificación de los animales en todo momento. La inspección macroscópica *post mortem* incluyó todas las cavidades y órganos y, más detalladamente, los pulmones con todos sus lóbulos y los nódulos linfáticos adyacentes. La categorización de las lesiones se realizó de la misma manera a la descrita para el diagnóstico de procesos durante las necropsias, en la fase previa a este estudio. Además, se tomaron muestras de 6 pulmones con lesiones de cada grupo

para realizar un diagnóstico de los agentes microbianos causantes de la lesión, que se procesaron de la misma forma a la descrita para el aislamiento y la identificación de patógenos.

Por otro lado, todos los animales que causaron baja durante el desarrollo del estudio experimental fueron sometidos a necropsia reglada y a un minucioso procedimiento de diagnóstico de los procesos patológicos para establecer la causa de la muerte, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

6. Recogida de datos y toma de muestras

Cálculo de los parámetros productivos

Se evaluó la mejora en la productividad de los animales mediante el cálculo de tres indicadores productivos: la ganancia media diaria (GMD), el índice de conversión (IC) y el rendimiento de la canal.

Ganancia media diaria

Se recogió el peso de los corderos mediante una báscula de pesaje electrónica con capacidad de lectura de crotales antes de la realización del estudio experimental (Figura 5.4), durante el estudio y al finalizar este, previo al sacrificio, para calcular la Ganancia Media Diaria (GMD) en dos periodos diferentes (del primer pesaje al segundo y del segundo pesaje al tercero) y la GMD total (del primer pesaje al último). La GMD es un indicador productivo que se utiliza para medir la velocidad de crecimiento y viene definido como la cantidad de peso ganado al día por los animales. Se calcula dividiendo el peso ganado por los animales de ambos grupos entre el número de días de duración del estudio.



Figura 5.4. Báscula de pesaje electrónica en el cebadero

Índice de conversión

El Índice de Conversión (IC) es un parámetro de rendimiento productivo que se define como la cantidad de alimento necesario para reponer 1 Kg de peso vivo, por lo que es un parámetro de eficiencia alimentaria. Se calcula dividiendo el consumo total de pienso entre la ganancia total de peso. Para su cálculo en nuestra experiencia hemos obtenido la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y el pienso que no fue consumido por los animales.

Rendimiento de la canal

Se obtuvo el peso de la canal, que es el peso del cuerpo del animal sacrificado, desangrado, desollado y eviscerado, sin cabeza ni extremidades, que se realiza de forma automática al final de la cadena de sacrificio. Este valor se obtuvo de forma automática al final de la cadena de sacrificio y permite calcular el rendimiento de la canal, que es la

relación entre el peso vivo del animal antes del sacrificio y el peso de la canal y se expresa en porcentaje.

7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis inferencial para detectar las diferencias en los parámetros descritos entre los dos grupos del estudio. Las variables cuantitativas se analizaron mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. Por el contrario, las diferencias entre las variables cualitativas se exploraron mediante la prueba Chi-cuadrado. Los programas estadísticos utilizados fueron R-4.0.4 y GraphPad Prism 8.

En la figura 5.5 se muestra una cronología con las etapas del estudio experimental descrito.

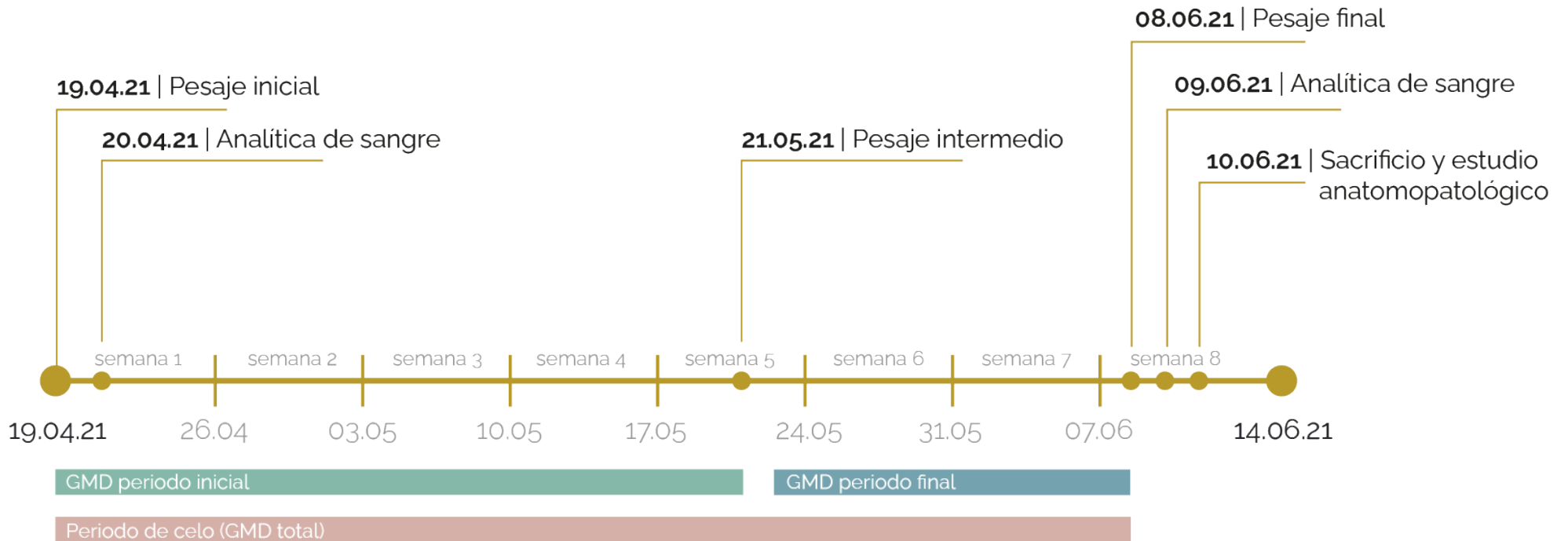


Figura 5.5. Cronología de la realización del estudio experimental

Figura resumen del método

01.

Diagnóstico de procesos infecciosos.



02.

Selección de BAL.



03.

Elaboración del posbiótico



04.

Diseño experimental: elaboración de los grupos.



05.

Evaluación del efecto del posbiótico sobre los indicadores sanitarios y productivos.



06.

Estudio estadístico.



RESULTADOS

Las neumonías por *Pasteurella* spp. constituyen uno de los procesos más frecuentes en los cebaderos de ovino

Se estudió la historia clínica de un cebadero de ovino, que fue completada con la realización de 20 necropsias de animales fallecidos en los meses de mayo y junio de 2019 para diagnosticar la principal causa de la muerte y diseñar un producto para prevenir los cuadros infecciosos más frecuentes. Se llevó a cabo la inspección macroscópica de los órganos torácicos y abdominales de todos los animales, pero solo se procesaron en el laboratorio los órganos de 19 animales debido a que uno de ellos presentaba un alto grado de autólisis.

Se aislaron diferentes especies de *Pasteurella* spp. en el 83,33% de los pulmones con lesiones neumónicas, que fueron identificadas como *P. multocida* tipo A en el 60 % de ellos, tipo B en el 6,67 % y tipo D en el 13,33 %. Algunos de los pulmones presentaban coinfecciones con otros patógenos como *Mycoplasma* spp., *Biberstenia trehalosi*, *Streptococcus* spp. o *E. coli*.

Se realizaron diferentes ensayos de actividad antimicrobiana de la colección de aislados de BAL frente a los patógenos más frecuentes del cebadero. Para la preparación del producto posbiótico para elaborar el pienso con actividad funcional, se seleccionaron varias BAL en función de los resultados de la actividad antimicrobiana. Además, también se tuvo en cuenta la activación de rutas del sistema inmunitario descrita en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral y que puedan resultar de utilidad para la protección de los animales frente a estos patógenos.

Todos los resultados del diagnóstico de procesos y de los ensayos de actividad se encuentran detallados en los Apéndices IIIA y IIIB, respectivamente.

Los animales suplementados presentan menos lesiones neumónicas y de menor extensión

No se obtuvieron diferencias en el porcentaje de mortalidad, puesto que se registró un 4 % de bajas en los dos grupos del estudio. Las causas de la muerte fueron similares en los dos grupos, registrándose en la mayoría de los casos lesiones neumónicas en las que se aisló *Pasteurella* spp., seguido de algún posible caso de *Clostridium* spp. en el grupo suplementado y otras causas no asociadas a procesos infecciosos de las cuales no se determinó el origen. El número de bajas no fue suficiente para realizar inferencia estadística.

En cuanto a las lesiones neumónicas (Figura 5.6), se observó la misma tendencia cuando se exploran estas de forma cualitativa, es decir presencia o ausencia de lesiones, como de forma cuantitativa, es decir, porcentaje de extensión de las lesiones (Figura 5.7A y 5.7B). Se detectaron lesiones neumónicas en 63 corderos del grupo control (65,62 %) y 50 corderos del grupo suplementado (52,08 %) y la media de los porcentajes de extensión de estas fue de 15,24 % y 12,3 %, respectivamente. Se observan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza al 90 % ($\chi^2= 3,097$, $P=0,078$) en la presencia de lesiones, pero no en el porcentaje de extensión de las mismas ($P=0,319$), aunque la tendencia es igualmente positiva. Los animales suplementados con el posbiótico presentan menos lesiones y de menor extensión que los animales del grupo control. Por otro lado, el porcentaje de decomisos fue similar en ambos grupos ($\chi^2= 0,218$, $P=0,64$) aunque se produjeron menos decomisos en el grupo suplementado, se encontraron un 33,33 % de decomisos en el grupo control y un 29,17 % en el grupo suplementado (Figura 5.7C). Por el contrario, con respecto a los patrones de las lesiones, así como su duración y el tipo de exudado, no se observa una tendencia clara y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 3,93$, $P= 0,14$; $\chi^2= 1,156$, $P= 0,763$; $\chi^2=4,628$, $P=0,592$).

El patógeno *P. multocida* tipo A es más prevalente en las lesiones neumónicas del grupo control

En el grupo control se obtuvieron cultivos puros de *P. multocida* (fundamentalmente tipo A, a excepción de un aislado de tipo D) en el 66,67 % de los pulmones muestreados. Sin embargo, en el grupo suplementado, *P. multocida* solo se registró en el 33,33 % de los pulmones muestreados. En el resto de los pulmones de este grupo se obtuvieron varios cultivos mixtos en los que no se determinó ningún patógeno predominante que pudiera ser causante de enfermedad. La especie *Aeromonas hydrophila* se detectó en la misma proporción en los dos grupos (Figura 5.7D).

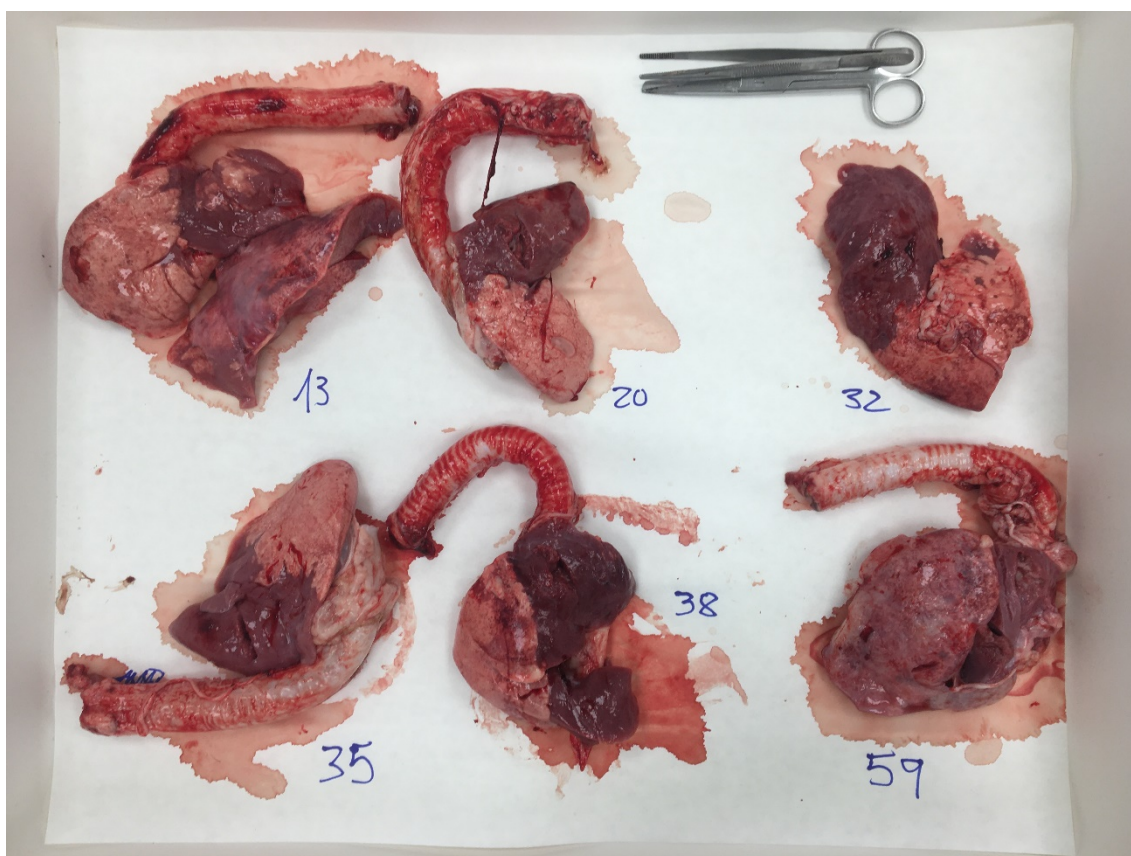


Figura 5.6. Distintos tipos de lesiones neumónicas encontradas durante el análisis macroscópico realizado tras el sacrificio de los animales en el matadero.

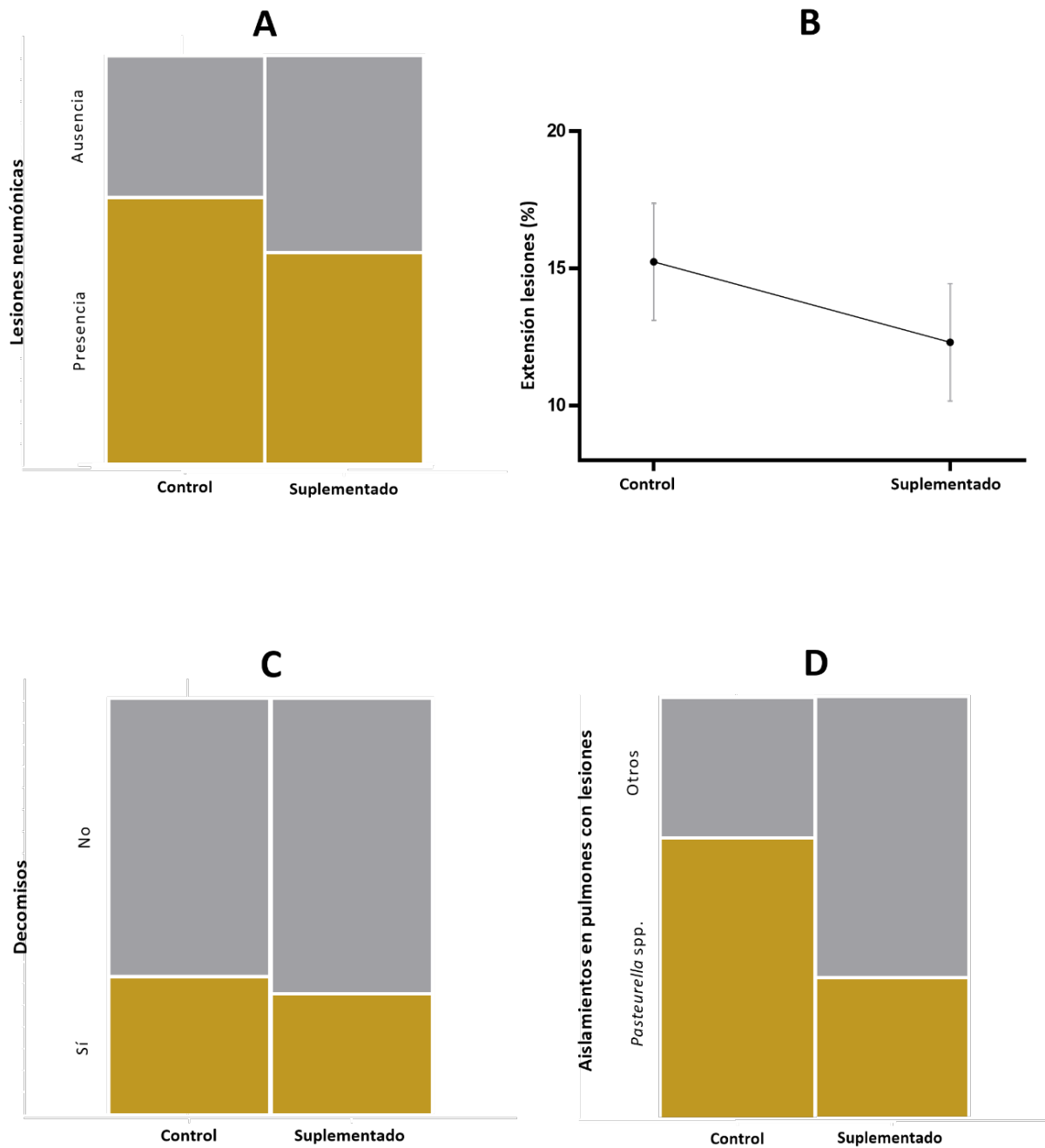


Figura 5.7. Mejora en los indicadores sanitarios en el grupo suplementado con el posbiótico. **(A)** El grupo control muestra mayor porcentaje de pulmones con lesiones neumónicas y **(B)** el grupo control presenta lesiones más extensas, esto es, de mayor gravedad, que el grupo suplementado. Los resultados se expresan en porcentaje de media y el error estándar de esta. **(C)** Mayor porcentaje de decomisos en el grupo suplementado. **(D)** El patógeno *Pasteurella* spp. fue el aislamiento predominante en los pulmones con lesiones neumónicas del grupo control, a diferencia del grupo suplementado.

Los animales suplementados muestran una mayor velocidad de crecimiento y una mayor eficiencia alimentaria

En cuanto a los pesos, se observaron diferencias estadísticamente significativas antes de comenzar el estudio, siendo el grupo suplementado el grupo con el peso medio más bajo ($P=0,004$). No obstante, durante la experiencia y una vez finalizado el periodo de suplementación, la media de los pesos fue similar entre los grupos ($P= 0,849$ y $P=0,996$, respectivamente). Esto viene refrendado por las diferencias encontradas en la GMD, que es un indicador de la velocidad de crecimiento, y que fue mayor en el grupo suplementado en el periodo inicial ($P=0,003$), así como en todo el periodo de cebo ($P=0,14$). La GMD del periodo final fue similar entre los grupos ($P=0,776$). Los animales del grupo que recibió el posbiótico tienen una velocidad de crecimiento más elevada y son capaces de alcanzar el mismo peso final partiendo de un peso inferior. De forma similar, se observó un IC inferior en el grupo suplementado, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($P=0,126$). Por otro lado, no se observaron diferencias en los pesos a la canal ni en los rendimientos de esta ($P=0,992$ y $P=0,632$, respectivamente). Todos los resultados se muestran en la Tabla 5.2 y la Figura 5.8.

Tabla 5.2. Resultados de los parámetros productivos por grupos de estudio

Parámetros	Control	Suplementado
Peso inicial (Kg)	18,77	18,22 ***
Peso mitad (Kg)	24,13	24,2
Peso final (Kg)	27,58	27,57
GMD 1 (g)	165,99	186,07 **
GMD 2 (g)	178,95	175,89
GMD Total (g)	172,04	182,80
Peso Canal (Kg)	12,79	12,79
Rendimiento (%)	46,39	46,24
IC	6,23	5,14

***Diferencias significativas entre grupos ($P=0,004$)

**Diferencias significativas entre grupos ($P=0,003$)

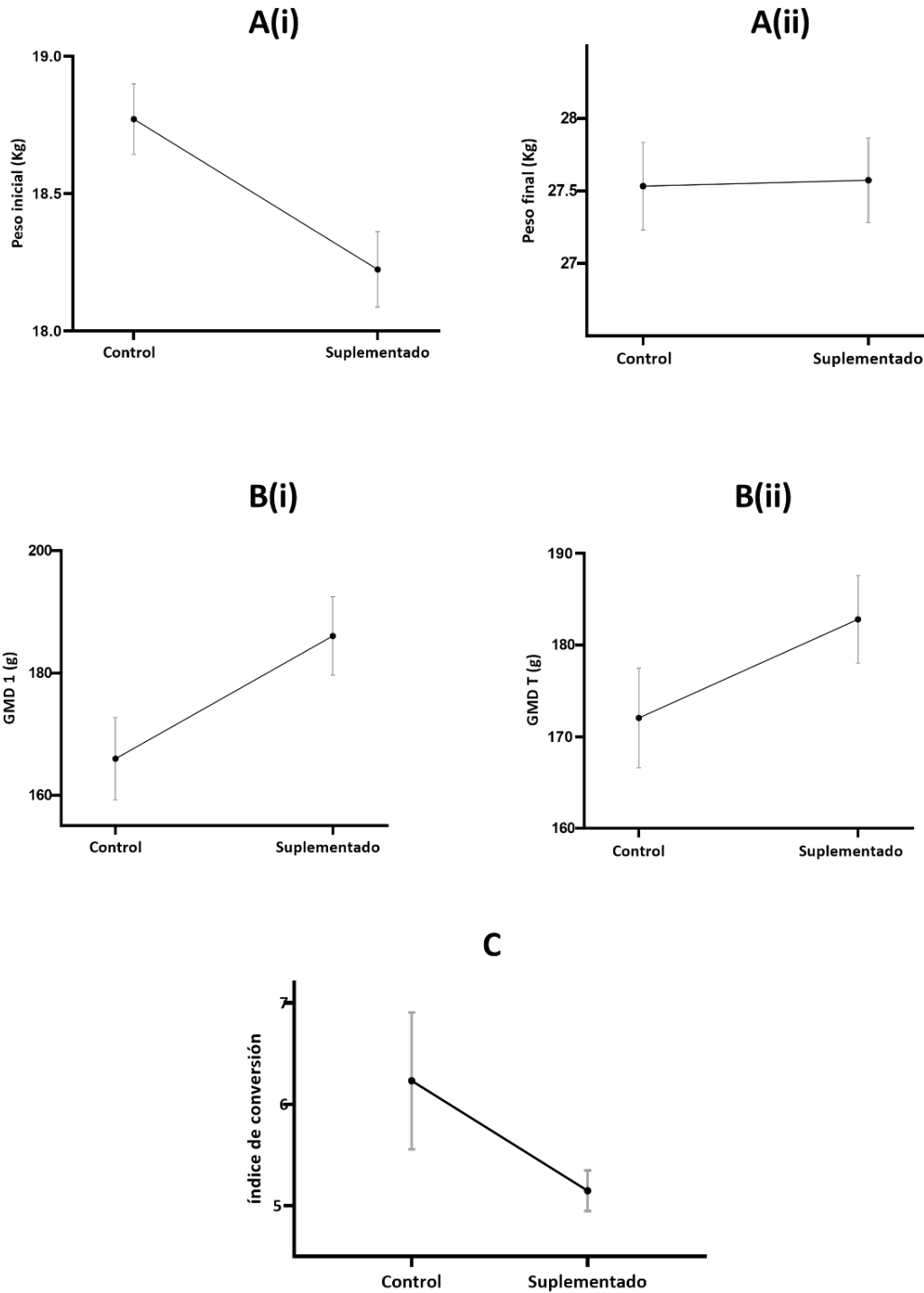


Figura 5.8. Mejora en los parámetros productivos del grupo suplementado. Los datos se expresan como media y error estándar de la media. **(Ai)** El grupo suplementado partía de una media de pesos menor antes del inicio de la experiencia ($P=0,004$) y **(Aii)** alcanzó el mismo peso final que el grupo control al final del cebo ($P=0,996$) **(B)** El ritmo de crecimiento, expresado en Ganancia Media Diaria (GMD, g), fue superior en el grupo suplementado (GMD en el primer periodo $P=0,0975$, GMD total $P=0,236$). **(C)** El índice de conversión fue inferior en el grupo suplementado.

Las analíticas realizadas a los corderos no arrojan datos de interés clínico relevante y la urea podría indicar un mejor aprovechamiento de las proteínas del pienso

No se observaron diferencias en los hemogramas de los grupos de estudio antes y después de la experiencia y todos los valores están dentro de los rangos de referencia para la especie ovina (Tablas 5.3 y 5.4).

En los parámetros bioquímicos se observaron diferencias entre los grupos, pero no revisten de una importancia clínica relevante (Tablas 5.5 y 5.6). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la enzima ALP ($P=0,094$), que es superior en el grupo suplementado tras la suplementación, y podría estar relacionado con la mayor velocidad de crecimiento de estos corderos. Por otro lado, se detectaron valores superiores a los rangos de referencia para ovinos en general en las actividades enzimáticas de la AST y LDH en ambos grupos de estudio, posiblemente relacionado con la toma o el manejo de las muestras. En los corderos del grupo suplementado se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,001$) en los niveles de urea detectados en suero, que por lo general son muy elevados en todos los animales, posiblemente por la alta concentración de proteínas del pienso de cebo. Es probable que en estos animales la urea sea significativamente inferior por un mejor aprovechamiento de las proteínas del pienso debido a la administración del posbiótico.

Tabla 5.3. Hemogramas completos de cada grupo al inicio de la experiencia, valores de referencia y sus unidades

Serie	Parámetro	Valores referencia ^a	Unidades	Control	Suplementado
Roja	Hematíes	9-15	10 ⁶ /μl	10,78	10,87
	Hemoglobina	9-15	g/dl	9,78	9,7
	Hematocrito	27-45	%	32,15	32,36
	VCM	28-40	fl	30,09	29,85
	HCM	8-12	pg	9,62	8,95
	CHMC	31-34	g/dl	30,12	30
Blanca	Leucocitos	4-12	10 ³ /μl	10,01	10,67
	Linfocitos	40-75	%	43	39
	Neutrófilos	10-50	%	51	50
	Monocitos	0-6	%	2	3
	Eosinófilos	0-10	%	4	7
Plaquetar	Plaquetas	300-750	10 ³ /μl	653,6	651,2

^a Valores hematológicos de referencia para ovinos (Byers y Kramer, 2010)

Tabla 5.4. Hemogramas completos al final de la experiencia de cada grupo de estudio, valores de referencia y sus unidades

Serie	Parámetro	Valores referencia ^a	Unidades	Control	Suplementado
Roja	Hematíes	9-15	10 ⁶ /μl	11,23	10,79
	Hemoglobina	9-15	g/dl	10,10	9,93
	Hematocrito	27-45	%	33,29	31,9
	VCM	28-40	fl	29,43	29,82
	HCM	8-12	pg	8,93	9,66
	CHMC	31-34	g/dl	30,36	30,69
Blanca	Leucocitos	4-12	10 ³ /μl	8,4	8,36
	Linfocitos	40-75	%	50	52
	Neutrófilos	10-50	%	40	40
	Monocitos	0-6	%	2	2
	Eosinófilos	0-10	%	8	2,9
Plaquetar	Plaquetas	300-750	10 ³ /μl	704,4	598

^a Valores hematológicos de referencia para ovinos (Byers y Kramer, 2010)

Tabla 5.5. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo antes del estudio, valores de referencia y sus unidades

Perfil	Parámetro	Valores referencia ^a	Unidades	Control	Suplementado
Proteico	Proteínas totales	5.9-7.8	g/dl	5,84	5,81
	Albúmina	2.7-3.7	g/dl	3,31	2,8***
Hepático	ALT	20-25	UI/l	19,31	21,24
	AST	49-123	UI/l	261,6	192,4
	Bilirrubina	0-0.5	mg/dl	0,094	0,08
Renal	Creatinina	0.9-2	mg/dl	0,61	0,63
	Urea	10-26	mg/dl	26,78	27,15
General	ALP	68-387	UI/l	265,7	280,9
	LDH	83-476	UI/l	1211	1101

^a Valores bioquímicos de referencia para ovinos (Kaneko et al., 2008; Latimer, 2011)

***Diferencias significativas entre grupos (albúmina P = 3,66x10⁻¹¹)

Tabla 5.6. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo al finalizar el estudio, valores de referencia y sus unidades

Perfil	Parámetro	Valores referencia ^a	Unidades	Control	Suplementado
Proteico	Proteínas totales	5.9-7.8	g/dl	20,95	6,12
	Albúmina	2.7-3.7	g/dl	3,37	3,3
Hepático	ALT	20-25	UI/l	22,09	23,47
	AST	49-123	UI/l	156,4	160,8
	Bilirrubina	0-0.5	mg/dl	0,083**	0,13
Renal	Creatinina	0.9-2	mg/dl	0,64	0,63
	Urea	10-26	mg/dl	42,19	34,94**
General	ALP	68-387	UI/l	156,4	326,4*
	LDH	83-476	UI/l	1538	1607

^a Valores bioquímicos de referencia para ovinos (Kaneko et al., 2008; Latimer, 2011)

***Diferencias significativas entre grupos (P=0,094)

**Diferencias significativas entre grupos (bilirrubina P=0,002 y urea P = 0,001)

DISCUSIÓN

La intensificación de las producciones ganaderas se ha incrementado como respuesta al aumento en la demanda de productos de origen animal y, además, ha contribuido a la diseminación de las resistencias antimicrobianas y a la emergencia de patógenos zoonóticos (Alexandratos y Bruinsma, 2012). De hecho, la creciente preocupación por la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos ocasionó la prohibición de la utilización de estos como promotores del crecimiento en el año 2006 (EC/1831/2003), y a partir de ahí se han desarrollado distintas estrategias recogidas en el PRAN (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos, 2014-2018;2019-2021) cuyo objetivo es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos y, consecuentemente, reducir el impacto de este problema sobre la salud de las personas y los animales, preservando de manera sostenible la eficacia de los antibióticos existentes.. Desde ese momento, la comunidad científica busca alternativas para mejorar los indicadores productivos de los animales, para satisfacer la demanda de alimentos de origen animal y, sobre todo, su salud, para garantizar como fin último la salud humana bajo el concepto «One Health».

La utilización de piensos funcionales enriquecidos con posbióticos constituyen una novedosa estrategia que se ha propuesto recientemente para mejorar tanto la salud como el rendimiento productivo de los animales, pero han sido escasamente investigados en estudios *in vivo* hasta la fecha, especialmente en el caso de los rumiantes. En este capítulo se describe la utilización de un posbiótico para evaluar su efecto sobre ciertos indicadores sanitarios, así como su impacto sobre los parámetros productivos, especialmente diseñado para el control de las pasteurelosis, un problema muy frecuente en cebaderos de ovino. La pasteurelosis es una de las enfermedades respiratorias que tiene un mayor impacto económico en todo el mundo (Radostits et al., 2007). En el ganado ovino, representa una de las principales causas de pérdidas económicas debido a la elevada morbilidad, gastos en tratamientos y a su influencia negativa sobre el rendimiento productivo de los corderos (Lacasta et al., 2008; Martín-

Palomino, 2020). Esta aproximación sanitaria es diferente a la del resto de estudios similares en esta y otras especies de animales de producción, puesto que se mejoró la rentabilidad de los corderos gracias al control de determinados procesos infecciosos mediante la utilización de un pienso funcional específicamente diseñado para la mejora de los problemas sanitarios más frecuentes de la explotación.

En el análisis previo al estudio experimental descrito en este capítulo, se realizó una evaluación del historial clínico de un cebadero de ovino para detectar los momentos de mayor incidencia de procesos infecciosos, así como un diagnóstico completo para aislar los patógenos causantes de enfermedad. Se estableció la infección por *P. multocida* tipo A como la enfermedad más frecuente del cebadero, pese a que las neumonías que causa, en ocasiones, pueden manifestarse de forma subclínica sin presencia de sintomatología evidente (García-Jiménez et al., 2019). De hecho, las lesiones que produce constituyen una causa frecuente de decomisos en matadero (García-Jiménez et al., 2019; Martín-Palomino, 2020). Los factores de estrés asociados al periodo de cebo y las condiciones climatológicas adversas pueden favorecer al padecimiento de la enfermedad y a la bajada consecuente del rendimiento productivo de los animales (González et al., 2016; Lacasta et al., 2008; Martín-Palomino, 2020). De hecho, se detectó que la máxima incidencia de pasteurelisis en el cebadero analizado se corresponde con el final de la primavera y el verano en Extremadura, región en la que se localiza el mismo. Por todo esto, se realizó un estudio experimental para tratar de controlar las neumonías infecciosas producidas fundamentalmente por *P. multocida*, considerado un residente habitual de la microbiota respiratoria ovina, que puede actuar como patógeno oportunista cuando se dan los condicionantes anteriormente mencionados y que afecta de forma sustancial al rendimiento productivo (Martín-Palomino, 2020).

Para el diseño del posbiótico se realizó un exhaustivo trabajo previo de selección y caracterización de bacterias potencialmente beneficiosas, que ha sido descrito los capítulos anteriores de esta tesis doctoral, seguido de la infección experimental descrita en modelo ratón para garantizar la seguridad de los compuestos. Como estudio complementario, en este capítulo, las bacterias candidatas a ser incluidas en el producto

diseñado para el cebadero en cuestión, fueron enfrentadas a los aislados patógenos más comunes del cebadero, brindando especial interés a los resultados frente a las especies de la familia Pasteurellaceae. Este último estudio permitió acotar una selección final de BAL a partir de las cuales se fabricó el producto posbiótico. Este producto fue añadido a una concentración del 0,4 % a la alimentación estándar de un grupo de corderos en cebo, cuyos indicadores sanitarios y productivos fueron mejores que los del grupo que no fue suplementado.

En cuanto a los indicadores sanitarios, el grupo suplementado mostró menores lesiones neumónicas y de menor extensión que el grupo control y, aunque las diferencias encontradas fueron menores, también se observó una tendencia positiva en el porcentaje de decomisos, que fue menor en los corderos suplementados. De hecho, un resultado para tener en cuenta es que se detectó una menor presencia del patógeno *P. multocida* tipo A en los pulmones con lesiones neumónicas de los grupos suplementados, puesto que este patógeno se seleccionó como modelo frente al cual se diseñaron los experimentos de cribado para elaborar el posbiótico. Tal y como se describió en el capítulo II de esta tesis doctoral, las BAL contenidas en el producto tienen potencial para interactuar con los macrófagos del hospedador, específicamente activando la ruta inmunitaria mediada por el factor de señalización NF-κB. Esta cascada de señalización podría estar contribuyendo al control de la infección producida por *P. multocida* en el cebadero y conferir cierta protección frente al desarrollo de las lesiones, puesto que se ha comprobado previamente que la activación de NF-κB vía TLR2 en el hospedador por esta y otras especies del género podría ser importante tanto para el control como para la prevención de la enfermedad (He et al., 2020; Hsuan et al., 1999). Por otro lado, se desconoce si los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL beneficiosas, que mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente al patógeno seleccionado, pueden alcanzar el pulmón cuando son administrados por vía oral, aunque tanto los resultados de la neumonía experimental descrita en el capítulo IV como estos podrían indicar que se produce una migración vía sistémica. De hecho, la modulación de la microbiota gastrointestinal puede favorecer la resolución de procesos que afectan al aparato respiratorio debido a la interacción conocida con el nombre de «eje intestino-

pulmón», que está recibiendo cada vez más atención en la comunidad científica durante los últimos años (He et al., 2017). En futuros estudios se ahondará en los mecanismos responsables de estos efectos beneficiosos observados.

En cuanto a los indicadores productivos, la ganancia media diaria (GMD) es un indicador muy utilizado para medir la velocidad de crecimiento de los animales. El ritmo de crecimiento en animales de producción tiene una primera fase de crecimiento rápido en el que la GMD alcanza un valor máximo para comenzar a descender cuando el animal logra aproximadamente un 30 % de su peso adulto, que es cuando el crecimiento disminuye progresivamente hasta estabilizarse (Lawrence et al., 2012). Por ello, en este estudio, observamos que la mayor diferencia entre el grupo control y el suplementado se detecta en el primer periodo de cebo considerado, momento en el que el ritmo de crecimiento es mayor, y eso se traduce en una GMD total al final del periodo de cebo también superior. El índice de conversión (IC), un parámetro de eficiencia alimentaria fue menor en el grupo suplementado, lo que supone una tendencia positiva, aunque en este caso las diferencias detectadas no son estadísticamente significativas.

La mejora en los indicadores productivos de los animales puede ser debida a que la administración de piensos con aditivos funcionales favorece la modulación de la microbiota, creando un equilibrio favorable entre poblaciones bacterianas que aportan un beneficio al hospedador y los grupos potencialmente nocivos (Pessione, 2012; Piqué et al., 2019). La mayor proporción de poblaciones bacterianas como lactobacilos favorece el incremento en la actividad enzimática ruminal e intestinal, lo que aumenta la digestibilidad de determinados nutrientes (LeBlanc et al., 2011; Pessione, 2012). Además, también se ha descrito en algunos estudios el aumento en la longitud de las vellosidades intestinales, incrementando la superficie de absorción de nutrientes, lo que se traduce en un mejor aprovechamiento de los alimentos y, con ello, un crecimiento más eficiente de los animales (Bajagai et al., 2016; Fleige et al., 2007; Saleem et al., 2017). De hecho, un estudio realizado en corderos destetados suplementados con posbióticos de *L. plantarum* describe un incremento en la altura y anchura de las papilas ruminales y un incremento en la función de barrera intestinal (Izuddin et al., 2019a); y otro estudio, también en corderos destetados, describe un aumento en los indicadores

productivos, el consumo de alimento y nutrientes y su digestibilidad (Izuddin et al., 2019b). Estos autores encontraron un incremento de la GMD de un 12,17 % en el grupo suplementado, muy similar al 12,1 % de incremento observado en la GMD del primer periodo en este estudio. Estos resultados sugieren que la administración de posbióticos podría ser suficiente únicamente durante las primeras semanas para acelerar el crecimiento de los corderos que inicien el periodo de cebo con un peso menor. No obstante, se podría plantear incrementar el porcentaje de posbiótico añadido al pienso funcional durante las últimas semanas previas a la finalización del cebo para tratar de detectar diferencias en la fase final, cuando el crecimiento de los animales comienza a estabilizarse (Lawrence et al., 2012).

Por otro lado, pese a que en todos los animales se observó una urea muy elevada, se descarta el fallo hepático o renal debido a que el resto de parámetros analíticos fueron normales y a que este parámetro no es un indicador válido para el diagnóstico de estas patologías debido al proceso fisiológico de reciclaje de la urea sanguínea que tiene lugar en el rumen (Getahun et al., 2019). La causa de estos niveles altos de urea podría ser el elevado porcentaje de proteína presente en el pienso de cebo. De hecho, en el grupo suplementado se encontraron unos niveles significativamente menores de urea en sangre, lo que parece indicar que estos animales poseen un mejor aprovechamiento de las proteínas del pienso. El metabolismo de las proteínas en rumiantes es diferente al del resto de mamíferos monogástricos, en el que los microorganismos del rumen tienen un papel fundamental para la síntesis de proteína microbiana. La utilización de compuestos bioactivos que modulan la microbiota intestinal podría estar contribuyendo al proceso fisiológico de metabolismo y síntesis de proteínas, optimizando los nutrientes de la dieta (Getahun et al., 2019; McCann et al., 2017). Los valores de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) son mayores en los corderos suplementados. Esta enzima no se asocia a daño hepático en esta especie, a diferencia de otras especies, y su elevada actividad enzimática se debe a que en animales jóvenes, especialmente aquellos cuyo crecimiento es mayor, la ALP indica una mayor actividad osteoblástica, ya que se libera durante el remodelado óseo (Latimer, 2011). De la misma forma, tanto la enzima AST como la LDH, ambas con valores por encima de los rangos de referencia para la especie ovina, no son

específicas para diagnóstico de patologías cuando se hallan de forma aislada, sino que sus valores se ven alterados si durante el procedimiento de toma de muestra o de obtención del suero, esta se encuentra moderadamente hemolizada (Latimer, 2011).

Por último, otros de los procesos comunes en el cebadero analizado se corresponden con las patologías digestivas de etiología infecciosa, debido a la disbiosis que producen los factores de estrés asociados al periodo de cebo, incluido el cambio de alimentación, el transporte y el hacinamiento de los animales. Los procesos digestivos no se han tenido en cuenta en el diseño del estudio experimental y, dado que el producto se administra por vía oral, es muy probable que los efectos detectados también se puedan estar viendo beneficiados por este y tengan una repercusión sobre los indicadores productivos. En futuras líneas de investigación, se tratará de dilucidar esta cuestión y se incluirán los patógenos digestivos en el procedimiento de cribado de BAL beneficiosas como paso previo a la elaboración del producto posbiótico.

El periodo de cebo es una etapa crucial para alcanzar la productividad óptima de los animales, pero las condiciones de intensificación conllevan situaciones de estrés para estos que pueden repercutir sobre su salud y, por ende, sobre el rendimiento productivo (González et al., 2016). Actualmente, el empleo de piensos funcionales enriquecidos con compuestos bioactivos es la principal alternativa para mejorar los parámetros productivos de los animales, incluso en situaciones de estrés, manteniendo tanto sus indicadores sanitarios en valores óptimos y respetando el bienestar animal, así como la normativa europea en materia de aditivos y regulación del uso de antimicrobianos (Bajagai et al., 2016). La gran ventaja que ofrecen los posbióticos con respecto a los probióticos es que no se requiere de la colonización para ejercer su acción, puesto que se añaden las moléculas funcionales producidas de forma óptima y además, el hecho de no incluir bacterias vivas en la preparación final facilita su conservación en condiciones de campo (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).

En este estudio, se realizó por primera vez una aproximación sanitaria para la consecución de una mejora en los parámetros productivos. El control de determinados procesos sanitarios, gracias a la utilización de un pienso funcional específicamente

diseñado para el patógeno más común del cebadero tuvo repercusión positiva, no solo sobre los indicadores sanitarios de los corderos, sino también sobre los indicadores productivos, mejorando la rentabilidad de estos.

CAPÍTULO VI

Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre



INTRODUCCIÓN

Importancia de la tuberculosis en todo el mundo

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica que afecta a un gran número de mamíferos, incluida la especie humana, y está causada por bacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC, *Mycobacterium tuberculosis* Complex), conocidas de forma general como «micobacterias». En la especie humana, hasta el año 2019, la TB figuraba entre las primeras 10 causas de muerte en todo el mundo. Actualmente, solo en África y Asia Sudoriental continúa siendo una de las principales causas de muerte, donde es la octava y quinta causa principal, respectivamente (*WHO Methods and Data Sources for Country-Level Causes of Death 2000-2019*, 2020).

En animales, la TB está causada por otras micobacterias pertenecientes al MTC y puede afectar a una gran variedad de hospedadores, como bovinos, cérvidos, caprinos, camélidos y otras especies domésticas y silvestres (Corner, 2006). La especie de micobacteria más importante en el mundo animal es *M. bovis*, causante de la TB bovina, pero también existen otras de relevancia como *M. caprae*. La TB bovina causa importantes pérdidas económicas en toda la cabaña ganadera mundial debido a su carácter crónico, que produce disminución de las producciones, y también debido a los decomisos producidos en mataderos y a la restricción en el movimiento de animales vivos (Ayele et al., 2004; Naranjo et al., 2008). En el caso de especies silvestres, la TB supone un problema sanitario importante en especies caza mayor y una amenaza importante para la conservación de especies en peligro de extinción, como el lince ibérico (Briones et al., 2000). Asimismo, está considerada como un problema de Salud Pública, puesto que la posibilidad de transmisión al ser humano hace que esta enfermedad sea una zoonosis. La principal vía de contagio al hombre suele ser la respiratoria mediante aerosoles, pero también se ha descrito la ingesta de material contaminado como vía de transmisión (De la Rúa-Domenech, 2006; Luciano y Roess, 2020).

Situación de la tuberculosis bovina en España

Gracias a los programas de erradicación de la TB bovina que se han llevado a cabo en España durante las últimas décadas, el porcentaje de rebaños positivos se ha reducido del 20 % en los años 70 a menos del 2 % en los últimos años (*Plan de Actuación Sobre Tuberculosis En Especies Silvestres*, 2017). No obstante, España es el tercer país de la UE, por detrás de Reino Unido e Irlanda, en prevalencia de esta enfermedad en la cabaña ganadera. Además, la situación epidemiológica de la TB bovina en España es variable entre las diferentes localizaciones geográficas: las regiones insulares se encuentran prácticamente libres, la zona norte y este tienen prevalencias relativamente bajas y las regiones del suroeste son las más problemáticas, con zonas de alta prevalencia (*Informe Final Técnico-Financiero Programa Nacional de La Tuberculosis Bovina Año 2019*, 2019) (Figura 6.1). Estos datos y algunos estudios realizados en España y en otros países demuestran que la TB bovina continúa siendo muy prevalente en zonas con alta densidad de hospedadores silvestres (Corner, 2006; Naranjo et al., 2008).

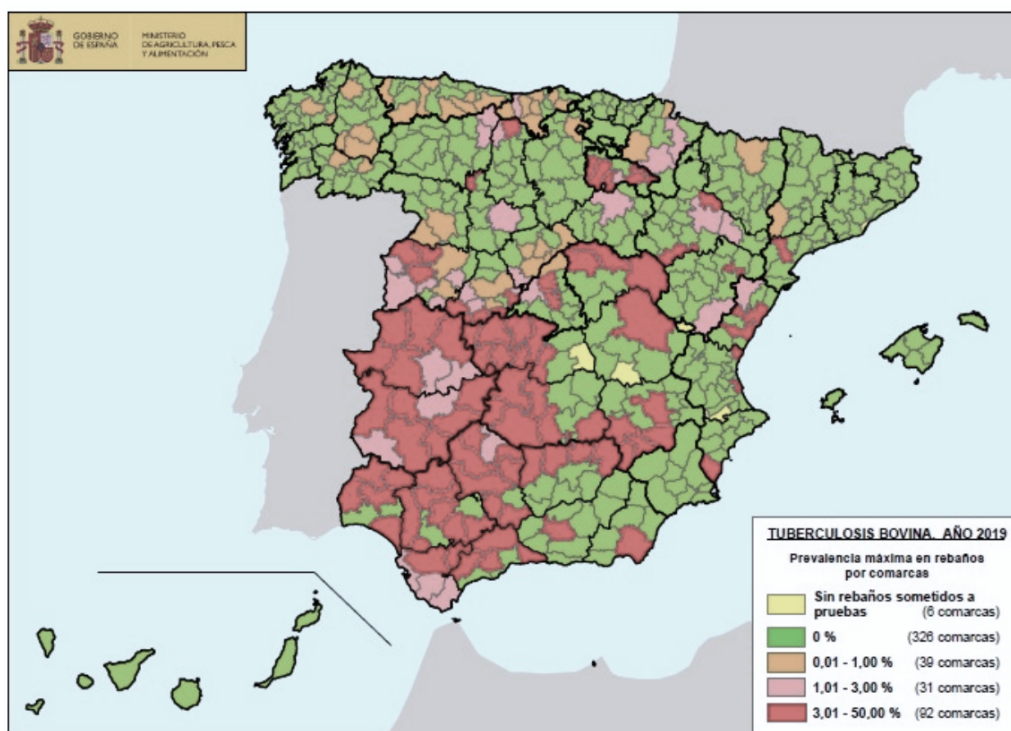


Figura 6.1. Mapa epidemiológico de la tuberculosis bovina en España, prevalencia por comarcas, año 2019. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.

El jabalí como reservorio silvestre principal de *M. bovis* en el suroeste de la Península Ibérica

En la Península Ibérica, los jabalíes; los cérvidos, como los ciervos o los gamos; y los tejones, actúan como reservorios silvestres de *M. bovis* y complican los programas de erradicación de la enfermedad en zonas con altas prevalencias. De hecho, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España también clasifica las diferentes comarcas o unidades veterinarias en función del riesgo en fauna silvestre, considerando como especial riesgo (alto) la zona suroeste de la Península Ibérica (Real Decreto 138/2020, de 28 de Enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (Complejo *Mycobacterium Tuberculosis*)., 2020) .

El jabalí es el reservorio principal de la TB en ecosistemas mediterráneos del sur de Portugal y del suroeste de España, con prevalencias que pueden llegar a superar el 50% (Risco et al., 2019). Los factores de riesgo que pueden predisponer a los jabalíes a mostrar estas prevalencias tan altas han sido estudiados en profundidad durante los últimos años e incluyen las altas densidades poblacionales, la edad y las coinfecciones con otros patógenos (Gortázar et al., 2006; Risco et al., 2014; Vicente et al., 2007).

El jabalí es una especie animal altamente susceptible a la TB, que presenta de forma frecuente lesiones generalizadas de curso crónico, pese a no mostrar signos clínicos de la enfermedad. Muchos de estos animales con lesiones generalizadas son «superexcretores», que excretan la bacteria por una o varias rutas (oronasal, fecal e incluso urinaria), aumentando su probabilidad de diseminación y manteniendo latente la enfermedad en el sistema multihospedador de estos ecosistemas (Risco et al., 2019; Santos et al., 2015).

Medidas de control de tuberculosis en animales silvestres

La erradicación de una enfermedad multihospedador, es decir, que afecta como acabamos de ver a un gran número de hospedadores diferentes, requiere que se lleven a cabo medidas de manejo en todos los hospedadores que contribuyan significativamente a su mantenimiento (Byrne et al., 2019; García-Jiménez et al., 2013). Debido a la situación epidemiológica que existe en España con relación al mantenimiento de altas prevalencias de TB bovina en zonas con altas densidades de animales silvestres, es necesario llevar a cabo medidas de prevención y control en estos reservorios para lograr una eliminación completa de esta enfermedad (Byrne et al., 2019; Risco et al., 2018).

El Plan de Actuación sobre TB en Especies Silvestres indica que, para las zonas con prevalencias bajas, no es necesaria una intervención más allá de la vigilancia poblacional y sanitaria. En cambio, en las zonas con riesgo especial, se requieren medidas de lucha encaminadas a controlar la enfermedad en la fauna silvestre que complementen el Programa Nacional de Erradicación de la TB en España (*Plan de Actuación Sobre Tuberculosis En Especies Silvestres*, 2017). Por otro lado, el Real Decreto 138/2020 establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que puedan actuar como reservorios de la TB y establece una clasificación administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos, que se muestra en la Figura 6.2.

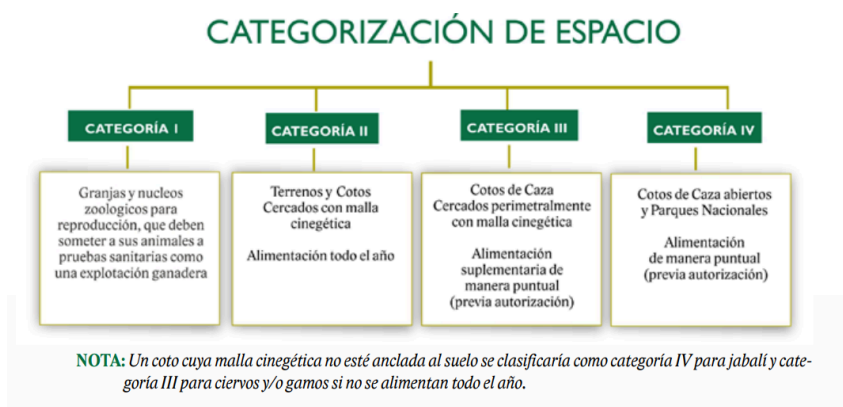


Figura 6.2. Categorización administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos. Fuente: Guía de Aplicación para el sector cinegético del Real Decreto 138/2020, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis.

Las medidas de control de TB en reservorios silvestres incluyen, primer lugar, las acciones preventivas y las medidas de bioseguridad como las medidas de gestión en granjas cinegéticas y de traslado de los animales, así como la utilización de barreras como vallados y la gestión de los residuos de caza, entre otros (Aranaz et al., 2004; Gortazar et al., 2015; *Plan de Actuación Sobre Tuberculosis En Especies Silvestres*, 2017). Una de las principales medidas de lucha es el control poblacional mediante reducción del aporte de alimento o mediante sacrificios aleatorios o eliminación selectiva de jabalíes (Aranaz et al., 2004; García-Jiménez et al., 2013; Gortazar et al., 2015; Naranjo et al., 2008). En cuanto a la inmunización de los animales que pueden actuar como reservorios, existen diversos estudios en jabalíes sobre la vacunación oral o parenteral con *M. bovis* inactivado y con *M. bovis* BCG (Beltrán-Beck et al., 2012; Buddle et al., 2018; Díez-Delgado et al., 2018). Por otro lado, otras alternativas más recientes e innovadoras incluyen la potenciación del sistema inmunitario mediante suplementación con vitamina D₃ (Risco et al., 2016) y la estrategia de actuar frente a las infecciones concomitantes, como la vacunación de circovirus porcino (Risco et al., 2018).

En la mayoría de los casos, además de ser técnica y económicamente inviable, la intervención en un ecosistema natural, en especial cuando se trata de control poblacional, puede resultar controvertida para algunos sectores (Aranaz et al., 2004; Gortazar et al., 2015; Naranjo et al., 2008). Por ello, las estrategias disponibles en la actualidad son cada vez más limitadas y son necesarias medidas alternativas que sean económicas, factibles y lo suficientemente efectivas.

Suplementación con posbióticos como una alternativa novedosa para el control de la TB

En este sentido, las bacterias beneficiosas como las BAL surgen como una alternativa ecológica y sostenible en la prevención de la transmisión y diseminación de enfermedades, incluida la TB en poblaciones silvestres (Sivaraj et al., 2018; Stedman et al., 2018). Como se ha comentado previamente a lo largo de esta tesis doctoral, el

proceso de elaboración de los posbióticos consiste en la optimización de la producción de subproductos metabólicos en condiciones controladas de cultivo y fermentación de microorganismos beneficiosos, incluyendo tanto los compuestos secretados como los componentes de la pared celular liberados después de la lisis bacteriana (Salminen et al., 2021). Estas moléculas pueden mejorar la salud del hospedador debido a su actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).

En los ensayos *in vitro* descritos en el bloque I de esta tesis doctoral se describen diferentes moléculas de BAL con capacidad para antagonizar la supervivencia de las micobacterias mediante mecanismos sinérgicos que incluyen la producción de metabolitos antimicrobianos y acidificación del pH, y también mediante su influencia en el proceso de fagocitosis por las células sanguíneas. Algunos aislados de BAL tienen capacidad para producir diferentes tipos de bacteriocinas y otros metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, etanol o dióxido de carbono, además de varios compuestos solubles y componentes de la pared celular, como exopolisacáridos o los ácidos teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA), que podrían actuar como agentes antimicobacterianos e inmunomoduladores, respectivamente, protegiendo al hospedador frente a la diseminación de la micobacteria por el organismo.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que la utilización de otras moléculas derivadas de bacterias diferentes a las BAL, como las micobacterias no productoras de TB, pueden inducir una respuesta inmunitaria beneficiosa confiriendo protección contra la diseminación de la enfermedad (Cardona et al., 2016; Shah et al., 2019; Von Reyn et al., 2010).

En fauna silvestre, las estrategias basadas en el manejo y la modulación de la microbiota, así como la utilización de los microorganismos que forman parte de ella, por ejemplo mediante la administración de productos posbióticos, se han propuesto recientemente como un método relativamente natural y sostenible para hacer frente a algunas enfermedades que afectan a las poblaciones silvestres de todo el mundo, incluida la TB

(Harrison et al., 2020; McKenzie et al., 2018; Stedman et al., 2020). Sin embargo y pese a la importancia de la TB en estas poblaciones, no se dispone de estudios realizados directamente en poblaciones silvestres que confirmen la utilidad real de estas nuevas alternativas.

Por ello, el **objetivo** general de este capítulo fue evaluar el efecto de la suplementación oral con metabolitos antimicobacterianos posbióticos producidos por bacterias beneficiosas sobre el desarrollo de la TB en poblaciones de jabalíes.

Los **objetivos** específicos son los siguientes:

- Diseñar y elaborar un producto posbiótico a partir de los compuestos bioactivos de una selección de bacterias beneficiosas que pueda contribuir al control de la TB.
- Analizar el efecto de la administración del producto añadido al pienso durante la época de suplementación llevada a cabo en poblaciones de jabalíes sobre la situación epidemiológica de la TB

MÉTODO

1. Elaboración del producto posbiótico

En función de la caracterización de las BAL descrita a lo largo de esta tesis doctoral, se seleccionó una combinación de moléculas derivadas de estas que pueda contribuir al control de la TB en diferentes poblaciones de jabalíes. Las BAL seleccionadas están depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron utilizada para desarrollar un producto posbiótico cuya composición está protegida por secreto industrial.

El contenido de esta sección está sujeto a protección.



El producto final, presentado como gránulos desecados que se añaden al pienso animal sin alterar los patrones dietéticos, está obtenido a partir de los metabolitos generados mediante la fermentación de los cultivos de los microorganismos seleccionados. Estos procedimientos han sido descritos en el capítulo V de esta tesis doctoral y su fabricación se realiza conforme al reglamento (UE) 2017/1017 (European Commission, 2017).

2. Diseño del estudio experimental: selección de las fincas y elaboración de los grupos de estudio

Se seleccionaron 20 fincas cinegéticas, ubicadas en el centro-oeste de España (Figura 6.3), que están dedicadas principalmente a la gestión y al manejo de las poblaciones cinegéticas y que disponen de vallado perimetral para evitar tanto la dispersión de los jabalíes como la entrada de otros animales, por lo que estas fincas están categorizadas

como tipo II según el RD 138/2020. En todas estas fincas se dispone de información detallada sobre el historial epidemiológico de la TB, incluyendo prevalencia de lesiones compatibles con TB y serologías de anticuerpos frente a esta, prevalencia de la infección en otros ungulados como ciervos, así como datos relativos a la densidad de jabalíes y otros ungulados.

La suplementación llevada a cabo en todas las fincas se realiza de la misma manera, aportando el alimento durante al menos 6 meses al año mediante comederos selectivos que solo permiten la entrada de jabalíes. La realización del estudio se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre el 1 de julio y el 1 de septiembre, debido a que el verano es la época del año en la que existe una mayor escasez de alimento natural en estas zonas de España, lo que hace necesario el aporte de alimento suplementario y asegura que el porcentaje de jabalíes que acuden a los comederos es máximo.

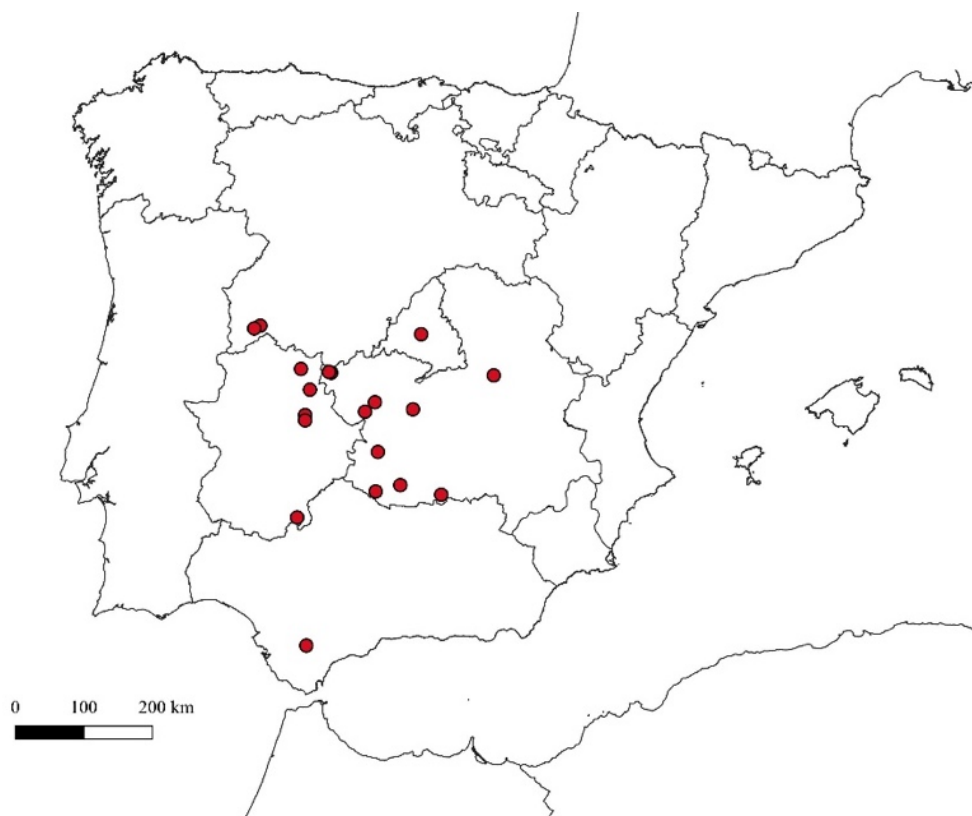


Figura 6.3. Localización geográfica de las 20 fincas incluidas en el estudio

Elaboración de los grupos

En todos los casos se administró el mismo pienso estándar (Jabalíes Mantenimiento Reforzado, INALSA S.A.) y los jabalíes no tuvieron acceso a otra fuente de alimentación complementaria durante el periodo de realización del estudio. Los animales de las 15 fincas suplementadas que conformaron el grupo «posbiótico» recibieron el pienso mencionado con la adición de 3 gramos por kilogramo del producto posbiótico durante 30 días consecutivos, mientras que las 5 fincas del grupo «control» recibieron la misma pauta con el mismo pienso, pero sin la adición del producto.

3. Recogida de datos y muestras para la valoración de la situación epidemiológica con relación a la TB

Se llevó a cabo una valoración de la situación epidemiológica de la TB en las poblaciones de jabalíes de todas las fincas incluidas en el estudio, tanto antes del comienzo de este, para evaluar la homogeneidad de las fincas; como después de la suplementación, para valorar el efecto del producto. La recogida de datos se llevó a cabo durante las acciones cinegéticas llevadas a cabo en la temporada de octubre de 2017 a febrero de 2018, antes de la suplementación; y de octubre de 2018 a febrero de 2019, después de la suplementación.

Estimación de edad y evaluación macroscópica de las lesiones

Para evitar sesgos en la recopilación de los datos, se seleccionaron aleatoriamente al menos 10 jabalíes por montería, si el número total de animales abatidos lo permitía. Los jabalíes se categorizaron por edad en función de su patrón de erupción dental, considerando jóvenes los animales de edades comprendidas entre 6 a 12 meses y adultos los jabalíes de más de 12 meses (Boitani, 1992; Risco et al., 2018). Se realizó una inspección *post-mortem* completa de los jabalíes, que consistió en la valoración macroscópica de los nódulos linfáticos submandibulares, retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, gastrohepáticos y mesentéricos; así como las

cavidades y órganos torácicos y abdominales, pulmones, hígado, bazo y aparato digestivo, principalmente. Los jabalíes con lesiones compatibles con TB se clasificaron según la gravedad de estas en dos tipos de patrones, denominando «localizado» cuando afecte solo a los ganglios linfáticos cefálicos o mesentéricos y «generalizado» al que afecta al menos a dos órganos o ganglios linfáticos diferentes. El diagnóstico de TB basado en la presencia de lesiones macroscópicas *post-mortem* en las canales es la inspección oficial reconocida por las Autoridades Sanitarias españolas y se considera un método adecuado para estimar la prevalencia de TB (García-Jiménez et al., 2013).

Toma de muestras sanguíneas y análisis serológico

Además, se realizó un estudio serológico en 14 fincas suplementadas y 4 fincas control incluidas en el estudio con el fin de detectar anticuerpos contra *M. bovis*. La sangre de los jabalíes seleccionados fue obtenida mediante punción del seno cavernoso retroorbital, y fue inmediatamente refrigerada a 4 °C y transportada al laboratorio, donde se extrajeron los sueros por centrifugación a 3000 r.p.m. durante cinco minutos y se mantuvieron a -21 °C hasta su procesamiento. Para detectar la presencia de anticuerpos contra *M. bovis* en los sueros sanguíneos se utilizó un kit ELISA comercial que se encuentra validado para muestras de jabalí (INGEZIM TB PORCINA, INGENASA, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El diseño experimental descrito permite monitorizar la situación epidemiológica de la TB mediante la evaluación de la presencia y la gravedad de lesiones macroscópicas compatibles con TB y seropositividad frente a *M. bovis*, en fincas control y suplementadas, antes y después de la adición del posbiótico. Por este motivo, este diseño se considera útil para valorar el efecto del producto sobre la situación epidemiológica con relación a la TB en estas poblaciones de jabalíes.

4. Análisis estadístico

Los parámetros utilizados para monitorizar la evolución de la TB en los dos grupos de estudio son los comentados anteriormente e incluyen el porcentaje de jabalíes con lesiones compatibles con TB, el porcentaje de animales con lesiones generalizadas y la seroprevalencia de TB. Todos los parámetros se compararon entre las poblaciones de control y suplementadas entre las dos temporadas de caza muestreadas, para evaluar las diferencias antes y después de la suplementación con el posbiótico. También se analizaron las diferencias dentro de cada grupo para evaluar el efecto de los posbióticos en las poblaciones suplementadas y para detectar posibles variaciones de la situación de la TB en las poblaciones de control. Las comparaciones se realizaron utilizando la prueba de Chi-cuadrado considerando un 5% de significancia.

Por otro lado, las diferencias dentro de cada grupo se analizaron más a fondo dividiendo la población suplementada en dos subconjuntos cribados por edad. Esto nos permitió distinguir entre animales con infecciones relativamente recientes, es decir, los animales jóvenes de entre 6 y 12 meses, y evitar el sesgo por la presencia de lesiones crónicas y la seropositividad en animales que puedan llevar desarrollando la enfermedad durante mucho tiempo, que es más probable que ocurra en animales adultos mayores de 12 meses. Este parámetro permite el cálculo de la incidencia de la enfermedad, es decir, la tasa de nuevos contagios, un parámetro muy interesante cuando se trata de valorar el efecto del producto sobre una enfermedad crónica que ya estaba presente en la población antes de la realización del estudio.

Figura resumen del método

01.

Selección de BAL y fincas de estudio.



02.

Elaboración del posbiótico.



03.

Diseño experimental: elaboración de los grupos.



04.

Recogida de datos y toma de muestras.



05.

Evaluación del efecto del posbiótico sobre la TB.



06.

Estudio estadístico.



RESULTADOS

El porcentaje de lesiones compatibles con TB fue similar en ambos grupos antes de la suplementación y disminuyó en las poblaciones de jabalíes suplementadas con el posbiótico

El número final de jabalíes analizados y el resultado de las evaluaciones patológicas durante las dos temporadas del estudio se puede encontrar en el Apéndice IV.

Durante el periodo de realización del estudio, un total de 3449 jabalíes fueron abatidos en monterías durante las 51 acciones cinegéticas realizadas en las 20 fincas del estudio. Se observaron lesiones macroscópicas compatibles con TB en el 35,69 % de los 409 jabalíes inspeccionados. Entre los animales afectados con lesiones compatibles con TB, 32 jabalíes mostraron lesiones en múltiples órganos, lo que se corresponde con un 27,82 % de patrones generalizados de TB. No obstante, no fue posible la realización de una evaluación patológica completa en 31 jabalíes que presentaban lesiones por falta de ciertos órganos en el momento de la inspección, debido a disparos, mordeduras de perro, etc; o porque no fueron eviscerados, debido a la decisión de decomiso total por parte del veterinario oficial por presentar lesiones en nódulos linfáticos cefálicos.

Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico de los dos grupos del estudio se resumen en la Tabla 6.1. El porcentaje de lesiones compatibles con TB en la temporada previa a la suplementación fue similar en ambos grupos (47,45 % vs 39,35 %, $\chi^2 = 0,84$, $P = 0,35$). Sin embargo, en la temporada posterior a la suplementación, este porcentaje fue significativamente mayor en los jabalíes del grupo control que en los jabalíes que fueron suplementados (45,23 % vs 24,84 %, $\chi^2 = 5,68$, $P = 0,017$). La proporción de patrones generalizados no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a lo largo de la experiencia (25 % vs 26,41 % en la temporada previa a la suplementación, $\chi^2 = 0,40$, $P = 0,52$ y 16,67 % vs 50 % en la temporada posterior a la suplementación, $\chi^2 = 1,99$, $P = 0,32$).

En cuanto a las comparaciones intragrupo, los animales pertenecientes al grupo control no mostraron diferencias significativas entre las dos temporadas cinegéticas, ni en el porcentaje de lesiones, ni en la proporción de patrones generalizados. Por el contrario, se observó un menor porcentaje de lesiones compatibles con TB en los jabalíes suplementados tras la administración del posbiótico en comparación con la temporada previa a la suplementación (24,84 % Vs 39,35 %, $\chi^2 = 6,7 / 96$, $P = 0,01$), pero no se detectaron diferencias en el porcentaje de patrones generalizados (41,18% vs 29,51%, $\chi^2 = 0,38$, valor de $p = 0,53$) entre el mismo grupo de animales.

La seroprevalencia de TB fue similar en ambos grupos antes de la suplementación y disminuyó en el grupo suplementado

Los resultados obtenidos en la prueba serológica revelaron que el 35,18 % de los sueros analizados contenían anticuerpos contra *M. bovis*. El porcentaje de jabalíes seropositivos fue similar en ambos grupos de estudio en la temporada previa a la suplementación (45,59 % vs 35,48 % $\chi^2 = 1,63$, $P = 0,2$). Sin embargo, después de la suplementación, la seropositividad fue significativamente inferior en el grupo suplementado (48,61 % vs 22,73 %, $\chi^2 = 17,26$, $P = 3,24 \times 10^{-5}$).

Al igual que con el parámetro anterior, mientras que la seropositividad no cambió a lo largo de la experiencia en el grupo control (45,59 % vs 48,61 %, $\chi^2 = 0,26$, $P = 0,6$), observamos una reducción en el porcentaje de animales seropositivos en las fincas suplementadas (35,48 % vs 22,73 %, $\chi^2 = 5,48$, $P = 0,019$).

Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico de los dos grupos del estudio se resumen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Resultados de la evaluación patológica y del estudio serológico de los dos grupos de estudio en las temporadas previa y posterior a la suplementación

Grupo			Pre-suplementación ^a	Pos-suplementación ^b	
Control	Lesiones compatibles con TB	Jabalíes positivos (%)	28 (47,45 %)	19 (45,23 %)	
		Total inspeccionado	59	42	
		Patrón generalizado	Jabalíes positivos (%)	5 (25 %)	2 (16,67 %)
		Total inspeccionado	25	12	
	Seropositividad a TB	Jabalíes positivos (%)	31 (45,59 %)	35 (48,61 %)	
		Total inspeccionado	68	72	
			Jabalíes positivos (%)	61 (39,35 %)	38 (24,84 %)
	Suplementado	Lesiones compatibles con TB	Jabalíes positivos (%)	61 (39,35 %)	38 (24,84 %)
			Total inspeccionado	155	153
Patrón generalizado			Jabalíes positivos (%)	18 (29,51 %)	7 (41,18 %) *
		Total inspeccionado	61	17	
Seropositividad a TB		Jabalíes positivos (%)	55 (35,48 %)	35 (22,73 %) **	
		Total inspeccionado	155	154	
			Jabalíes positivos (%)	55 (35,48 %)	35 (22,73 %) **
		Total inspeccionado	155	154	

^a Temporada pre-suplementación: de octubre 2017 a febrero 2018

^b Temporada pos-suplementación: de octubre 2018 a febrero 2019

*Diferencias significativas entre grupos (P = 0,017) e intragrupo (P = 0,01)

**Diferencias significativas entre grupos (P = 3,24 x 10⁻⁵) e intragrupo (P = 0,019)

El porcentaje de lesiones compatibles y la seroprevalencia de TB correspondiente a las nuevas infecciones disminuyeron en el grupo suplementado

Las comparaciones dentro de cada grupo se analizaron en función de la edad de los animales divididos en dos subclases de edad, para evitar malinterpretar la presencia de lesiones crónicas en animales adultos que pudieron infectarse antes del inicio de la experiencia. El porcentaje de animales jóvenes infectados se corresponde con la incidencia de la enfermedad o la tasa de nuevos contagios.

Los parámetros de TB obtenidos en cada clase de edad (jóvenes y adultos) de la población suplementada se resumen en la Tabla 6.2. En los adultos, no se detectaron diferencias significativas al comparar los parámetros de TB en las temporadas de pre y pos-suplementación. Sin embargo, en los animales jóvenes del grupo suplementado, el porcentaje de lesiones compatibles con TB ($\chi^2 = 9,9$, $P = 0,002$) y la presencia de anticuerpos frente a *M. bovis* ($\chi^2 = 6,64$, $P = 0,009$) disminuyeron de forma significativa después de la suplementación.



Figura 6.4. Animal adulto junto a varios animales jóvenes (rayones)

Tabla 6.2. Resultados por grupos de edad de la evaluación patológica y el estudio serológico del grupo suplementado antes y después de la suplementación con el posbiótico

			Pre-suplementación ^a	Pos-suplementación ^b
Jabalíes jóvenes (6-12 meses)	Lesiones compatibles con TB	Jabalíes positivos	17	12
		(%)	(47,22 %)	(16,66 %) *
		Total inspeccionado	36	72
	Patrón generalizado	Jabalíes positivos	9	3
		(%)	(52,94 %)	(37,50 %)
		Total inspeccionado	17	8
	Seropositividad a TB	Jabalíes positivos	7	3
		(%)	(26,92 %)	(4,90 %) **
		Total inspeccionado	26	61
Jabalíes adultos (>12 meses)	Lesiones compatibles con TB	Jabalíes positivos	44	26
		(%)	(36,97 %)	(32,09 %)
		Total inspeccionado	119	81
	Patrón generalizado	Jabalíes positivos	9	4
		(%)	(20,45 %)	(44,44 %)
		Total inspeccionado	44	9
	Seropositividad a TB	Jabalíes positivos	45	25
		(%)	(37,81 %)	(33,78 %)
		Total inspeccionado	119	74

^a Temporada pre-suplementación: de octubre 2017 a febrero 2018

^b Temporada pos-suplementación: de octubre 2018 a febrero 2019

*Diferencias significativas (P = 0,002)

**Diferencias significativas (P = 0,009)

DISCUSIÓN

La utilización de microorganismos beneficiosos se ha propuesto en los últimos años como una nueva herramienta para el control de enfermedades que afectan a la fauna silvestre, incluida la TB (Harrison et al., 2020; McKenzie et al., 2018). Existen diversas estrategias para elaborar productos a partir de microorganismos beneficiosos, que se denominan en función de las características del producto final y que se engloban de forma general bajo el término de «piensos funcionales» cuando se incorporan a la alimentación animal. Los piensos funcionales son aquellos que incorporan compuestos bioactivos para mejorar determinados parámetros más allá de lo que cabría esperar por su simple potencial nutricional (Velasco et al., 2006). Por otro lado, los compuestos bioactivos producidos a partir de microorganismos beneficiosos que se encuentran de forma más frecuente en el mercado son los probióticos y los simbióticos, cuyos términos han sido definidos en capítulos previos de esta tesis doctoral. Los posbióticos son productos novedosos cuya definición ha alcanzado un consenso en la comunidad científica muy recientemente (Salminen et al., 2021). Pese a que se han propuesto por algunos autores como una estrategia potencial para el control de enfermedades en humanos, animales de compañía y en ganadería, en el campo de la fauna silvestre es un concepto aún desconocido.

Los resultados de las pruebas *in vitro* llevadas a cabo en el capítulo I de esta tesis doctoral, así como otros estudios, sugieren un potencial efecto saludable de los componentes de microorganismos, especialmente BAL, para el control de la bacteria *M. bovis*, el agente causal de la TB (Stedman et al., 2018). No obstante, este es el primer estudio que diseña y evalúa la eficacia de un producto de estas características. Los resultados de este capítulo sugieren un efecto beneficioso del producto posbiótico sobre el desarrollo de la TB en poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural a la infección.

Este estudio de campo se considera correctamente validado para el objetivo propuesto, ya que se han cumplido los requisitos para su justificación. En primer lugar, al tratarse de infecciones naturales, es importante garantizar que todos los grupos de fincas parten de la misma situación epidemiológica. En ese sentido, no se encontraron diferencias entre grupos antes de la experiencia. Por el contrario, mientras que la situación epidemiológica con relación a la TB en el grupo control permaneció estable, se obtuvieron diferencias en los parámetros analizados después de la realización del estudio en el grupo suplementado. Concretamente, el porcentaje de lesiones compatibles con TB y la presencia de anticuerpos frente a *M. bovis* disminuyeron respectivamente en un 36,87 % y 35,94 % después de la suplementación oral con el producto posbiótico en las poblaciones suplementadas. Además, estos parámetros fueron significativamente más bajos en las fincas suplementadas en comparación con las fincas control después de la suplementación, lo que supone una reducción del 45,08 % y 53,24 %, respectivamente. Estos hallazgos sugieren un efecto positivo de la suplementación sobre la situación de la TB con resultados comparables a otras medidas de control que han sido utilizadas previamente.

Las principales estrategias para controlar la transmisión de TB entre la fauna silvestre y la cabaña ganadera incluyen medidas preventivas y de bioseguridad, control poblacional y la inmunización mediante vacunación (Che'Amat et al., 2016). Algunas de las estrategias de vacunación en poblaciones de jabalíes llevadas a cabo en condiciones similares a las de este estudio arrojaron resultados comparables. Las vacunas inactivadas por calor redujeron las lesiones compatibles con TB en un 34 % (Díez-Delgado et al., 2018) y en un 43,3 % (Garrido et al., 2011) cuando se administraron por vía oral y en un 43,3 % (Garrido et al., 2011) y en un 66 % (Díez-Delgado et al., 2017) cuando se administraron por vía parenteral. Por otro lado, la vacunación oral con BCG confiere una protección variable (Díez-Delgado et al., 2018, 2019; Garrido et al., 2011). Otros estudios que tenían un enfoque similar arrojaron resultados muy diferentes entre sí. Mientras que el control poblacional mediante eliminación no selectiva de jabalíes disminuyó el porcentaje de lesiones compatibles con TB y los anticuerpos frente a *M. bovis* en un 21-48% (Boadella et al., 2012), la eliminación selectiva de animales no logró

reducir la seroprevalencia de TB (Che'Amat et al., 2016). De hecho, algunos estudios sugieren que las estrategias de eliminación deben implementarse conjuntamente con otras medidas complementarias para observar un efecto significativo sobre la prevalencia de la TB (García-Jiménez et al., 2013; Mentaberre et al., 2014). En esta experiencia, el porcentaje de lesiones generalizadas se mantuvo estable en ambos grupos antes y después de la suplementación, a diferencia de otros estudios similares (Risco et al., 2016, 2018).

Al explorar el efecto de los posbióticos en animales jóvenes para distinguir entre infecciones relativamente recientes con respecto a infecciones crónicas, observamos que el porcentaje de lesiones compatibles con TB y de anticuerpos frente a *M. bovis* en las nuevas infecciones disminuyó en un 64,72 % y un 81,80 % respectivamente después de la suplementación. Esto sugiere que la administración de posbióticos podría contribuir a una disminución en el número de nuevos contagios, es decir, la reducir la incidencia de la enfermedad. Curiosamente, estas diferencias no se detectaron en adultos, posiblemente debido al carácter crónico de la TB, ya que estos animales podrían haberse infectado antes del inicio de la experiencia y continuar desarrollando la enfermedad en el momento de la recogida de muestras y datos. Para evaluar si puede alcanzarse un efecto similar sobre los animales adultos, habría que repetir esta pauta de administración en los periodos de suplementación de los próximos años.

El suplemento diseñado en este estudio contiene una combinación de metabolitos y componentes de la pared microbiana de microorganismos beneficiosos que han sido transformados durante el propio proceso de producción y que se han descrito en capítulos previos de esta tesis doctoral, aunque la composición exacta del mismo está protegida por secreto industrial. Por tanto, el mecanismo de acción del posbiótico que se propone es complejo y requiere de la actuación sinérgica de las moléculas que se incluyen en el producto, lo que lo hace más completo y efectivo. Los metabolitos posbióticos podrían contener la propagación de la enfermedad en los animales infectados por *M. bovis* a través de dos efectos principalmente: por un lado, su efecto

antimicobacteriano reduciría la viabilidad de la bacteria y, por otro, su interacción con el sistema inmunitario de los animales potenciaría sus propios mecanismos de defensa.

Debido a sus propiedades antimicrobianas, los posbióticos administrados por vía oral podrían disminuir la carga micobacteriana en el tracto gastrointestinal (Sosunov et al., 2007; Stedman et al., 2018), reduciendo así la transmisión del contagio indirecto fecal-oral, lo que se considera de gran importancia epidemiológica en jabalíes puesto que la excreción fecal es una de las principales vías de diseminación de *M. bovis* en esta especie (Barasona et al., 2017; Santos et al., 2015). Por otro lado, la interacción de las moléculas de las BAL con las células inmunitarias del hospedador, pueden desencadenar una respuesta inmunitaria favorable para que el animal pueda hacer frente a la infección por *M. bovis*. La respuesta fagocítica del hospedador frente a las micobacterias es crucial para la supervivencia de las bacterias en el organismo y el desarrollo de la enfermedad (de Martino et al., 2019), por lo que la utilización de moléculas de BAL que influyan en la capacidad de los fagocitos podría estar contribuyendo al control de la TB en estas poblaciones. Los metabolitos antimicobacterianos y las moléculas inmunomoduladoras de las BAL aisladas, han sido descritos en profundidad en el bloque I de esta tesis doctoral. Por último, algunos metabolitos de las BAL y los extractos proteicos de otras bacterias que pueden utilizarse como posbióticos pueden aumentar los niveles de citoquinas Th1 y disminuir las citoquinas asociadas a Th2 (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019), lo que también podría ser positivo para un mayor control del desarrollo de la TB bovina en los jabalíes infectados, ya que la respuesta Th1 es fundamental para este propósito (de Martino et al., 2019; Welsh et al., 2005). No obstante, estos mecanismos no han sido evaluados de forma directa en este estudio por la dificultad del diseño adecuado para este planteamiento en infecciones naturales y, más concretamente, en poblaciones silvestres. Por ello, en estudios futuros en modelos experimentales se llevará a cabo una caracterización completa del perfil inmunomodulador y de citoquinas de la suplementación con el producto posbiótico para dilucidar estas cuestiones, que permitirá optimizar el desarrollo de nuevos productos.

La erradicación de una enfermedad transmisible en un complejo multihospedador requiere que se lleven a cabo medidas de control en todos sus reservorios (Byrne et al., 2019; García-Jiménez et al., 2013). Debido a la situación epidemiológica que existe en

España con relación al mantenimiento de altas prevalencias de TB bovina en zonas con altas densidades de animales silvestres, es necesario llevar a cabo medidas de prevención y control en estos reservorios de *M. bovis* para lograr una eliminación completa de esta enfermedad (Byrne et al., 2019; Risco et al., 2018). El producto posbiótico elaborado podría ser útil para el control de la TB en poblaciones de jabalíes silvestres que complican los programas de erradicación de esta enfermedad en la cabaña ganadera. Esta medida es particularmente factible en aquellos terrenos cinegéticos o explotaciones en los que la normativa actual requiera la implantación de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la TB, entre las que se incluye el jabalí (RD 138/2020). La normativa española permite la suplementación sistemática en las categorías I y II, que son granjas o núcleos zoológicos y explotaciones valladas perimetralmente, respectivamente. En la categoría III, explotaciones valladas sin aporte sistemático de suplementación y la categoría IV, cotos abiertos o Parques Nacionales, solo se permiten estas actuaciones sanitarias de forma puntual, previamente autorizada, cuando se den condiciones muy particulares, como una incidencia especialmente elevada de TB o cuando exista carencia de alimentación natural en periodos determinados.

El uso de suplementos posbióticos en fauna silvestre se plantea como alternativa a otras medidas que podrían ser controvertidas, como el control poblacional mediante eliminación de animales, ya que el jabalí es una especie con gran un valor económico y cultural en España; y medidas que requieren un manejo considerable de los animales, como la vacunación parenteral, que podría ser técnicamente complicada en la mayoría de las poblaciones silvestres (Gortazar et al., 2015; O'Connor et al., 2012; Stedman et al., 2020). No obstante, esta medida podría considerarse una herramienta complementaria en los programas de erradicación de la enfermedad a gran escala y podría extenderse a otros reservorios que limitan la eficacia de estos programas en España y otros países. Así, podría ensayarse en poblaciones de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*) en España, tejón euroasiático (*Meles meles*) en el Reino Unido, el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en América del Norte, en la zarigüeyas australiana (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda o búfalo africano

(*Syncerus caffer*) en Sudáfrica (Corner, 2006), e introducirse en los programas para la conservación de especies en peligro de extinción, como el lince ibérico (Briones et al., 2000).

La utilización de posbióticos se propone como una estrategia factible, económicamente viable, con una intervención mínima y basada en productos naturales, que están demostrando ser eficaces en los últimos años y que se postulan como una novedosa alternativa para el control de enfermedades infecciosas en medicina humana y animal (Salminen et al., 2021). En el caso concreto de la TB, debido a la necesidad de introducción de nuevas herramientas de control de la enfermedad, estos resultados arrojan perspectivas de futuro con enormes posibilidades, no solo sobre la fauna doméstica y silvestre, sino también sobre la salud humana bajo el enfoque One Health, pudiendo contribuir de forma significativa a la Salud Pública mundial, debido a que TB humana continúa siendo una de las principales causas de muerte las zonas del mundo con menores posibilidades económicas.

Bloque 3

Transferencia de tecnología y conocimiento científico



ÍNDICE BLOQUE III

CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica	301
<i>INTRODUCCIÓN</i>	303

TEC

CAPÍTULO VII

Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica



INTRODUCCIÓN

La modalidad de «doctorado industrial» incluye un concepto relativamente nuevo que está cobrando cada vez más relevancia en España durante los últimos años. El RD 195/2016 introduce los doctorados industriales, que son aquellos en los que el doctorando participa en un proyecto de investigación industrial o de desarrollo experimental directamente relacionado con su tesis, desarrollado en una empresa o Administración Pública distinta a la universidad. Esta legislación propone por primera vez en nuestro país la Mención Industrial al título de Doctor, a la que opta la presente tesis doctoral, cuyo fin es estimular la participación de las empresas en los programas de Doctorado. Este tipo de proyectos doctorales se realizarían con la colaboración del tejido industrial para garantizar los lazos entre el mundo académico y el mundo empresarial, lo que aporta numerosas ventajas, como veremos a continuación (RD 99/2011, RD 195/2016).

Uno de los retos del sistema público de investigación en España, que se propuso hace un par de décadas y se está llevando a cabo de forma más fehaciente en los últimos años, es la creación de un mercado tecnológico más competitivo mediante la transferencia de la tecnología y los conocimientos generados en el entorno de la investigación pública para su transformación en el sector empresarial. La transferencia de conocimiento y tecnología se refiere normalmente a la transmisión del conocimiento científico y tecnológico generado en las universidades y centros de investigación al tejido social y productivo, esto es, persigue incorporar el conocimiento a una cadena de valor para que genere un retorno económico. El proceso de transferencia resulta enriquecedor tanto para las empresas, los centros de generación de conocimiento, si son distintas a estas, y para la sociedad en general. Por tanto, los beneficios de este sistema suponen la generación de una mayor competitividad empresarial y, con ello, un mayor crecimiento económico, mayor bienestar social y pleno empleo (Rubiralta y Bellavista, 2003).

Por otro lado, el conocimiento generado de una investigación puede difundirse a través de diferentes canales. La difusión *per se* es la propagación del conocimiento científico entre especialistas de un área en cuestión y puede realizarse mediante la publicación de la investigación en revistas científicas o mediante la comunicación de los resultados en congresos, seminarios o foros especializados, entre otros. Por otro lado, la divulgación hace referencia a la comunicación de los resultados a la comunidad mediante un lenguaje y diferentes canales que sean más accesibles a la sociedad en general (Espinosa-Santos, 2010).

El **objetivo general** de este bloque es transferir la tecnología y el conocimiento científico derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral.

Para ello, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- La protección de las invenciones que sean sujetas a explotación comercial por parte de la empresa, mediante la solicitud de patentes.
- La incorporación de la tecnología a una cadena de valor que genere retorno económico y la aplicación de los conocimientos al desarrollo de procesos como parte de la actividad productiva de la empresa.
- La publicación en revistas científicas de impacto de aquellos contenidos que se consideren relevantes para la comunidad científica en general, así como la difusión de los hallazgos en seminarios y congresos específicos del área.
- La publicación en revistas de divulgación científica, bien destinada a sectores específicos del área de sanidad animal, como a revistas para la sociedad en general.

1. Materialización de la transferencia tecnológica de la presente tesis doctoral

El conjunto de las técnicas diseñadas y los procedimientos descritos en los bloques anteriores de este documento, así como el conocimiento científico generado a partir del desarrollo de esta tesis doctoral, han sido aplicados en contextos muy similares para la materialización de la transferencia tecnológica en forma de patentes. Todos estos conocimientos se conocen en el mundo empresarial como *know how* y forman parte del conjunto de procesos que conforman la estrategia competitiva de una empresa con respecto a sus competidores dentro del mismo sector productivo. Para la protección de las invenciones industriales, la Ley 24/2015 de Patentes concede el título de «patente de invención» a aquellos productos y procedimientos que impliquen una actividad inventiva y sean susceptibles de reproducción y reiteración industrial, incluidos los productos obtenidos mediante un procedimiento microbiológico. Por otro lado, las patentes pueden conllevar una extensión internacional a través del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT, Patent Cooperation Treaty) para proteger la invención en un gran número de países.

Los aislados y las cepas mencionadas a lo largo de todo este documento son objeto de publicación científica como parte del proceso de la aplicación del método científico y es una parte relevante en el desarrollo de una tesis doctoral. Sin embargo, dos aislados bacterianos que han sido seleccionados y caracterizados mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente, así como los productos generados por las mismas, constan de actividad inventiva suficiente como para ser candidatos a la protección mediante patente de invención.

El contenido de esta sección está
sujeto a protección.



El contenido de esta sección está
sujeto a protección.



El contenido de esta sección está
sujeto a protección.



2. Impacto industrial de la tesis doctoral para la empresa

Se entiende como «investigación industrial» a los estudios planificados cuyo objetivo es la adquisición de nuevos conocimientos y aptitudes que puedan resultar de utilidad para desarrollar nuevos productos, procesos o servicios, o permitan mejorar considerablemente los ya existentes, especialmente en el entorno empresarial (ECC/1402/2013).

El Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación (Plan Estatal I+D) recoge en su estructura los objetivos de la Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y de Innovación. Dentro de este plan, el Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad convoca las ayudas para contratos para la formación de doctores en empresa «Doctorados Industriales» mediante un sistema de concurrencia competitiva. La finalidad de estas ayudas es promover la realización de proyectos de investigación industrial en empresas para favorecer la inserción laboral de personal investigador en estas, contribuir a la empleabilidad de estos investigadores y promover la incorporación de talento en el tejido productivo para elevar la competitividad del mismo.

El impacto que ha tenido el proyecto de investigación industrial para la empresa INGULADOS se ha materializado en tres hitos fundamentalmente. Por un lado, el método científico y los procesos tecnológicos descritos en esta tesis doctoral han desembocado en la creación de la línea de Desarrollo de Productos Alternativos a Antibióticos, dentro del departamento de «Desarrollo de Productos» para centralizar los procedimientos encaminados a la elaboración de productos innovadores que den una respuesta eficaz a los problemas planteados por los clientes de la empresa, y complementar otras líneas de productos de la empresa como son las Fórmulas nutricionales y Autovacunas. Por otro lado, el lanzamiento al mercado de una gama de productos posbióticos ha tenido un impacto significativo sobre la actividad económica de la empresa. Por último, para favorecer la empleabilidad de los investigadores y su incorporación a las empresas, y así responder a la finalidad de la ayuda recibida por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación, se crea en INGULADOS el puesto de

«Responsable de Calidad» para asegurar la excelencia en todos estos procedimientos descritos y lograr la implantación de un sistema de gestión de la calidad.

Instauración de la línea de productos alternativos a los antibióticos

Esta línea de Productos en INGULADOS pretende aportar soluciones innovadoras a las necesidades planteadas por los clientes de la empresa, que pueden ser los ganaderos, los veterinarios o los propios propietarios de las fincas que la entidad gestiona y asesora. Dentro de este departamento, los conocimientos generados del desarrollo de esta tesis doctoral se establecen dentro de una línea propia mediante un conjunto de procesos, que se describen en la Figura 7.1 y cuyo fin es prestar este servicio a los clientes. Las bacterias beneficiosas aisladas y caracterizadas en esta tesis doctoral, que son candidatas a ser incluidas en los productos innovadores, constituyen la colección de bacterias de INGULADOS.

Las fases de este procedimiento se muestran en el diagrama de flujo de la Figura 7.1 y son las siguientes:

Identificación del problema o necesidad

El proceso comienza cuando se detecta un problema o una necesidad en una finca, bien por parte de los veterinarios o asesores de INGULADOS, o bien a petición del cliente, que pueden ser los ganaderos, los veterinarios de las granjas de animales de producción o cinegéticas o los propietarios de las fincas.

Caracterización microbiológica

En la mayoría de las ocasiones, los problemas responden a una casuística infecciosa de base, esto es, un problema que requiere el aislamiento y la caracterización del agente patógeno mediante la aplicación de procedimientos microbiológicos que incluyen cultivo e identificación por pruebas bioquímicas y moleculares.

Preselección de bacterias candidatas

Para el diseño de una estrategia que pueda ser favorable para la resolución del problema, se realiza una preselección de bacterias beneficiosas en función de estudios previos. En primer lugar, se seleccionan las bacterias que pueden ser candidatas incluirse en el producto. Estas pueden pertenecer a la colección de INGULADOS, las cuales ya se encuentran caracterizadas; o bien se puede realizar una búsqueda de nuevas bacterias en función de las necesidades, que deberán seguir procedimientos más complejos de para asegurar su viabilidad e inocuidad.

Selección final de bacterias beneficiosas

La selección final de bacterias candidatas se realizará en tres fases:

- Estudio de seguridad de los candidatos: solo en el caso de que las bacterias seleccionadas sean nuevas y no pertenezcan a la colección de INGULADOS. Dicho estudio consiste en la detección fenotípica y genotípica de resistencias antimicrobianas, factores de virulencia y marcadores de patogenicidad.
- Actividad antimicrobiana: se realiza la detección genotípica y fenotípica de metabolitos antibacterianos producidos por las bacterias que inhiban el patógeno concreto caracterizado en las primeras fases del procedimiento. La detección genotípica se realiza mediante análisis bioinformático y la detección fenotípica mediante técnicas que incluyen los cocultivos, ensayo de microdilución en caldo y difusión de sobrenadantes.
- Capacidad inmunomoduladora: se realizan estudios genotípicos y fenotípicos de interacción con células inmunitarias y activación de rutas de señalización mediante diferentes marcadores.

En función de estos tres parámetros se seleccionarían las bacterias que potencialmente pueden aportar una solución al problema planteado.

Elaboración del producto

Las bacterias seleccionadas se envían a un proveedor subcontratado (PENTA SL), que realiza la fabricación del suplemento alimentario mediante procedimientos que incluyen unas etapas que ya han sido descritas previamente.

Validación del producto

La validación se realiza a través de diseño experimental, en el caso de nuevos productos desarrollados, o mediante la valoración del cumplimiento de la necesidad detectada. En el caso de que la validación sea positiva y se dé respuesta de forma satisfactoria a la necesidad, se establecerán diferentes pautas de administración. En el caso de que el resultado de la validación sea negativo, se realizarían las acciones para volver a las fases anteriores de preselección/selección, continuando el proceso definido con anterioridad.

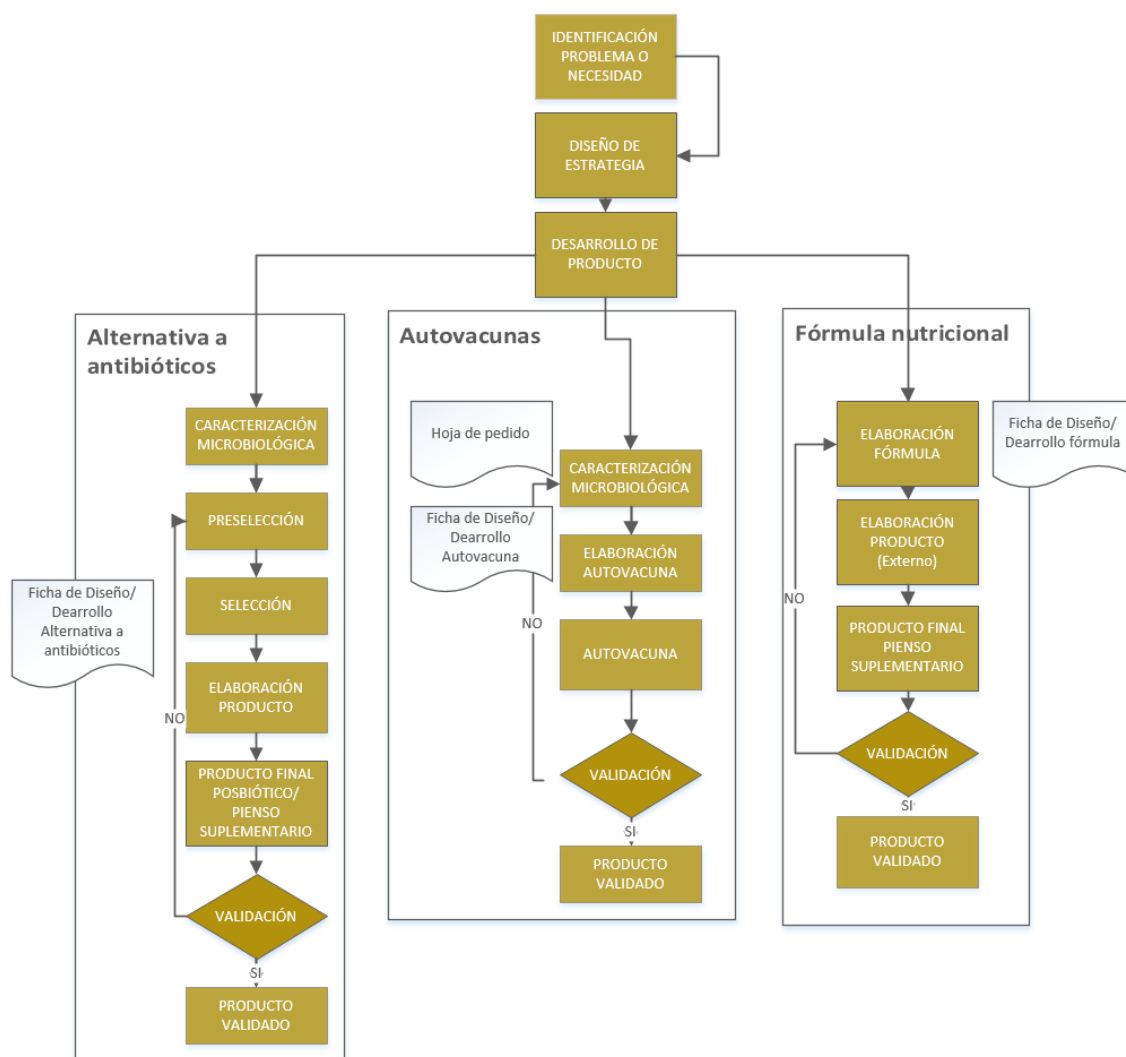


Figura 7.1. Diagrama de flujo de los procesos del Departamento de Desarrollo de Productos

Lanzamiento al mercado de la gama de productos INGUBAL

El proyecto de investigación industrial descrito en esta tesis doctoral ha tenido un impacto muy significativo en la empresa INGULADOS, permitiendo incorporar la investigación desarrollada a una cadena de valor mediante su materialización en el lanzamiento al mercado de una gama de productos denominada INGUBAL (Figura 7.2). Estos productos son posbióticos que incluyen una combinación de metabolitos producidos por bacterias beneficiosas cuya composición está protegida por secreto industrial. La gama de productos está registrada como piensos suplementarios y se comercializa para el control de determinados procesos en diferentes especies animales, una vez han sido validados por los procedimientos descritos anteriormente, generando un retorno económico de gran impacto para la empresa.



Figura 7.2. Ejemplo de productos de la gama INGUBAL en las instalaciones de INGULADOS.

Implantación de un sistema de gestión de la calidad y creación de un nuevo perfil de puesto de trabajo

Uno de los objetivos del Plan Estatal I+D, en concreto del Programa de Promoción del Talento y Empleabilidad en el que se enmarca el programa de Doctorados Industriales del Ministerio de Ciencia e Innovación, es favorecer la inserción laboral de los jóvenes investigadores para elevar la competitividad del sector productivo de las empresas.

Como parte del proceso de generación de empleo de este Programa, la investigadora en formación se incorporará a la empresa en un nuevo perfil de puesto de trabajo creado para este fin, que es el denominado como «Responsable de Calidad». En la actualidad, los procedimientos descritos en esta tesis doctoral se encuentran enmarcados en un Sistema de Gestión de la Calidad que afecta de forma directa al procedimiento de desarrollo de productos y que está diseñado en conformidad con los requisitos de la Norma UNE-EN ISO 9001:2015 para incrementar y consolidar la investigación, el desarrollo tecnológico y la innovación en la empresa. En INGULADOS la I+D+i constituye una actividad diferenciadora en el sector, aportando prestigio y reconocimiento a toda la organización, acorde también a los requisitos de la Norma UNE 166002 de Gestión de la I+D+i.

3. Difusión del contenido científico y divulgativo

La difusión de los conocimientos científicos generados a raíz de esta tesis doctoral se ha realizado mediante la publicación de artículos científicos y divulgativos y mediante la asistencia a congresos y seminarios especializados. Además, se incluyen varias estancias de formación que se realizaron durante la etapa predoctoral en otros centros de investigación, concretamente en universidades.

Publicaciones científicas

1. María Bravo; Theo Combes; Fernando O Martínez; Rosario Cerrato; Joaquín Rey; Waldo García-Jiménez; Pedro Fernández-Llario; David Risco; Jorge Gutiérrez Merino. Lactobacilli isolated from wild boar (*Sus scrofa*) antagonize *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) in a species-dependent manner. *Frontiers in Microbiology*. 10 - 1663, 30/07/2019. Disponible en Internet en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01663/full>
2. María Bravo; Theo Combes; Fernando O Martínez; David Risco; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; Jorge Gutiérrez Merino. Wildlife symbiont bacteria are indicators of the health status of the host and its ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. En revisión. 13/07/2021.
3. María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Jorge Gutiérrez-Merino; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Bacteria-derived postbiotic supplementation improved tuberculosis epidemiological situation in wild boar populations. Pendiente de publicación.
4. María Bravo; Waldo García-Jiménez; María José Montero; David Risco; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Carlos Martínez; Javier Blanco; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Postbiotic supplementation in fattened lamb improved health indicators and productive parameters. En preparación.
5. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Javier Blanco; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; María José Montero; Carlos Martínez; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Synergistic effect of bacteria-derived metabolites on antibiotic therapy in an experimental pneumonia in a mouse model. En preparación.

1. María Bravo. Monitorización de resistencias antimicrobianas en poblaciones de jabalí. V Jornadas Veterinarias de Estudiantes y IV Jornadas de Ciencias de la Salud. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 30/03/2017
2. Almudena Torres; María Bravo. Descripción de una técnica para el estudio de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. V Jornadas Veterinarias de Estudiantes y IV Jornadas de Ciencias de la Salud, Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 30/03/2017
3. María Bravo. Overview of Probiotics in Wildlife. Applied Microbiology Group Seminar. University of Surrey (Guildford, Reino Unido). 12/06/2017
4. Pedro Fernández-Llario; María Bravo; Rosario Cerrato; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Joaquín Rey; Jorge Gutiérrez-Merino. Potential use of lactic acid bacteria as probiotics to control TB in wildlife. International Scientific Conference of Probiotics and Prebiotics. Pamida Internacional (Budapest, Hungría). 22/06/2017
5. María Bravo. Isolation of Lactic Acid Bacteria with probiotic properties. Annual meeting of the Association for Veterinary Teaching and Research Work, AVTRW (Guildford, Reino Unido). 12/09/2017
6. María Bravo; Jorge Gutierrez-Merino; Rosario Cerrato; David Risco; Waldo García; Pilar Gonçalves; Joaquín Rey; Pedro Fernández-Llario. Potential use of lactic acid bacteria as probiotics to control TB in wildlife. Xth International Symposium on WILD FAUNA - ISoWIF 2017. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real, Portugal). 21/09/2017
7. Waldo Luis García-Jiménez; David Risco; María Bravo; Caridad Pinilla; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Francisco Javier Salguero; Pedro

- Fernández-Llario. El tratamiento con postbióticos reduce la morbilidad y la mortalidad provocada por *Lawsonia intracellularis* en porcino ibérico. X Foro Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico. Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico (Badajoz, España). 14/03/2018
8. David Risco; Waldo Luis García-Jiménez; María Bravo; Caridad Pinilla; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Francisco Javier Salguero; Pedro Fernández-Llario. Efecto de la aplicación de postbióticos en la flora intestinal, índices productivos y respuesta inmune del lechón ibérico durante la lactación. X Foro Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico. Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico (Badajoz, España). 14/03/2018
 9. María Bravo. Métodos de control de enfermedades infecciosas alternativos al uso de antibióticos en especies cinegéticas. II Jornada Anual de Becarios de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Madrid, España). 13/04/2018
 10. Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; María Bravo; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Javier Salguero; Joaquín Rey; Jorge Gutiérrez. Potential immunomodulatory role of LAB inducing NK-KB and IRF-3 activation and phagocytosis under experimental conditions. Microbial food and feed ingredients. The Danish Microbiological society (Copenhagen, Dinamarca). 02/05/2018
 11. María Bravo. Alternativas al uso de antibióticos en producción animal: los probióticos. IV Congreso Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores Extremeños. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/05/2018
 12. María Bravo. Probióticos como estrategia para el control de enfermedades y la mejora de la productividad en ganadería. II Jornadas Doctorales de la Universidad de Extremadura. Universidad de Extremadura (Cáceres, España).

23/11/2018

13. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Alfredo García; Fermín López; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Joaquín Rey; Pedro Fernández-Llario. Reduction in the incidence of diarrhoea and improved growth performance in lambs supplemented with Ingubal®. 7th Beneficial Microbes Conference. Pre- and Probiotics for Lifelong Human and Animal Health. Bastiaanse Communication (Amsterdam, Holanda). 26/11/2018
14. Carlos Martínez; María Bravo; Rosario Cerrato. Bacteriocinas: una alternativa a los antibióticos para el control de enfermedades. VI Jornadas Veterinarias para Estudiantes y V Jornadas de Ciencias de la Salud. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/03/2019
15. María José Montero; María Bravo; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; David Risco. Efecto de la administración de piensos fermentados en perdices. VI Jornadas Veterinarias para Estudiantes y V Jornadas de Ciencias de la Salud. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/03/2019
16. Carlos Martínez; María Bravo. Actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas. V Congreso Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores Extremeños. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/05/2019
17. María Bravo; María José Montero. Reducción del uso de antibióticos en cerdos blancos suplementados con piensos posbióticos. V Congreso Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores Extremeños. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/05/2019

18. María Bravo; Rosario Cerrato; Waldo García-Jiménez; David Risco; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Jesús Femia; Joaquín Rey; Pedro Fernández-Llario. Improvement in productive and health indicators in Iberian pigs supplemented with Ingubal. Workshop Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. SEPyP (Las Palmas de Gran Canaria, España). 06/02/2019
19. María Bravo. Moduladores de la microbiota como alternativa a los antibióticos en ganadería. V Jornadas Doctorales de la Universidad de Extremadura. Asociación de Doctorandos de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España). 29/11/2019
20. María Bravo. Moduladores de la microbiota como alternativa a los antibióticos en ganadería. VIII Jornadas Doctorales del grupo G9 Universidades. Universidad de Zaragoza (virtual). 23/11/2020
21. María Bravo. Wildlife microbiota: a promising source for probiotics development. Vet School Research Symposium. University of Surrey (virtual). 01/07/2021
22. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Javier Blanco; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; María José Montero; Carlos Martínez; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Efecto sinérgico de posbióticos sobre la terapia antibiótica en una neumonía experimental en modelo ratón. XII Workshop de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, SEMiPyP (virtual). 15/09/2021

Publicaciones divulgativas

1. María Bravo; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pedro Fernández-Llario; Joaquín Rey. Nuevas alternativas a los antibióticos: cómo actúan los probióticos en producción animal. Producción Animal. 310 - septiembre-octubre, pp. 32 - 38. 31/10/2018.

2. David Risco; Julio Fernández; Waldo García-Jiménez; María Bravo; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Mejora de signos clínicos de paratuberculosis en bovino mediante la aplicación de suplementos alimenticios. *Ganadería*. 120 - marzo-abril, pp. 40 - 44. Editorial Agrícola, 30/04/2019.
3. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Pilar Gonçalves; Alfredo García; Joaquín Sánchez-Peinado; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Administración de piensos fermentados (Ingubal Ruminant) en cebo de corderos: mejora de parámetros productivos e indicadores de salud. *Producción Animal*. 314 - mayo-junio, pp. 54 - 60. 28/06/2019.
4. María Bravo; Carlos Martínez; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; María José Montero; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; Joaquín Rey. Efecto inmunomodulador de las bacterias ácido-lácticas. *Ganadería*. 122 - julio-agosto, pp. 52 - 54. Editorial Agrícola, 26/07/2019.
5. Waldo García-Jiménez; María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Francisco J Salguero; Jesús V Díaz; Paula Sánchez-Jiménez; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Empleo de suplementos posbióticos (INGUBAL) para la reducción del uso de antibióticos y mejora de parámetros de salud en porcino. *Producción animal*. 315 - Julio/agosto, pp. 54 - 63. 30/08/2019.
6. María Bravo; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Modulación de la microbiota intestinal y su importancia en los animales de producción. *Badajoz Veterinaria*. 17- diciembre 2020. Colegio de Veterinarios de Badajoz, 1/12/2019.
7. María Bravo; María José Montero; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario.

Suplementación con posbióticos en caballos con piroplasmosis. Extremadura PRE. 35 - abril 2020, pp. 18 - 25. AECCPRE, 30/04/2020.

8. María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Posbióticos, la alternativa a la utilización de antibióticos. Mundo Ganadero. julio/agosto 2020, pp. 22 - 25. Eumedia, 30/07/2020.
9. María Bravo. Posbióticos, un concepto innovador en nutrición animal. Albeitar. 236/237 - junio/julio 2020, pp. 16 - 19. Grupo Asís, 30/07/2020.
10. María Bravo. Moduladores de la microbiota intestinal en veterinaria. En Catálogo de Investigación Joven en Extremadura, volumen III. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura. ISBN: 978-84-0925-221-3. 07/02/2021.

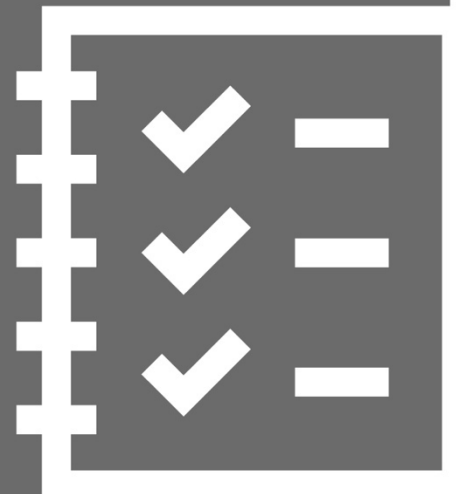
Estancias de formación en centros de I+D+i

1. Estancia de doctorado en la School of Biosciences and Medicina de la Faculty of Health and Medical Sciences de la University of Surrey (Guildford, Reino Unido) en el periodo de tiempo comprendido entre las fechas 20/04/2017 a 30/06/2017 (3 meses de duración)
2. Estancia de doctorado en la School of Biosciences and Medicina de la Faculty of Health and Medical Sciences de la University of Surrey (Guildford, Reino Unido) en el periodo de tiempo comprendido entre las fechas 06/09/2017 a 08/12/2017 (3 meses de duración)
3. Estancia complementaria de doctorado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética en el periodo de tiempo comprendido entre 03/06/2019 y 30/09/2019.

CON

— .

Conclusiones
conclusions



Conclusiones del bloque I: Experimentos de laboratorio *in vitro*

Capítulo I → objetivo I. Dilucidar si la microbiota de las poblaciones de jabalíes contribuye a mantener un estado libre de tuberculosis en fincas localizadas en zonas de alto riesgo de la enfermedad mediante el estudio de las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de su perfil de bacterias ácido-lácticas con capacidad para antagonizar *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis.

Las poblaciones de jabalíes libres de tuberculosis, que están localizadas en zonas catalogadas como de alto riesgo de la enfermedad, presentan un perfil predominante de lactobacilos en su microbiota, cuyo fenotipo se manifiesta como antagonista de *Mycobacterium bovis*, corroborado por un genotipo marcado por clústeres de bacteriocinas que se sobreexpresan en presencia del patógeno. Tanto las propiedades antimicrobianas frente a la micobacteria como la estimulación de respuestas inmunitarias frente a patógenos intracelulares indican que la microbiota podría conferir protección a estos jabalíes frente al desarrollo de la enfermedad. De hecho, un perfil completamente diferente, con abundancia de enterococos que carecen de esas propiedades antagonistas, fue encontrado en jabalíes que habitan en zonas con una prevalencia alta de tuberculosis. Los pediococos fueron encontrados en ambos grupos de estudio, pero solo el pediococo encontrado en el grupo de fincas libres de tuberculosis mostró propiedades inhibitorias frente a *M. bovis*, lo que refuerza la hipótesis de que **la microbiota juega un papel fundamental en la protección frente al desarrollo de la tuberculosis.**

Capítulo II → objetivo II. Estudiar las propiedades potencialmente beneficiosas de las bacterias ácido-lácticas aisladas de la microbiota de jabalíes mediante un análisis genotípico y fenotípico completo del perfil de seguridad de los aislados, de su actividad antimicrobiana frente a patógenos del jabalí y de sus propiedades inmunomoduladoras.

Un total de 11 aislados de la microbiota de jabalí poseen genes que codifican para la producción de metabolitos antimicrobianos, incluidas las bacteriocinas, y otras moléculas que pueden actuar como inmunomoduladoras. **Los lactobacilos son los aislados que disponen de un mayor potencial beneficioso**, debido a que gozan del estado de Presunción Cualificada de Seguridad y muestran proximidad filogenética con cepas de diverso origen, tanto alimentario como medioambiental e individuos sanos, muchas de ellas utilizadas en productos probióticos. **Las propiedades beneficiosas de este grupo de microorganismos dependen de la especie**, así, mientras que los aislados de *Ligilactobacillus salivarius* tienen potencial para el control de infecciones bacterianas con una actividad antimicrobiana potente frente a *Pasteurella multocida* activando, además, la cascada de señalización mediada por NF-κB en macrófagos, los aislados de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lacticaseibacillus paracasei* promueven la activación de la ruta antiviral del interferón. Los pediococos muestran un gran potencial beneficioso, en especial un aislado de *Pediococcus acidilactici* productor de pediocina que muestra una actividad antimicrobiana muy potente frente a *Listeria monocytogenes* y su origen filogenético está relacionado con cepas seguras para los hospedadores. Los enterococos producen varias bacteriocinas como sactipéptidos y lantipéptidos que inhiben al patógeno *Escherichia coli*, pero su origen filogenético se relaciona con cepas patógenas y además contienen en el genoma varios genes de resistencia antimicrobiana, que correlacionan con su fenotipo, y determinantes de virulencia. Por esto, **el potencial perjudicial de los enterococos supera al beneficioso.**

Capítulo III → objetivo III. Determinar la naturaleza de la fracción antimicrobiana y estudiar la sinergia de los metabolitos secretados al sobrenadante de forma óptima con una selección de antibióticos frente a patógenos importantes en medicina veterinaria.

La detección de la fase del crecimiento microbiano en la que se produce la máxima actividad antimicrobiana ha propiciado que se haya optimizado la producción de metabolitos, que actúan en sinergia con varios antibióticos de uso común en medicina veterinaria, fundamentalmente amoxicilina o doxiciclina, frente a los patógenos *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*, respectivamente. Dentro de estos metabolitos, **la fracción de naturaleza proteica**, entre las que se incluyen las bacteriocinas de diferentes clases, **contribuye de forma significativa a la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas aisladas.**

Conclusiones del bloque II: Experimentación animal *in vivo*

Capítulo IV → objetivo IV. Estudiar el efecto de la administración por vía oral de un suplemento elaborado a partir de los metabolitos producidos por las bacterias ácido-lácticas en combinación con la terapia antibiótica para el control de una neumonía experimental en modelo ratón.

El suplemento elaborado para el control de una neumonía experimental producida por el patógeno *Pasteurella multocida* administrado por vía **oral favorece la supervivencia de los ratones infectados** con la dosis letal absoluta **cuando se combina con la terapia antibiótica.** Este modelo experimental valida los procedimientos de cribado y selección de bacterias ácido-lácticas beneficiosas y constituye el paso previo para la elaboración de un posbiótico y su aplicación en condiciones reales.

Capítulo V → objetivo V. Analizar el efecto de la administración de un producto posbiótico elaborado a partir de los aislados sobre los indicadores sanitarios y los parámetros productivos en un cebadero de corderos.

La administración de posbióticos específicamente diseñados para el control de los procesos producidos por el patógeno *Pasteurella multocida* en cebadero de corderos **mejora la prevalencia y gravedad de las lesiones neumónicas y se asocia a un mayor ritmo de crecimiento de los animales**, lo que se traduce en una mejor eficiencia alimentaria. Esta aproximación sanitaria favorece de forma directa la resolución de una problemática infecciosa y tiene un impacto indirecto sobre los parámetros productivos, con la consiguiente mejora en la rentabilidad de los animales de producción. La utilización de posbióticos en ganadería podría constituir una herramienta para limitar la administración de antimicrobianos a situaciones terapéuticas y permitiría satisfacer el incremento en la demanda de productos de origen animal, sin comprometer la salud de estos y de las personas.

Capítulo VI → objetivo VI. Evaluar el efecto de un producto posbiótico administrado durante la época de suplementación llevada a cabo en poblaciones de jabalíes sobre la situación epidemiológica de la tuberculosis.

La suplementación con metabolitos antimicobacterianos e inmunomoduladores incluidos en un **posbiótico** específicamente elaborado **para el control de la tuberculosis se asocia a una disminución en la incidencia**, así como en la **presencia de lesiones** compatibles con esta enfermedad y en la **seroprevalencia** de anticuerpos frente a *M. bovis*, agente causal de la misma, en poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural a la infección. La utilización de posbióticos puede ser considerada como una estrategia factible para el control de la tuberculosis y podría introducirse como herramienta complementaria en los programas de erradicación de la enfermedad a gran escala, tanto en fauna silvestre como en animales de producción y en medicina humana.

Conclusiones del bloque III: transferencia de tecnología y conocimiento científico

Capítulo VII → objetivo VII. Transferir la tecnología y el conocimiento científico derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral mediante la solicitud de patentes de invención, la aplicación de los conocimientos al desarrollo de procesos en la empresa y la difusión de los resultados mediante la asistencia a congresos y la publicación en revistas científicas y divulgativas.

El conocimiento científico generado del desarrollo de la presente tesis de Doctorado Industrial ha tenido un impacto significativo sobre la actividad de la empresa INGULADOS, mejorando su competitividad en el sector. **Se ha creado una nueva línea de trabajo**, dentro del Departamento de Desarrollo de Productos, que ha propiciado el lanzamiento de una gama de productos posbióticos innovadora, así como a la instauración de un nuevo perfil laboral de Responsable de Calidad. La transferencia tecnológica se ha materializado en la **solicitud de dos patentes de invención** y el conocimiento científico generado se ha difundido mediante la publicación de varios artículos científicos en revistas de impacto, abundantes artículos de divulgación en revistas y canales destinados a profesionales del sector y la asistencia a numerosos congresos y seminarios.

Conclusions from block I: *in vitro* laboratory experiments

Chapter I → objective I. To determine whether the microbiota of wild boar populations contributes to maintain a tuberculosis-free status in farms located in high-risk areas of the disease by studying the antimicrobial and immunomodulatory properties of their lactic acid bacteria profile with the ability to antagonize *Mycobacterium bovis*, the causative agent of tuberculosis.

Wild boar tuberculosis-free populations, which are located in high-risk areas of the disease, harbor a predominant lactobacilli profile within their microbiota, whose phenotype displays an antagonism toward *Mycobacterium bovis*, corroborated by a genotype marked by clusters of bacteriocins that are overexpressed in the presence of the pathogen. Both the antimicrobial properties against mycobacteria and the stimulation of immune responses against intracellular pathogens indicate that the microbiota could confer protection against the development of the disease in the host. In fact, a completely different profile, with an abundance of enterococci lacking these antagonistic properties, was found in wild boar inhabiting areas with a high prevalence of tuberculosis. Pediococci were found in both study groups, but only the pediococcus found in the group of tuberculosis-free populations showed inhibitory properties against *M. bovis*, which reinforces the hypothesis that **the microbiota plays an essential role on the protection against the development of tuberculosis.**

Chapter II → objective II. To study the potentially beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from the microbiota of wild boars through a complete genotypic and phenotypic analysis of the safety profile of the isolates, their antimicrobial activity against wild boar pathogens and their immunomodulatory properties.

A total of 11 isolates from the wild boar microbiota possess genes that code for the production of antimicrobial metabolites, including bacteriocins, and other molecules that can act as immunomodulators. **Lactobacilli are the isolates with the greatest beneficial potential**, due to their status of Qualified Presumption of Safety and their phylogenetic proximity with strains of diverse origin, including food, environmental and healthy individuals, many of them used in probiotic products. **The beneficial properties of this group of microorganisms depend on the species.** *Ligilactobacillus salivarius* isolates have the potential to control bacterial infections due to their strong antimicrobial activity against *Pasteurella multocida* and their ability to activate the signaling cascade mediated by NF- κ B in macrophages. On the other side, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* isolates promote the activation of the interferon antiviral pathway. Pediococci show a great beneficial potential, especially the pediocin-producer *Pediococcus acidilactici* isolate that shows a very potent antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and its phylogenetic origin is related to safe strains. Enterococci produce several bacteriocins such as sactipeptides and lanthipeptides that inhibit the pathogen *Escherichia coli*, but their phylogenetic origin is related to pathogenic strains and they also contain several virulence determinants and antimicrobial resistance genes in the genome, which correlate with their phenotype. Therefore, **the harmful risk of enterococci outweighs the beneficial potential.**

Chapter III → objective III. To determine the nature of the antimicrobial fraction and to study the synergy of the metabolites optimally secreted to the supernatant with a selection of antibiotics against important pathogens in veterinary medicine.

The detection of the microbial growth phase in which the maximum antimicrobial activity occurs has led to the optimization of the production of metabolites, which act in synergy with several antibiotics commonly used in veterinary medicine, mainly amoxicillin or doxycycline, against pathogens *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida*, respectively. Within these metabolites, **the protein fraction**, including bacteriocins of different classes, **contributes significantly to the antimicrobial activity displayed by the lactic acid bacteria.**

Conclusions from block II: *in vivo* animal experiments

Chapter IV → objective IV. To study the effect of the oral administration of a supplement produced from lactic acid bacteria metabolites in combination with the antibiotic therapy for the control of an experimental pneumonia in a mouse model.

The oral supplement developed for the control of an experimental pneumonia produced by the pathogen *Pasteurella multocida* **favors the survival of infected mice** with the absolute lethal dose **when combined with antibiotic therapy.** This experimental model validates the procedures of beneficial lactic acid bacteria screening and selection and constitutes the preliminary step for the postbiotic elaboration before its application in real conditions.

Chapter V → objective V. To analyze the effect of the administration of a lactic acid bacteria-derived postbiotic on the health indicators and the productive parameters in a lamb feedlot.

The administration of postbiotics specifically designed to control the processes produced by the pathogen *Pasteurella multocida* in a lamb feedlot **improves the prevalence and severity of pneumonic lesions and is associated with a higher growth rate of the animals**, which translates into a better feed efficiency. This sanitary approach directly favors the resolution of an infectious problem and has an indirect impact on the productive parameters, with the consequent improvement in the profitability of production animals. The use of postbiotics in livestock could be a tool to limit the administration of antimicrobials to therapeutic situations and would allow meeting the increase in demand for products of animal origin without compromising animal or human health.

Chapter VI → objective VI. To evaluate the effect of a postbiotic product administered during the supplementation period on the epidemiological situation of tuberculosis in wild boar populations.

Supplementation with antimycobacterial and immunomodulatory metabolites included in a **postbiotic** specifically developed **for the control of tuberculosis is associated with a decrease in the incidence**, as well as in the **presence of lesions** compatible with this disease and in the **seroprevalence** of antibodies against *M. bovis* in populations of naturally exposed wild boar. The use of postbiotics can be considered as a feasible strategy for tuberculosis control and could be introduced as a complementary tool in large-scale eradication programs of the disease, not only in wildlife and livestock but also in human medicine.

Conclusions from block III: technology and scientific knowledge transfer

Chapter VII → objective VII. To transfer the technology and scientific knowledge derived from this doctoral thesis through the application of invention patents, the application of knowledge to the development of processes in the company and the dissemination of the results by attending congresses and publishing in scientific journals and popular press.

The scientific knowledge generated from the development of this Industrial Doctorate thesis has had a significant impact on the activity of INGULADOS, improving the competitiveness of the company within its sector. **A new line of work has been created**, within the Product Development Department, which has led to the launch of an innovative range of postbiotic products, as well as the establishment of a new job profile for Quality Manager. The technology transfer has resulted in the **application for two invention patents** and the scientific knowledge generated has been communicated through the publication of several scientific articles in high-impact journals, abundant dissemination articles in magazines and channels aimed at target professionals and assistance to numerous conferences and seminars.

REF

— .

Referencias bibliográficas



- Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortazar, C., Höfle, U., Fernández-de-Mera, I., y Amos, W. (2005). Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology*, 14(10), 3209–3217.
- Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(Supplement_2), S340-5.
- Adesina, I., y Enerijiofi, K. (2016). Effect of pH and heat treatment on bacteriocin activity of *Pediococcus pentosaceus* IO1, *Tetragenococcus halophilus* PO9 and *Lactobacillus cellobiosus* BE1. *SAU Science-Tech Journal*, 1(1), 113-118.
- Afdora, P. T., Ardiyati, T., Sjojfan, O., y Kalsum, U. (2010). Potential antibacterials compounds of lactic acid bacteria (LAB) from quail intestine (*Coturnix japonica*) in inhibition growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Tropical Life Science*, 1(1), 28–31.
- Aguilar-Toalá, J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., y Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science y Technology*, 75, 105–114.
- Ahern, P. P., y Maloy, K. J. (2020). Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. *Immunology*, 159(1), 4–14.
- Ai, L., Chen, C., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W., y Guo, B. (2011). Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3160-3161.

- Aktas, B., De Wolfe, T. J., Tandee, K., Safdar, N., Darien, B. J., y Steele, J. L. (2015). The effect of *Lactobacillus casei* 32G on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. *PloS One*, *10*(12), e0145784.
- Akter, T., Rahman, M. M., Tay, A. C. Y., Ehsan, R., y Islam, M. T. (2020). Whole-Genome Sequence of Fish-Pathogenic *Enterococcus faecalis* Strain BFFF11. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(7), e01447-19.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., y Helander, I. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(5), 2001–2005.
- Alam, A., y Neish, A. (2018). Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function. *Tissue Barriers*, *6*(3), 1539595.
- Alexandratos, N., y Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: The 2012 revision*. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.
- Ali, L., Goraya, M. U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.-L., y Yu, D. (2017). Molecular mechanism of quorum-sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(5), 960.
- Al-Otaibi, H. S., Gashgari, R. M., Mohammed, A. E., Almojel, S. A., Elobeid, M. M., y Al Abrahaim, J. S. (2016). Investigation of the growth ability of probiotic (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) in infant's milk under different environmental conditions. *Biomedical and Pharmacology Journal*, *9*(2), 451–462.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., y Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 2939–2951.

- Amado, I. R., Fuciños, C., Fajardo, P., y Pastrana, L. (2016). Pediocin SA-1: A selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 8070–8080.
- Amat, S., Timsit, E., Baines, D., Yanke, J., y Alexander, T. W. (2019). Development of bacterial therapeutics against the bovine respiratory pathogen *Mannheimia haemolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(21), e01359-19.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., y Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(6), 2269–2272.
- Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., y Vela, A. I. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6), 2602–2608.
- Ayele, W., Neill, S., Zinsstag, J., Weiss, M., y Pavlik, I. (2004). Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *8*(8), 924–937.
- Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., y Lund Nielsen, J. (2016). The microbiome of animals: Implications for conservation biology. *International Journal of Genomics*, 2016.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., y Bryden, W. L. (2016a). *Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation*. FAO.
- Baker, K. S. (2020). Microbe hunting in the modern era: Reflecting on a decade of microbial genomic epidemiology. *Current Biology*, *30*(19), R1124–R1130.

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., y Prjibelski, A. D. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477.
- Barasona, J. A., Torres, M. J., Aznar, J., Gortázar, C., y Vicente, J. (2017). DNA detection reveals Mycobacterium tuberculosis complex shedding routes in its wildlife reservoir the Eurasian wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(3), 906–915.
- Bárcena, J. B., Siñeriz, F., de Llano, D. G., Rodríguez, A., y Suárez, J. E. (1998). Chemostat Production of Plantaricin C By *Lactobacillus plantarum* LL441. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3512–3514.
- Barragán, P. J., Sanchez, O. J., y Henao-Rojas, J. C. (2020). Evaluation of the Growth Kinetics of *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 on a Medium Based on Hydrolyzed Bovine Blood Plasma at Laboratory and Bench-Scale Levels and Its Application as a Starter Culture in a Meat Product. *Fermentation*, 6(2), 45.
- Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., y Biron, E. (2018). Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
- Belkaid, Y., y Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157(1), 121–141.
- Beltrán-Beck, B., Ballesteros, C., Vicente, J., De la Fuente, J., y Gortázar, C. (2012). Progress in oral vaccination against tuberculosis in its main wildlife reservoir in Iberia, the Eurasian wild boar. *Veterinary Medicine International*, 2012.

- Braïek, O.B., y Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International*, 2019.
- Bene, K. P., Kavanaugh, D. W., Leclaire, C., Gunning, A. P., MacKenzie, D. A., Wittmann, A., Young, I. D., Kawasaki, N., Rajnavolgyi, E., y Juge, N. (2017). Lactobacillus reuteri surface mucus adhesins upregulate inflammatory responses through interactions with innate C-type lectin receptors. *Frontiers in Microbiology*, 8, 321.
- Bizani, D., y Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 512–519.
- Blumenthal, D. K., y Garrison, J. C. (2011). Pharmacodynamics: Molecular mechanisms of drug action. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. San Diego: The McGraw-Hill Companies*, 41–71.
- Boadella, M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., De la Fuente, J., y Gortázar, C. (2012). Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of Mycobacterium bovis and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(3–4), 214–221.
- Boitani, L. (1992). Aging wild boar (Sus scrofa) by tooth eruption. *Ongules/Ungulates*, 91, 419–421.
- Borsuk, S., Mendum, T. A., Fagundes, M. Q., Michelon, M., Cunha, C. W., McFadden, J., y Dellagostin, O. A. (2007). Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in Mycobacterium bovis BCG. *Tuberculosis*, 87(6), 474–480.

- Bravo, M. (2019). *Resistencias antimicrobianas: A propósito de una investigación sobre la prevalencia en trabajadores de la Universidad de Extremadura*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura.
- Bravo, M., Iglesias, R., y Palomo, G. (2020). Situación del sector ovino y caprino en España. In *Principales enfermedades infecciosas y parasitarias del ganado ovino y caprino en España* (pp. 19–40). Servicio de Publicaciones UEx.
- Briones, V., De Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.-I., y Galka, M. (2000). Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerging Infectious Diseases*, 6(2), 189.
- Broadbent, J. R., Neeno-Eckwall, E. C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath, P., Heidenreich, J., Perna, N. T., y Barrangou, R. (2012). Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics*, 13(1), 1–18.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Buchrieser, C., Pym, A. S., Garnier, T., y Cole, S. T. (2000). Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast*, 17(2), 111–123.
- Buddle, B. M., Vordermeier, H. M., Chambers, M. A., y de Klerk-Lorist, L.-M. (2018). Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 259.
- Buffie, C. G., y Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(11), 790–801.
- Busarcevic, M., y Dalgalarrodo, M. (2012). Purification and genetic characterisation of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(2), 127–134.

- Byers, S. R., y Kramer, J. W. (2010). Normal hematology of sheep and goats. In *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed., pp. 862–869). Blackwell Publishing.
- Byrne, A. W., Allen, A. R., O'Brien, D. J., y Miller, M. A. (2019). Bovine Tuberculosis—International Perspectives on Epidemiology and Management. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 202.
- Cambier, C., Falkow, S., y Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497–1509.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., y O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), e01738-18.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., y Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903.
- Cardona, P., Marzo-Escartín, E., Tapia, G., Díaz, J., García, V., Varela, I., Vilaplana, C., y Cardona, P.-J. (2016). Oral administration of heat-killed *Mycobacterium manresensis* delays progression toward active tuberculosis in C3HeB/FeJ mice. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1482.
- Casadei, G., Grilli, E., y Piva, A. (2009). Pediocin A modulates intestinal microflora metabolism in swine in vitro intestinal fermentations. *Journal of Animal Science*, 87(6), 2020–2028.
- Cebrián, R., Rodríguez-Cabezas, M. E., Martín-Escolano, R., Rubiño, S., Garrido-Barros, M., Montalbán-López, M., Rosales, M. J., Sánchez-Moreno, M., Valdivia, E., y

- Martínez-Bueno, M. (2019). Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48 bacteriocin. *Journal of Advanced Research*, 20, 129–139.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., y Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686–707.
- Che' Amat, A., Armenteros, J. A., González-Barrio, D., Lima, J., Díez-Delgado, I., Barasona, J. A., Romero, B., Lyashchenko, K. P., Ortiz, J.-A., y Gortázar, C. (2016). Is targeted removal a suitable means for tuberculosis control in wild boar? *Preventive Veterinary Medicine*, 135, 132–135.
- Chen, Y. E., Fischbach, M. A., y Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota–host interactions. *Nature*, 553(7689), 427–436.
- Ch'ng, J.-H., Chong, K. K., Lam, L. N., Wong, J. J., y Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 82–94.
- Cho, S. W., Yang, J., Park, S., Kim, B., y Seo, S. W. (2019). Complete Genome Sequence of Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* Strain ATCC 8042, an Autolytic Anti-bacterial Peptidoglycan Hydrolase Producer. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(3), 483–487.
- Choi, E. A., y Chang, H. C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 210–217.
- Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., y Severi, C. (2014). Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48, S18–S22.

- Cleveland, J., Chikindas, M., y Montville, T. J. (2002). Multimethod assessment of commercial nisin preparations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 228–232.
- Collado, M., Vinderola, G., y Salminen, S. (2019). Postbiotics: Facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Beneficial Microbes*, 10(7), 711–719.
- Reglamento (CE) 429/2008 de la comisión de 25 de abril de 2008 sobre normas de desarrollo para la aplicación del Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a la preparación y presentación de solicitudes y a la evaluación y autorización de aditivos para piensos, (2008).
- Coque, T. M., Singh, K. V., Weinstock, G. M., y Murray, B. E. (1999). Characterization of Dihydrofolate Reductase Genes from Trimethoprim-Susceptible and Trimethoprim-Resistant Strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 141–147.
- Corner, L. A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112(2–4), 303–312.
- Correa-Fiz, F., Blanco-Fuertes, M., Navas, M. J., Lacasta, A., Bishop, R. P., Githaka, N., Onzere, C., Le Potier, M.-F., Almagro-Delgado, V., y Martinez, J. (2019). Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of domesticated and wild suids. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15.
- Cosma, C. L., Sherman, D. R., y Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 641–676.

- Rubiralta, M., Bellavista, J. (2003). Nuevos mecanismos de transferencia de tecnología. Debilidades y oportunidades del sistema español de transferencia de tecnología. *Libro Nº 9 de la Colección de Encuentros Empresariales CONEC*. Fundación Cotec Para La Innovación Tecnológica.
- Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788.
- Cumming, B. M., y Steyn, A. J. (2015). Metabolic plasticity of central carbon metabolism protects mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13135–13136.
- De la Rúa-Domenech, R. (2006). Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 86(2), 77–109.
- de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., y Chiappini, E. (2019). Immune response to Mycobacterium tuberculosis: A narrative review. *Frontiers in Pediatrics*, 7, 350.
- Deng, L., He, C., Zhou, Y., Xu, L., y Xiong, H. (2017). Ground transport stress affects bacteria in the rumen of beef cattle: A real-time PCR analysis. *Animal Science Journal*, 88(5), 790–797.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., y Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*, 8(4), 1153–1177.
- Diep, D. B., Håvarstein, L. S., y Nes, I. F. (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in Lactobacillus plantarum C11. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4472–4483.

- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., y Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562–1574.
- Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., y Gortázar, C. (2017). Parenteral vaccination with heat-inactivated mycobacterium bovis reduces the prevalence of tuberculosis-compatible lesions in farmed wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), e18–e21.
- Díez-Delgado, I., Sevilla, I. A., Romero, B., Tanner, E., Barasona, J. A., White, A. R., Lurz, P. W., Boots, M., de la Fuente, J., y Dominguez, L. (2018). Impact of piglet oral vaccination against tuberculosis in endemic free-ranging wild boar populations. *Preventive Veterinary Medicine*, 155, 11–20.
- Díez-Delgado, I., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Romero, B., Geijo, M. V., Dominguez, L., Juste, R. A., Aranaz, A., de la Fuente, J., y Gortazar, C. (2019). Tuberculosis vaccination sequence effect on protection in wild boar. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66, 101329.
- Dimitrieva-Moats, G. Y., y Ünlü, G. (2012). Development of freeze-dried bacteriocin-containing preparations from lactic acid bacteria to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(1), 27–38.
- Dina, J., Malbruny, B., y Leclercq, R. (2003). Nonsense mutations in the *Isa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2307–2309.

- Dolasia, K., Bisht, M. K., Pradhan, G., Udgata, A., y Mukhopadhyay, S. (2018). TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 3–19.
- du Teil Espina, M., Gabarrini, G., Harmsen, H. J., Westra, J., van Winkelhoff, A. J., y van Dijk, J. M. (2019). Talk to your gut: The oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(1), 1–18.
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., y Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S27–S48.
- Ducarmon, Q., Zwiittink, R., Hornung, B., van Schaik, W., Young, V., y Kuijper, E. (2019). Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(3), e00007-19.
- Dumas, A., Corral, D., Colom, A., Levillain, F., Peixoto, A., Hudrisier, D., Poquet, Y., y Neyrolles, O. (2018). The host microbiota contributes to early protection against lung colonization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology*, 9, 2656.
- Dunbar, K. L., Scharf, D. H., Litomska, A., y Hertweck, C. (2017). Enzymatic carbon–sulfur bond formation in natural product biosynthesis. *Chemical Reviews*, 117(8), 5521–5577.
- Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N. C., y Kemp, E. H. (2016). Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. In

Autoimmunity Reviews (Vol. 15, Issue 4, pp. 379–392). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.002>

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).

(2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-

Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A.,

Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P.,

Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., ... Herman, L. (2021).

Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to

food or feed as notified to EFSA 13: Suitability of taxonomic units notified to EFSA

until September 2020. *EFSA Journal*, 19(1), e06377.

Ekblad, B., Kyriakou, P. K., Oppegård, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y. N., y Kristiansen,

P. E. (2016). Structure–function analysis of the two-peptide bacteriocin

plantaricin EF. *Biochemistry*, 55(36), 5106–5116.

Espinosa-Santos, V. (2010). Difusión y divulgación de la investigación científica. *Idesia*

(Arica), 28(3), 5–6.

EUCAST. (2021). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.*

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0,

2021. [Http://www.eucast.org](http://www.eucast.org).

European Commission. (2017). Commission regulation (EU) 2017/1017 of 15 June 2017

amending Regulation (EU) No 68/2013 on the catalogue of feed materials.

Official J, 50, 48–119.

- European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA-Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587.
- FAO/WHO, E. C. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*.
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M.-H., Lievin-Le Moal, V., y Servin, A. L. (2005). PH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008–6013.
- Fellag, M., Gouba, N., Bedotto, M., Sakana, M., Zingué, D., Tarnagda, Z., Million, M., y Drancourt, M. (2020). Culturomics Discloses Anti-Tubercular Enterococci Exclusive of Pulmonary Tuberculosis: A Preliminary Report. *Microorganisms*, 8(10), 1544.
- Fernández-Llario, P. (2006). Jabalí (Sus scrofa). In Carrascal, L.M. y Salvador, A. (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*.
- Ferran, A. A., Toutain, P.-L., y Bousquet-Mélou, A. (2011). Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of Pasteurella multocida infection. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 292–297.
- Fisher, K., y Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155(6), 1749–1757.

- Fitzgerald, S., y Kaneene, J. (2013). Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: Hosts, pathology, surveillance, and control. *Veterinary Pathology*, 50(3), 488–499.
- Fleige, S., Preißinger, W., Meyer, H., y Pfaffl, M. (2007). Effect of lactulose on growth performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk replacer containing *Enterococcus faecium*. *Animal*, 1(3), 367–373.
- Flynn, S., Van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I. F., y Collins, J. K. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* UCC118. The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF408405. *Microbiology*, 148(4), 973–984.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., y Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62.
- Ganguli, K., Collado, M. C., Rautava, J., Lu, L., Satokari, R., von Ossowski, I., Reunanen, J., de Vos, W. M., Palva, A., y Isolauri, E. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatric Research*, 77(4), 528–535.
- Gao, H., Chi, X., Li, G., Qin, W., Song, P., Jiang, F., Liu, D., Zhang, J., Zhou, X., y Li, S. (2020). Gut microbial diversity and stabilizing functions enhance the plateau adaptability of Tibetan wild ass (*Equus kiang*). *MicrobiologyOpen*, e1025.
- García, C. E. V., Petrova, M., Claes, I. J., De Boeck, I., Verhoeven, T. L., Dilissen, E., von Ossowski, I., Palva, A., Bullens, D. M., y Vanderleyden, J. (2015). Piliation of

- Lactobacillus rhamnosus GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2050–2062.
- García-Jiménez, W., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J., Cerrato, R., Cuesta, J., García-Sánchez, A., Gonçalves, P., Martínez, R., Risco, D., y Salguero, F. (2013). Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3–4), 435–446.
- García-Jiménez, W., Bravo, M., Risco, D., Gonçalves, P., Montero, M. J., Martínez, C., Arenas, V., Horrillo, R., y Fernández-Llario, P. (2019). Pasteurellosis ovina: Utilidad de los cuadros lesionales para el diagnóstico. *Ganadería*, 123, 38–43.
- Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R. C., Boadella, M., Lyashchenko, K. P., Romero, B., y Geijo, M. V. (2011). Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PloS One*, 6(9), e24905.
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S., Kumar, A., y Kapila, S. (2014). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(1), 47–58.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., y Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116–S119.
- Gazzaniga, F. S., y Kasper, D. L. (2018). Wild gut microbiota protects from disease. *Cell Research*, 28(2), 135–136.

- Getahun, D., Getabalew, M., Zewdie, D., Alemneh, T., y Akeberegn, D. (2019). Urea metabolism and recycling in ruminants. *BJSTR*, 20, 14790–14796.
- Gibson, K. M., Nguyen, B. N., Neumann, L. M., Miller, M., Buss, P., Daniels, S., Ahn, M. J., Crandall, K. A., y Pukazhenthii, B. (2019). Gut microbiome differences between wild and captive black rhinoceros—implications for rhino health. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- Gil Sánchez, J. (2003). Toxiinfecciones alimentarias: ¿una patología emergente?. *Control calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Toxialim.pdf>
- Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., y Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98–S107.
- Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco, B. D., y De Martinis, E. C. (2008). Prevalence and characterization of Enterococcus spp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25(5), 668–675.
- Gonzalez, C. F., y Kunka, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2534–2538.
- González, J., Bello, J., Rodríguez, M., Navarro, T., Lacasta, D., Fernández, A., y De las Heras, M. (2016). Lamb feedlot production in Spain: Most relevant health issues. *Small Ruminant Research*, 142, 83–87.

- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity*, *44*(3), 463–475.
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., y Vicente, J. (2006). Disease risk and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, *52*, 81–87.
- Gortazar, C., Diez-Delgado, I., Barasona, J. A., Vicente, J., De La Fuente, J., y Boadella, M. (2015). The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: A review. *Frontiers in Veterinary Science*, *1*, 27.
- Gradisteanu-Pircalabioru, G., Popa, L. I., Marutescu, L., Gheorghe, I., Popa, M., Czobor Barbu, I., Cristescu, R., y Chifiriuc, M.-C. (2021). Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics*, *13*(2), 196.
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(4), a025387.
- Grove, T. L., Himes, P. M., Hwang, S., Yumerefendi, H., Bonanno, J. B., Kuhlman, B., Almo, S. C., y Bowers, A. A. (2017). Structural insights into thioether bond formation in the biosynthesis of sactipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, *139*(34), 11734–11744.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de Los Reyes-Gavilán, C. G., y Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 202.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., y Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., y Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, *26*(2), 142–150.

- Halim, M., Mustafa, N. A. M., Othman, M., Wasoh, H., Kapri, M. R., y Ariff, A. B. (2017). Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. *LWT-Food Science and Technology*, *81*, 210–216.
- Han, N., Qiang, Y., y Zhang, W. (2016). ANItools web: A web tool for fast genome comparison within multiple bacterial strains. *Database*, *2016*, baw084.
- Hanchi, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J., Ouellette, M., y Fliss, I. (2017). Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. *Future Microbiology*, *12*(3), 205–212.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., y Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—An update. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1791.
- Harkness, J. E., Turner, P. V., VandeWoude, S., y Wheler, C. L. (2013). *Harkness and Wagner's biology and medicine of rabbits and rodents*. John Wiley y Sons.
- Harris, H. M., Bourin, M. J., Claesson, M. J., y O'Toole, P. W. (2017). Phylogenomics and comparative genomics of *Lactobacillus salivarius*, a mammalian gut commensal. *Microbial Genomics*, *3*(8).
- Harrison, X. A., Sewell, T., Fisher, M., y Antwis, R. E. (2020). Designing probiotic therapies with broad-spectrum activity against a wildlife pathogen. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3134.
- Hayden, M., West, A., y Ghosh, S. (2006). NF- κ B and the immune response. *Oncogene*, *25*(51), 6758–6780.

- He, F., Qin, X., Xu, N., Li, P., Wu, X., Duan, L., Du, Y., Fang, R., Hardwidge, P. R., y Li, N. (2020). *Pasteurella multocida* Pm0442 affects virulence gene expression and targets TLR2 to induce inflammatory responses. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1972.
- He, Y., Wen, Q., Yao, F., Xu, D., Huang, Y., y Wang, J. (2017). Gut–lung axis: The microbial contributions and clinical implications. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(1), 81–95.
- Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., y Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin production: A relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research*, *5*.
- Herbin, S., Mathieu, F., Brulé, F., Branlant, C., Lefebvre, G., y Lebrihi, A. (1997). Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology*, *35*(6), 319–326.
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., y Margolles, A. (2015). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1285.
- Hochwind, K., Weinmaier, T., Schmid, M., van Hemert, S., Hartmann, A., Rattei, T., y Rothballer, M. (2012). Draft genome sequence of *Lactobacillus casei* W56. *Journal of Bacteriology*, *194*(23), 6638.
- Hong, B.-Y., Maulén, N. P., Adami, A. J., Granados, H., Balcells, M. E., y Cervantes, J. (2016). Microbiome changes during tuberculosis and antituberculous therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, *29*(4), 915–926.

- Hooper, L. V., Midtvedt, T., y Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283–307.
- Hörmannspenger, G., von Schillde, M.-A., y Haller, D. (2013). Lactocepín as a protective microbial structure in the context of IBD. *Gut Microbes*, 4(2), 152–157.
- Hsuan, S., Kannan, M. S., Jeyaseelan, S., Prakash, Y., Malazdrewich, C., Abrahamsen, M., Sieck, G., y Maheswaran, S. (1999). Pasteurella haemolytica leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF- κ B activation and calcium elevation. *Microbial Pathogenesis*, 26(5), 263–273.
- Hu, C., Mayadas-Norton, T., Tanaka, K., Chan, J., y Salgame, P. (2000). Mycobacterium tuberculosis infection in complement receptor 3-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2596–2602.
- Hu, Y., Feng, Y., Wu, J., Liu, F., Zhang, Z., Hao, Y., Liang, S., Li, B., Li, J., y Lv, N. (2019). The gut microbiome signatures discriminate healthy from pulmonary tuberculosis patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 90.
- Huberman, Y., Malena, R., Lomónaco, J., Nievas, P., y Terzolo, H. (2015). *Evaluación de medios de cultivo para aislamiento de Pasteurella multocida*. 9nas. Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, Mar del Plata.
- Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., Mustapha, N. M., Zulkifli, I., y Izuddin, W. I. (2019). Effects of Feeding Different Postbiotics Produced by Lactobacillus plantarum on Growth Performance, Carcass Yield, Intestinal

- Morphology, Gut Microbiota Composition, Immune Status, and Growth Gene Expression in Broilers under Heat Stress. *Animals*, 9(9), 644.
- Hutchings, M. I., Palmer, T., Harrington, D. J., y Sutcliffe, I. C. (2009). Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: Knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends in Microbiology*, 17(1), 13–21.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., FitzGerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Informe Final Técnico-Financiero Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina Año 2019.* (2019). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Izuddin, W. I., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., y Humam, A. M. (2019a). Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- Izuddin, W. I., Loh, T. C., Samsudin, A. A., Foo, H. L., Humam, A. M., y Shazali, N. (2019b). Effects of postbiotic supplementation on growth performance, ruminal fermentation and microbial profile, blood metabolite and GHR, IGF-1 and MCT-1 gene expression in post-weaning lambs. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 315.
- Jabés, D., Brunati, C., Candiani, G., Riva, S., Romanó, G., y Donadio, S. (2011). Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-

- resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1671–1676.
- Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D., y Andersen, S. R. (2007). Horizontal transfer of tet (M) and erm (B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1), 158–166.
- Jaimee, G., y Halami, P. (2016). Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin—An impending menace. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1137–1151.
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.-A., Chamba, J.-F., Bertrand, X., y Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiology*, 31(2), 191–198.
- Kanak, E. K., y Yilmaz, S. Ö. (2018). Maldi-tof mass spectrometry for the identification and detection of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from local cheeses. *Food Science and Technology*, 39, 462-469.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., y Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Elsevier academic press.
- Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B. E., y Höök, M. (2013). Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20520–20531.

- Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., y Jacobsen, I. D. (2018). Fungi as part of the microbiota and interactions with intestinal bacteria. En M. Rodrigues (Ed.), *Fungal physiology and immunopathogenesis* (264-293). Springer.
- Karczewski, J., Poniedziałek, B., Adamski, Z., y Rzymiski, P. (2014). The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*, 47(8), 494–504.
- Kaufmann, S. H., y Dorhoi, A. (2016). Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity*, 44(3), 476–491.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., y Itoh, T. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2906–2911.
- Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D.-J., y Carreras, J. (2013). Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity*, 38(6), 1187–1197.
- Kehrenberg, C., Salmon, S. A., Watts, J. L., y Schwarz, S. (2001). Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: Intergeneric spread of the tet (H) plasmid pMHT1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(5), 631–640.
- Kim, S., Covington, A., y Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*, 279(1), 90–105.

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., y Fiers, M. W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1990–1995.
- Kline, K., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., y Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host y Microbe*, *5*, 580–592.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>
- Klose, V., Bayer, K., Kern, C., Goelß, F., Fibi, S., y Wegl, G. (2014). Antibiotic resistances of intestinal lactobacilli isolated from wild boars. *Veterinary Microbiology*, *168*(1), 240–244.
- Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., y Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, *43*(3), 336–341.
- Kristinsson, G., y Adam, H. (2007). *Pasteurella multocida* infections. *Pediatr. Rev*, *28*(2), 472-473.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., y De Vos, W. M. (1993). Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*: Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry*, *216*(1), 281–291.
- Lacasta, D., Ferrer, L., Ramos, J., González, J., y De las Heras, M. (2008). Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. *Small Ruminant Research*, *80*(1–3), 28–32.
- Latimer, K. S. (2011). *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: Clinical pathology*. John Wiley y Sons.

- Lawrence, T. L. J., Fowler, V. R., y Novakofski, J. E. (2012). *Growth of farm animals*. Cabi.
- Lebedeva, E., Bagaev, A., Pichugin, A., Chulkina, M., Lysenko, A., Tutykhina, I., Shmarov, M., Logunov, D., Naroditsky, B., y Ataulakhanov, R. (2018). The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. *BMC Immunology*, 19(1), 1–14.
- LeBel, G., Piché, F., Frenette, M., Gottschalk, M., y Grenier, D. (2013). Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides*, 50, 19–23.
- LeBlanc, J., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V. v, van Sinderen, D., Taranto, M. P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S., y Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297–1309.
- Lebreton, F., Willems, R. J., y Gilmore, M. S. (2014). Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection [Internet]*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Lee, W.-J., y Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416–424.
- Leonard, M. T., Valladares, R. B., Ardisson, A., Gonzalez, C. F., Lorca, G. L., y Triplett, E. W. (2014). Complete genome sequences of *Lactobacillus johnsonii* strain N6. 2 and *Lactobacillus reuteri* strain TD1. *Genome Announcements*, 2(3), e00397-14.
- Li, F., Shah, A. M., Wang, Z., Peng, Q., Hu, R., Zou, H., Tan, C., Zhang, X., Liao, Y., y Wang, Y. (2019). Effects of Land Transport Stress on Variations in Ruminal Microbe Diversity and Immune Functions in Different Breeds of Cattle. *Animals*, 9(9), 599.

- Li, J. B., Lee, D. S. W., y Madrenas, J. (2013). Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: Basic research and translational opportunities. *Frontiers in Immunology*, 4, 347.
- Litvak, Y., y Bäumler, A. J. (2019). The founder hypothesis: A basis for microbiota resistance, diversity in taxa carriage, and colonization resistance against pathogens. *PLoS Pathogens*, 15(2), e1007563.
- Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., y Chi, C. (2016). Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 386–390.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., y Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria* (pp. 103–203). Springer.
- Loh, T. C., Foo, H. L., Sazili, A. Q., y Bejo, M. H. (2014). Effects of feeding different postbiotic metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* strains on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma cholesterol in laying hens. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 149.
- López, M. M., Jiménez, S. P., y González, S. V. (2007). Probióticos: Potencial para prevenir y curar. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 573.
- Luciano, S. A., y Roess, A. (2020). Human zoonotic tuberculosis and livestock exposure in low-and middle-income countries: A systematic review identifying challenges in laboratory diagnosis. *Zoonoses and Public Health*, 67(2), 97–111.
- Luo, M., Liu, Y., Wu, P., Luo, D.-X., Sun, Q., Zheng, H., Hu, R., Pandol, S. J., Li, Q.-F., y Han, Y.-P. (2017). Alternation of gut microbiota in patients with pulmonary tuberculosis. *Frontiers in Physiology*, 8, 822.

- MacKenzie, D. A., McLay, K., Roos, S., Walter, J., Swarbreck, D., Drou, N., Crossman, L. C., y Juge, N. (2014). Draft genome sequence of a novel *Lactobacillus salivarius* strain isolated from piglet. *Genome Announcements*, 2(1), e01231-13.
- Macuamule, C., Wiid, I., van Helden, P., Tanner, M., y Witthuhn, R. (2016). Effect of milk fermentation by kefir grains and selected single strains of lactic acid bacteria on the survival of *Mycobacterium bovis* BCG. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 170–176.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2003). Microbial growth. *Brock Biology of Microorganisms*, 137–166.
- Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., y Ruiz-Barba, J. L. (2004). Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1556–1564.
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., y Jiménez-Díaz, R. (2004). Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*, 181(1), 8–16.
- Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., y Ruiz-Barba, J. L. (2013). Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiology*, 33(1), 40–47.
- Marakalala, M. J., Martinez, F. O., Plüddemann, A., y Gordon, S. (2018). Macrophage heterogeneity in the immunopathogenesis of tuberculosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1028.

- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., y Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14277–14284.
- Marco, M. L., y Tachon, S. (2013). Environmental factors influencing the efficacy of probiotic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 207–213.
- Mariam, S. H. (2009). Interaction between lactic acid bacteria and *Mycobacterium bovis* in Ethiopian fermented milk: Insight into the fate of *M. bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1790–1792.
- Martin, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., y Hernandez, P. E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *Journal of Food Protection*, 69(3), 520–531.
- Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J. M., de la Fuente, J., y Gortazar, C. (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), 360–367.
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S. A., y Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974–4989.
- Martín-Palomino, Pedro. (2020, June 23). *Pasteurella multocida* tipo A en pequeños rumiantes: ¿patógeno emergente? *Bioseguridad, Bienestar y Patologías En Pequeños Rumiantes*. XXII Foro Nacional de Ovino 2020, Edición virtual.

- Matevosyan, L., Bazukyan, I., y Trchounian, A. (2019). Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–8.
- Mathur, H., Beresford, T. P., y Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, *12*(6), 1679.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: A medical and food perspective. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1205.
- Matos, A., Andrade, S., Figueira, L., Matos, M., Pires, M., Coelho, A., y Pinto, M. (2016). Mesenteric lymph node granulomatous lesions in naturally infected wild boar (*Sus scrofa*) in Portugal—Histological, immunohistochemical and molecular aspects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *173*, 21–26.
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M. J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., y Beauvils, S. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology*, *192*(10), 2647–2648.
- McCann, J. C., Elolimy, A. A., y Loor, J. J. (2017). Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *33*(3), 539–553.
- McKenzie, V. J., Kueneman, J. G., y Harris, R. N. (2018). Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: Insights from food production and medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1429*(1), 18–30.
- Meade, E., Slattery, M. A., y Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? *Antibiotics*, *9*(1), 32.

- Mekadim, C., Killer, J., Pechar, R., y Mrázek, J. (2019). Fragment of the aspartyl-tRNA synthetase applicable as a shared classification and phylogenetic marker in particular representatives of the order Lactobacillales. *Folia Microbiologica*, 64(1), 113–120.
- Menin, Á., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., y Báfica, A. (2013). Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PloS One*, 8(1), e53884.
- Mentaberre, G., Romero, B., De Juan, L., Navarro-González, N., Velarde, R., Mateos, A., Marco, I., Olivé-Boix, X., Domínguez, L., y Lavín, S. (2014). Long-term assessment of wild boar harvesting and cattle removal for bovine tuberculosis control in free ranging populations. *PLoS One*, 9(2), e88824.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., y Le Maréchal, P. (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *The EMBO Journal*, 22(18), 4709–4718.
- Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*)., (2020).
- Mirkovic, N., Radulovic, Z., Uzelac, G., Lozo, J., Obradovic, D., Topisirovic, L., y Kojic, M. (2015). Isolation and characterisation of bacteriocin and aggregation-promoting factor production in *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* BGBM50 strain. *Food Technology and Biotechnology*, 53(2), 237–242.

- Miró, J. M., y Gatell, J. M. (2000). *Modelos experimentales de patología infecciosa*. Ediciones Doyma.
- Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M., y Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: From basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*, 57(S1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., Bavari, S., y Klaenhammer, T. R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 2880–2885.
- Moreno, C., y Sanchez-Ibarrola, A. (2003). Receptores tipo Toll: Bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Revisiones Médicas de la Universidad de Navarra*, 47(3), 29-33.
- Morris, T. (1995). Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Laboratory Animals*, 29(1), 16–36.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., y Latorre, A. (2008). Learning how to live together: Genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218–229.
- Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., y Kincade, P. W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24(6), 801–812.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., y de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex. *Veterinary Microbiology*, 127(1–2), 1–9.

- Nava, G. M., y Stappenbeck, T. S. (2011). Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes*, 2(2), 99–104.
- Navarro-Gonzalez, N., Porrero, M. C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Cabal, A., Domínguez, L., y Lavín, S. (2015). Escherichia coli O157: H7 in wild boars (Sus scrofa) and Iberian ibex (Capra pyrenaica) sharing pastures with free-ranging livestock in a natural environment in Spain. *Veterinary Quarterly*, 35(2), 102–106.
- Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., y Honda, K. (2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 21016–21021.
- Nelson, R. (1999). Intrinsically vancomycin-resistant gram-positive organisms: Clinical relevance and implications for infection control. *Journal of Hospital Infection*, 42(4), 275–282.
- Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., y Tan, J. S. (2020). Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A review. *RSC Advances*, 10(64), 38937–38964.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., y Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267.
- Nissen-Meyer, J., Oppedgård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., y Kristiansen, P. E. (2010). Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 52–60.

- O'Connor, C. M., Haydon, D. T., y Kao, R. R. (2012). An ecological and comparative perspective on the control of bovine tuberculosis in Great Britain and the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(3–4), 185–197.
- O'Donnell, M. M., Harris, H. M., Ross, R. P., y O'Toole, P. W. (2017). Core fecal microbiota of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric animals. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00509.
- Ołdak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A., y Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. *BioMed Research International*, 2017, 6820369.
- Oppegård, C., Kjos, M., Veening, J., Nissen-Meyer, J., y Kristensen, T. (2016). A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 700–708.
- Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., y Balci, I. (2005). Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 140–143.
- O'Shea, E. F., O'Connor, P. M., Raftis, E. J., O'Toole, P. W., Stanton, C., Cotter, P. D., Ross, R. P., y Hill, C. (2011). Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6973–6982.
- Pachón, J., Gavaldà, J., y Miró, J. M. (2000). Modelo de Neumonía. In *Modelos experimentales de patología infecciosa* (José M Miró y José M Gatell, pp. 81–90). Ediciones Doyma.

- Papagianni, M. (2012). Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1–13.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., y Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 512–542.
- Pasparakis, M. (2012). Role of NF- κ B in epithelial biology. *Immunological Reviews*, 246(1), 346–358.
- Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., y Nitert, M. D. (2017). Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*, 54, 30–37.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
- Peters, V., van de Steeg, E., van Bilsen, J., y Meijerink, M. (2019). Mechanisms and immunomodulatory properties of pre-and probiotics. *Beneficial Microbes*, 10(3), 225–236.
- Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: Maintaining a balance. *Cell Host y Microbe*, 3(6), 399–407.
- Piqué, N., Berlanga, M., y Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2534.
- Plan de Actuación Sobre Tuberculosis en Especies Silvestres*. (2017). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rodrigues, J., y Torres, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Veterinary Microbiology*, 125(3–4), 368–374.

Pornsukarom, S., van Vliet, A. H., y Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics*, 19(1), 1–14.

Prabhu, V. R., Kamalakkannan, R., Arjun, M. S., y Nagarajan, M. (2020). Consequences of domestication on gut microbiome: A comparative study between wild gaur and domestic mithun. *Frontiers in Microbiology*, 11, 133.

Praveena, P. E., Periasamy, S., Kumar, A., y Singh, N. (2010). Cytokine profiles, apoptosis and pathology of experimental *Pasteurella multocida* serotype A1 infection in mice. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 332–339.

Qin, W., Song, P., Lin, G., Huang, Y., Wang, L., Zhou, X., Li, S., y Zhang, T. (2020). Gut Microbiota Plasticity Influences the Adaptability of Wild and Domestic Animals in Co-inhabited Areas. *Frontiers in Microbiology*, 11, 125.

Radostits, O. M., Gay, C., Hinchcliff, K. W., y Constable, P. D. (2007). Diseases associated with *Pasteurella* species. In *Veterinary medicina: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (Vol. 10, pp. 921–963). Saunders Elsevier. publisher: 10th Co., Philadelphia, USA

Ramírez-López, C., y Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información Tecnológica*, 27(6), 115–128.

- Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., y Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology*, *147*(4), 1017–1024.
- Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*)., (2020).
- Reenen, V. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(6), 1131–1137.
- Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Zhang, H., Faas, M. M., y De Vos, P. (2016). Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–12.
- Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., y Van Der Donk, W. A. (2017). Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chemical Reviews*, *117*(8), 5457–5520.
- Rezvani, F., Ardestani, F., y Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(2), 251–258.
- Ribeiro, G., Gruninger, R., Badhan, A., y McAllister, T. (2016). Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. *Animal Frontiers*, *6*(2), 20–26.
- Ribelles, P., Rodríguez, I., y Suárez, J. E. (2012). LysA2, the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(1), 101–110.

- Rich, J. T., Neely, J. G., Paniello, R. C., Voelker, C. C., Nussenbaum, B., y Wang, E. W. (2010). A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, *143*(3), 331–336.
- Risco, D., Bravo, M., Martínez, R., Torres, A., Gonçalves, P., Cuesta, J., García-Jiménez, W., Cerrato, R., Iglesias, R., y Galapero, J. (2018). Vaccination against porcine Circovirus-2 reduces severity of tuberculosis in wild boar. *Ecohealth*, *15*(2), 388–395.
- Risco, D., Fernández-Llario, P., Cuesta, J. M., García-Jiménez, W. L., Gil, M., Gonçalves, P., Martínez, R., Gómez, L., García, A., y Rey, J. (2013). Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (*Sus scrofa*) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *25*(6), 791–794.
- Risco, D., y García, A. (2020). Enfermedades respiratorias. In *Principales enfermedades infecciosas y parasitarias en el ganado ovino y caprino extensivo* (pp. 145–160). Servicio de Publicaciones UEx.
- Risco, D., Gonçalves, P., Mentaberre, G., Navarro-González, N., Casas-Díaz, E., Gassó, D., Colom-Cadena, A., Fernández-Aguilar, X., Castillo-Contreras, R., y Velarde, R. (2018). Biometrical measurements as efficient indicators to assess wild boar body condition. *Ecological Indicators*, *88*, 43–50.
- Risco, D., Martínez, R., Bravo, M., Llario, P. F., Cerrato, R., Garcia-Jiménez, W. L., Gonçalves, P., García, A., Barquero-Pérez, Ó., y Quesada, A. (2019). Nasal shedding of *Mycobacterium tuberculosis* in wild boar is related to generalised tuberculosis and concomitant infections. *Veterinary Record*, *185*(20), 629-629.
- Risco, D., Salguero, F. J., Cerrato, R., Gutierrez-Merino, J., Lanham-New, S., Barquero-Pérez, Ó., Hermoso de Mendoza, J., y Fernández-Llario, P. (2016). Association

- between vitamin D supplementation and severity of tuberculosis in wild boar and red deer. *Research in Veterinary Science*, 108, 116–119.
- Risco, D., Serrano, E., Fernández-Llario, P., Cuesta, J. M., Gonçalves, P., García-Jiménez, W. L., Martínez, R., Cerrato, R., Velarde, R., Gómez, L., Segalés, J., y Hermoso de Mendoza, J. (2014). Severity of Bovine Tuberculosis Is Associated with Co-Infection with Common Pathogens in Wild Boar. *PLOS ONE*, 9(10), e110123.
- Rocha, D. J., Santos, C. S., y Pacheco, L. G. (2015). Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(3), 685–693.
- Rocha-Ramírez, L., Pérez-Solano, R., Castañón-Alonso, S., Moreno Guerrero, S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., y Eslava, C. (2017). Probiotic Lactobacillus strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2017.
- Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., Russell-White, K., Méndez, E. de los Á., y Simonetta, A. C. (2011). Efecto inhibitor de Lactobacillus casei 206/1 contra Escherichia coli O157: H7. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 37–41.
- Roosaare, M., Vaher, M., Kaplinski, L., Möls, M., Andreson, R., Lepamets, M., Kõressaar, T., Naaber, P., Kõljalg, S., y Remm, M. (2017). StrainSeeker: Fast identification of bacterial strains from raw sequencing reads using user-provided guide trees. *PeerJ*, 5, e3353.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., y Tuohy, K. (2018).

Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components.

European Journal of Nutrition, 57(1), 1–24.

Saad, M. A., Abdelsamei, H. M., Ibrahim, E., Abdou, A. M., y El Sohaimy, S. A. (2015).

Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of

Lactobacillus acidophilus bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(1),

210–215.

Sable, S., y Lortal, S. (1995). The lysins of bacteriophages infecting lactic acid bacteria.

Applied Microbiology and Biotechnology, 43(1), 1–6.

Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Navarro, L., Díez, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F.,

y Torres, C. (2009). Genetic diversity of the *pln* locus among oenological

Lactobacillus plantarum strains. *International Journal of Food Microbiology*,

134(3), 176–183.

Saleem, A., Zounouy, A., y Singer, A. (2017). Growth performance, nutrients digestibility,

and blood metabolites of lambs fed diets supplemented with probiotics during

pre-and post-weaning period. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*,

30(4), 523.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., Sanders, M. E.,

Shamir, R., Swann, J. R., y Szajewska, H. (2021). The International Scientific

Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the

definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology y*

Hepatology, 1–19.

Sandoval-Mosqueda, I., Llorente-Bousquets, A., Montiel-Sosa, J., Corona, L., y

Guadarrama-Álvarez, Z. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC

- 8014 and *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum arabic system and its in vitro testing under gastrointestinal conditions. *Journal of Microencapsulation*, 36(7), 591–602.
- Sanhueza, E., Paredes-Osses, E., González, C. L., y García, A. (2015). Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid acclimated variant. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(5), 343–346.
- Şanlıbaba, P., y Güçer, Y. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *J. Int. Sci. Publ*, 3, 451–457.
- Santos, N., Almeida, V., Gortázar, C., y Correia-Neves, M. (2015). Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Veterinary Research*, 46(1), 1–10.
- Schroeder, B. O. (2019). Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report*, 7(1), 3–12.
- Schwartz, A., y Rusch, V. (2016). A short definition of terms. In *Microbiota of the Human Body* (pp. 1–3). Springer.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., y Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2013.

- Shah, J. A., Lindestam Arlehamn, C. S., Horne, D. J., Sette, A., y Hawn, T. R. (2019). Nontuberculous mycobacteria and heterologous immunity to tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(7), 1091–1098.
- Silva, Y. P., Bernardi, A., y Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 25.
- Sims, G. E., Jun, S.-R., Wu, G. A., y Kim, S.-H. (2009). Alignment-free genome comparison with feature frequency profiles (FFP) and optimal resolutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2677–2682.
- Singh, A. P., Preet, S., y Rishi, P. (2014). Nisin/ β -lactam adjunct therapy against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: A mechanistic approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(7), 1877–1887.
- Singla, V., Mandal, S., Sharma, P., Anand, S., y Tomar, S. K. (2018). Antibiotic susceptibility profile of *Pediococcus* spp. From diverse sources. *3 Biotech*, 8(12), 489.
- Sivaraj, A., Sundar, R., Manikkam, R., Parthasarathy, K., Rani, U., y Kumar, V. (2018). Potential applications of lactic acid bacteria and bacteriocins in anti-mycobacterial therapy. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(8), 453.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., y Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), fuaa039.
- Sorbara, M. T., y Pamer, E. G. (2019). Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunology*, 12(1), 1–9.

- Sosunov, V., Mischenko, V., Eruslanov, B., Svetoch, E., Shakina, Y., Stern, N., Majorov, K., Sorokoumova, G., Selishcheva, A., y Apt, A. (2007). Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 919–925.
- Stedman, A. (2017). *BCG as a vaccine vehicle to deliver porcine immunity to African swine fever virus*. [Tesis Doctoral, University of Surrey]. ExLibris. <https://openresearch.surrey.ac.uk/esploro/outputs/doctoral/BCG-as-a-vaccine-vehicle-to/99515580002346>
- Stedman, A., de Motes, C. M., Lesellier, S., Dalley, D., Chambers, M., y Gutierrez-Merino, J. (2018). Lactic acid Bacteria isolated from European badgers (*Meles meles*) reduce the viability and survival of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) vaccine and influence the immune response to BCG in a human macrophage model. *BMC Microbiology*, 18(1), 74.
- Stedman, A., van Vliet, A. H., A. Chambers, M., y Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1467(1), 112–132.
- Stefanovic, E., Casey, A., Cotter, P., Cavanagh, D., Fitzgerald, G., y McAuliffe, O. (2016). Draft genome sequence of *Lactobacillus casei* DPC6800, an isolate with the potential to diversify flavor in cheese. *Genome Announcements*, 4(2), e00063-16.
- Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección (Ed.). (2019). *Caracterización del sector ovino y caprino en España* (No. 003-19-255–7;

- Catálogo de Publicaciones de La Administración General Del Estado, p. 22).
<https://cpage.mpr.gob.es/>
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., y Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. In *Nature Medicine* (Vol. 25, Issue 5, pp. 716–729). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., y Deguchi, Y. (1997). *Vibrio* sp. Strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4986–4989.
- Sun, B., Wang, X., Bernstein, S., Huffman, M. A., Xia, D.-P., Gu, Z., Chen, R., Sheeran, L. K., Wagner, R. S., y Li, J. (2016). Marked variation between winter and spring gut microbiota in free-ranging Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*). *Scientific Reports*, 6, 26035.
- Tai, H. F., Foo, H. L., Rahim, R. A., Loh, T. C., Abdullah, M. P., y Yoshinobu, K. (2015). Molecular characterisation of new organisation of plnEF and plw loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–13.
- Takeuchi, O., y Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 805–820). Cell Press.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Teneva, D., Goranov, B., Denkova, R., Denkova, Z., y Kostov, G. (2016). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* strains against *Escherichia coli* strains. *Scientific Works of University of Food Technologies*, 63(1), 199-206.

- Thomas-White, K., Forster, S. C., Kumar, N., Van Kuiken, M., Putonti, C., Stares, M. D., Hilt, E. E., Price, T. K., Wolfe, A. J., y Lawley, T. D. (2018). Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nature Communications*, 9(1), 1557. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03968-5>
- Todorov, S., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M., Holzapfel, W., y Dicks, L. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 465–477.
- Todorov, S., y Dicks, L. (2006). Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia*, 61(3), 269–274.
- Todorov, S., Franco, B., y Wiid, I. (2014). In vitro study of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products. *Beneficial Microbes*, 5(3), 351–366.
- Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., y Adler, B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 924–929.
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., y Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biology*, 15(11), 1–15.
- Tulini, F. L. (2014). *Isolation of lactic acid bacteria from milk and cheese with potential for food biopreservation and utilization for increasing whey digestibility*. [Tesis Doctoral, Universidade de Sao Paulo]. Teses USP.

https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-30102014-142251/publico/Tese_Completa_original.pdf

Turgis, M., Khanh, D., Majid, J., Behnouch, M., y Monique, L. (2016). Synergistic antimicrobial effect of combined bacteriocins against food pathogens and spoilage bacteria. *Microb Res Inter*, 4(1), 1–5.

Unger, S. A., y Bogaert, D. (2017). The respiratory microbiome and respiratory infections. *Journal of Infection*, 74, S84–S88.

Ushida, K., Tsuchida, S., Ogura, Y., Toyoda, A., y Maruyama, F. (2016). Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of suidae. *Animal Science Journal*, 87(6), 835–841.

van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., y Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: A user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281.

Van Tassell, M. L., y Miller, M. J. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613–636.

Van Zyl, W., Deane, S., y Dicks, L. (2019). Bacteriocin production and adhesion properties as mechanisms for the anti-listerial activity of Lactobacillus plantarum 423 and Enterococcus mundtii ST4SA. *Beneficial Microbes*, 10(3), 329–349.

Vásquez, S. M., Suárez, H., y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64–71.

Vasseur, M. V., Lacroix, M. Z., Toutain, P.-L., Bousquet-Melou, A., y Ferran, A. A. (2017). Infection-stage adjusted dose of beta-lactams for parsimonious and efficient

- antibiotic treatments: A *Pasteurella multocida* experimental pneumonia in mice. *Plos One*, 12(8), e0182863.
- Velasco, J. L. F., Moreno, E. E. C., Ramírez, M. C., y Vara, I. A. D. (2006). Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Veterinaria México*, 37(1), 117–136.
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J., Fernandez de Mera, I., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., y Gortázar, C. (2007). Risk Factors Associated With the Prevalence of Tuberculosis-Like Lesions in Fenced Wild Boar and Red Deer in South Central Spain. *Veterinary Research*, 38, 451–464.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2007002>
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Fernández-De-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., y Gortazar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research*, 37(1), 107–119.
- Viera, K. R. M., y Márquez, P. L. (2020). Utilización de animales en la investigación biomédica y médica. *Revista Iberoamericana de Bioética*, 12, 01–19.
- Von Reyn, C. F., Mtei, L., Arbeit, R. D., Waddell, R., Cole, B., Mackenzie, T., Matee, M., Bakari, M., Tvaroha, S., y Adams, L. V. (2010). Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette–Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. *Aids*, 24(5), 675–685.
- Wang, Y., Qin, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Hu, J., y Li, P. (2018). Purification and characterization of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from fermented fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2276.

- Ward, D., y Somkuti, G. (1995). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2), 330–335.
- Ward, L., y Timmins, M. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 90–92.
- Wegh, C. A., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., y Belzer, C. (2019). Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4673.
- Weindl, L., Frank, E., Ullrich, U., Heurich, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., y Gareis, M. (2016). *Listeria monocytogenes* in different specimens from healthy red deer and wild boars. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(7), 391–397.
- Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A., Bryson, D. G., y Pollock, J. M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114(1), 101–111.
- WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019. (2020). World Health Organization.
- Winglee, K., Eloje-Fadros, E., Gupta, S., Guo, H., Fraser, C., y Bishai, W. (2014). Aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection causes rapid loss of diversity in gut microbiota. *PloS One*, 9(5), e97048.
- Wood, M. R., Elaine, A. Y., y Mehta, S. (2017). The human microbiome in the fight against tuberculosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(6), 1274–1284.

- Xavier, K. B. (2018). Bacterial interspecies quorum sensing in the mammalian gut microbiota. *Comptes Rendus Biologies*, 341(5), 297–299.
- Xu, C., Fu, Y., Liu, F., Liu, Z., Ma, J., Jiang, R., Song, C., Jiang, Z., y Hou, J. (2021). Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320. *LWT*, 137, 110338.
- Yatera, K., Noguchi, S., y Mukae, H. (2018). The microbiome in the lower respiratory tract. *Respiratory Investigation*, 56(6), 432–439.
- Yoon, S. S., Kim, E.-K., y Lee, W.-J. (2015). Functional genomic and metagenomic approaches to understanding gut microbiota–animal mutualism. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 38–46.
- Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., y Hirai, K. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* in wild animals in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(6), 673–675.
- Yu, S., y Gao, N. (2015). Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 17, pp. 3343–3353). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1931-1>
- Yu, X., Jaatinen, A., Rintahaka, J., Hynönen, U., Lyytinen, O., Kant, R., Åvall-Jääskeläinen, S., von Ossowski, I., y Palva, A. (2015). Human gut-commensal *Lactobacillus ruminis* ATCC 25644 displays sortase-assembled surface piliation: Phenotypic characterization of its fimbrial operon through in silico predictive analysis and recombinant expression in *Lactococcus lactis*. *PLoS One*, 10(12), e0145718.

- Zacharof, M., y Lovitt, R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apchbee Procedia*, 2, 50–56.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., y Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644.
- Zhang, D., Ji, H., Wang, S., Liu, H., Wang, J., y Wang, Y. (2019). In vitro characterisation of two *Lactobacillus* strains and evaluation of their suitability as probiotics for growing-finishing pigs. *Animal Production Science*, 59(8), 1537–1545.
- Zhang, Q., Lee, W.-B., Kang, J.-S., Kim, L. K., y Kim, Y.-J. (2018). Integrin CD11b negatively regulates Mincle-induced signaling via the Lyn–SIRP α –SHP1 complex. *Experimental y Molecular Medicine*, 50(2), e439–e439.
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., y Gänzle, M. (2015). A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7233–7243.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O’Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., y Walter, J. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858.

APN

— .

Apéndices



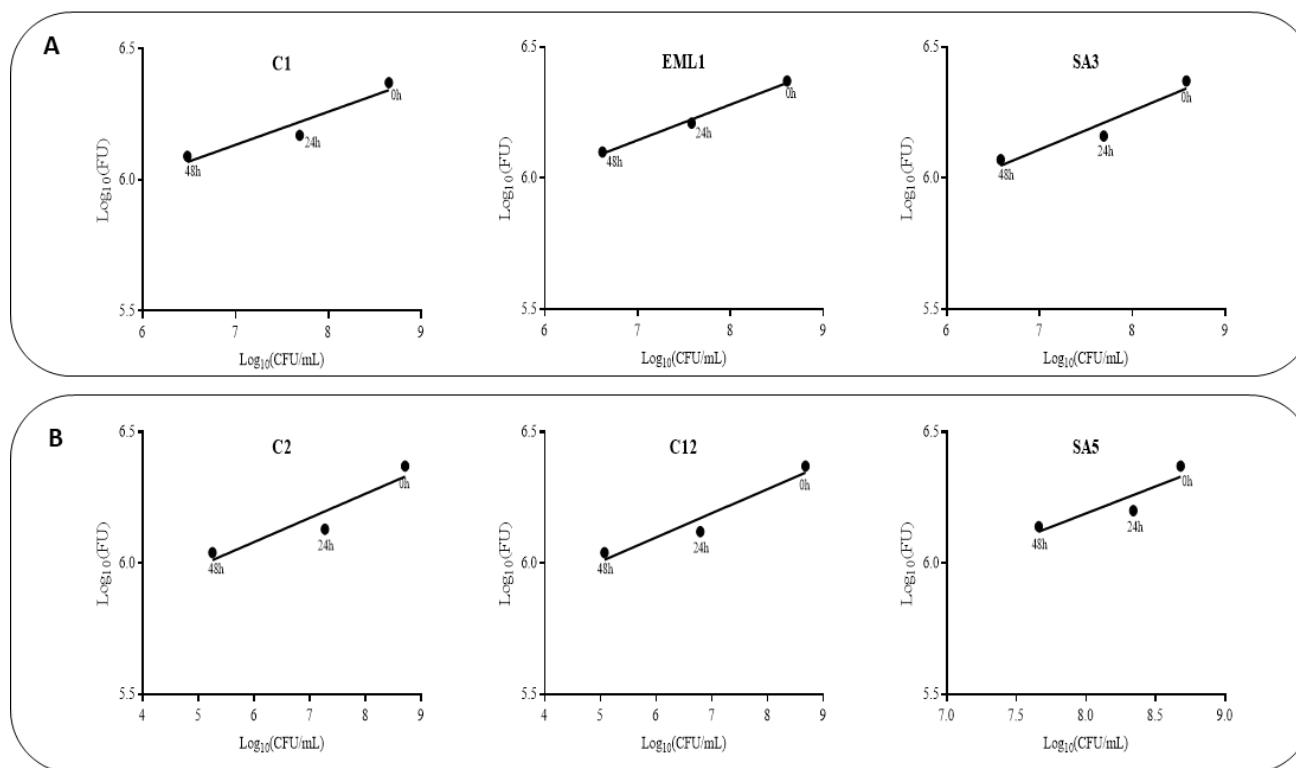
APÉNDICE I

Apéndice IA. Cebadores utilizados para la amplificación de los transcritos derivados de los precursores de las bacteriocinas clase II de *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. salivarius*.

Gen	Bacteriocina	Cebadores	
<i>plnE</i>	Plantaricina E, <i>L. plantarum</i>	Fw: caatattccagggtgccga	Rv: gaatgctgcaactgaacca
<i>plnF</i>	Plantaricina F, <i>L. plantarum</i>	Fw: atttcaggtggcgtttcca	Rv: aatcctcggacagcgctaata
<i>plnJ</i>	Plantaricina J, <i>L. plantarum</i>	Fw: gccagcttcgcatcataaa	Rv: aggattggatgtagtagatgca
<i>plnK</i>	Plantaricina K, <i>L. plantarum</i>	Fw: ttgaaccaccaagcacgg	Rv: ttgaagaattaactgctgacgc
<i>A</i>	Bacteriocina clase IIb, <i>L. casei</i>	Fw: agttgtcaggggttcaggt	Rv: cgcctgattcccaaaagg
<i>B</i>	Bacteriocina clase IIb, <i>L. casei</i>	Fw: gagccaagcgcgcaataaa	Rv: cgcctgcaacagttgtaaagt
<i>Ta</i>	Bacteriocina clase IIc, <i>L. salivarius</i>	Fw: gcaatcagaggaggaatggc	Rv: ccgatacaagccaatccacc
<i>Tb</i>	Bacteriocina clase IIc, <i>L. salivarius</i>	Fw: gggaaatggcattaattgggga	Rv: ggattaccgaaagctgcacc
<i>gyrA</i>	DNA topoisomerasa, <i>L. plantarum</i>	Fw: ttaagtgcgaacaccgtgg	Rv: gattccttggccgtacgac
<i>dnaG</i>	DNA primasa, <i>L. plantarum</i>	Fw: agttgtagtcggtctggtg	Rv: cgcacctaaggatcagcaac
<i>gyrA</i>	DNA topoisomerasa, <i>L. paracasei</i>	Fw: ctccacgcatgatgtcctg	Rv: cgccttcatgcacgttgata
<i>dnaG</i>	DNA primasa, <i>L. paracasei</i>	Fw: cagttcggccaattgatcgt	Rv: cgactcgatccaggaatcca
<i>gyrA</i>	DNA topoisomerasa, <i>L. salivarius</i>	Fw: gtttggccagcagctttcc	Rv: tcccattacaattgcgccag
<i>dnaG</i>	DNA primasa, <i>L. salivarius</i>	Fw: gcacaaagattcaacgtcgc	Rv: cgttctgctttctctgctt

gyrA y *dnaG* fueron seleccionados como genes constitutivos (Rocha et al., 2015).

Apéndice IB. Correlación entre valores medios de \log_{10} (UFC / mL) y \log_{10} (FU) de *M. bovis* BCG en cocultivos con lactobacilos después de 48 horas (h) de incubación en caldo MH con OADC (10 %), Tween 80 (0,1 %) y glicerol (0,2 %). Los gráficos muestran una bondad de ajuste positiva entre \log_{10} (UFC / mL) y \log_{10} (FU) ($R^2 > 0.9$).



Apéndice IC. Proteínas codificadas por el clúster de la bacteriocina de péptido único de *Ligilactobacillus salivarius* C12

ORF (gen)	Tamaño (aa)	Función	Homólogo	%	Referencia
1 (T2)	87	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> CCUG47825	96	(Harris et al., 2017)
2 (T3)	57	Péptido similar a bacteriocinas	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> UCC118	96	(Flynn et al., 2002)
3(T4)	85	Péptido similar a bacteriocinas	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	96	(Harris et al., 2017)
4 (Ta)	80	Subunidad A bacteriocina ThmA	<i>Blp1a, Ligilactobacillus salivarius</i> BGH01	96	(Busarcevic y Dalgarrondo, 2012)
5 (T1M1)	59	Inmunidad	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> BGH01	82	(Busarcevic y Dalgarrondo, 2012)
6 (Tb)	69	Subunidad B bacteriocina TmhB	<i>Blp1b, Ligilactobacillus salivarius</i> BGH01	100	(Busarcevic y Dalgarrondo, 2012)
7 (T1M2)	54	Inmunidad	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> BGH01	100	(Busarcevic y Dalgarrondo, 2012)
8 (TIP)	39	Péptido de inducción	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	79	(Harris et al., 2017)
9 (TK)	429	Histidina quinasa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	87	(Harris et al., 2017)
10 (TR)	264	Regulador de la respuesta	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> UCC118	99	(Flynn et al., 2002)
11 (orf1)	76	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	99	(Harris et al., 2017)
12(orf2)	65	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	100	(Harris et al., 2017)
13 (orf3)	44	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	100	(Harris et al., 2017)
14 (orf4)	237	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ATCC11741	98	(Harris et al., 2017)
15 (orf5)	88	Proteína putativa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> CCUG47825	99	(Harris et al., 2017)
16 (orf6)	273	Integrasa	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> UCC118	99	(Flynn et al., 2002)

Apéndice ID. Proteínas codificadas por el clúster de las bacteriocinas de dos péptidos de los aislados de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lacticaseibacillus paracasei*

Aislados	ORF (gen)	Tamaño (aa)	Función	Homólogo (100%)	Referencia
C1/EML1/SA3	1 (W)	228	Proteasa CAAX autoinmunidad	<i>PlnW</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	2 (V)	226	Proteasa CAAX autoinmunidad	<i>PlnV</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	3(U)	222	Familia CAAX proteína putativa	<i>PlnU</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	4 (T)	149	Familia CAAX proteína putativa	<i>PlnT</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	5 (S)	99	Proteína putativa	<i>PlnS</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	6 (H)	458	Factor accesorio de transportador ABC	<i>PlnH</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	7 (G)	716	Transportador ABC	<i>PlnG</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	8 (E)	56	Plantaricina E	<i>PlnE</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
	9 (F)	52	Plantaricina F	<i>PlnF</i> , <i>L. plantarum</i> C11	(Diep et al., 1996, 2009)
SA5	1 (A)	77	Bacteriocina clase IIb	<i>L. casei</i> DPC6800	(Stefanovic et al., 2016)
	2 (B)	71	Bacteriocina clase IIb	<i>L. casei</i> UCD174	(Broadbent et al., 2012)
	3(C)	102	Proteína putativa	<i>L. casei</i> W56	(Hochwind et al., 2012)
	4 (AT)	198	Acetiltransferasa	<i>L. casei</i> W56	(Hochwind et al., 2012)
	5 (D)	111	Inmunidad	<i>L. casei</i> DPC6800	(Stefanovic et al., 2016)
	6 (E)	225	Metaloproteasa	<i>L. casei</i> W56	(Hochwind et al., 2012)
	7 (F)	110	Proteína putativa	<i>L. casei</i> W56	(Hochwind et al., 2012)
	8 (G)	52	Proteína de membrana putativa	<i>L. casei</i> BL23	(Mazé et al., 2010)

Apéndice IE. Proteínas codificadas por los genes hipotéticos de bacteriolisinas identificadas en los aislados de lactobacilos

Proteína	Gen	Tamaño (aa)	Dominio catalítico conservado	Lactobacilos ^a	Homólogo (100%)	Referencia
Fago lisina	<i>acm</i>	245-772	Endopeptidasa Muramidasa GH25-PlyB	M23 C1, EML1, SA3, C2 C12, SA5	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3606 <i>paracasei</i> ATCC 25302 <i>salivarius</i> CECT 5713	<i>L.</i> Genomas completos NCBI (Martin et al., 2006; Ward y Timmins, 1999)
Lisozima	<i>lyc</i>	309-921	Endolisina GH25-LysA	C2, C12, SA5	<i>L. reuteri</i> TD1 <i>L. casei</i> 32G	(Aktas et al., 2015; Leonard et al., 2014)
Autolisina 1	<i>lytA_1</i>	486	Endopeptidasa C39	C2	<i>L. salivarius</i> cp400	(MacKenzie et al., 2014)
Autolisina 2	<i>lytA_2</i>	350-468	Amidasa familia PGRP	C2, C12, SA5	<i>L. salivarius</i> ACS-116-V-Col5a <i>L. casei</i> 32G	Genomas completos NCBI (Aktas et al., 2015)
Amidasa	<i>lytC</i>	282-350	MurNAc-LAA	C1, EML1, SA3 C2, C12, SA5	<i>Lactobacillus</i> sp. CBA3606 <i>Lactobacillus</i> sp. DS22_6	Genomas completos NCBI
Toxina 1	<i>toxA_1</i>	125	Amidasa	C2	<i>L. salivarius</i> cp400	(MacKenzie et al., 2014)
Toxina 2	<i>toxA_2</i>	523	Endopeptidasa M23	C2, C12	<i>L. salivarius</i> cp400	(MacKenzie et al., 2014)

^aAislados de lactobacilos del estudio en los que se ha identificado

APÉNDICE II

APÉNDICE II. Resultados de la mortalidad y los síntomas registrados tras las infecciones experimentales con *Pasteurella multocida* en modelo ratón en los grupos del estudio

Grupo	Suplemento ^a	Dosis		Síntomas	Nº de bajas (dpi) ^d					Mortalidad (%)	
		Antibiótico ^b	Infección ^c		1	2	3	4	5		
Fase 0	Control	-	-	-	No	0	0	0	0	0	0 (0 %)
	Suplemento	1:1	-	-	No	0	0	0	0	0	0 (0 %)
	Infección DL50	-	-	DL50	Leves/Moderados	0	2	1	0	0	3 (50 %)
	Infección DL100	-	-	DL100	Graves	1	2	1	2	0	6 (100 %)
Fase 1	No tratamiento	-	-	DL50	Leves/Moderados	0	2	1	0	0	3 (50 %)
	Antibiótico	-	10mg/Kg/día	DL50	Leves	0	0	0	0	0	0 (0 %)
	Suplemento	1:1	-	DL50	Leves/Moderados	0	0	3	0	0	3 (50 %)
Fase 2	No tratamiento	-	-	DL100	Graves	1	3	2	0	0	6 (100 %)
	Antibiótico	-	10mg/Kg/día	DL100	Graves	0	3	3	0	0	6 (100 %)
	Suplemento	1:1	-	DL100	Graves	0	4	2	0	0	6 (100 %)
	Antibiótico + suplemento	1:1	10mg/Kg/día	DL100	Moderados/Graves	1	0	3	0	0	2 (66,67 %)

^aSuplemento administrado en el agua de bebida en proporción 1:1 semanalmente (50 mL de sobrenadante de *L. salivarius* C12 en 50 mL de agua) 14 días antes de la infección y 5 días después

^bAntibiótico administrado en el agua de bebida a una dosis de 10 mg de doxaciclina por Kg de peso y por día durante 5 días (300 µL doxaciclina al 10 % en 100 mL de agua)

^cInóculo del patógeno *Pasteurella multocida* a DL50 (10^4 ufc/mL) o DL100 (10^7 ufc/mL)

^dNúmero de animales muertos en los días posinfección (dpi)

APÉNDICE III

APÉNDICE IIIA. Informe de resultados del diagnóstico previo de procesos infecciosos que causan mortalidad en un cebadero de corderos



INFORME DE RESULTADOS

A/A: [REDACTED]

REFERENCIA: 19/156

FECHA: 10/07/2019

DIAGNÓSTICO DE PROCESOS QUE CAUSAN MORTALIDAD EN CEBADEROS DE CORDEROS

El objetivo de este informe es analizar los resultados de las necropsias regladas y completas de 20 corderos procedentes del cebadero de Azuaga (EA Group) realizadas en los meses de mayo y junio de 2019 (IR 19.101; IR 19.126; IR 19.127; IR 19.144; IR 19.145; IR 19.146). Además de los agentes infecciosos involucrados se ha tenido en cuenta el tipo de cuadro patológico que presentaban los animales (respiratorio, digestivo, septicémico, etc), el curso de la enfermedad (agudo o crónico) y cuál sería la principal causa de la muerte.

RESULTADOS

APARATO RESPIRATORIO

Se realizó la inspección macroscópica de los pulmones de 19 animales, atendiendo al tipo de neumonía (Gráfico 1), el curso de las lesiones (agudas o crónicas) y el grado de extensión o afectación del pulmón (Gráfico 2).

Tipos de Neumonías

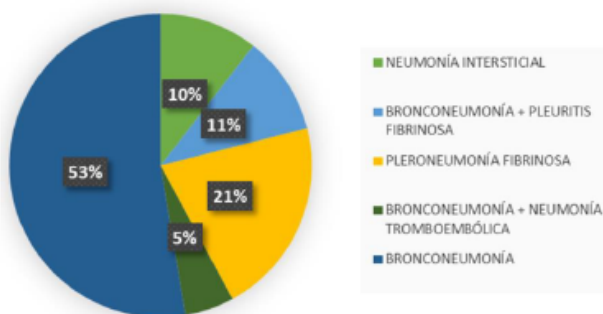


Gráfico 1. Proporción de los tipos de neumonías identificados.

1

INNOVACIÓN EN GESTIÓN Y CONSERVACIÓN DE UNGULADOS S.L., c/San Pedro de Alcántara, 14, 2ªA, 10001 CÁCERES; Telf. 927216684; e-mail : contacto@ingulados.com. CIF: B10412484. AVISO LEGAL: Esta información es reservada, confidencial y está protegida. Su uso no autorizado está prohibido. Se dirige exclusivamente a las personas o entidades mencionadas en el mismo así como a aquellas que hubieran sido específicamente autorizadas para recibirla.

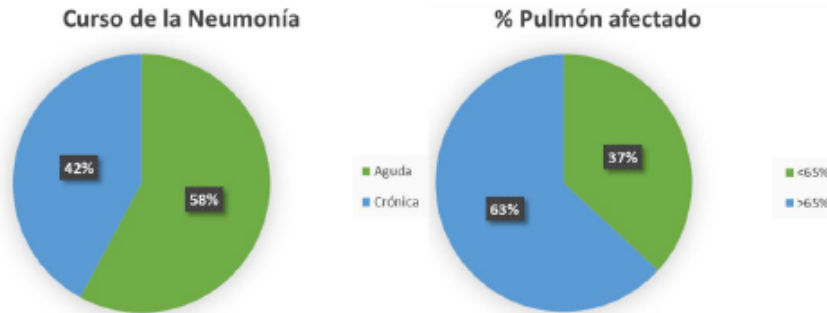


Gráfico 2. Curso de las neumonías y % de tejido afectado.

Se recogieron muestras de 19 pulmones (una de las muestras no fue recogida por presentar un alto grado de autólisis) para su análisis en el laboratorio, donde se realizaron cultivos en medios selectivos (agar Sangre y agar MacKonkey). Los agentes bacterianos aislados fueron identificados mediante técnicas bioquímicas y tintoriales, y posteriormente caracterizados mediante técnicas moleculares (Gráfico 3).

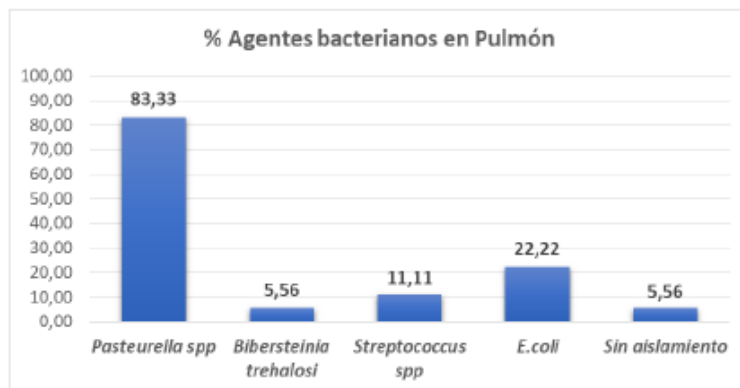


Gráfico 3. Proporción de los agentes patógenos identificados en los pulmones.

En cuanto a los agentes bacterianos aislados en los pulmones observamos que el agente patógeno mayormente identificado fue *Pasteurella spp* (78,95%). Cuando se han realizado aislamientos de *Escherichia coli*, siempre ha sido en co-infección principalmente con *Pasteurella spp*.



Posteriormente hemos realizado la caracterización molecular de los aislados de *Pasteurella spp.* (Gráfico 4), destacando la prevalencia de *Pasteurella multocida* tipo A (60%).

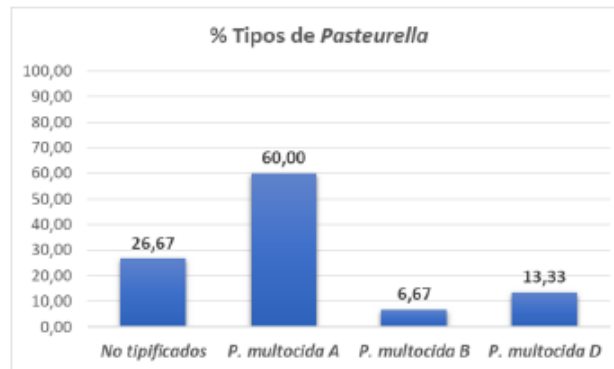


Gráfico 4. Caracterización molecular de los aislados de *Pasteurella spp.*

Por último, se realizó una extracción de ADN del tejido pulmonar para el diagnóstico de *Mycoplasma spp.* en los 17 pulmones que presentaban lesiones compatibles. El 71% de los pulmones analizados presentaban ADN de *Mycoplasma spp.* (Gráfico 5). Todos los animales con este patógeno presentaban co-infecciones con *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bibersteinis trehalosi* o *E. coli*.

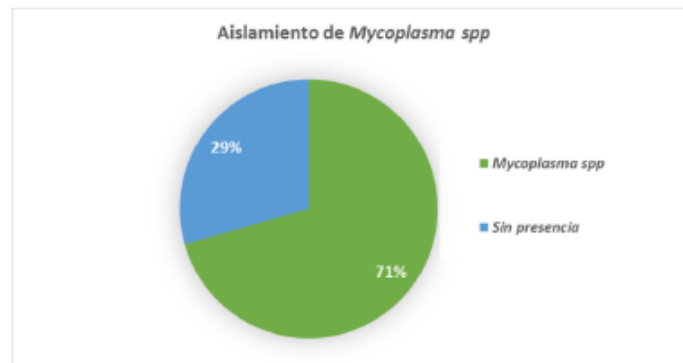


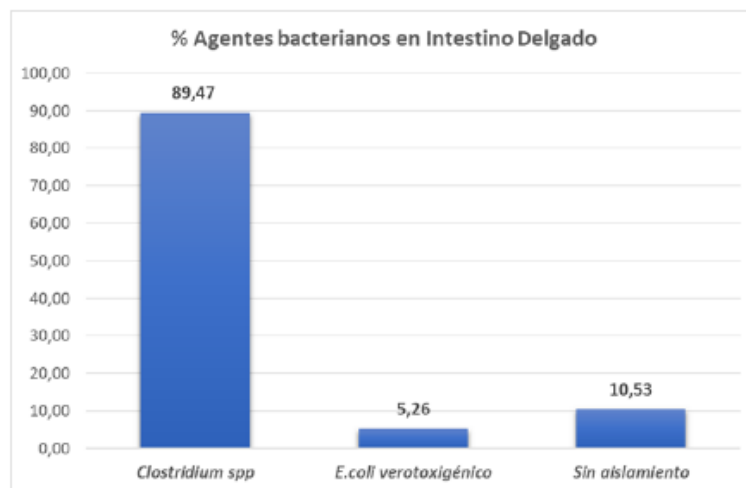
Gráfico 5. Presencia de *Mycoplasma spp.*



APARATO DIGESTIVO

Al igual que en el aparato respiratorio, se realizó primero una evaluación macroscópica de los órganos de la cavidad abdominal y se tomaron muestras de hígado, riñón e intestino para su análisis en el laboratorio. Los hallazgos de mayor interés fueron los patógenos identificados en el intestino delgado. En el gráfico 6 se pueden observar los agentes identificados.

Destaca que el 89,47% de los animales presentaban *Clostridium spp*, en tramos de intestino delgado.



Gráfica 1. Proporción de agentes patógenos identificados en las muestras de intestino delgado.

La caracterización molecular de los aislados se muestra en la siguiente gráfica (Gráfica 7). Destaca que el 70,59% de los aislados pertenecían a *Clostridium perfringens* tipo D.

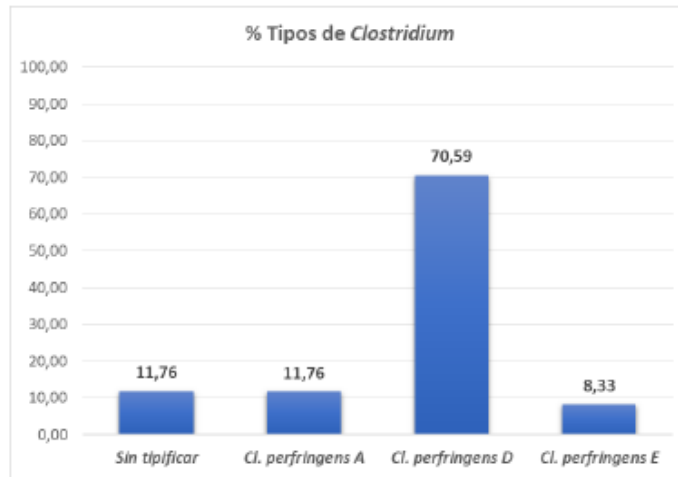


Gráfico 7. Caracterización molecular de los aislados de Clostridium spp.

Analizando los datos anteriormente mostrados, junto con las evaluaciones macroscópicas de los órganos, se ha podido concluir el posible motivo de la muerte del animal (Gráfico 8).



Gráfico 8. Posibles motivos de la muerte de los animales.



ACTUACIONES FUTURAS

Una vez analizadas las principales causas de mortalidad en cebadero, y aislados lo patógenos, hemos procedido a conservar las cepas patógenas para los siguientes desafíos en el laboratorio.

El siguiente paso es realizar pruebas *in vitro* con colección de cepas BAL de INGULADOS, para analizar la actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas aisladas y determinar las más apropiadas para el desarrollo de un producto postbiótico que se administre a través de la alimentación y pueda ayudar al control de los procesos infecciosos diagnosticados.

APÉNDICE IIIB. Informe de resultados de las pruebas de cribado para la selección de BAL candidatas para el diseño y elaboración del producto posbiótico de un cebadero de corderos



INFORME DE RESULTADOS

A/A: [REDACTED]

REFERENCIA: 19/201

FECHA: 27/08/2019

SELECCIÓN DE CEPAS BAL CON ACTIVIDAD FRENTE A PATÓGENOS AISLADOS DE CEBADERO DE CORDERO

Como continuación al informe de referencia IR 19.156: DIAGNÓSTICO DE PROCESOS QUE CAUSAN MORTALIDAD EN CEBADEROS DE CORDEROS, se realiza un estudio *in vitro* para determinar si las bacterias ácido-lácticas de la colección de cepas aisladas por INGULADOS producen inhibición del crecimiento de las cepas patógenas aisladas. A partir de estos resultados se seleccionarán las cepas que tengan una mayor actividad para la elaboración de un producto fermentado de la gama INGUBAL, específico para su uso en cebadero y será administrado junto con el pienso estándar.

ANÁLISIS REALIZADOS

Análisis microbiológicos para valorar la actividad de las cepas BAL-INGULADOS, frente a cepas de patógenas aisladas de corderos de cebadero, mediante dos técnicas:

- CO-CULTIVO: con esta técnica analizamos la actividad antimicrobiana de las cepas BAL frente a las patógenas mediante cultivo de ambas cepas juntas, recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y medida del % de reducción de crecimiento de la cepa patógena debido a la actividad antimicrobiana de la cepa BAL (% Reducción).

- MICRODILUCIÓN: se estudia la actividad antimicrobiana de las cepas BAL frente a las patógenas, mediante cultivo en medio líquido de las patógenas con diferentes microdiluciones de sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de las cepas BAL en condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas, y posterior comprobación de inhibición del crecimiento de las cepas patógenas. El resultado se expresa en Unidades de Actividad por mililitro (AU/ml).

RESULTADOS

CO-CULTIVO

Se ensayan un total de 6 cepas BAL, y se observa actividad antimicrobiana en todos los enfrentamientos probados con respecto al control, se seleccionan tres de las cepas con las que se consigue una reducción del crecimiento del 99% frente a los patógenos respiratorios ensayados. (Imagen 1)

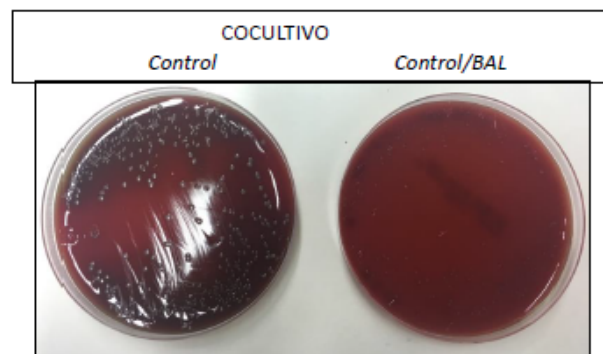


Imagen 1: Resultados del cocultivo frente a *Pasteurella* spp.

MICRODILUCIÓN

Se ensayan un total de 8 cepas frente a los patógenos respiratorios y en este caso también frente a *Clostridium perfringens* tipo D, aislados del cebadero.

Se observa actividad antimicrobiana frente a los patógenos respiratorios en todos los enfrentamientos probados con respecto al control. Los enfrentamientos más eficaces fueron aquellos en los que los sobrenadantes seleccionados alcanzaron una actividad antimicrobiana mayor de 1600 AU/mL (unidades de actividad, entendidas como el recíproco de la dilución más alta a la que se observó inhibición total del crecimiento) frente a las cepas de *Pasteurella* spp. y *Bibersteinia trehalosi*. Se seleccionan las 5 cepas cuya actividad antimicrobiana es mayor de 800 AU/mL, como se recoge en la Tabla 1.

En el caso de *Clostridium perfringens* tipo D, y se obtiene una actividad mayor de 800 AU/ml en una de ellas.

2

INNOVACIÓN EN GESTIÓN Y CONSERVACIÓN DE UNGULADOS S.L, c/San Pedro de Alcántara, 14, 2ªA, 10001 CÁCERES; Telf. 927216684; e-mail : contacto@ingulados.com. CIF: B10412484. AVISO LEGAL: Esta información es reservada, confidencial y está protegida. Su uso no autorizado está prohibido. Se dirige exclusivamente a las personas o entidades mencionadas en el mismo, así como a aquellas que hubieran sido específicamente autorizadas para recibirla.



Tabla 1. Resultados de actividad antimicrobiana frente a *Pasteurella*, *Bibersteinia* y *Clostridium perfringens* mediante la técnica de microdilución (AU/ml)

CEPAS BAL	<i>Pasteurella</i> spp.	<i>P. multocida</i> A	<i>P. multocida</i> B	<i>P. multocida</i> D	<i>B. trehalosi</i>	<i>C. perfringens</i> D
BAL5	1600	800	800	800	1600	400
BAL6	800	800	800	800	1600	400
BAL8	800	800	800	800	800	400
BAL13	800	800	800	800	800	400
BAL15	800	800	800	800	800	200
BAL11	800	800	800	800	800	800

CONCLUSIONES

Estos resultados indican, según nuestra experiencia en otras especies, que un producto fermentado elaborado a partir de las cepas BAL que han mostrado mayor actividad y administrado a través del pienso, podría contribuir al control de procesos causados por estos patógenos en cebaderos.

APÉNDICE IV

APÉNDICE IV. Resultados totales de los jabalíes abatidos y muestreados durante las dos temporadas de caza

Fecha montería	Finca	Jabalíes abatidos	Jabalíes inspeccionados	Lesiones TB	Lesiones generalizadas	Lesiones localizadas	Inspección incompleta	Sueros recogidos	Sueros positivos
20/1/18	1	151	10	0	0	0	NA	10	0
19/1/19	1	191	10	0	0	0	NA	10	0
4/11/17	2	71	10	0	0	0	0	10	0
17/10/18	2	116	10	0	0	0	0	10	0
12/1/18	3	90	0	0	0	0	NA	6	0
7/2/19	3	131	10	0	0	0	0	10	0
3/12/17	4	10	9	7	1	3	3	9	6
3/2/18	4	7	0	0	0	0	NA	7	7
14/11/18	4	45	0	0	0	0	NA	10	9
30/1/19	4	45	0	0	0	0	NA	10	8
13/12/17	5	57	10	8	2	6	0	10	6
15/2/18	5	88	10	4	1	3	0	10	7
20/2/19	5	39	8	6	2	1	3	8	7
4/11/17	6	53	10	5	0	5	0	10	0
9/11/18	6	55	9	1	0	1	0	9	0
10/2/18	7	15	15	5	2	3	0	15	8
15/11/18	7	87	0	0	0	0	NA	10	5
3/1/19	7	13	10	4	2	1	1	10	0
3/2/18	8	48	10	0	0	0	NA	10	0
11/1/19	8	60	10	2	1	1	0	10	0
27/1/18	9	185	10	5	0	5	0	10	3
9/2/19	9	175	10	0	0	0	0	10	3
18/11/17	10	107	0	0	0	0	0	14	5
22/12/18	10	161	8	0	0	0	0	8	0
31/10/17	11	132	10	1	0	1	0	0	NA
24/11/18	11	75	10	3	1	1	1	0	NA
9/2/18	12	11	10	10	4	6	0	10	8
14/1/19	12	7	5	5	0	0	5	5	0
28/12/17	13	38	10	2	0	2	0	10	2
18/1/19	13	148	10	0	0	0	0	10	3
20/1/18	14	11	10	0	0	0	NA	10	3
9/1/19	14	16	3	0	0	0	0	3	0
20/1/18	15	171	10	8	3	5	0	10	7
13/12/18	15	178	15	3	1	2	0	15	1
15/11/17	16	33	10	0	0	0	0	10	2
18/2/19	16	31	0	0	0	0	NA	9	0
22/11/17	17	103	10	7	4	3	0	0	NA
12/1/19	17	86	10	3	0	3	0	0	NA
11/11/17	18	17	9	7	2	5	0	9	6
16/12/17	18	17	8	0	0	0	0	10	3
13/1/18	18	49	10	8	0	8	0	10	3
17/11/18	18	16	9	5	0	5	0	9	3
8/12/18	18	44	0	0	0	0	0	10	4
22/12/18	18	56	10	8	1	1	6	10	6
13/2/18	19	72	10	6	2	4	0	10	5
14/2/19	19	49	8	6	0	0	NA	10	6
15/2/19	19	30	10	5	0	0	NA	10	7
20/10/17	20	8	4	2	1	1	0	4	0
27/1/18	20	18	9	4	1	3	0	9	3
27/10/18	20	18	10	5	1	3	1	10	7
12/1/19	20	15	10	1	0	1	0	10	0
TOTAL		3449	409	146	32	83	20	449	153

